



Universidad de Concepción



FACULTAD DE CIENCIAS
AMBIENTALES

Aproximación al estudio de la viabilidad microbiológica del río Biobío y
su relación con variables ambientales

Habilitación presentada para optar al título de
Ingeniero Ambiental

CAMILA CONSTANZA DEL ROSARIO VÁSQUEZ CHÁVEZ

CONCEPCION (Chile), 2023



Universidad de Concepción



FACULTAD DE CIENCIAS
AMBIENTALES

Aproximación al estudio de la viabilidad microbiológica del río Biobío y su relación con variables ambientales

Habilitación presentada para optar al título de
Ingeniero Ambiental

Alumna: Camila Vásquez Chávez

Prof. Guía: Dr. Ricardo Figueroa Jara

Prof. Co-guía: Dr. Homero Urrutia Briones

CONCEPCION (Chile), 2022

“Aproximación al estudio de la viabilidad microbiológica del río Biobío y su relación con variables ambientales”

Profesor Guía: Dr. Ricardo Figueroa Jara



Profesor Co-Guía: Dr. Homero Urrutia Briones



Profesor Comisión: Dr. Mauricio Aguayo Arias



Profesor Comisión: Maria Elisa Díaz Burgos



CONCEPTO: APROBADO CON DISTINCIÓN MÁXIMA

Conceptos que se indica en el Título

- ✓ Aprobado por Unanimidad (En Escala de 4,0 a 4,9)
- ✓ Aprobado con Distinción (En Escala de 5,0 a 5,6)
- ✓ Aprobado con Distinción Máxima (En Escala de 5,7 a 7,0)

Concepción, julio 2023

Por el desarrollo libre del espíritu

Casilla 160 C - Correo 3 - Fono (56-41) 204072 - Fax (56-41) 2207076 - Ciudad Universitaria - Concepción - Chile -
<http://www.eula.cl>

ÍNDICE

1. Resumen	9
2. Introducción	14
2.1. Antecedentes.....	18
2.1.1. Aspectos normativos	24
2.1.2. Importancia de la comunidad microbiana.....	29
3. Pregunta de investigación	35
4. Objetivos.....	35
4.1. Objetivo general	35
4.2. Objetivos específicos.....	35
4.2.1. Objetivo 1	35
4.2.2. Objetivo 2	35
4.2.3. Objetivo 3	36
5. Metodología.....	36
5.1. Área de estudio	36
5.2. Muestreo y procesamiento de las muestras	40
5.3. Análisis de muestras	42
5.3.1. Tinción de viabilidad	42
5.3.2. Filtración de muestras	45
.....	46
5.3.3. Extracción y cuantificación de ADN	48
5.3.5. Cuantificación del ADN.....	54
5.3.6. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	56
5.3.7. Verificación de integridad del ADN por electroforesis.....	60
5.4. Análisis bioestadístico	61
5.4.1. Análisis de componentes principales	61
6. Resultados y discusiones.....	64
6.1. Análisis de muestras	64
6.1.1. Recuentos de viabilidad	64
6.1.2. Cuantificaciones de ADN	68
6.1.3. Verificación de integridad del ADN extraído con el protocolo inicial por electroforesis en gel de agarosa.....	70
6.1.4. Resultados de ensayo experimental para modificación del protocolo inicial de extracción de ADN.....	73
6.1.5. Protocolo optimizado de extracción de ADN.....	75

6.1.6.	Verificación de integridad del ADN de muestras usando protocolo optimizado de extracción a través de electroforesis en gel de agarosa.....	77
6.1.7.	Detecciones de bacterias y hongos por reacción en cadena de la polimerasa	80
6.2.	Análisis bioestadístico	82
6.2.1.	Análisis de componente principales	82
6.3.	Relación entre variables ambientales y datos de viabilidad microbiológica	95
6.3.1.	Correlación entre datos de viabilidad y variables fisicoquímicas	95
	104
7.	Discusión	109
8.	Conclusiones	112
9.	Referencias	113

