



UNIVERSIDAD
DE LA REPUBLICA
URUGUAY



Proyecto de tesis de Maestría en Biotecnología

Estudio de la función de bacterias
filamentosas del filo Chloroflexota
en sistemas de tratamiento
de aguas residuales

Gerardo Gabriel Viera Silvera

Programa de Posgrado en Biotecnología
Facultad de Ciencias Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable,
Departamento de Bioquímica y Genómica Microbiana
Laboratorio de Ecología Microbiana
Universidad de la República. Ggabrielviera@gmail.com/097404913
Orientadora: Dra. Claudia Etchebehere
Co-Orientador: Dra. Patricia Bovio Winkler
Financiación: Beca de maestría de la ANII
Montevideo– Uruguay
Noviembre de 2022

Índice

1- Resumen del Proyecto.....	3
2- Antecedentes.....	4
Sistemas de tratamiento de aguas residuales.....	4
Sistemas de tratamiento aerobio de lodos activados.....	4
Sistemas anaerobios de tratamiento de aguas residuales.....	5
Reactores Anaeróbicos.....	6
Bacterias filamentosas en sistemas de lodos activados.....	6
Filo Chloroflexota en sistemas de tratamiento de aguas residuales.....	7
Métodos de biología molecular para el estudio de microorganismos en sistemas de tratamiento de aguas residuales.....	8
Antecedentes del tema en el grupo de investigación.....	9
3- Hipótesis de trabajo.....	10
4- Objetivos.....	10
Objetivos Específicos.....	11
5- Metodología / Plan de trabajo.....	11
Actividad 1- Puesta a punto de los métodos.....	11
Determinación de la concentración de carbohidratos mediante la técnica de azúcares reductores por espectrofotometría.....	11
Puesta a punto de la cuantificación del número de copias de organismos del filo Chloroflexota mediante qPCR.....	12
Técnica de FISH para el filo Chloroflexota.....	13
Fijación de las células.....	13
Hibridación y lavado.....	14
Resultados.....	14
Actividad 2 - Experimentos para determinar la velocidad de crecimiento en cultivos en batch.....	15
Toma de muestras para determinación de azúcares reductores, qPCR y FISH.....	16
Actividad 3- Monitoreo de plantas de tratamiento escala real que operan en nuestro país.....	16
Actividad 4- Monitoreo de reactor escala laboratorio para determinar el efecto de los cambios de operación en la población de Chloroflexota.....	16
6- Cronograma de actividades.....	18
7- Resultados esperados y perspectivas.....	19
8- Bibliografía.....	20
ANEXO.....	22

1- Resumen del Proyecto

El presente proyecto de tesis tiene como objetivo principal comprender el rol de bacterias filamentosas pertenecientes al filo Chloroflexota en sistemas de tratamiento de aguas residuales. Los sistemas de tratamiento biológico emplean microorganismos para descomponer la materia orgánica presente en el agua residual, generando dióxido de carbono en sistemas aerobios o metano en sistemas anaerobios y de esta forma obtener agua con una calidad tal que sea posible de verter en cursos de agua sin causar problemas ambientales.

Existen varias configuraciones de sistemas de tratamiento, siendo los sistemas de lodos activados uno de los más utilizados. Estos sistemas constan de un tanque de aireación donde los microorganismos degradan la materia orgánica, y un sedimentador externo donde la biomasa se sedimenta y se separa la biomasa del efluente tratado. Las comunidades microbianas presentes en estos sistemas están compuestas por bacterias, protozoarios, virus y algas. Dentro de este consorcio, el filo Chloroflexota es uno de los grupos de bacterias filamentosas más abundantes. No obstante, debido a las dificultades para aislar estos organismos en cultivo puro, el conocimiento sobre su fisiología y función en los sistemas de tratamiento de aguas residuales es limitado.

A través de este proyecto de Maestría, se propone estudiar los microorganismos del filo Chloroflexota en sistemas de tratamiento de aguas residuales de lodos activados, utilizando diferentes técnicas de biología molecular: PCR en tiempo real, hibridación in situ fluorescente, análisis de las comunidades microbianas mediante secuenciación masiva del gen del ARNr de 16S. Estos enfoques permitirán conocer la diversidad y abundancia de las bacterias del filo Chloroflexota en diferentes plantas de tratamiento. Además, se realizarán estudios en un reactor escala laboratorio sometido a diferentes condiciones de operación para evaluar la capacidad de estas bacterias para degradar diferentes compuestos presentes en las aguas residuales y de adaptarse a diferentes condiciones de operación.

Los resultados de este proyecto proporcionarán una comprensión más completa de la ecología y el papel de bacterias del filo Chloroflexota en los sistemas de tratamiento de aguas residuales.

2- Antecedentes

En la actualidad, se observa un incremento significativo en la demanda de procedimientos para el tratamiento de efluentes en instalaciones destinadas al tratamiento de aguas residuales e industriales. Este aumento de interés se fundamenta en múltiples factores, entre ellos la preservación de los recursos naturales, la estricta conformidad con las regulaciones en vigor y la oportunidad de generar productos con valor añadido (Lopez; 2016).

En el contexto de la biotecnología aplicada al ámbito agroindustrial y ambiental, Uruguay ha emergido debido a su compromiso con la optimización de los sistemas de tratamiento de aguas residuales. Nuestro país, reconocido por su destacada industria agroalimentaria, ha reconocido la importancia crucial de la gestión sostenible del recurso hídrico para mantener la integridad ambiental y la prosperidad económica.

La adecuada gestión de las aguas residuales provenientes de fuentes domésticas e industriales es de vital importancia para de alguna forma mitigar los niveles potencialmente nocivos de compuestos orgánicos e inorgánicos, así como de microorganismos patógenos. Estos sistemas permiten la disposición de las aguas tratadas en cuerpos receptores, sin comprometer la capacidad de autopurificación de dichos cuerpos de agua (Catherine et al., 2013; Gaget et al., 2017).

Sistemas de tratamiento de aguas residuales

Los sistemas de tratamiento de aguas residuales pueden ser aerobios o anaerobios, dentro de los sistemas aerobios la tecnología más utilizada tanto para el tratamiento de aguas residuales industriales como urbanas, es la tecnología de lodos activados (Daigger, 2014), que es utilizada hace más de un siglo (Lofrano y Brown, 2010; Jenkins y Wanner, 2014).

Sistemas de tratamiento aerobio de lodos activados

Las plantas de tratamiento de lodos activados más convencionales consisten en una pileta de aireación o reactor biológico donde un consorcio de microorganismos degrada la materia orgánica presente en el agua residual produciendo CO₂ y biomasa. Dentro de

este reactor se produce la formación de flóculos, agregados de microorganismos que juegan un papel crucial en la sedimentación de la biomasa. Posterior a la pileta de aireación se coloca un sedimentador que separa la biomasa del agua tratada. El fenómeno de agregación es fundamental para la eficacia de los sistemas de tratamiento basados en lodos activados, ya que permite la formación de biosólidos compactos que pueden ser separados del agua tratada, facilitando así su posterior procesamiento y disposición adecuada (Balcárcel et al., 2014).

La biomasa se compone principalmente de bacterias y componentes biopoliméricos, que actúan como matrices que capturan partículas suspendidas, que se organizan como agregados formando los ya mencionados "flóculos" (Speirs et al., 2019) (ver anexo, Forma de los flóculos).

A su vez estos procesos ya no se ven como sistemas de eliminación, sino como fuentes valiosas de agua reciclada y biomasa o lodo para la recuperación de productos químicos con valor (van Loosdrecht et al., 2014; Puyol et al., 2016).

Sistemas anaerobios de tratamiento de aguas residuales

Los sistemas de tratamiento de aguas residuales anaerobios están diseñados para la producción controlada de metano (CH_4) a partir de la descomposición anaeróbica de materia orgánica. Este proceso es llevado a cabo por una comunidad diversa de microorganismos conocidos como arqueas metanogénicas, que pertenecen al dominio Archaea y son capaces de realizar la última etapa de la degradación anaeróbica de la materia orgánica, convirtiendo ácidos orgánicos y compuestos de carbono simples en metano y dióxido de carbono.

