

# Informe final publicable de proyecto

## Descubriendo el rol de microorganismos no cultivados del filo Chloroflexi en sistemas de tratamiento de aguas residuales a través de la metatranscriptómica

Código de proyecto ANII: FCE\_3\_2020\_1\_162450

Fecha de cierre de proyecto: 01/09/2023

**BOVIO WINKLER, Patricia** (Responsable Técnico - Científico)

**CABEZAS DA ROSA, Angela** (Investigador)

**ERIJMAN, Leonardo** (Investigador)

**ETCHEBEHERE ARENAS, Claudia** (Investigador)

**GUERRERO, Leandro** (Investigador)

---

MINISTERIO DE EDUCACIÓN Y CULTURA. INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS "CLEMENTE ESTABLE"

(Institución Proponente) \\

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN INGENIERÍA GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR ?DR HÉCTOR N. TORRES? \\

UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA. INSTITUTO TECNOLÓGICO REGIONAL CENTRO SUR \\

FUNDACIÓN DE APOYO AL INSTITUTO CLEMENTE ESTABLE

## **Resumen del proyecto**

El filo Chloroflexota es uno de los grupos predominantes en sistemas de tratamiento de aguas residuales. Sin embargo, su rol permanece desconocido debido a que son difíciles de aislar en cultivo puro. La ventaja de poder aislar estos microorganismos es que se puede determinar de qué se alimentan. A partir de las 14 especies aisladas, se sabe que pueden consumir carbohidratos y aminoácidos, y que crecen muy lento. Se presentan en forma de largos filamentos por lo que podrían tener un rol importante en los reactores ayudando a sedimentar la biomasa dentro del sistema. Sin embargo, su sobrecrecimiento causa graves problemas operacionales. Las causas que generan este sobrecrecimiento aún no se conocen debido a que son difíciles de aislar. En este proyecto se reconstruyeron genomas de especies de Chloroflexota en 4 sistemas de tratamiento de aguas industriales y se estudiaron que vías metabólicas estaban activas mediante técnicas de biología molecular de avanzada. Se obtuvieron 18 genomas de especies nuevas de Chloroflexota capaces de degradar glucosa, celulosa y aminoácidos. También se observó que tienen propiedades de adhesión por lo que ayudan a formar agrupaciones de microorganismos en estos sistemas. Pudimos determinar que Chloroflexota tiene un rol principal en la eliminación de la materia orgánica en sistemas de tratamiento de aguas residuales, y colaboran de forma fundamental en la formación de flóculos en sistemas aerobios. A partir de este trabajo se generó conocimiento sobre un grupo de microorganismos no cultivables de gran importancia en sistemas de tratamiento de aguas residuales.

**Ciencias Naturales y Exactas / Ciencias Biológicas / Biología Celular, Microbiología / Biotecnología ambiental**

**Palabras clave: Chloroflexi / Metagenómica / Metatranscriptómica /**

**Antecedentes, problema de investigación, objetivos y justificación.**

El filo Chloroflexota abarca un grupo de bacterias filogenética y fisiológicamente diverso principalmente detectado mediante técnicas de biología molecular, que presentan alta abundancia en diferentes sistemas de tratamiento de aguas residuales, ya sean reactores metanogénicos (Hug et al. 2013; McIlroy et al. 2016; Sun et al. 2016; Xia et al. 2016; Petriglieri et al. 2018; Bovio et al. 2019), reactores Anammox (Kindaichi et al. 2012; Cao et al. 2016; Wang et al. 2016) o reactores aerobios (Björnsson et al. 2002a; Kragelund et al. 2007; Speirs et al. 2009; Yamada and Sekiguchi 2009; Kragelund et al. 2011; Speirs et al. 2011; McIlroy et al. 2017; Speirs et al. 2017; Andersen et al. 2018; Nierychlo et al. 2019b). Según la clasificación Silva/Midas/GTDB, está constituido por las clases Anaerolineae, Thermoflexia, Chloroflexia, Thermomicrobia y Dehalococcoidia (Parks et al. 2018). La clase Anaerolineae, que representa más del 90% del filo Chloroflexota en sistemas de tratamiento, está constituida por los órdenes Caldilineales, Anaerolineales, Ardenticatenales y SJA-15 (Speirs et al. 2019). A pesar de que son abundantes en sistemas de tratamiento, su ecofisiología básica aún se desconoce debido a que son bacterias difíciles de aislar. Actualmente en la base de datos del NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) hay depositadas 24009 secuencias ambientales pertenecientes a Anaerolineae, pero solamente se han aislado 14 especies distribuidas en 12 géneros (Tabla 1).

Los sistemas de tratamiento biológico de aguas residuales se basan en la descomposición de la materia orgánica por parte de una comunidad microbiana. Los sistemas aerobios más utilizados (sistemas de lodos activados) constan de una pileta aireada en la cual crece la biomasa (microorganismos) en forma de flóculos (Figura 1a), mientras que los reactores anaerobios se basan en la degradación en ausencia de oxígeno y los más utilizados presentan biomasa granular (reactores tipo UASB) (Figura 1b). En ambos sistemas, el rol de Anaerolineae parecería centrarse en la hidrólisis y fermentación de la materia orgánica y en la degradación de restos celulares (Nielsen et al. 2009; Petriglieri et al. 2018; Bovio et al. 2019; Nierychlo et al. 2019b). Se ha sugerido que la predominancia de Anaerolineae podría deberse a su adhesividad celular, su potencial como degradadores de celulosa y/o por la posible sintrofia con arqueas metanogénicas en sistemas anaerobios (Sekiguchi et al. 2001a; Yamada et al. 2005; Xia et al. 2016; Bovio et al. 2019). Debido a su morfología filamentososa, podrían desempeñar un rol fundamental generando el núcleo de formación de flóculos y gránulos en estos sistemas (Yamada et al. 2005; Yamada and Sekiguchi 2009). Pero, se ha relacionado el aumento en la abundancia de algunas especies de Anaerolineae con episodios bulking filamentososo (Sekiguchi et al. 2001a; Li et al. 2008; Song et al. 2017; Nierychlo et al. 2019b). El bulking filamentososo es causado por el sobrecrecimiento de bacterias filamentosas que desestabilizan los flóculos y gránulos, alterando su sedimentación generando graves problemas de operación (Passeggi et al. 2012). A pesar de los esfuerzos de investigación no se conocen aún las causas que originan el proceso de bulking. En muchos casos debido a que estos organismos no se han podido cultivar ni conocer sus propiedades metabólicas.