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Clases de calidad propuesta por el MMA	27
Tabla 2.	Niveles de Calidad Ambiental normados por área de vigilancia en la cuenca del río Biobío	28
Tabla 3.	Áreas de vigilancia establecidas por NSCA-BB.....	28
Tabla 4.	Recuentos y porcentajes de viabilidad para estaciones de monitoreo pertenecientes al PMBB	65
Tabla 5.	Porcentajes de viabilidad menores a 40% y mayores a 60% para las respectivas estaciones de control pertenecientes al PMBB.....	67
Tabla 6.	Cuantificaciones de ADN y porcentajes de viabilidad de muestras pertenecientes a las estaciones de control del PMBB	68
Tabla 7.	Resultados de concentraciones y purezas de ensayo experimental para modificaciones al protocolo inicial de extracción de ADN	74
Tabla 8.	Diferencias entre protocolo inicial de extracción de ADN y protocolo optimizado de extracción de ADN.....	77
Tabla 9.	Rangos de correlación según su nivel de fuerza	84
Tabla 10.	Cargas de las variables pertenecientes al PMBB y NSCA-BB.....	87
Tabla 11.	Puntuaciones de los individuos correspondientes a las estaciones de monitoreo pertenecientes al PMBB (incluyendo Guaqui)	88
Tabla 12.	Cargas de las variables pertenecientes al PMBB y NSCA-BB.....	90
Tabla 13.	Cargas de las variables pertenecientes al PMBB y NSCA-BB.....	91
Tabla 14.	Puntuaciones de los individuos correspondientes a las estaciones de monitoreo pertenecientes al PMBB (sin incluir Guaqui).....	92

Tabla 15. Matriz de correlación para datos de variables ambientales pertenecientes a las estaciones de control del PMBB considerando Guaqui (dic-21, mar-22 y ag-22) con datos de calidad microbiológica (dic-21, mar-22 y ag-22) con datos de calidad microbiológica	95
Tabla 16 Matriz de correlación para datos de variables ambientales pertenecientes a las estaciones de control del PMBB sin considerar Guaqui (dic-21, mar-22 y ag-22) con datos de calidad microbiológica.....	97

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Principales industrias a lo largo de la cuenca del Río Biobío	38
Figura 2. Ubicación de las 19 estaciones del PMBB con sus respectivos códigos (Fuente: Programa de Monitoreo de la calidad del agua del sistema río Biobío).	41
Figura 3. Visualización de bacterias vivas a través de densidad óptica	44
Figura 4. Sistema de filtración de muestras de agua del río Biobío	46
Figura 5. Esquema general del procedimiento de extracción de ADN a filtros de éster celulosa	51
Figura 6. Recuento celular de medio líquido para ensayo experimental mediante Neubauer	52
Figura 7. Microorganismos, tamaños y aumentos	57
Figura 8. Programación de ciclos para detección de bacterias mediante los partidores 27F y 1492R	59
Figura 9. Programación de ciclos para detección de hongos mediante los partidores ITS1 y ITS2	59
Figura 10. Cámara de electroforesis para verificación del ADN por electroforesis en gel de agarosa	61
Figura 11. Base de datos de las 19 estaciones de monitoreo del PMBB para los 23 parámetros fisicoquímicos que son monitoreados por el NSCA-BB.....	63
Figura 12 Gel de agarosa al 1,2% corrido por 40 min a 80V para muestras pertenecientes al PMBB	71
Figura 13 Gel de agarosa al 1,2% corrido por 40 min a 80V para muestras pertenecientes al PMBB	72
Figura 14 Gel de agarosa al 1,2% corrido por 40 min a 80V para muestras pertenecientes al PMBB	72
Figura 15 Gel de agarosa al 1,2% corrido por 40 min a 80V	75
Figura 16 Geles A, B, C y D de agarosa 1,2%, corrido por 40 min a 80V para 13 muestras estudiadas usando el protocolo final de extracción.....	79
Figura 17 Gel de agarosa al 1,2%, corrido por 30 min a 80V para muestras estudiadas usando protocolo de PCR para detección de bacterias.....	81
Figura 18 Gel de agarosa al 1,2%, corrido por 30 min a 80V para muestras estudiadas usando protocolo de PCR para detección de hongos	82