Los reactores metanogénicos pueden operar en diferentes configuraciones, como reactores de flujo continuo, reactores de lecho fluidizado o reactores anaeróbicos de membrana (RAM), cada uno con sus propias ventajas y desventajas en términos de eficiencia de tratamiento, costos operativos y complejidad de diseño. La temperatura es un factor crítico en el funcionamiento de estos sistemas, ya que la actividad microbiana óptima se encuentra en un rango termofílico o mesofílico, dependiendo de las condiciones específicas del reactor y del tipo de microorganismos presentes.

Bacterias filamentosas en sistemas de lodos activados

Las bacterias filamentosas suelen mantenerse en el núcleo de los flóculos. Sin embargo, en situaciones de estrés, como en aguas residuales con una baja relación sustrato/microorganismo (F/M) y bajos niveles de oxígeno disuelto (OD), tienden a elongar sus filamentos para satisfacer sus requerimientos nutricionales. Este fenómeno conduce a una dominancia sobre las bacterias floculantes y, como resultado, se manifiesta el fenómeno del bulking filamentoso (Balcárcel G. et al., 2014).

Las bacterias filamentosas desempeñan un papel crucial al constituir la estructura de sostén del cual se agregan las bacterias que forman los flóculos. Esto es posible debido a la presencia de sustancias poliméricas extracelulares producidas por estas últimas, las cuales mantienen la firmeza y la estructura compacta del flóculo. No obstante, un crecimiento excesivo de microorganismos filamentosos debilita los flóculos, dejándolos más abiertos y con espacios internos. Esto tiene un impacto negativo en las propiedades del lodo, volviéndolo menos denso y más esponjoso (Balcárcel G. et al., 2014).

El fenómeno reconocido como bulking filamentoso resulta en un deterioro del proceso, dado que el lodo no logra una sedimentación apropiada. Esto ocasiona que la biomasa se desprenda y escape con el efluente del clarificador secundario, resultando en la pérdida de sólidos suspendidos y generando un efluente con una carga orgánica elevada (Balcárcel G. et al., 2014).

Filo Chloroflexota en sistemas de tratamiento de aguas residuales

Las bacterias filamentosas del filo Chloroflexota se han observado durante mucho tiempo en las plantas de tratamiento de aguas residuales (Thiel et al., 2019). Pero a pesar de que se detectan frecuentemente, se desconocen sus funciones y relevancia en el medio (Yamada and Sekiguchi, 2009), parte de la gran dificultad en su conocimiento es debido a las dificultades a la hora de obtener cultivos puro o aislados.

Se ha reportado que el filo Chloroflexota desempeña un papel crucial al actuar como la estructura filamentosa que sirve como andamiaje para la formación de flóculos robustos y deseables con propiedades de sedimentación rápida (Kragelund et al., 2007a; Wanner and Jobbagy, 2014; Nierychlo et al., 2019; Speirs et al., 2019)

En la actualidad se han podido aislar y describir ocho clases que son Anaerolineae, Ardenticatenia, Caldilineae, Chloroflexia, Dehalococcoidia, Ktedonobacteria, Thermoflexia y Thermomicrobia (ver anexo, Árbol de las clases filogenética del filo bacteriano Chloroflexota). Y se estima que hay entre 25 y 30 clases sin cultivar, dentro del filo Chloroflexota (Thiel et al., 2019). Con base en las propiedades fisiológicas de las cepas aisladas, se ha sugerido que en los biorreactores podrían desempeñar un papel significativo en la degradación de carbohidratos y otros componentes celulares, incluyendo aminoácidos (Thiel et al., 2019).

Muchas bacterias del filo Chloroflexota fueron descritos únicamente en base a estudios microscópicos y Eikelboom les dio diferentes números de 'morfotipo' (p. ej., el morfotipo 0914 de Eikelboom, ahora denominado 'Candidatus Sarcinathrix'). La mayoría pertenecen a las clases Anaerolineae y Caldilineae, pero también representan otros clados de nivel de clase no cultivados en el 'subfilo I', que se están caracterizando in situ mediante microscopía y análisis del genoma (Thiel et al., 2019).

Métodos de biología molecular para el estudio de microorganismos en sistemas de tratamiento de aguas residuales

En los últimos 30 años hemos comenzado a comprender la microbiología de los lodos activados, un resultado que coincide con el desarrollo de métodos moleculares independientes del cultivo (Nielsen y McMahon, 2014). El desarrollo de las técnicas de PCR, la clonación y la secuenciación del ADN de Sanger permitió dilucidar las composiciones de las comunidades de lodos activados, sin necesidad de cultivar miembros individuales, basándose en cambio en el uso de análisis de secuencias de genes ARNr 23S y 16S utilizados como marcadores filogenéticos (Nielsen y McMahon, 2014).

Entre estas técnicas, la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) ha demostrado ser especialmente útil al facilitar la detección semicuantitativa de genes específicos de distintas cepas bacterianas individuales, incluso en concentraciones extremadamente bajas (Cotto et al., 2015).

Más recientemente, la PCR cuantitativa, conocida como qPCR, se ha empleado para realizar mediciones precisas de la cantidad de bacterias a través de la información genómica. Esta técnica de cuantificación tiene el potencial de ser una alternativa a otras

metodologías empleadas para cuantificar biomasa. Un aspecto de gran relevancia es que la qPCR proporciona información cuantitativa precisa acerca de la presencia de genes específicos en cultivos mixtos o muestras ambientales (Cotto et al., 2015).

El diseño de las sondas de oligonucleótidos marcadas con fluorescencia dirigidas a secuencias de ARN ribosomal de poblaciones de interés, permitió la identificación de células individuales mediante FISH (Fluorescence in situ hybridization, por sus siglas en inglés) (Amann y Fuchs, 2008; Nielsen et al., 2009a; Seviour, 2010b; Noguera et al., 2014).

En combinación con la tinción histoquímica, la micro autorradiografía (MAR) (McIlroy et al., 2017a), ha aclarado la ecofisiología in situ y las posibles funciones de las poblaciones individuales analizadas a nivel de células individuales. Dichos datos han revelado la verdadera biodiversidad de las comunidades de lodos activados y la presencia de poblaciones previamente desconocidas que existen allí, incluido el filo Chloroflexota, donde la mayoría aún no se ha cultivado (Speirs et al., 2019), así también como su morfología.

Antecedentes del tema en el grupo de investigación

El Laboratorio de Ecología Microbiana (LEM) del Departamento de Bioquímica y Genómica Microbiana del Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE) ha llevado a cabo una investigación prolongada en el ámbito de la microbiología aplicada a sistemas de tratamiento de aguas residuales. En colaboración con grupos de ingeniería tanto nacionales como internacionales de América Latina y Europa, se han abordado diversos proyectos relacionados con sistemas anaerobios metanogénicos, producción de hidrógeno y remoción de nitrógeno, entre otros (Callejas et al., 2019; Cabezas et al., 2020; Callejas et al., 2021; Castelló et al., 2009; Perna et al., 2013; Ferraz et al., 2015; Costa et al., 2014).

Durante este extenso período de investigación, se observó consistentemente la presencia del filo Chloroflexota en los diferentes reactores estudiados, pero aún se desconoce su papel específico en los sistemas de tratamiento de aguas residuales.

El interés en el filo Chloroflexota se inició con el trabajo de Tesis de la Dra. Etchebehere en 2002, donde se identificaron dentro de un reactor desnitrificante alimentado con lixiviado de relleno sanitario. Posteriormente, se detectó un

sobrecrecimiento de bacterias filamentosas, incluyendo Chloroflexota, en un reactor metanogénico industrial en 2008, lo que motivó un estudio más profundo en reactores a escala real. Estudios posteriores revelaron la presencia de bacterias Chloroflexotas en sistemas aerobios de lodos activados, tanto a nivel local como internacional (Bovio et al., 2019; Wu et al., 2019).

A pesar de la abundancia y diversidad del filo Chloroflexota detectada en estos sistemas, su función aún no ha sido completamente esclarecida. Para abordar esta pregunta, se ha empleado una combinación de técnicas moleculares avanzadas, incluyendo la secuenciación de genomas de células individuales y metagenomas, así como el análisis de metatranscriptomas (Dam et al., 2020; Bovio, 2021).