En los últimos años, con el avance de las técnicas metagenómicas se han podido ensamblar nuevos genomas de Chloroflexota a partir de metagenomas de sistemas de tratamiento de aguas residuales (McIlroy et al. 2016; McIlroy et al. 2017; Andersen et al. 2018). Estos estudios han sugerido la participación de Anaerolineae en la fermentación de azúcares y en la descomposición de compuestos orgánicos complejos a través de enzimas hidrolíticas asociadas a superficie

(Kragelund et al. 2007; Kragelund et al. 2011; Petriqlieri et al. 2018). Pero aún se desconoce cuáles son las vías metabólicas que están activas en los diferentes sistemas.

La metatranscriptómica (secuenciación del ARN mensajero) permite conocer los genes que se expresan dentro de un ecosistema. Hasta el momento hay un solo artículo enfocado en determinar el rol de Anaerolineae mediante esta aproximación (Xia et al. 2016). Los resultados indicaron que la prevalencia de Anaerolineae en un reactor termófilo podría explicarse por la alta expresión génica de la proteína de adherencia (Tfp) que favorece la agregación celular (Xia et al. 2016). Debido a la dificultad de aislar estos microorganismos, es fundamental centrar los esfuerzos en ensamblar genomas y estudiar su expresión génica. Así contribuiremos al conocimiento metabólico y filogenómico sobre un grupo de microorganismos del que se conoce muy poco.

#### Aporte al estudio de Chloroflexota en sistemas de tratamiento

Desde el año 2012 nos hemos enfocado al estudio del filo Chloroflexota, inicialmente en sistemas anaerobios de tratamiento de aguas residuales y posteriormente ampliando el estudio a sistemas aerobios y anammox. En la tesis de Maestría de Patricia Bovio (POS\_NAC\_2013\_1\_11500) se establecieron métodos moleculares específicos para detección y cuantificación de Chloroflexota como Terminal-restriction-fragment-length-polymorphism (T-RFLP), PCR cuantitativa, Fluorescence in-situ hybridization (FISH) y secuenciación masiva del gen de ARNr de 16S. Se estudiaron cinco reactores anaerobios escala real instalados en Uruguay, determinando que Anaerolineae presentaba morfología filamentosa y una mayor abundancia en reactores con biomasa granular comparado con reactores con biomasa flocular. Las secuencias de Chloroflexota detectadas formaban clusters en el árbol filogenético sin representantes cultivados (Figura 2), por lo tanto, podrían ser especies nuevas y no había información sobre su metabolismo. Los resultados de este trabajo fueron publicados en *Journal of Applied Microbiology* (Bovio et al. 2019). También enfocamos esfuerzos en el aislamiento de Chloroflexota a partir de inóculos obtenidos de distintos sistemas de tratamiento aerobios y anaerobios. Se aplicaron distintas estrategias de cultivo utilizando diversos compuestos como fuente de carbono y energía, pero no se logró enriquecer los cultivos en Chloroflexota.

En el marco de la tesis de Doctorado de Patricia Bovio se realizó un meta-análisis a partir de datos de secuenciación masiva del gen de ARNr de 16S depositadas en bases de datos de 62 reactores metanogénicos de tratamiento de residuos sólidos y efluentes líquidos. Se determinó que el género T78 dentro de Anaerolineae y sin representantes cultivados, predominó en todos los reactores con distintas especies entre los reactores de tratamiento de residuos sólidos y efluentes líquidos (Figura 3). El artículo correspondiente a este trabajo fue publicado en *Frontiers in Microbiology* (Bovio-Winkler et al. 2021).

Con el objetivo de avanzar en la determinación del potencial metabólico de Chloroflexota, ensamblamos 17 genomas de especies nuevas a partir de metagenomas de un reactor aerobio, un reactor anaerobio y un reactor anammox (Figura 4). Los genomas obtenidos formaron clusters en el árbol filogenético sin genomas cercanos. A partir del estudio de las vías metabólicas, logramos determinar que tenían el potencial de fermentar diversos compuestos orgánicos utilizando como aceptores de electrones compuestos nitrogenados, de azufre o formiato, generando acetato, etanol, lactato o propionato como productos de fermentación (Bovio-Winkler et al. 2023). La obtención de genomas ensamblados es importante para contribuir a la diversidad filogenómica y potencial metabólico de bacterias difíciles de cultivar. Sin embargo, nos vemos limitados en la determinación de las vías metabólicas activas en ciertas condiciones operacionales. En este sentido, es fundamental la incorporación de la metatranscriptómica para determinar su expresión génica.

#### Antecedentes del equipo de trabajo

Nuestro interés por el estudio del filo Chloroflexota en sistemas de tratamiento de aguas residuales comenzó en el año 2008. Nuestros colegas del laboratorio BioProa de Facultad de Ingeniería (liderado por Liliana Borzacconi) detectaron pérdida de eficiencia en un reactor metanogénico de una industria procesadora de malta debido al sobre-crecimiento de bacterias filamentosas. Determinamos mediante la técnica de FISH con sondas específicas para el filo Chloroflexota, que este grupo era el responsable de la pérdida de densidad de los gránulos y su flotación (Figura 5). Se hipotetizó que su sobre-crecimiento podría deberse al alto contenido de células en el reactor y con la lisis celular debida a una bajada abrupta del pH. Los resultados además de buscar soluciones al problema de la industria permitieron publicar un trabajo en conjunto (Borzacconi et al. 2008). En el año 2012 obtuvimos financiación del Fondo Clemente Estable (FCE\_2\_2011\_1\_7062) para estudiar la diversidad y abundancia de Chloroflexota en reactores metanogénicos escala real en nuestro país (Maestría de Patricia Bovio POS\_NAC\_2013\_1\_11500). Los resultados fueron publicados en *Journal of Applied Microbiology* (Bovio et al. 2019). Angela Cabezas realizó una pasantía en el laboratorio de la Dra. Anne Kristin Kaster, en ese entonces directora del grupo de Single Cell Genomics de DSMZ (Alemania), para secuenciar genomas de Chloroflexota detectados en un sistema aerobio de una planta vitivinícola de Uruguay mediante Fluorescence-activated cell sorting (FACS) y Single Cell Genomics. Este trabajo fue aceptado recientemente para su publicación en *Frontiers in*