Figura 19 Base de datos para las 23 variables ambientales pertenecientes a diciembre 2021, marzo 2022 y agosto 2022	83
Figura 20 Matriz de correlaciones entre variables ambientales correspondientes a Dic-2021, Mar-2022 y Ag-2022	84
Figura 21 Gráfico de sedimentación	85
Figura 22 Varianza explicada de las dimensiones.....	85
Figura 23 Representación gráfica de los pesos de las variables (incluyendo datos de GU-1)	86
Figura 24 Representación gráfica las puntuaciones de las estaciones para los meses marzo, agosto y diciembre (Incluyendo la estación de Guaqui)	87
Figura 25 Biplot del Análisis de Componentes Principales de variables ambientales para el período dic-21, mar-22 y ag-22 con respecto a las estaciones de monitoreo (incluyendo Guaqui)	89
Figura 26 Gráfico de sedimentación	90
Figura 27 Representación gráfica de los pesos de las variables (sin datos de la estación GU-1)...	91
Figura 28 Representación gráfica las puntuaciones de las estaciones para los meses marzo, agosto y diciembre (sin incluir la estación de Guaqui).....	92
Figura 29 Biplot del Análisis de Componentes Principales de variables ambientales para el período dic-21, mar-22 y ag-22 con respecto a las estaciones de monitoreo (sin incluir Guaqui)	93
Figura 30 Gráfico de dispersión con línea de tendencia lineal para Nitrato y recuento de células bacterianas viables (Incluyendo datos de Guaqui)	95
Figura 31 Diagrama de dispersión con línea de tendencia lineal para recuento total bacteriano y nitrógeno total (Sin datos de estación Guaqui)	98
Figura 32 Diagrama de dispersión con línea de tendencia exponencial para recuento total bacteriano y nitrógeno total (Sin datos de estación Guaqui)	99
Figura 33 Diagrama de dispersión con línea de tendencia lineal para recuento células bacterianas muertas y nitrato (NO ₃) (Sin datos de estación Guaqui)	99
Figura 34 Diagrama de dispersión con línea de tendencia exponencial para recuento células bacterianas muertas y nitrato (NO ₃) (Sin datos de estación Guaqui)	99
Figura 35 Diagrama de dispersión con línea de tendencia lineal para recuento total y fósforo total (Sin datos de estación Guaqui)	104
Figura 36 Diagrama de dispersión con línea de tendencia exponencial para recuento total y fósforo total (Sin datos de estación Guaqui)	104
Figura 37 Diagrama de dispersión con línea de tendencia lineal para concentración de ADN y hierro total (Sin datos de estación Guaqui)	107
Figura 38 Diagrama de dispersión con línea de tendencia exponencial para concentración de ADN y hierro total (Sin datos de estación Guaqui)	107

Agradecimientos

A mis padres por siempre seguir cada paso que doy, aconsejándome y aceptando mis virtudes y debilidades para aconsejarme queriendo lo mejor para mi y alentarme a ser mejor persona cada día.

A toda mi familia por darme la contención para no decaer en la constancia de seguir mis metas e intereses, por acompañarme en cada proceso a lo largo de la carrera y brindarme lo necesario para poder estudiar lo que me apasiono desde que termine el colegio.

A mis amigos por su apoyo motivacional, por siempre darme palabras de apoyo y estar presentes en mi vida durante los momentos buenos y malos.

A mis profesores, profesor guía Dr. Ricardo Figueroa y profesor co-guía Homero Urrutia por estar guiándome con sus conocimientos y observaciones para obtener los resultados esperados y ayudarme a ir adquiriendo a lo largo del proceso las herramientas necesarias para ser una buena profesional.

Al personal del laboratorio de Biopelículas y Microbiología Ambiental del centro de Biotecnología que me acogió e integro desde el primer día de trabajo y en especial a quienes se convirtieron en mis amigos a lo largo del camino y que se tomaron todo el tiempo para enseñarme nuevas metodologías y a fortalecer mis habilidades de trabajo en equipo.

Al Programa de Monitoreo del río Biobío, a cargo del centro EULA-Chile, por su importante labor de muestreo y generación de datos en la cuenca del Biobío.

AL CENTRO DE RECURSOS HÍDRICOS PARA LA AGRICULTURA Y LA MINERÍA
– CRHIAM, PROYECTO ANID/FONDAP/15130015.

1. Resumen

Todos los cuerpos de agua existentes en el planeta tanto de agua dulce como de agua salada, contienen o pueden contener microorganismos y dentro de los ecosistemas de agua dulce y en la microbiología del agua los grupos más significativos que podemos encontrar son: las bacterias, los virus, los hongos, las algas, y los protozoos, estos microorganismos dentro de los ecosistemas acuáticos pueden estar en suspensión en el agua o adheridos a superficies sólidas y su abundancia depende de su capacidad de supervivencia al utilizar los nutrientes disponibles.

Los microorganismos acuáticos juegan un papel importante en las redes tróficas y la dinámica de los ambientes acuáticos ya que cumplen diversas funciones fundamentales para el funcionamiento de ciclos biogeoquímicos y el ecosistema.

Una cuenca hidrográfica está compuesta por dos componentes: los ecosistemas terrestres que se instalan sobre las laderas de las montañas, y los ecosistemas acuáticos, los riachuelos y los ríos que drenan el agua de precipitación que no es evaporada, transpirada por un ecosistema acuático los vegetales, o percola en profundidad y alimenta los acuíferos. A una escala de tiempo histórica, el efecto de los ecosistemas terrestres sobre los acuáticos es preponderante. Las cuencas hidrográficas son sistemas integrados que entregan servicios a la sociedad y son una fuente de agua para todas las zonas ribereñas que la componen, de ahí la importancia de monitorear distintos parámetros de calidad que permitan mejorar la gestión del recurso hídrico para asegurar la salud de las personas y todos los seres vivos que la consumen.