Esta tesis se enmarca en el proyecto FCE-

En este proyecto se propone realizar un monitoreo de las bacterias del filo Chloroflexota en sistemas de lodos activados que estén operando en nuestro país. Se propone estudiar la taxonomía de estos microorganismos mediante secuenciación masiva del gen del ARNr de 16S, la abundancia mediante qPCR y la morfología mediante FISH. Además, se planea operar reactores de laboratorio bajo condiciones controladas en diferentes condiciones para determinar las condiciones que favorecen el crecimiento de las bacterias del filo Chloroflexota. Estos reactores se van a operar en los laboratorios de la UTEC de Durazno, el grupo de investigación de la Dra. Cabezas se va a encargar del armado, logística operativa del reactor y monitoreo, por otro lado el grupo de la Dra. Etchebere del IIBCE analizará las muestras obtenidas, induciendo perturbaciones específicas y monitoreando la respuesta de Chloroflexota utilizando técnicas moleculares. Estos experimentos serán complementarios a los estudios realizados a escala real, permitiendo una comprensión más detallada de la función de Chloroflexota en los sistemas de tratamiento de aguas residuales.

3- Hipótesis de trabajo

La hipótesis principal de esta tesis es que los microorganismos del filo Chloroflexota juegan un papel importante en la formación de gránulos o flóculos, así como en la degradación de la materia orgánica compleja presente en los sistemas de tratamiento.

El sobrecrecimiento de estas bacterias está influenciado por factores ambientales y operacionales específicos.

Estos microorganismos tienen un crecimiento lento lo que dificulta su aislamiento.

4- Objetivos

El objetivo principal de este proyecto es determinar el rol de las bacterias del filo Chloroflexota en los sistemas de tratamiento de aguas residuales y las causas que producen el sobrecrecimiento.

Objetivos Específicos

- a) Conocer la diversidad y abundancia de microorganismos del filo Chloroflexota en sistemas de tratamiento de aguas residuales de lodos activados de nuestro país.
- b) Conocer su morfología y su inserción dentro de los flóculos.
- c) Determinar su velocidad de crecimiento en cultivos en batch.
- d) Conocer el efecto de cambios en la operación de los reactores sobre estos microorganismos para determinar las posibles causas del sobrecrecimiento.

5- Metodología / Plan de trabajo.

Actividad 1- Puesta a punto de los métodos

Puesta a punto de la cuantificación del número de copias de organismos del filo Chloroflexota mediante qPCR

Para cuantificar el número de copias de organismos del filo Chloroflexota en las muestras de los diferentes experimentos se utilizó la técnica de qPCR ya utilizada en un trabajo anterior (Bovio et al., 2019). Se utilizaron primers específicos para este filo (941F y 1223R), dirigidos a una región del ARNr de 16S. Se utilizó como estándar el producto de PCR del Clon 58 como se indica en (Bovio et al., 2019). El estándar proviene del análisis mediante clonado del gen del ARNr de 16S de una muestra de lodo de un reactor en el cual se detectó la presencia de este filo.

El protocolo de qPCR utilizado se muestra en el Anexo II. Para la curva de calibración se realizaron diluciones seriadas del producto de PCR de manera de tener $3.8E+4$, $3.8E+5$, $3.8E+6$, $3.8E+7$ copias/ng de ADN. Se obtuvo la curva de calibración que se muestra en la Figura 1.

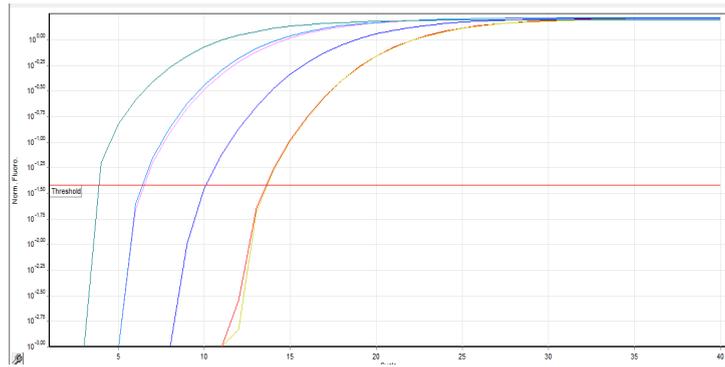


Fig. 1.- Curva de calibración qPCR del filo Chloroflexota

También se puso a punto la cuantificación de bacterias en general utilizando los primers Ba519f y Ba907r (Lueders et al., 2004) dirigidos a una región del ARNr de 16S. Como control positivo y para realizar la curva de calibración se utilizó el mismo Clon (C58) de Chloroflexota como cuantificación general de Bacteria (Fig. 2).

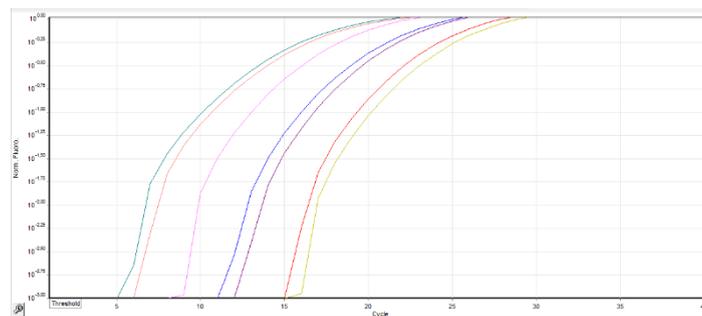


Fig. 2.- Curva de calibración de qPCR con primers para el Dominio Bacteria.

Técnica de FISH para el filo Chloroflexota

La técnica de FISH se utilizará para determinar la morfología y la posición dentro de los flóculos de los organismos del filo Chloroflexota en las muestras de los diferentes experimentos y plantas de tratamiento. Para la puesta a punto de FISH se utilizará un protocolo estandarizado como se indica en (Bovio et al., 2019).

Fijación de las células

El proceso de fijación de las células se hace de manera de dejar a la célula estática, se prepara la muestra con una solución fijadora (formaldehído) que en este caso se utilizará al 4%, esto lo que va a hacer es causar enlaces cruzados entre proteína-proteína o proteína-ácido nucleico, por lo cual a partir de este punto la célula ya no es viable.

Hibridación y lavado

Lo que se realiza en esta etapa es incubar la muestra con la sonda a 46°C en estufa durante 90 minutos a 4 hs, de manera que esto permite que la sonda puede hibridarse mediante complementariedad a nuestra secuencia blanco y una vez que ya se ha dado tiempo para que esto suceda se hace un lavado con buffer de lavado y así remover cualquier sonda sobrante, que no se haya hibridado (Fig. 3).

Finalmente se observa la morfología de las células que han hibridado con la sonda el equipo de microscopía confocal de epifluorescencia disponible en el IIBCE.

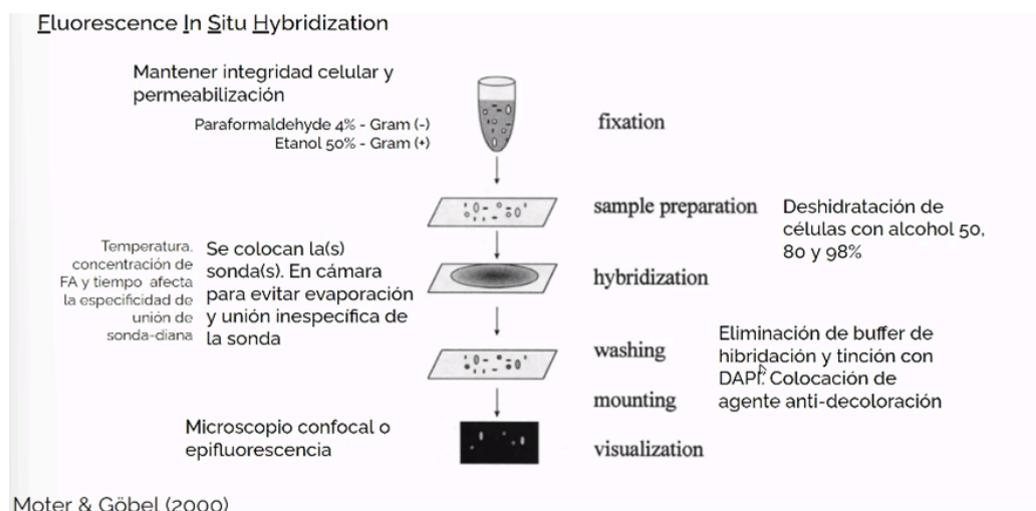


Fig. 3. Esquema mostrando las diferentes etapas del protocolo de hibridación in situ fluorescente (FISH).