Microbiology (Dam et al. 2020). En la tesis de Doctorado de Patricia Bovio (POS\_NAC\_2015\_1\_109786), se realizó un meta-análisis para determinar abundancia y diversidad de Chloroflexota a partir de datos de secuenciación masiva del gen de ARNr de 16S de 17 artículos publicados depositados en bases de datos en 62 reactores anaerobios que trataban residuos sólidos y líquidos. El artículo correspondiente a está siendo enviado para su revisión (Bovio-Winkler et al. 2021). En 2018 el Fondo Vaz Ferreira (I/FVF2017/135) financió un proyecto liderado por Angela Cabezas para secuenciar metagenomas y ensamblar genomas de Chloroflexota de un reactor anaerobio y de un reactor aerobio. Al mismo tiempo, Patricia Bovio fue financiada por la beca de movilidad ANII (MOV\_CA\_2017\_1\_138200) para su capacitación en el análisis de metagenomas en el Instituto de Investigaciones en Ingeniería Genética y Biología Molecular "Dr Héctor N. Torres" (INGEBI-CONICET, Buenos Aires) bajo la orientación del Dr. Leonardo Erijman y el Dr. Leandro Guerrero. Esto permitió ensamblar y analizar 8 genomas de especies nuevas de Anaerolineae distribuidos en distintas familias. Gracias a la formación de Patricia Bovio en el análisis de metagenomas, recibimos en 2019 a una estudiante de Doctorado de la Universidad Autónoma de Barcelona, para formarla en el análisis de metagenomas de reactores anammox generando nuevas colaboraciones. A partir de estos metagenomas de anammox, ensamblamos 9 genomas de especies nuevas de Anaerolineae que tendrían un rol fundamental en el loop de nitrógeno con las bacterias anammox. A partir de estos resultados fueron publicados dos manuscritos (Oyarzúa et al. 2021; Bovio-Winkler et al. 2023). También se dictaron cursos en el periodo de proyecto para la capacitación en el análisis de datos de secuenciación de amplicones y metagenomas:

- 2022 Genome-centric metagenomics for bioremediation and resource recovery. Curso de posgrado de carácter regional, con financiamiento UNU-BIOLAC, realizado en el Instituto de Investigaciones en Ingeniería Genética y Biología Molecular "Dr Héctor N. Torres" (INGEBI-CONICET) in Buenos Aires, Argentina del 31 de octubre al 4 de.
- 2022 Producción de energía y compuestos con valor agregado mediante procesos microbianos. Curso de posgrado de carácter regional, con financiamiento UNU-BIOLAC, realizado en Facultad de Química y el IIBCE en Montevideo, Uruguay, del 14 al 25 de noviembre
- 2021 Curso Análisis integral de experimentos de fermentación oscura para la producción de hidrógeno. En el marco de la Red Latinoamericana de Biohidrógeno.
- 2020 Curso práctico de análisis de datos de secuenciación masiva y análisis multivariados. Grupo de "Sistemas de tratamiento de desechos", VI Escuela Regional de Microbiología, IIBCE, Montevideo, Uruguay. Responsable del curso práctico.

## OBJETIVOS

### Objetivo general

Conocer el rol organismos no cultivados del filo Chloroflexota en distintos sistemas de tratamiento de aguas residuales escala real.

### Objetivos específicos

Conocer la abundancia, diversidad y morfología de organismos afiliados a Chloroflexota en sistemas de tratamiento de aguas residuales de nuestro país.

Obtener genomas de organismos no cultivados a partir de muestras de sistemas de tratamiento de aguas residuales.

Conocer el potencial metabólico a partir de los genomas ensamblados.

Conocer cuáles son los genes que se expresan en los sistemas de tratamiento de aguas residuales operados en diferentes condiciones.

Correlacionar la expresión génica con los datos operacionales de los reactores para entender su función.

Conocer el rol de estos microorganismos en la formación de flóculos y gránulos

Determinar si tienen crecimiento lento y porqué.

El proyecto intentará responder las siguientes preguntas:

¿Qué morfología presentan?

¿Qué disposición espacial tienen en los gránulos y flóculos?

¿Qué potenciales vías metabólicas tienen los genomas?

¿Qué vías metabólicas se expresan?

¿Expresan diferentes vías metabólicas en reactores aerobios y anaerobios?

¿Tienen crecimiento lento, por qué?

¿Cuáles son las ventajas metabólicas o estructurales que favorecen la acumulación de organismos del filo Chloroflexota en estos sistemas?

¿Cómo se podría explicar los eventos de bulking?

## CONTENIDO TÉCNICO

### Hipótesis de Investigación

De acuerdo con lo expuesto en los antecedentes sabemos que los sistemas de tratamiento de aguas residuales tienen una alta abundancia de organismos del filo Chloroflexota afiliados a especies no conocidas dentro de la clase Anaerolinea. Esta alta abundancia sugiere que cumplen un rol importante en los sistemas de tratamiento de aguas residuales. Debido a que estos microorganismos son de muy difícil cultivo se conoce poco sobre su metabolismo y su rol en los diferentes sistemas. La hipótesis es que mediante técnicas de metagenómica y de metatranscriptómica es posible obtener información que permita entender el rol que tienen estos microorganismos en los sistemas de tratamiento de efluentes. A partir de los genomas ensamblados a partir de los datos de los metagenomas es posible conocer su potencial metabólico, y a partir de los datos de metatranscriptomas es posible determinar las vías metabólicas activas en los biorreactores. El estudio del genoma de estos organismos y de su función en estos sistemas permite llenar los vacíos de conocimiento sobre un grupo de organismos difíciles de cultivar importantes tanto en sistemas artificiales como en la naturaleza. La información obtenida ayuda a determinar las condiciones de operación que eviten su sobrecrecimiento y los problemas de bulking. La información sobre las vías metabólicas presentes y activas en estos microorganismos permite definir condiciones de cultivo que posibilite su enriquecimiento y aislamiento en el laboratorio. La información sobre genes involucrados en la formación de biofilms, en conjunto con las observaciones de disposición espacial dentro de flóculos y gránulos, permite comprender cuál es la función de estos microorganismos en la estructuración de flóculos y gránulos fundamentales para el buen funcionamiento de los sistemas de tratamiento de aguas residuales. Los resultados de este proyecto son un aporte fundamental para completar el árbol filogenético de los seres vivos en ramas evolutivas donde no existen representantes cultivados, así como también aportando información metabólica de un grupo ampliamente distribuido en sistemas de tratamiento de aguas residuales.