En la actualidad debido a la creciente urbanización e industrialización se han generado diversos tipos de contaminación sobre los ecosistemas acuáticos y que

junto a los usos del suelo de sus cuencas hidrográficas, se ven impactados alterando las composiciones microbiológicas del agua y favoreciendo la aparición de microorganismos patógenos, es por esto que a nivel mundial sobre todo en países desarrollados existen diversas organizaciones y normativas para garantizar la calidad y seguridad del agua sin embargo, la mayoría de los países en vías de desarrollo cuentan con poca información de la calidad microbiológica considerando las variaciones temporales y espaciales que hay dentro de cuerpos de agua dulce que interfieren en la calidad microbiológica del agua como lo es en el caso de Chile, que dentro de la Norma chilena de calidad del agua (NCh 409/1) solo impone que dentro del agua para consumo que todas las muestras que se analicen deben estar exentas de *Escherichia coli*.

Este estudio considera el Programa de Monitoreo de la Calidad del Agua del río Biobío (PMBB) que es un programa que se creó en el año 1994 por el Centro EULA-Chile y en conjunto con las principales empresas que hacen uso de la cuenca han ido monitoreando el río Biobío por más de tres décadas, información relevante para observar patrones de comportamiento y relacionarlos con los datos microbiológicos. Al respecto, se analizaron muestra de agua pertenecientes al PMBB para 19 estaciones de control correspondientes a los meses de diciembre 2021, marzo 2022 y agosto 2022, analizando variables ambientales, incorporando análisis de viabilidad microbiológica tomando como criterio la evaluación de la integridad de las membranas celulares de los microorganismos en los distintos puntos de control a lo largo del curso del río Biobío para así cuantificar los microorganismos bacterianos viables y muertos a través de densidad óptica. Para los análisis también se aplicaron técnicas de biología molecular que permitieron la extracción y cuantificación del DNA de las muestras pertenecientes a las estaciones de control del PMBB para así luego realizar reacciones en cadena de la polimerasa PCR para detectar y confirmar la presencia de bacterias y hongos en las muestras de aguas.

Para establecer la relación entre datos de viabilidad y las variables ambientales, se realizó en paralelo un análisis de componentes principales (PCA) con datos históricos de los 23 parámetros fisicoquímicos que evalúa la NSCA-BB para las 19

estaciones de control pertenecientes al PMBB, para identificar patrones de comportamiento y las variables que lo explican. Esto se hizo mediante los softwares RStudio y Excel para luego correlacionar las variables fisicoquímicas con los datos de calidad microbiológica.

Para los resultados del Análisis de componentes principales de interés analizado que no incluye los datos de la estación de Guaqui debido a que esta presentó un comportamiento atípico, se pudieron identificar dos componentes principales: el componente principal 1 se identificó por patrones asociados a la dimensión 1 con respecto a nutrientes y estacionalidad por las variables de conductividad, fósforo total, nitrito (NO₂), temperatura, AOX y cloruros, y el componente principal 2 se identificó por patrones asociados a la dimensión 2 con respecto a caudal y erosión por las variables de nitrato, hierro total, aluminio total y nitrógeno total. Para obtener una mejor interpretación del comportamiento de los patrones identificados, se generó un Biplot que superpuso el gráfico de carga e individuos (estaciones) para determinar las interpretaciones del impacto de las cargas de las variables ambientales sobre las estaciones.

Respecto a los análisis de las muestras de agua del río Biobío en el laboratorio, las extracciones de ADN utilizando el protocolo inicial de extracción del kit comercial Qiagen, Kit DNeasy PowerSoil Pro, presentaron en su mayoría buenos resultados respecto a concentración y pureza del ADN extraído, sin embargo, el ADN presentó fallas en su verificación de integridad a través de electroforesis.

Por lo tanto, a razón de los anteriores se procedió a modificar algunos pasos con respecto a la manipulación de las muestras al utilizar el protocolo de extracción de ADN del kit comercial Qiagen, Kit DNeasy PowerSoil Pro, de manera de optimizarlo y adecuarlo a la calidad de procedencia de las muestras para obtener mejores resultados de calidad del ADN extraído. Las modificaciones del protocolo inicial de extracción se generaron a través de la realización de un ensayo experimental en el laboratorio, en donde se procuró; mantener la cadena de frío a -80°C durante la manipulación de las muestras, limitar el uso de material por tubo con perlas de lisis (Power Bead Pro Tube), limitar el tiempo de lisis mecánica de las muestras a través

del uso del equipo beadbeater y contemplar más solución del primer buffer de lisis (CD1) del kit de extracción.