En la Fig. 4 se observan micrografías tomadas con la técnica de FISH de muestras de reactores en la cual se localiza la bacteria *Chloroflexota* con morfología filamentosas. En “A” y “B” se puede observar filamentos finos y cortos, mientras que en “C” las estructuras filamentosas son más gruesas y segmentadas.

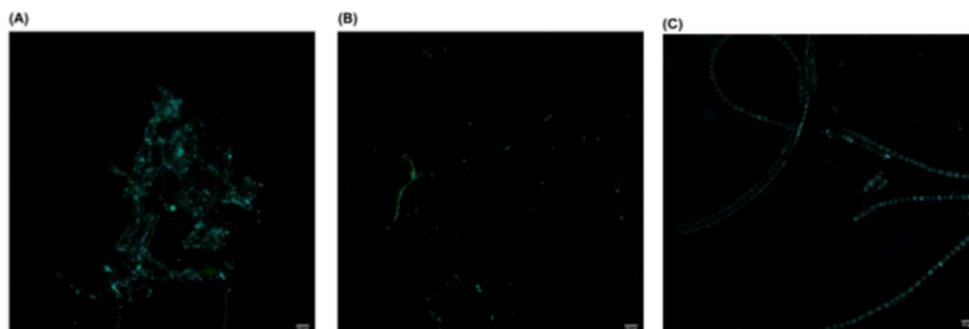


Fig. 4. Micrografía mostrando la morfología de bacterias filamentosas del filo Chloroflexota que hibridan con la sonda específica mediante FISH.

Determinación de la concentración de carbohidratos mediante la técnica de azúcares reductores por espectrofotometría

Esta metodología va a ser utilizada para el seguimiento del consumo de glucosa en los ensayos en batch que se realizarán para determinar la velocidad de crecimiento.

Esta es una técnica espectrofotométrica que se basa en la formación de un compuesto coloreado mediante una reacción del extremo reductor de los azúcares con el ácido di nitro salicílico (DNS). El detalle de la metodología se presenta en el Anexo 1 (Protocolo DNS para detección de azúcares reductores).

Para poner a punto esta técnica se preparó una curva de calibración a partir de una solución de glucosa de concentración conocida (Fig. 5).

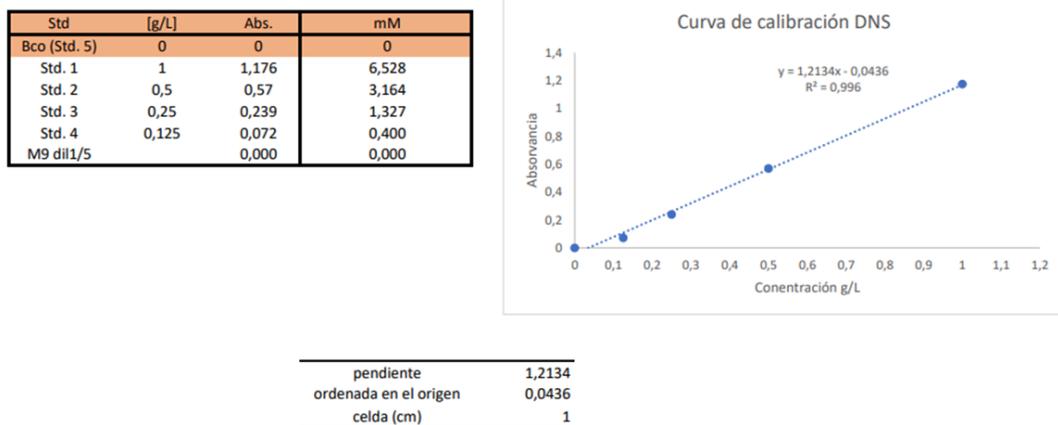


Fig. 5. Curva de calibración para el método de determinación de azúcares reductores por DNS

Esta curva permitirá luego determinar la concentración de azúcares reductores en las muestras de los ensayos de crecimiento con glucosa.

Actividad 2 - Experimentos para determinar la velocidad de crecimiento en cultivos en batch.

Se plantea operar biorreactores en batch para determinar la velocidad de crecimiento de los microorganismos del filo Chloroflexota y compararla con la velocidad de

crecimiento promedio de microorganismos del Dominio Bacteria. Para ello se operarán reactores en batch en condiciones aerobias y se determinará el número de microorganismos del filo Chloroflexota y el número de microorganismos del Dominio Bacteria por mL de cultivo en muestras tomadas a lo largo del tiempo mediante qPCR. Los experimentos se realizarán en frascos de vidrio de un volumen 2 L, utilizando 1 L de medio de cultivo más el inóculo para cada biorreactor. El experimento se realizará por duplicado, mientras que el tercer reactor se utilizará como blanco (inóculo más medio, sin sustrato).

Cada reactor tendrá una entrada de aire continua proporcionada a través de un motor aireador, con sistema de mangueras bifurcadas para la salida de 2 piedras porosas por biorreactor para facilitar la circulación del aire de forma turbulenta.

Para inocular los reactores en batch se utilizará biomasa de la planta de tratamiento de lodos activados de ABORGAMA que es una planta de tratamiento de residuos hospitalarios. Se eligió esta planta porque en estudios previos realizados en nuestro laboratorio se determinó mediante secuenciación masiva de amplicones del gen de ARN ribosomal de 16S que el filo Chloroflexota presentaba una alta abundancia (10-40%).

La aclimatación del inóculo se realizará mediante aireación por 24 hs. De esta manera se elimina la materia orgánica remanente.

Los biorreactores se inocularán con 100 mL de lodo aireado por 24 hs, se completará a volumen de 1 L con 680 mL de sales, 20 mL de solución de glucosa al 20% y 200 mL de medio mínimo M9 (Miller, et al., 1972) para cada reactor. Los biorreactores serán incubados a 37°C dentro de una incubadora.

El muestreo de los reactores se realizará durante 15 días tomando muestras cada 24 horas. Las muestras tomadas para extracción de ADN serán almacenadas a -20°C hasta su análisis. Se realizará la determinación de la concentración de glucosa en el sobrenadante de las muestras luego de centrifugadas utilizando la técnica de determinación de azúcares reductores (Miller et al., 1959).

Para realizar la cuantificación de los microorganismos del filo Chloroflexota y del Dominio Bacteria, se extraerá el ADN de las muestras almacenadas utilizando el kit Zymo/Quick-DNA FECAL/SOIL Microbe Miniprep D6010 y se realizará la determinación por qPCR como se indica en el Anexo 1. Se utilizará el equipo Rotor gene (Model 2PLEX RG-6000 Corbett) disponible en el IIBCE.

Actividad 3- Monitoreo de plantas de tratamiento de lodos activados a escala real que operan en nuestro país.

Se tomarán muestras de reactores a escala real de nuestro país, en la cual se realizarán muestreos semestrales o anuales a determinar. El muestreo lo está realizando el grupo de la Dra. Cabezas de UTEC, actualmente se han tomado muestras de unas 12 plantas de tratamiento de aguas residuales. En estas muestras se estudiará la comunidad microbiana mediante secuenciación masiva del gen del ARNr de 16S, se cuantificará la proporción de organismos del filo Chloroflexota mediante qPCR y se determinará su morfología y posición dentro de los gránulos mediante FISH. Las metodologías para cada una de estas determinaciones están descritas en el Anexo 1.

Actividad 4- Monitoreo de reactor escala laboratorio para determinar el efecto de los cambios de operación en la población de Chloroflexota.

Se realizará una serie de experimentos en un reactor de laboratorio para determinar el efecto de la variación de las condiciones de operación en los microorganismos del filo Chloroflexota.

Se estudiará el efecto del cambio del sustrato, para ello se alimentará el reactor primero con un sustrato compuesto por carbohidratos y una vez que el reactor esté operando en forma estable se cambiará la composición de la alimentación utilizando un sustrato proteico.