### Hipótesis principal

El conocimiento del potencial metabólico y la expresión génica de organismos no cultivados del filo Chloroflexota permiten determinar su rol en sistemas biológicos de tratamiento de efluentes. Entender qué participación tienen en la degradación de la materia orgánica, que factores desencadenan su sobre-crecimiento, que función cumplen en la estructura de gránulos y flóculos y aportar información para el diseño de estrategias exitosas para su aislamiento.

### **Metodología/Diseño del estudio**

#### Muestreo de reactores

Se estudiaron dos reactores aerobios y dos reactores anaerobios escala real que traten distintos tipos de aguas residuales (contenido variable en proteínas, lípidos, glúcidos, nitrógeno, fósforo, etc). Estos dos tipos de reactores se diferencian en la presencia/ausencia de oxígeno, y en que los reactores anaerobios presentan biomasa granular mientras que los aerobios presentan biomasa flocular. El primer reactor anaerobio seleccionado, denominado reactor M0, es un UASB metanogénico (con biomasa granular) que se encuentra operando desde hace más de 15 años en una industria procesadora de malta. En este reactor se detectaron previamente problemas de bulking anaerobio (Borzacconi et al. 2008). Hemos estudiado ampliamente la diversidad, abundancia y morfología del filo Chloroflexota en este reactor (Bovio et al. 2019). Además, mediante ensamblado de genomas a partir del metagenoma detectamos 4 nuevas especies de la clase Anaerolineae (Bovio-Winkler et al. 2023). El segundo reactor anaerobio seleccionado perteneció a una industria de bebidas (FNC). El primer reactor aerobio (reactor RH) seleccionado es un reactor de lodos activados (biomasa en forma de flóculos) escala real que realiza el tratamiento de agua de residuos hospitalarios. Este reactor, ha tenido varios episodios de bulking filamentoso y fue estudiado previamente en nuestro laboratorio en el marco de una tesis de grado (García, 2019), detectando la presencia de Chloroflexota mediante FISH y secuenciación masiva del gen de ARNr de 16S. Recientemente, ensamblamos genomas de 4 nuevas especies de Anaerolineae sin representantes cultivados (Bovio-Winkler et al. 2023). El segundo reactor aerobio pertenece a una industria de grasas y aceites (CO).

Se tomaron muestras de cada reactor mensualmente durante 6 meses para monitorear la abundancia, diversidad y morfología de Chloroflexota mediante FISH y secuenciación masiva del gen de ARNr de 16S. Posteriormente se seleccionaron muestras con alta abundancia relativa de Chloroflexota para la secuenciación de metagenomas y metatranscriptomas. El hecho de realizar un muestreo a lo largo del tiempo permite seleccionar muestras que tengan una diferencia significativa en abundancia relativa de Chloroflexota para aplicar el método de cobertura diferencial para el paso de binning en el ensamblado de genomas (Albertsen et al. 2013). Todas las muestras tomadas se fijaron inmediatamente para FISH (ver más adelante). A partir de cada muestra tomada, una sub-muestra se almacenó a -20 °C para extracción de ADN para secuenciación de amplicones de genes del ARNr de 16S y metagenómica. Una segunda sub-muestra que constó de 3 réplicas biológicas, la cual se colocó en nitrógeno líquido y posteriormente se almacenó a -80°C

para extracción de ARN y posterior secuenciación del metatranscriptoma.

#### Hibridación in situ fluorescente (FISH)

La técnica de hibridación in situ fluorescente se basa en la hibridación de sondas fluorescentes de ADN dirigidas al ARN ribosomal. Esta técnica permite detectar diferentes grupos de microorganismos diseñando sondas con especificidades diferentes. En nuestro laboratorio tenemos amplia experiencia en el uso de esta técnica para estudiar la morfología y disposición del filo Chloroflexota en muestras de reactores con sondas específicas para este grupo. Por otro lado, nos permite evaluar si los organismos detectados están metabólicamente activos ya que las sondas se unen a los ribosomas que están presentes en células activas. Las muestras obtenidas se fijaron con paraformaldehído al 4% por 3 horas a 4°C para mantener la morfología celular. Luego se adhieren a un portaobjeto y se realiza la hibridación con las sondas CFX1223 (Björnsson et al. 2002b) y GNSB941 (Gich et al. 2002) en condiciones establecidas por los autores. Se utilizará DAPI para teñir todas las células. Se utilizó un microscopio laser confocal (LSM 800, Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) disponible en la plataforma de microscopía confocal del IIBCE. Para cada muestra se realizó un control negativo el cual carece de las sondas y un control positivo con una cepa perteneciente al filo Chloroflexota (*Sphaerobacter thermophilus* DMS20745).

#### Secuenciación masiva del gen de ARNr de 16S

Se seleccionaron muestras donde se detectó la presencia de Chloroflexota de forma abundante mediante FISH. Las muestras se centrifugaron centrifugadas a 3000 g por 5 minutos para separar la biomasa. El ADN genómico se extrajo a partir de 0,25 g de biomasa húmeda con el Kit PowerSoil® DNA Isolation (QIAGEN) según las instrucciones del fabricante. La calidad del ADN se verificó en un gel de agarosa 1 %. Se realizó la secuenciación masiva del gen de ARNr de 16S usando los primers generales para la región V4: 515F (5'-GTGCCAGCMGCCGCGGTAA-3') y 806R (5'-GGACTACVSGGGTATCTAAT-3') (Caporaso et al. 2012), en el secuenciador Ion Torrent PMG de la plataforma de secuenciación del IIBCE.