El protocolo optimizado resulto mejorar los resultados de las muestras de aguas del río Biobío que no se habían sometido a extracción de ADN con el protocolo inicial y a través de estos resultados se propuso un protocolo adecuado a la procedencia de las muestras del PMBB. A través de las modificaciones que se realizaron al protocolo inicial de extracción de ADN se destaca el hecho de proponer el cuidado de mantener la cadena de frío de las muestras pertenecientes al PMBB desde el muestreo para así poder mejorar los resultados al aplicar técnicas de biología molecular en los futuros análisis que se requieran sobre las muestras pertenecientes al programa de monitoreo del río Biobío.

Al relacionar los datos de viabilidad bacteriana incluyendo las concentraciones de ADN de muestras de agua del río Biobío para las 19 estaciones de control del PMBB con los datos de los parámetros fisicoquímicos evaluados por la NSCA-BB, se pudieron generar interpretaciones finales con respecto a la correlación de variables que evidenciaron efectos toxicológicos provocados por variables fisicoquímicas que afectaron la viabilidad y la capacidad de supervivencia de las células bacterianas y (ej.: compuestos nitrogenados como NO_3 y NO_2) a través del análisis de componentes principales se logró identificar patrones de comportamiento que respaldan que los resultados de los efectos toxicológicos identificados y que son consistentes con estudios previos donde los cambios estacionales y espaciales en las variables ambientales tienen un efecto significativo en la viabilidad de la comunidad microbiana.

De manera más específica se lograron identificar los efectos que suceden con respecto a los compuestos nitrogenados, fósforo y hierro, frente a los recuentos de viabilidad.

Las bacterias nitrificantes regulan los efectos y los riesgos de eutrofización, que pueden tener la entrada del N alóctonos en los ecosistemas acuáticos meso-oligotróficos, ya que, mediante su metabolismo, consumen las formas inorgánicas y contribuyen al equilibrio del ciclo biogeoquímico (Xia et al. 2004; French et al. 2012).

Sin embargo, de los resultados se pudo observar como el exceso de cantidad de compuestos nitrogenados como nitrato (NO_3) y nitrito (NO_2) en el ecosistema acuático afecta la viabilidad de los microorganismos presentes en el agua. La alta presencia de nitrito en el agua tiene efectos tóxicos sobre los microorganismos en el sistema, inhibiendo la actividad celular y afectando la eficiencia de eliminación de nitrógeno y fósforo (Wang et al., 2019a; Zekker et al., 2021) e investigadores han considerado que un alto contenido de nitrito tiene un impacto tóxico en las células microbianas, interrumpiendo la desnitrificación y la eliminación de fósforo e incluso provocando la ruptura de las células microbianas y la liberación de polifosfato (poli-P) (Rey-Martínez et al., 2021; Zeng et al., 2014). Respecto a la presencia de nitrato se observó en los gráficos de dispersión su alta presencia produce que existan más células muertas que vivas, y es que el exceso de nitratos en el agua genera una serie de problemas para el entorno y la biodiversidad de la zona afectada por esta contaminación, agotando la cantidad de oxígeno disponible en el agua ocasionando la muerte de la vida acuática, aumento de la turbidez, aumento del grado de sedimentación y también afecta a las características organolépticas del agua, tales como olor, color, sabor.

Con respecto a el fósforo se observó un efecto positivo respecto al crecimiento bacteriano ya que a medida que aumenta la presencia de fósforo en el agua aumentaba la cantidad de células bacterianas. El fósforo actúa como un sustrato clave para la viabilidad de las células bacterianas, a mayor cantidad de fósforo aumentara a la vez la cantidad de células bacterianas totales debido a que es fundamental para la supervivencia de las bacterias, debido a que es esencial en la generación de energía (ATP) y es un componente químico importante de los ácidos nucleicos, azúcares, ácidos orgánicos y lípidos. Sin embargo, se menciona que un exceso de fósforo y en sus formas como ortofosfato provocan el crecimiento excesivo de algas las que rápidamente provocan un deterioro en la calidad del agua, produciendo un desequilibrio en la vida acuática conocido como eutrofización, provocando menor disponibilidad de oxígeno para organismos como peces y crustáceos, reduciendo así la biodiversidad y aumentando la sedimentación (Haygarth y col., 2005; Gerardi, 2006).

Otro efecto que se identificó fue la correlación positiva existente entre Hierro y Concentraciones de ADN, esto se explica debido a que este metal es esencial para el metabolismo celular como cofactor numerosas enzimas (Wandersman y Delepelaire, 2004), además de cumplir diversas funciones en procesos biológicos esenciales, como transporte de oxígeno, síntesis de ADN, fijación de nitrógeno, respiración y fotosíntesis (Greenshields et al., 2007).