Para determinar si la lisis celular favorece el crecimiento de estos microorganismos se realizará un shock de pH alcalino provocando lisis celular.

Para determinar el efecto de las bacterias del filo Chloroflexota en la formación de flóculos se operará el reactor utilizando como inóculo el lodo disgregado (sin flóculos) de manera de observar el comportamiento de Chloroflexota durante la formación de flóculos. Cabe aclarar que el armado y la operación del reactor de laboratorio se llevará a cabo por la UTEC bajo la supervisión de la Dra. Cabezas, con modelos realizados en parte con tecnología de impresión 3D.

En todas las operaciones se extraerá muestras de la biomasa que serán fijadas para FISH y guardadas a -20oC para la extracción de ADN. Las muestras fijadas y el ADN extraído serán enviados al IIBCE. En estas muestras se determinará la composición de las comunidades microbianas mediante secuenciación masiva de amplicones del gen del

ARNr de 16S, se determinará la abundancia mediante qPCR y la morfología mediante FISH. Las metodologías a utilizar se describen en el Anexo 1. El monitoreo de este reactor de laboratorio se realizará en el marco de esta tesis.

6- Cronograma de actividades

N°	Descripción de la actividad	Año 1 (bimestre)						Año 2 (bimestre)					
		1°	2°	3°	4°	5°	6°	1°	2°	3°	4°	5°	6°
1	Cursos de posgrado.	X	X	X	X	X	X		X				
2	Búsqueda bibliográfica	X	X	X	X			X	X				
3	Puesta a punto de las técnicas		X	X									
4	Experimentos para determinar la velocidad de crecimiento en cultivos en batch			X	X	X	X						
5	Monitoreo de plantas de tratamiento escala real					X	X	X	X	X	X		
6	Monitoreo de reactor de laboratorio							X	X	X	X		
7	Escritura de la tesis										X	X	X
8	Defensa de Maestría												X

Cursos de posgrado

CURSOS	FECHA	CRÉDITOS	Hs.	AÑO 2023
La educación ambiental en la gestión ambiental	11 al 14 de junio de 2019	2	30	
Literatura y Comunicación Científica	02 al 09 de marzo de 2020	4	60	
Abordagens metabólicas e de caracterizacáo microbiana em microbiomas e biorrefinarias anaeróbicas	03 de agosto al 16 de noviembre de 2022	4	30	
Producción de energía y compuestos con valor agregado mediante procesos microbianos	14 al 25 de Noviembre del 2022	11	80	
Aplicaciones de la PCR en tiempo real a la investigación 2022	5 y el 9 de diciembre de 2022 (recurso 23 al 30 OCT. 23)	5	34	
Introducción a la línea de comandos y a la programación para análisis bioinformáticos	24 de julio y el 10 de agosto de 2023	8	66	
Gestión, Evaluación y Preparación de Proyectos	10 al 21 de julio de 2023	6	30	
Tecnologías de revalorización de residuos y subproductos agroalimentarios	25 de octubre al 1 de diciembre 2023	5	40	

7- Resultados esperados y perspectivas

Mediante el ensayo en batch se espera obtener las curvas de crecimiento de microorganismos del filo Chloroflexota y del dominio Bacteria. Se espera que los microorganismos del filo Chloroflexota tengan una curva de crecimiento menor comparada con la curva de los microorganismos del Dominio Bacteria. Se espera ver un aumento del número de copias de ambos grupos de microorganismos concomitantemente con el consumo de glucosa.

Se espera monitorear diferentes plantas de lodos activados que operan en Uruguay de forma mensual o anual para comparar la abundancia relativa de bacterias Chloroflexota mediante qPCR. Se espera conocer cuales son los microorganismos de este filo que predominan mediante el análisis de las comunidades microbianas por secuenciación masiva de amplicones del gen del ARNr de 16S. Mediante el análisis de estos resultados se espera determinar si hay algún tipo de operación o algún tipo de agua residual que favorezca el crecimiento de estos microorganismos.

Mediante el monitoreo del reactor de laboratorio se espera determinar cuáles condiciones de las utilizadas favorecen el crecimiento de los microorganismos del filo Chloroflexota.

8- Bibliografía

- Amann, R. I., and Fuchs, B. M. (2008). Single-cell identification in microbial communities by improved fluorescence in situ hybridization techniques. *Nat. Rev. Microbiol.* 6, 339–348. doi: 10.1038/nrmicro1888
- Balcárcel G., L. M., Erazo H., P. N., Vides G., A. M., & Ramírez P., A. (2014). Parámetros fisicoquímicos asociados a la proliferación de bacterias filamentosas (Bulking filamentoso) en las plantas de tratamiento de aguas residuales mediante lodos activados: revisión sistemática. *Hechos Microbiológicos*, 3(2), 47–58. <https://doi.org/10.17533/udea.hm.18736>
- Quiblier, C., Wood, S., Echenique-Subiabre, I., Heath, M., Villeneuve, A., Humbert, J-F. (2013). A review of current knowledge on toxic benthic freshwater cyanobacteria—ecology, toxin production and risk management. *Water Res.* 15, 5464–5479. doi: 10.1016/j.watres.2013.06.042
- Cotto, A., Looper, J. K., Mota, L. C., & Son, A. (2015). Quantitative polymerase chain reaction for microbial growth kinetics of mixed culture system. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25(11), 1928–1935. <https://doi.org/10.4014/jmb.1503.03090>
- Daigger, G. T. (2014). “Arden and Lockett remembrance,” in *Activated Sludge - 100 Years and Counting*, eds D. Jenkins, and J. Wanner, (London: IWA Publishing), 1–15.
- Gaget, V., Lau, M., Sendall, B., Froscio, S., and Humpage, A. R. (2017). Cyanotoxins: which detection technique for an optimum risk assessment? *Water Res.* 118, 227–238. doi: 10.1016/j.watres.2017.04.025
- Jenkins, D., and Wanner, J. (2014). *Activated Sludge-100 Years and Counting*. London: IWA Publishing.
- Kragelund, C., Levantesi, C., Borger, A., Thelen, K., Eikelboom, D., Tandoi, V., et al. (2007a). Identity, abundance and ecophysiology of filamentous Chloroflexi species present in activated sludge treatment plants. *FEMS Microbiol. Ecol.* 59, 671–682. doi: 10.1111/j.1574-6941.2006.00251.x
- Lofrano, G., and Brown, J. (2010). Wastewater management through the ages: a history of mankind. *Sci. Total Environ.* 408, 5254–5264. doi: 10.1016/j.scitotenv.2010.07.062
- Lopez, I. (2016) The potential of biogas production in Uruguay. *Renew Sustain Energy Rev* 54, 1580–1591. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2015.10.099>.
- McIlroy, S. J., Kirkegaard, R. H., Dueholm, M. S., Fernando, E., Karst, S. M., Albertsen, M., et al. (2017a). Culture-Independent analyses reveal novel Anaerolineaceae as abundant primary fermenters in anaerobic digesters Treating waste activated sludge. *Front. Microbiol.* 8:1134. doi: 10.3389/fmicb.2017.01134