#### Análisis bio-informático de secuencias del gen de ARNr de 16S

Las secuencias crudas provenientes del secuenciador Ion Torrent en formato fastq se importaron en QIIME2 para su análisis (Figura 7). Se demultiplexaron y se eliminaron secuencias con una calidad menor a 25 usando QIIME cutadapt demux-single. Se eliminaron quimeras y se generaron las ASV (amplicon sequence variant) para cada muestra con qiime dada2 denoise-pyro (Callahan et al. 2016). La taxonomía se asignó a cada ASV usando qiime feature-classifier classify-sklearn contra la base de datos MiDAS 4.8.1 database (Nierychlo et al. 2019a).

#### Secuenciación de metagenomas

Para secuenciación de metagenomas se seleccionaron dos muestras por reactor con alta proporción de Chloroflexota según el análisis de secuenciación de amplicones. La secuenciación se realizó en la plataforma Illumina Novaseq 6000 (PE, 2x150) en Novogen corporation (Beijing, China) obteniéndose 6GB por cada metagenoma.

#### Análisis bio-informático de metagenomas: ensamblado, binning y anotación de genomas

En la Figura 7 se muestra el esquema general de procesamiento de datos metagenómicos. La calidad de las secuencias crudas (fastq) de los metagenomas se analizó con FastQC (v0.11.8) (<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>). Las secuencias se filtraron por calidad ( $q > 25$ ) y se removieron adaptadores con Trimmomatic (v0.39) (Bolger et al. 2014). Los metagenomas se ensamblaron con MEGAHIT (v1.1.4-2) (Li et al. 2016). El binning y refinamiento de los genomas se hizo con MetaWRAP. La completitud y contaminación de los bins se evaluó con CheckM2 (v1.0.13) (Parks et al. 2015). Los genomas se anotaron con la herramienta EnrichM usando la base de datos KEGG y CAZy. A partir de la anotación buscaron genes vinculados a la formación de biofilms y/o adhesión celular, y se determinaron potenciales vías metabólicas en cada genoma. Se construyeron arboles filogenómicos con el programa gtdbtk que se basa en el alineamiento de 120 genes marcadores (Parks et al. 2018).

#### Análisis de Metatranscriptómica

Para realizar el estudio de expresión de genes mediante metatranscriptómica se seleccionarán aquellas muestras en las cuales se logró ensamblar genomas de especies nuevas de organismos del filo Chloroflexota a partir de los metagenomas.

#### Extracción de ARN y secuenciación

A partir de las muestras de biomasa guardadas a -80°C se extrajo el ARN total utilizando 0,5 g de biomasa húmeda para

cada una de las tres réplicas obtenidas por cada muestra. Se usó el kit Quick-RNATM MiniPrep Plus Kit (DNA-free) según las instrucciones del proveedor. La concentración del ARN total se midió utilizando el fluorómetro Qubit de acuerdo a las especificaciones del proveedor. La depleción del ARN ribosomal se realizó en la plataforma de secuenciación. El ARN mensajero de las muestras de los cuatro reactores fue secuenciado en la plataforma Illumina Novaseq 6000 (PE, 2x150) en Novogen corporation (Beijing, China) con una profundidad de 96 GB de secuencias para cada transcriptoma.

**Análisis bio-informático de los datos de metatranscriptomas: expresión de genes**

El preprocesamiento y control de calidad de los metatranscriptomas se realizó de igual forma que para los metagenomas (Figura 7). Las secuencias de los metatranscriptomas se mapearon contra cada genoma de Chloroflexota mediante Bowtie2. Se calcularon las secuencias mapeadas contra cada gen de los genomas mediante featurecounts, las cuales fueron normalizadas de acuerdo a 10 genes housekeeping.

### **Resultados, análisis y discusión**

**Morfología y distribución de organismos del filo Chloroflexota en lodos activados y reactores metanogénicos mediante la técnica de FISH**

En primer lugar, se aplicó la técnica de FISH para determinar la morfología del filo Chloroflexota. Con esta técnica además es posible determinar si estos microorganismos están activos ya que la hibridación de las sondas de ADN es sobre el ARN ribosomal. Por lo tanto, serán detectados organismos del filo Chloroflexota que estén activos. Que estos microorganismos estén metabólicamente activos es de especial importancia para que sean detectados mediante la metatranscriptómica. Los resultados mostraron diferentes morfologías de Chloroflexota en todos los reactores estudiados.

En el reactor de lodos activados de CO se observó gran abundancia del filo Chloroflexota (Figura 8). Presentó filamentos largos, finos y enredados, posicionados dentro de los flóculos (flechas amarillas). Esto es de especial importancia ya que este grupo detectado de Chloroflexota no estaría dando la posibilidad de generar puentes interfoculares y ser potencial agente causante de bulking.

Por otro lado, se observaron otros filamentos que presentaron morfología filamentosa distinta a los filamentos que hibridaron con la sonda (flechas rojas) (Figura 8). Estas bacterias filamentosas pertenecerían a otro grupo filogenético. Estos microorganismos estuvieron en su mayoría distribuidos formando puentes interfoculares, aunque en muy baja abundancia.

En el reactor de lodos activados de RH, el filo Chloroflexota presentó distintas morfologías (flechas amarillas): filamentos finos, gruesos, más cortos que en el reactor de CO, y se observaron septos más marcados (Figura 9). Los filamentos no fueron muy abundantes, y estuvieron en su mayoría dentro de los flóculos. También se detectaron filamentos que no hibridaron con la sonda y en su mayoría estuvieron fuera de los flóculos, pero en baja abundancia (flechas rojas).

Se observó que la muestra RH7 fue la que presentó mayor cantidad de filamentos.

El reactor metanogénico MO, fue el que presentó mayor abundancia de filamentos que hibridaron con la sonda (flechas amarillas) (Figura 10).

Los filamentos fueron finos, largos y enredados de forma similar a los encontrados en CO. También se detectaron otros microorganismos filamentosos que no hibridaron con la sonda (flechas rojas).