2. Introducción

En la actualidad, escenarios como el cambio climático, el aumento demográfico y la creciente demanda de agua por parte del sector productivo, han elevado la preocupación por este recurso limitado y vital para el desarrollo de la vida como la conocemos. El recurso hídrico y el ciclo que conforma resulta determinante dentro de las dinámicas ecosistémicas, siendo el principal sostén para la realización de procesos como la fotosíntesis, el transporte de nutrientes y el hábitat de organismos acuáticos. (Hirji & Ibrekk, 2001).

Los ecosistemas fluviales de agua dulce han sido cruciales para la supervivencia de todos los seres vivos y en especial para los primeros asentamientos humanos, puesto que las cuencas hidrográficas constituyen áreas favorables para el aumento poblacional, disponiendo tierras fértiles, agua para irrigación, y suministro para la industria y la población (Vega et al, 1998). Durante el paso del tiempo se han visto procesos como la creciente urbanización e industrialización que han generado crecientes tipos de contaminación a los cuerpos de agua alterando los ciclos biogeoquímicos y en consecuencia las composiciones microbiológicas del agua. Los ríos y arroyos son ecosistemas únicos en el sentido de que representan un continuo de espacio y tiempo durante la transición desde la cabecera hasta la desembocadura del río. Asimismo, los paisajes ribereños y sus ecosistemas asociados poseen una gran relevancia, siendo la base de nuestro bienestar social, cultural y económico (Thoms et al, 2016).

El estudio de la microbiología del agua ha ido ganando protagonismo en todo el mundo ya que el análisis de los microorganismos a través de herramientas de la

microbiología aplicadas en la ecología y ligadas a la investigación medioambiental nos permite entender mejor cómo funcionan los ecosistemas acuáticos y como su estudio puede generar una expresión de cómo afectan la conexión de actividades antropogénicas y naturales conectadas sobre un ecosistema acuático.

Producto de las distintas actividades antropogénicas, se han generado diversas presiones al recurso hídrico, pudiendo mencionar, a modo de ejemplo, la agricultura, actividad que es la mayor consumidora de agua, usando alrededor del 70% del agua que se extrae de las diversas fuentes a nivel mundial. (Fundación Chile, 2017) y otras como la actividad industrial, agroindustrial, plantas de tratamiento de aguas servidas, etc., que son actividades antropogénicas que generan crecientes tipos de contaminación sobre la viabilidad microbiológica de las aguas.

Estas fuentes de contaminación que pueden proceder de fuentes naturales normalmente muy dispersas y no provocan concentraciones altas de polución, siendo poco significativas en contaminación microbiológica y menos con relación a patógenos; y de actividades humanas. Las posibles consecuencias producidas por fuentes de contaminación antrópica sobre la calidad microbiana en el agua son un tema importante respecto a la salud de las personas y enfermedades relacionadas con el agua de consumo, principalmente en países en vía de desarrollo.

En Chile, a partir del año 1980 la Constitución Política de la República establece el “derecho a vivir en un medio ambiente libre de contaminación”, y es a partir de ese primer hito que se comienza con una institucionalidad enfocada en la protección y conservación del medio ambiente. (Nieto, 2020). La norma NCh 409/1-2005: Agua Potable Requisitos, oficializada en el año 2006 por decreto del Ministerio de Salud N° 446 de fecha 16.06.2016, establece la calidad que debe cumplir el agua potable en todo el territorio nacional, en base a límites máximos permisibles para distintas sustancias esenciales, no esenciales, tóxicos y algunos contaminantes, compuestos y/o elementos de tipo microbiológico, físico, químico, radiactivo, organoléptico y de desinfección, de tal forma que pueda ser considerada apta para el consumo humano. Sin embargo, este documento que establece la calidad que debe cumplir el agua potable en nuestro país tiene una excesiva antigüedad y necesita incorporar

nuevas normativas con respecto a complementar las que protegen la seguridad y calidad del agua, poniendo énfasis en incorporar normas que contemplen en evaluar nuevos parámetros microbiológicos para asegurar el agua potable y todo tipo de fuente de agua para consumo, ya que esta norma solo considera dos aspectos fundamentales respecto al monitoreo microbiológico que son, efectividad-continuidad de la desinfección, mediante el seguimiento de las bacterias Coliformes totales y ausencia de contaminación fecal mediante la detección de *Escherichia coli.*, cuando en realidad a través de variados estudios a nivel mundial se conoce que este indicador (muy sensible a la desinfección) de microorganismos de origen fecal, es solo la punta del iceberg de los indicadores y estudios que se deben considerar a causa de los crecientes tipos de contaminantes que existen en el agua, que han favorecido la presencia de microorganismos patógenos (virus entéricos y protozoos) capaces de hasta sobrevivir a los procesos de desinfección de tratamiento de aguas servidas y captación. Producto de las ambigüedades que presenta la Norma Chilena sobre los requisitos que debe cumplir el agua potable, es importante mencionar que esta norma debe actualizarse al considerar no solo controlar la calidad microbiológica en los puntos de potabilización y tratamiento, si no que se deben contemplar estudios a nivel nacional que estudien las fuentes de aguas y su disponibilidad como por ejemplo en las cuencas hidrográficas del país y sus trayectorias con relación a su calidad para controlar las fuentes de contaminación que estén provocando un desbalance en los microorganismos y la aparición de microorganismos patógenos que pueden ser perjudiciales para salud de las personas y los seres vivos.