- Miller, G. L. (1959). Modified DNS method for reducing sugars. *Anal Chem*, 31(3), 426-428.
- Nielsen, P. H., Daims, H., Lemmer, H., Arslan-Alaton, I., and Olmez-Hanci, T. (2009a). *FISH Handbook for Biological Wastewater Treatment*. London: IWA Publishing.
- Nielsen, P. H., and McMahon, K. D. (2014). “Microbiology and microbial ecology of the activated sludge process,” in *Activated Sludge – 100 Years and Counting*, eds D. Jenkins, and J. Wanner, (London: IWA Publishing), 53–75.
- Nierychlo, M., Milobedzka, A., Petriglieri, F., McIlroy, B., Nielsen, P. H., and McIlroy, S. J. (2019). The morphology and metabolic potential of the Chloroflexi in full-scale activated sludge wastewater treatment plants. *FEMS Microbiol. Ecol.* 95:fiy228. doi: 10.1093/femsec/fiy22
- Noguera, D. R., Wright, E. S., Camejo, P., and Yilmaz, L. S. (2014). Mathematical tools to optimize the design of oligonucleotide probes and primers. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98, 9595–9608. doi: 10.1007/s00253-014-6165-x
- Bovio, P., Cabezas, A., & Etchebehere, C. (2019). Preliminary analysis of Chloroflexi populations in full-scale UASB methanogenic reactors. *Journal of Applied Microbiology*, 126(2), 667–683. <https://doi.org/10.1111/jam.14115>
- Puyol, D., Batstone, D. J., Hülsen, T., Astals, S., Peces, M., and Kromer, J. O. (2016). Resource recovery from wastewater by biological technologies: opportunities, challenges, and prospects. *Front. Microbiol.* 7:2106. doi: 10.3389/fmicb.2016.02106
- Seviour, R. J. (2010a). “Factors affecting the bulking and foaming filamentous bacteria in activated sludge,” in *Microbial Ecology of Activated Sludge*, eds R. J. Seviour, and P. H. Nielsen, (London: IWA Publishing), 139–168.
- Speirs, L. B. M., Rice, D. T. F., Petrovski, S., & Seviour, R. J. (2019). The Phylogeny, Biodiversity, and Ecology of the Chloroflexi in Activated Sludge. *Frontiers in Microbiology*, 10(September). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02015>
- Thiel, V., Fukushima, S. I., Kanno, N., & Hanada, S. (2019). Chloroflexi. *Encyclopedia of Microbiology*, 651–662. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809633-8.20771-1>
- van Loosdrecht, M., Seah, H., Wah, Y. L., and Cao, Y. (2014). “The next 100 years,” in *Activated Sludge - 100 Years and Counting*, eds D. Jenkins, and J. Wanner, (London: IWA Publishing), 407–424.
- Wanner, J., and Jobbagy, A. (2014). “Solids separation,” in *Activated Sludge - 100 Years and Counting*, eds D. Jenkins, and J. Wanner, (London: IWA Publishing), 171–194.
- Yamada, T. and Sekiguchi, Y. (2009) Cultivation of uncultured Chloroflexi subphyla: significance and ecophysiology of formerly uncultured Chloroflexi “subphylum I”

with natural and biotechnological relevance. *Microbes Environ* 24, 205–216.
<https://doi.org/10.1264/jsme2.ME09151S>.

ANEXO 1

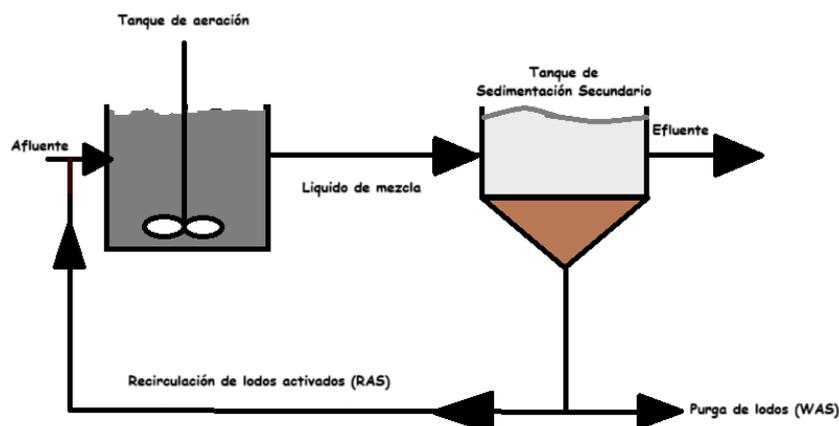


Figura 1- Anexo. Esquema de un sistema de tratamiento de lodos activados. Imagen propia.

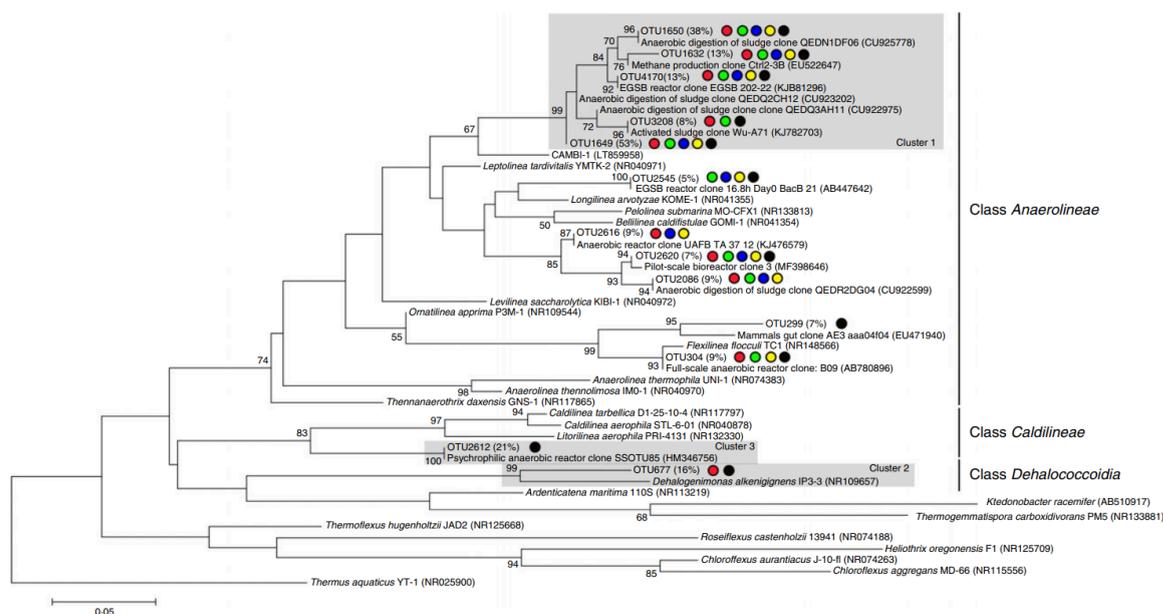


Figura 2- Anexo 1. Árbol del filo Chloroflexota construido en base a la secuencia del gen 16S rRNA, incluyendo clones ambientales, representantes cultivados pertenecientes al filo Chloroflexota y secuencias OTU clasificadas dentro del filo Chloroflexota (O) AL (O) COA (O) COB (O) SR (O) MO. Se muestran los valores de bootstrap (>50%) obtenidos con el método de máxima verosimilitud basado en 1000 replicaciones en los nodos de las ramas. *Thermus aquaticus* YT-1 fue utilizado como grupo externo. La barra indica 0.05 sustituciones por sitio. La abundancia relativa de las OTUs en las muestras se muestra entre corchetes. Se identificó cada reactor con una etiqueta diferente. Solo se utilizaron en el análisis las OTUs que superan el 5%. Extraído de Bovio et al., 2019.

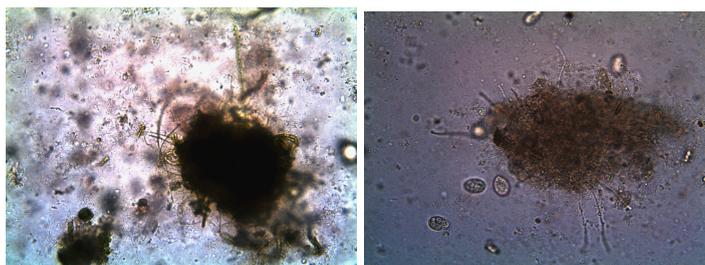


Figura 3- Anexo 1- Microfotografía mostrando la estructura de un flóculo ideal, redondeados, compactos y firmes. (imagen: Gerardo Viera)

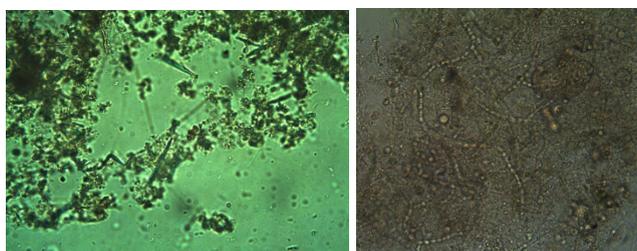


Figura 3- Anexo 1- Microfotografía mostrando la estructura de flóculos no ideales, muy disgregados y separados, no compactos. (imagen: Gerardo Viera)

Determinación de la concentración de azúcares reductores mediante la técnica del DNS

Se prepara el estándar de glucosa 1 g/L y a partir del mismo se hacen las diluciones.