Finalmente, la técnica de FISH aplicada a muestras del reactor FNC mostro filamentos de Chloroflexota finos muy cortos y también filamentos largos.

### **Diversidad mediante secuenciación del gen de ARNr 16S**

Se secuenciaron muestras de 4 reactores de tratamiento de aguas residuales industriales: dos reactores aerobios de lodos activados escala real (RH y CO) y dos reactores metanogénicos escala real (MO y FNC). Las muestras fueron tomadas una vez al mes durante 6 meses.

El filo Chloroflexota fue uno de los grupos centrales en todos los reactores, presentando una mayor abundancia en el reactor aerobio que trataba residuos hospitalarios (RH) seguido por el reactor metanogénico de aguas residuales provenientes de una industria de bebidas (Figura 12).

Dentro del filo Chloroflexota, predominó la clase Anaerolineae superando una abundancia relativa de 43.8% en todas las muestras, y alcanzando hasta el 100% de la comunidad de Chloroflexota (Figura 13).

A partir de estos resultados se seleccionaron 2 muestras por reactor con mayor abundancia de Chloroflexota para la secuenciación de metagenomas para realizar el co-ensamblado, y una muestra con el mayor porcentaje para metatranscriptómica (en triplicado).

## Genomas ensamblados a partir de metagenomas

Las muestras seleccionadas para la secuenciación de metagenomas fueron: CO5, CO6, RH10, RH11, FNC4, FNC5, MO5 y MO6.

El ensamblado de los metagenomas, binning y refinamiento de genomas resultó en un total de 18 genomas de Chloroflexota (Tabla 2). El reactor que tuvo mas genomas de Chloroflexota fue RH (10 genomas), que presentó por secuenciación de amplicones un 40% aproximadamente de Chloroflexota en la comunidad microbiana total. En segundo lugar, se ensamblaron 6 genomas de Chloroflexota en el reactor de MO, 2 genomas en FNC y 1 genoma en CO. Ninguno de los genomas ensamblados tiene representantes cultivados, por lo tanto el analisis de estos genomas es un gran aporte al entendimiento del rol de las especies de Chloroflexota en estos sistemas.

De los 17 genomas, 16 pertenecieron a la clase Anaerolineae, mientras que 1 genoma se afilió a la clase Dehalococcoidia. A partir de los genomas se construyó un árbol filogenómico (Figura 14), el cual mostró que los genomas se agruparon de acuerdo al reactor que provenían. Esto indica que cada especie de Chloroflexota es especifica de cada reactor.

### Análisis de la expresión génica

Para secuenciar metatranscriptomas por triplicado para una muestra por reactor se seleccionaron: CO6, RH10, FNC4 y MO6. Debido a la perdida de genes por la baja completitud de algunos genomas, la expresión génica fue calculada para genomas con una completitud mayor al 85%, resultando en 9 genomas de Chloroflexota. Los resultados mostraron que los genomas de las especies de Chloroflexota obtenidas de reactores anaerobios (FNC y MO) expresan genes para fermentación de glucosa formando lactato en el proceso, y a su vez degradan aminoácidos (Figura 14). Esto indica que estas especies son anaerobios estrictos.

Las especies obtenidas de los reactores aerobios pueden respirar aeróbicamente debido a la expresión de genes de la fosforilación oxidativa (oxígeno como aceptor final de electrones), oxidando glucosa, aminoácidos y acetato. También se determinó para algunas especies que pueden reducir compuestos nitrogenados por la expresión de genes tales como nirK y nosZ. Se determinó la expresión de genes vinculados a la adhesividad en especies provenientes de los reactores aerobios, lo que indicaría un rol fundamental en la formación de los flóculos.

Su capacidad de degradar materia orgánica puede ser foco de estudios sobre sobrecrecimiento de este grupo de microorganismos. El control de la alimentación de los reactores puede ser clave para controlar el crecimiento de Chloroflexota y evitar eventos de bulking filamentoso.

Un trabajo reciente indicó que la mayoría de las bacterias filamentosas del filo Chloroflexota presentes en los reactores aerobios de lodos activados estudiados se encontraron dentro de los flóculos (Petriglieri et al. 2023), pero a su vez también han sido ampliamente reportados como agentes causantes de bulking por su sobrecrecimiento (Sekiguchi et al. 2001b; Björnsson et al. 2002c; Li et al. 2008; Song et al. 2017; Nierychlo et al. 2020). Por lo tanto, conocer las causas por las cuales sobrecrecen algunas especies resulta fundamental.

### Conclusiones y recomendaciones

Se logró ensamblar 18 especies nuevas del filo Chloroflexota en 4 reactores de tratamiento de aguas residuales industriales, en su mayoría pertenecientes a la clase Anaerolineae. Se determinó que estas especies son degradadores de materia orgánica colaborando en su eliminación, lo cual los hace fundamentales en estos sistemas. Se determinó que en sistemas de lodos activados cumplen un importante rol en la formación de los flóculos que son indispensables para la sedimentación de la biomasa debido a la expresión de genes de adhesividad.

Son necesarios mas estudios que abarquen una mayor diversidad de sistemas de tratamiento de aguas residuales aerobios y anaerobios, con distintos sustratos y configuraciones para determinar el rol de Chloroflexota en cada uno de los reactores.