La Cuenca del río Biobío entrega diversos servicios a la sociedad y el medio ambiente de gran importancia para el país ya que es un ecosistema de múltiples usos, entre ellos el abastecimiento de agua potable e industrial, generación hidroeléctrica, riego, captación de efluentes urbanos e industriales, acuicultura, recreación y turismo, extracción de áridos y conservación de la biodiversidad (MMA, 2017), haciendo que hoy en día el Biobío se presente como un importante promotor de la economía regional. (Valdovinos y Parra, 2006). La cuenca del río Biobío es una fuente de agua para todas las zonas urbanas ribereñas de ahí la importancia

de monitorear no solo parámetros fisicoquímicos, sino que también en conjunto la calidad microbiológica de sus aguas.

En Chile existe la Norma Secundaria de Calidad Ambiental para aguas continentales y marinas (NSCA), definiendo el agua en términos de sus parámetros físicos, químicos y biológicos, pretende regular la presencia de contaminantes en el medio ambiente. El río Biobío cuenta con una NSCA para la protección de las aguas continentales superficiales del río Biobío (NSCA-BB; D.S. N°9/2015 MMA) que ha sido creada con el objetivo de “conservar o preservar los ecosistemas acuáticos y sus servicios ecosistémicos” a través de la mantención o mejoramiento de la calidad de las aguas de la cuenca (D.S N°9/2015 art.1); buscando controlar variables ambientales fisicoquímicas que pudiesen afectar o modificar el curso del río o el ecosistema acuático. Además el río Biobío también cuenta con el Programa de Monitoreo de la Calidad del Agua del río Biobío (PMBB), que se creó en el año 1994 por el Centro EULA-Chile en conjunto con las principales empresas a lo largo de la cuenca, monitoreando distintos parámetros fisicoquímicos desde hace más de tres décadas creando así un mapa de actualización continua de la calidad del agua de la cuenca a través de muestreos para los meses de marzo, agosto y diciembre de cada año, que corresponden a las condiciones extremas que presenta el caudal de la cuenca del río Biobío; máximo caudal por el invierno representando las altas precipitaciones en agosto, primavera en diciembre en relación a los procesos de máximos de deshielos y verano en marzo representando el período de estiaje con un mínimo caudal.

La importancia del PMBB y la NSCA-BB para este estudio residió en que para analizar la calidad microbiológica del río Biobío a lo largo de su trayectoria, se hizo uso de las muestras de aguas superficiales del río Biobío que ya habían sido recolectadas por el PMBB en específico para los meses mencionados anteriormente; diciembre (2021), marzo (2022) y agosto (2022) para las 19 estaciones de control monitoreadas por el PMBB y la NSCA-BB, que evalúan anualmente 23 variables fisicoquímicos (pH, conductividad, oxígeno, aluminio total, cloruros, coliformes fecales, DBO5, DQO, hierro total, fósforo total, fenol, nitritos,

nitratos, amonio, nitrógeno total, fosfatos, sólidos suspendidos, sulfatos, AOX, temperatura, color, clorofila a y clorofila total) de calidad de las aguas del río Biobío, cabe destacar que estas variables no incluyen parámetros microbiológicos para estudiar la viabilidad de los microorganismos en el río a excepción del análisis de coliformes fecales.

Hoy en día mejorar la calidad del agua en competencia con la escasez y presión sobre este recurso es un desafío presente en toda la población mundial sobre todo en aquellas con menos recursos para gestionar la calidad de sus aguas, por lo que poder estudiar y monitorear los componentes fisicoquímicos en relación con los microorganismos en el agua resulta de gran ayuda para tomar medidas que mejoren la calidad del agua y tomar decisiones adecuadas en su gestión como recurso para la sociedad y seres vivos, para así en consecuencia se pueda evitar a tiempo la propagación de microorganismos patógenos de origen hídrico que puede ser altamente perjudicial para la salud de todos los seres vivos y sobre todo para los humanos.