Para la reacción con el reactivo, primero se agrega el agua, luego la muestra (o estándar) y el reactivo di nitro salicílico (DNS) al final en el volumen especificado en la tabla.

Estándar	Glucosa g/L	Volumen standard (μL)	Volumen H ₂ O destilada (μL)	Volumen DNS (μL)	Volumen final (μL)
Std 1	1	500	0	250	750
Std 2	0.5	250	250	250	750
Std 3	0.25	125	375	250	750
Std 4	0.125	62.5	437.5	250	750
Std 5	0	0	500	250	750

	Volumen de muestra (μL)	Volumen de H ₂ O (μL)	Volumen DNS (μL)	Volumen final (μL)
Muestra	50	450	250	750

- Se hierve 5 minutos
- Se deja en hielo 1 minuto
- Se agrega 1 mL de H₂O
- Se deja a temperatura ambiente 15 min
- Se mide absorbancia en espectrofotómetro a 540 nm.

Técnica de hibridación in situ fluorescente (FISH)

1-Fijación

1. Centrifugar 1 volumen (300 μL) de la muestra a 5000 g, 10 min. Lavar el pellet con 1X PBS, centrifugar nuevamente y resuspender el pellet en 1X PBS (300 μL).
2. Adicionar 3 volúmenes (900 μL) de solución fría de PFA 4%.
3. Incubar por 2 a 18 hs a 4 °C (no más de 18 hs).
4. Centrifugar a 5000 g, 10 min. Descartar el sobrenadante y lavar el pellet con solución 1X de PBS. Centrifugar nuevamente a 5000 g, 10 min y resuspender en solución 1X de PBS (300 μL).
- 5, Agregar 1 volumen de Etanol (300 μL) y mezclar.
6. Almacenar a -20°C. Las muestras congeladas pueden almacenarse a -20°C por meses.

2-Secado

Colocar 10 µl de muestra en un portaobjeto, dejando secar al aire o estufa entre 46°C a 55°C.

Luego que la muestra esté bien seca sobre el portaobjeto se pasa a la etapa de deshidratación:

Con 1 mL de etanol 50% (25 mL de etanol y 25 mL de H₂O destilada) escurrir tocando la muestra indirectamente, dejar secar bien, repetir con alcohol 80% (40 mL de etanol y 10 mL de H₂O destilada) y 96% (48 mL de etanol y 2 mL de H₂O destilada). Siempre dejando secar bien entre alcohol y alcohol.

Los portaobjetos deshidratados se pueden almacenar varias semanas en un lugar seco y sin polvo.

3- Hibridación

Para la hibridación, se colocan 10 µL de buffer de hibridación.

Lo cual para preparar 2 mL de buffer por cada portaobjeto y las sondas utilizadas consiste en:

40 µL Tris-HCL 1M pH8

360 µL de NaCl 5M.

700 µL de formamida (35%, para sondas CFX 941 y 1223) o si queremos una formamida al 20% se coloca 400 µl de formamida.

900 µL de agua MiliQ esterilizada (o 1200 µL si la formamida la queremos al 20%).

2 µL de SDS (siempre se agrega SDS al final, sino precipita) SDS 0,01% (Amann, 1995).

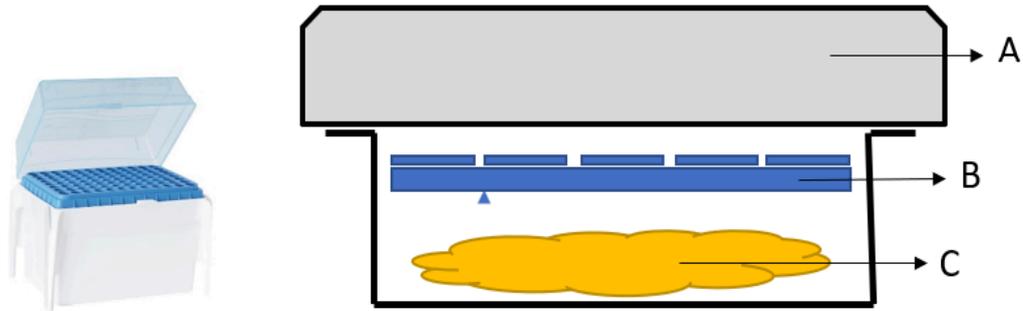
Preparar 2 mL de buffer de hibridación por porta, el buffer se prepara en el momento.

En paralelo se prepara un tubo eppendorf forrado con aluminio para hacer una solución stock del buffer de hibridación más 1 µl de cada una de las sondas [50 ng/µl] por porta (1223 Cy3 y 941 Cy3) (Björnsson, L., et al., 2002, Gich, et al., 2001) esta solución es la que va sobre las muestras previamente deshidratadas.

Por lo que si fuera para 5 muestras sería lo siguiente:

(10 µl de buffer de hibridación por porta) x 5 + (1 µl de sonda 1223) x 5 + (1 µl de sonda 941) x 5 = 50+10= 60 µl para 5 porta 12 µl c/u.

Para colocar los portaobjetos se prepara una caja de tips vacía forrada con aluminio (A) (para proteger de la luz) un soporte (B) (para apoyar los portaobjetos) y un pañuelo de papel (C).



Cámara húmeda de hibridación

Luego de colocado los 2 mL de buffer sobre la muestra deshidratada en el porta, el restante sobrante se vuelca en el pañuelo de papel dentro de una caja de tips (para que quede una cámara húmeda) y se incuba a 46°C por 90 min a 4 horas en oscuridad.

Lavado de porta en vasos de bohemia de 50 mL, para remover el buffer de hibridación. Con 1-2 mL de buffer de lavado calentado a 48°C.

<u>Para 50 mL:</u>	700 µL NaCl
1 mL Tris-HCl 1M pH 8	Agua MiliQ hasta 50 ml.
500 µL EDTA 0,5 M	50 µL de SDS (siempre agregar SDS al final, sino precipita)

El buffer de lavado se prepara en el momento del lavado y se agrega DAPI (concentración final 0,025 µg/mL para ello agregar 50 µl de DAPI 25 µg/mL para 50 mL de buffer de lavado) ante de distribuir en los vasos de bohemia (tener en cuenta 50 mL x 5 = 250 mL finales).

Preparación del DAPI (DAPI Sigma 5 mg, diluir en 1 mL STOCK). Para alicuotar, partir del stock y diluir 5 μ L del stock en 995 μ L H₂O, para obtener una solución 25 μ g/mL.

Disolver DAPI con agua nanopure para hacer una solución stock de 250 μ g/mL.

Alicuotar en eppendorf de 1 mL y almacenar en la oscuridad a -20°C (dura varios meses).

Sumergir el porta en buffer de lavado e incubar a 48 °C por 10 min.

Lavar cuidadosamente el porta con agua MiliQ o destilada fría y secar en la oscuridad a temperatura ambiente.

Una vez bien seco y protegiendo la muestra de la luz, colocar 3 μ L de citifluor (una gotita) por cada muestra, cubrir con cubre y sellar en los extremos con esmalte de uñas, y volver a proteger de la luz.

Finalmente se puede observar la muestra en un Microscopio Confocal Zeiss de epifluorescencia.

Extracción de ADN utilizando el kit “Quick-DNA Fecal/Soil Microbe Miniprep Kit” de Zymo Research

Colocar hasta 250 mg de muestra (lodo) al tubo de microesfera de cristal ①, más...