## Referencias bibliográficas

- Albertsen M, Hugenholtz P, Skarshewski A, Nielsen KL, Tyson GW, Nielsen PH (2013) Genome sequences of rare, uncultured bacteria obtained by differential coverage binning of multiple metagenomes. *Nat Biotechnol* 31:533–538. <https://doi.org/10.1038/nbt.2579>
- Andersen MH, McIlroy SJ, Nierychlo M, Nielsen PH, Albertsen M (2018) Genomic insights into *Candidatus Amarolinea aalborgensis* gen. nov., sp. nov., associated with settleability problems in wastewater treatment plants. *Syst Appl Microbiol* 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2018.08.001>
- Björnsson L, Hugenholtz P, Tyson GW, Blackall LL (2002a) Filamentous Chloroflexi (green non-sulfur bacteria) are abundant in wastewater treatment processes with biological nutrient removal. *Microbiology (N Y)* 148:2309–2318. <https://doi.org/10.1099/00221287-148-8-2309>
- Björnsson L, Hugenholtz P, Tyson GW, Blackall LL (2002b) Filamentous Chloroflexi (green non-sulfur bacteria) are abundant in wastewater treatment processes with biological nutrient removal. *Microbiology (N Y)* 148:2309–2318
- Björnsson L, Hugenholtz P, Tyson GW, Blackall LL (2002c) Filamentous Chloroflexi (green non-sulfur bacteria) are abundant in wastewater treatment processes with biological nutrient removal. *Microbiology (N Y)* 148:2309–2318. <https://doi.org/10.1099/00221287-148-8-2309>
- Bolger AM, Lohse M, Usadel B (2014) Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* 30:2114–2120. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170>
- Borzacconi L, López I, Passeggi M, Etchebehere C, Barcia R (2008) Sludge deterioration in a full scale UASB reactor after a pH drop working under low loading conditions. *Water Science and Technology* 57:797–802. <https://doi.org/10.2166/wst.2008.071>
- Bovio P, Cabezas A, Etchebehere C (2019) Preliminary analysis of Chloroflexi populations in full-scale UASB methanogenic reactors. *J Appl Microbiol* 126:667–683. <https://doi.org/10.1111/jam.14115>
- Bovio-Winkler P, Cabezas A, Etchebehere C (2021) Database Mining to Unravel the Ecology of the Phylum Chloroflexi in Methanogenic Full Scale Bioreactors. *Front Microbiol* 11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.603234>
- Bovio-Winkler P, Guerrero LD, Erijman L, Oyarzúa P, Suárez-Ojeda ME, Cabezas A, Etchebehere C (2023) Genome-centric metagenomic insights into the role of Chloroflexi in anammox, activated sludge and methanogenic reactors. *BMC Microbiol* 23:1–19. <https://doi.org/10.1186/s12866-023-02765-5>
- Callahan BJ, McMurdie PJ, Rosen MJ, Han AW, Johnson AJA, Holmes SP (2016) DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nat Methods* 13:581–583. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3869>
- Cao S, Du R, Li B, Ren N, Peng Y (2016) High-throughput profiling of microbial community structures in an ANAMMOX-UASB reactor treating high-strength wastewater. *Appl Microbiol Biotechnol* 100:6457–6467. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7427-6>
- Dam H, John V, Sobol MS, Cabezas A, Kaster A-K (2020) Targeted Cell Sorting Combined with Single Cell Genomics reveals Microbial Dark Matter overlooked by Metagenomics. *Front Microbiol*
- Gich F, Garcia-Gil J, Overmann J (2002) Previously unknown and phylogenetically diverse members of the green nonsulfur bacteria are indigenous to freshwater lakes. *Arch Microbiol* 177:1–10. <https://doi.org/10.1007/s00203-001-0354-6>
- Hug L a, Castelle CJ, Wrighton KC, Thomas BC, Sharon I, Frischkorn KR, Williams KH, Tringe SG, Banfield JF (2013) Community genomic analyses constrain the distribution of metabolic traits across the Chloroflexi phylum and indicate roles in sediment carbon cycling. *Microbiome* 1:22. <https://doi.org/10.1186/2049-2618-1-22>
- Kindaichi T, Yuri S, Ozaki N, Ohashi A (2012) Ecophysiological role and function of uncultured Chloroflexi in an anammox reactor. *Water Science and Technology* 66:2556–2561. <https://doi.org/10.2166/wst.2012.479>
- Kragelund C, Levantesi C, Borger A, Thelen K, Eikelboom D, Tandoi V, Kong Y, Van Der Waarde J, Krooneman J, Rossetti S, Thomsen TR, Nielsen PH (2007) Identity, abundance and ecophysiology of filamentous Chloroflexi species present in activated sludge treatment plants. *FEMS Microbiol Ecol* 59:671–682. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2006.00251.x>
- Kragelund C, Thomsen TR, Mielczarek AT, Nielsen PH (2011) Eikelboom's morphotype 0803 in activated sludge belongs to the genus *Caldilinea* in the phylum Chloroflexi. *FEMS Microbiol Ecol* 76:451–462. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2011.01065.x>
- Li D, Luo R, Liu CM, Leung CM, Ting HF, Sadakane K, Yamashita H, Lam TW (2016) MEGAHIT v1.0: A fast and scalable metagenome assembler driven by advanced methodologies and community practices. *Methods* 102:3–11. <https://doi.org/10.1016/j.jymeth.2016.02.020>
- Li J, Hu B, Zheng P, Qaisar M, Mei L (2008) Filamentous granular sludge bulking in a laboratory scale UASB reactor. *Bioresour Technol* 99:3431–3438. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.08.005>
- McIlroy SJ, Karst SM, Nierychlo M, Dueholm MS, Albertsen M, Kirkegaard RH, Seviour RJ, Nielsen PH (2016) Genomic and in

situ investigations of the novel uncultured Chloroflexi associated with 0092 morphotype filamentous bulking in activated sludge. *ISME Journal* 10:2223–2234. <https://doi.org/10.1038/ismej.2016.14>

McIlroy SJ, Kirkegaard RH, Dueholm MS, Fernando E, Karst SM, Albertsen M, Nielsen PH (2017) Culture-independent analyses reveal novel anaerolineaceae as abundant primary fermenters in anaerobic digesters treating waste activated sludge. *Front Microbiol* 8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01134>

Nielsen PH, Kragelund C, Seviour RJ, Nielsen JL (2009) Identity and ecophysiology of filamentous bacteria in activated sludge. *FEMS Microbiol Rev* 33:969–998

Nierychlo M, Andersen K, Nielsen PH (2019a) Species-level microbiome composition of activated sludge - introducing the MiDAS 3 ecosystem-specific reference database and taxonomy

Nierychlo M, McIlroy SJ, Kucheryavskiy S, Jiang C, Ziegler AS, Kondrotaitė Z, Stokholm-Bjerregaard M, Nielsen PH (2020) Candidatus Amarolinea and Candidatus Microthrix Are Mainly Responsible for Filamentous Bulking in Danish Municipal Wastewater Treatment Plants. *Front Microbiol* 11:1–17. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01214>

Nierychlo M, Miobdzka A, Petriglieri F, McIlroy B, Nielsen PH, McIlroy SJ (2019b) The morphology and metabolic potential of the Chloroflexi in full-scale activated sludge wastewater treatment plants. *FEMS Microbiol Ecol* 95:1–11. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiy228>

Oyarzúa P, Bovio-Winkler P, Etchebehere C, Suárez-Ojeda MEME (2021) Microbial communities in an anammox reactor treating municipal wastewater at mainstream conditions: Practical implications of different molecular approaches. *J Environ Chem Eng* 9:106622. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2021.106622>

Parks DH, Chuvochina M, Waite DW, Rinke C, Skarshewski A, Chaumeil PA, Hugenholtz P (2018) A standardized bacterial taxonomy based on genome phylogeny substantially revises the tree of life. *Nat Biotechnol* 36:996. <https://doi.org/10.1038/nbt.4229>

Parks DH, Imelfort M, Skennerton CT, Hugenholtz P, Tyson GW (2015) CheckM: Assessing the quality of microbial genomes recovered from isolates, single cells, and metagenomes. *Genome Res* 25:1043–1055. <https://doi.org/10.1101/gr.186072.114>

Passeggi M, López I, Borzacconi L (2012) Modified UASB reactor for dairy industry wastewater: performance indicators and comparison with the traditional approach. *J Clean Prod* 26:90–94. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2011.12.022>

Petriglieri F, Kondrotaitė Z, Singleton C, Nierychlo M, Dueholm MKD (2023) A comprehensive overview of the Chloroflexota community in wastewater treatment plants worldwide. 1–25

Petriglieri F, Nierychlo M, Nielsen PH, McIlroy SJ (2018) In situ visualisation of the abundant Chloroflexi populations in full-scale anaerobic digesters and the fate of immigrating species. *PLoS One* 13:1–14. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0206255>

Sekiguchi Y, Takahashi H, Kamagata Y, Ohashi A, Harada H (2001a) In Situ Detection, Isolation, and Physiological Properties of a Thin Filamentous Microorganism Abundant in Methanogenic Granular Sludges: A Novel Isolate Affiliated with a Clone Cluster, the Green Non-Sulfur Bacteria, Subdivision I. *Appl Environ Microbiol* 67:5740–5749. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.12.5740-5749.2001>

Sekiguchi Y, Takahashi H, Kamagata Y, Ohashi A, Harada H (2001b) In Situ Detection, Isolation, and Physiological Properties of a Thin Filamentous Microorganism Abundant in Methanogenic Granular Sludges: A Novel Isolate Affiliated with a Clone Cluster, the Green Non-Sulfur Bacteria, Subdivision I. *Appl Environ Microbiol* 67:5740–5749. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.12.5740-5749.2001>

Song YX, Liao Q, Yu C, Xiao R, Tang CJ, Chai LY, Duan CS (2017) Physicochemical and microbial properties of settled and floating anammox granules in upflow reactor. *Biochem Eng J* 123:75–85. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2017.04.002>

Speirs L, Nittami T, McIlroy S, Schroeder S, Seviour RJ (2009) Filamentous bacterium Eikelboom Type 0092 in activated sludge plants in Australia is a member of the phylum chloroflexi. *Appl Environ Microbiol* 75:2446–2452. <https://doi.org/10.1128/AEM.02310-08>

Speirs LBM, Dyson ZA, Tucci J, Seviour RJ (2017) Eikelboom filamentous morphotypes 0675 and 0041 embrace members of the Chloroflexi: resolving their phylogeny, and design of fluorescence in situ hybridisation probes for their identification. *FEMS Microbiol Ecol* 93:1–13. <https://doi.org/10.1093/femsec/fix115>

Speirs LBM, Mcilroy SJ, Petrovski S, Seviour RJ (2011) The activated sludge bulking filament Eikelboom morphotype 0914 is a member of the Chloroflexi. *Environ Microbiol Rep* 3:159–165. <https://doi.org/10.1111/j.1758-2229.2010.00201.x>

Speirs LBM, Rice DTF, Petrovski S, Seviour RJ, Mcilroy SJ (2019) The Phylogeny, Biodiversity, and Ecology of the Chloroflexi in Activated Sludge. *Front Microbiol* 10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02015>

Sun L, Toyonaga M, Ohashi A, Matsuura N, Tourlousse DM, Meng X, Tamaki H, Hanada S, Cruz R, Yamaguchi T, Sekiguchi Y (2016) Isolation and characterization of Flexilinea flocculi gen. nov., sp. nov., a filamentous, anaerobic bacterium belonging to the class Anaerolineae in the phylum Chloroflexi. *Int J Syst Evol Microbiol* 66:988–996. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.000822>

Wang Y, Wang Q, Li M, Yang Y, He W, Yan G, Guo S (2016) An alternative anaerobic treatment process for treatment of heavy oil refinery wastewater containing polar organics. *Biochem Eng J* 105:44–51. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2015.08.012>

Xia Y, Wang Y, Wang Y, Chin FYL, Zhang T (2016) Cellular adhesiveness and cellulolytic capacity in Anaerolineae revealed by omics-based genome interpretation. *Biotechnol Biofuels* 9:1–13. <https://doi.org/10.1186/s13068-016-0524-z>

Yamada T, Sekiguchi Y (2009) Cultivation of uncultured chloroflexi subphyla: significance and ecophysiology of formerly uncultured chloroflexi “subphylum i” with natural and biotechnological relevance. *Microbes and environments / JSME* 24:205–216. <https://doi.org/10.1264/jsme2.ME09151S>

Yamada T, Sekiguchi Y, Imachi H, Kamagata Y, Ohashi A, Harada H (2005) Diversity, localization, and physiological properties of filamentous microbes belonging to Chloroflexi subphylum I in mesophilic and thermophilic methanogenic sludge granules. *Appl Environ Microbiol* 71:7493–7503. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.11.7493-7503.2005>

#### **Licenciamiento**

Reconocimiento 4.0 Internacional. (CC BY)