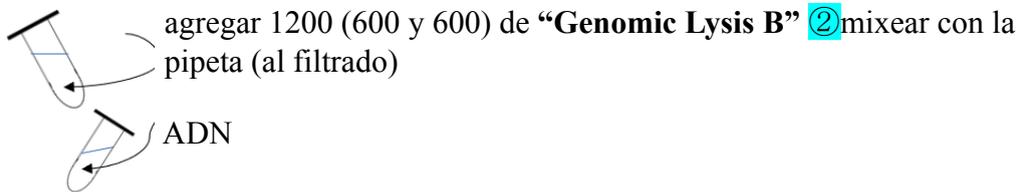
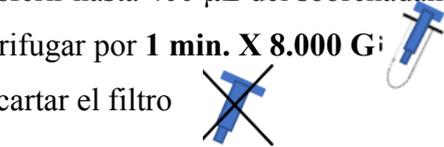
750 µL solución de lisis ① “Bashing Bead Buffer”, vortex 5 min con adaptador

Centrifugar **1 minuto x 10.000 G**

Transferir hasta 400 µL del sobrenadante a un tubo con filtro “II” ②

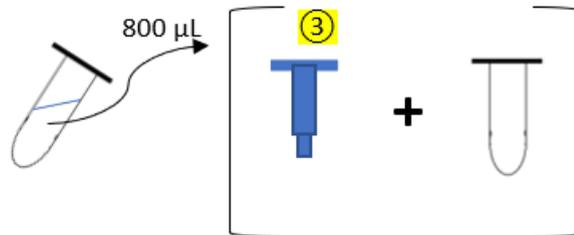
Centrifugar por **1 min. X 8.000 G**;

Descartar el filtro



*** transferir 800 µL para ello...

Colocar una columna “Spin Column II” ③ y transferir el contenido del paso anterior al nuevo tubo con la columna (centrifugar **1 min x 10.000 G**)

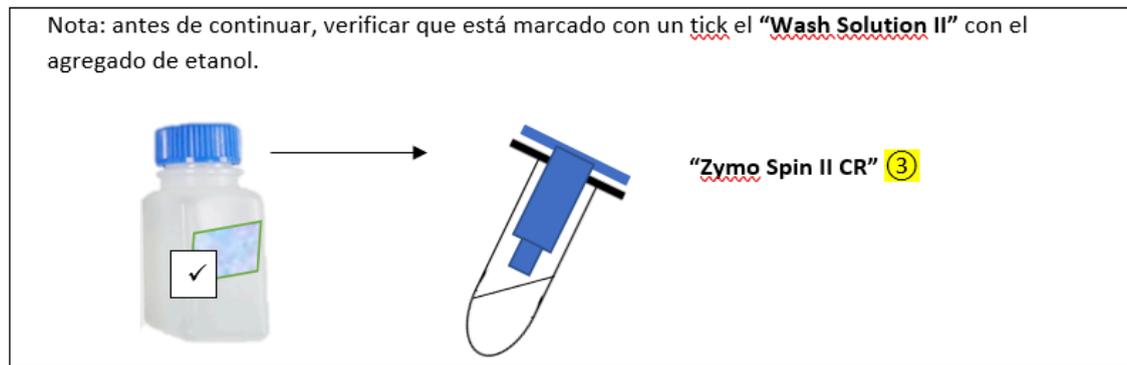


Descartar líquido (filtrado) me quedo con la columna.

Se puede reutilizar el tubo (repetir ***) $800 + 800 = 1600 \mu\text{L}$

Adicionar 200 µL de “pre-Wash Solution” ③ a columna ③ en un nuevo tubo

Centrifugar **1 min x 10.000 G**



Adicionar a la misma columna 500 μL de **“Wash buffer”** ④ centrifugue, **1 min x 10.000 G**

Descartar el filtrado, conservó la columna

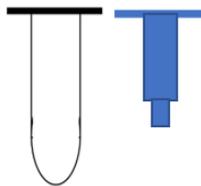
Colocar las columnas en un tubo de elución o ependorff

Adicionar 50 μL de ADN buffer de elución ⑤ a las columnas (en la matrix de la columna)

Y centrifugar **(1/2 min) x 10.000 G**

Activación de la columna ④ para purificación final del ADN:

Colocar un filtro **“Zymo-Spin III”** ④ en un tubo nuevo + 600 μL **“Pre Solution”** ⑥ centrifugar **(3min x 8.000 G)**



Una vez activado el filtro **“Zymo-Spin III”** ④ se transfiere los 50 μl de ADN y centrifugar por **3 min x 16.000 G**

Extracción de ADN listo para análisis o conservación a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

qPCR para microorganismos del filo Chloroflexota

Dilución de los primers

Se toma 5 μL del stock del primer 1223 R en 45 μL de agua MiliQ para un volumen final de 50 μL .

Se toma 5 μL del stock del primer 941F en 45 μL de agua MiliQ para un volumen final de 50 μL .

Para la reacción de PCR se utiliza el kit Quanti Nova Syber Green PCR Kit (Qiagen)

Volumen final 20 μL para cada muestra:

Mix Syber Green	10 μl	}	Master Mix
H ₂ O esterilizada	3,6 μl		15 μl + 5 μl de ADN = 20 μl
Primer 941F	0,7 μl		
Primer 1223R	<u>0,7 μl</u>		
	15 μl		

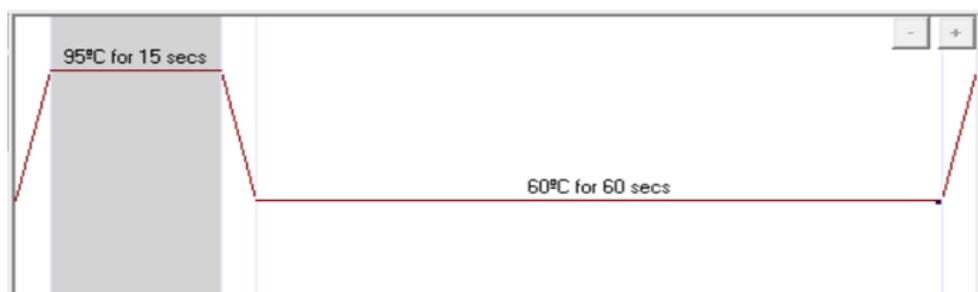
Para la muestras de ADN se hacen diluciones 1:10.

Tener en cuenta a la hora de hacer los cálculos de la cantidad de Master Mix los duplicados de las muestras, los puntos de la curva por duplicados, los NTC y una muestra más por error de pipeteo.

Total de muestras + 1 = volumen total de Master Mix.

Para el programa del Rotor Gene, se utiliza la siguiente rampa de temperaturas:

- Hold: 95°C por 2 minutos
- Ciclo: 95°C por 15 segundos X 40 ciclos
60°C por 60 segundos



Secuenciación masiva del gen del ARNr de 16S

La secuenciación de amplicones del gen del ARNr de 16S se realiza con primers dirigidos a la región v3-v4 en el servicio de secuenciación de la empresa Macrogen, Inc.

Para cumplir con los requisitos del proyecto, se solicita una concentración de ADN superior a 0.1ng/μl por muestra, que se evalúa mediante cuantificación de ADN utilizando el método de Picogreen. La preparación de la biblioteca se lleva a cabo mediante PCR con cebadores universales, seguido de la adición de índices y adaptadores utilizando el kit de índices Nextera XT.

La secuenciación se realiza en una plataforma Illumina MiSeq, utilizando un enfoque de extremo único de 300pb y se añade un 30% de PhiX para mejorar la calidad de la secuenciación como control externo. Se espera obtener 100k lecturas de datos crudos por muestra (Fastq), lo que equivale a aproximadamente 30Mb de datos por muestra.

Los cebadores universales utilizados para amplificar la región 16S V3-V4 son:

341F: CCTACGGGNGGCWGCAG

805R: GACTACHVGGGTATCTAATCC

Análisis bioinformático de los datos de secuenciación masiva

Las lecturas sin procesar (FASTQ) de cada estudio serán evaluadas para determinar la calidad de los nucleótidos y la contaminación de los adaptadores utilizando FastQC v0.11.5.1. Las lecturas sin procesar se procesarán mediante Trimmomatic v0.38 (Bolger et al., 2014) para eliminar lecturas ambiguas, adaptadores y secuencias de baja calidad, obteniendo así lecturas de alta calidad (ventana corredera: 4:25, minlen: 200). Para el análisis de secuencias paired-end mediante la tecnología Illumina, los datos preprocesados se importarán en QIIME2 v2023.7.

La demultiplexación de los datos sin procesar se realizará utilizando qiime cutadapt demux-paired con la configuración predeterminada. Las secuencias serán filtradas por

calidad mediante DADA2, donde se realizará el corte de secuencias y se descartarán quimeras y quimeras limítrofes utilizando el complemento qiime vsearch uchime-denovo (vsearch v2.7.0) con configuración predeterminada.

La clasificación taxonómica se llevará a cabo utilizando la base de datos pre entrenada MiDAS 4.8.1. Para el análisis multivariado, se empleará RStudio (R versión 4.2.1).