1.1. Antecedentes

La cuenca del río Biobío representa un importante centro de desarrollo económico y es la principal fuente de suministro de energía del país (Parra et al., 2013), a grandes rasgos tiene una superficie total de 24.260 km² lo que la convierte en una de las cuencas del país con mayor superficie, contiene 15 subcuencas, un orden 9 en su curso principal y posee un caudal promedio anual de 960 m³/s en la desembocadura del río, con máximos y mínimos medios de 1.600 m³/s (julio) y 160 m³/s (marzo), julio representando el mes con mayores precipitaciones y marzo el mes con más sequía en el río. Esta cuenca cumple un rol importante para el funcionamiento de la vida siendo una fuente de agua para todas las zonas urbanas ribereñas a lo largo de la cuenca que dependen de sus servicios ecosistémicos que entrega y que responde a 326 localidades pobladas, de las cuales 17 son ciudades y el resto lo conforman poblados con menor cantidad de habitantes y un número importante de 271 localidades rurales.

La cuenca del río Biobío posee distintos usos del suelo desde bosque nativo hasta zonas densamente pobladas, a la fecha contiene alrededor de 17 centrales hidroeléctricas instaladas y operando a la fecha, 7 de ellas en la Subcuenca del río Laja, 2 en el río Duqueco, 3 centrales en el curso principal y otras, con una producción que supera los 2800 MW y el número de instalaciones puede variar día a día con nuevos proyectos aprobados. Esta cuenta también cuenta con alta actividad industrial a lo largo de su trayectoria, sobre todo en la parte media y baja que generan un aporte de contaminantes a sus cursos de agua en donde la principal carga industrial que evacua el río corresponde a la industria forestal de celulosa y/o papel, localizadas desde Negrete hasta la desembocadura con tres plantas de celulosa: CMPC Pacífico, CMPC Santa Fe, CMPC Laja y una fábrica de papel, Papeles Biobío. Asimismo, destacan Iansa S.A una de las principales agroindustrias del país, sin embargo, su evacuación no es constante y Enap Refinería Biobío que se localiza cerca de la desembocadura del río Biobío. Otro uso relevante del río corresponde al de riego con un caudal total cercano a los 220 m³/s y con una capacidad de riego de aproximadamente 220.000 ha" (Stehr, et al., 2020).

Tanto en su curso principal como en sus afluentes o tributarios principales, en el sistema fluvial del río Biobío se distinguen las zonas ecológicas de rítrón, transición y potamón, que son determinantes para reconocer y comprender los factores que inciden en la calidad del agua y en la distribución de la biota acuática (Valdovinos y Parra 2003, Parra et al., 2013).

Otro factor en la dinámica del suelo en la cuenca recae en el cambio en el uso del suelo a nivel global, que ha sido alterado en alrededor de un 50% debido a la acción humana y es uno de los principales factores que han causado el cambio climático, y de toda la tierra que constituye nuestro planeta el 50 % está destinado actualmente para uso agrícola-ganadero sin dejar de mencionar como otro gran porcentaje ha sido destinado para el área forestal. Se estima que, durante los últimos 150 años, la mayor parte de los ecosistemas mundiales fueron afectados por el cambio de uso de la tierra. La mayoría de los impactos se han producido por la pérdida y/o

transformación de ecosistemas boscosos y praderas naturales en terrenos habilitados para el desarrollo agrícola, ganadero, forestal y urbano/industrial.

La dinámica en el uso del suelo de la cuenca del río Biobío a lo largo del tiempo corresponde al uso destinado a: Bosque nativo adulto, renoval de bosque nativo, matorral, estepa andina, plantaciones forestales, terrenos agropecuarios, cuerpos de agua, nieves y glaciares, áreas desprovistas de vegetación, humedales y áreas urbanas.

En lo que respecta a datos cuantificables de los usos del agua en la Cuenca del río Biobío, desde las nacientes hacia la desembocadura, destaca lo siguiente:

- A. Provisión de agua para una población de 970.000 habitantes, de los cuales 745.000 habitantes, se abastecen de aguas superficiales y 225.000 habitantes de aguas subterráneas.
- B. Producción actual de 2.337 MW como energía hidroeléctrica (aprox. Entre el 35 y 40% del consumo hidroeléctrico nacional) generado en 2 centrales de embalse y 9 de paso. En el corto plazo esta generación incorporará 316 MW con una Central de embalse (Angostura) y 34,4 MW de una central de paso (Central Laja).
- C. Riego de 211.800 hectáreas a través de una red de canales que conducen aprox. 158,5 m³/seg y con un número total de usuarios que alcanzan a 6.700 personas.
- D. Pesca deportiva en lagos y lagunas cordilleranas (Icalma, Galletué, Laja, Malleco y el Barco), así como también a lo largo de más de 150 km del mismo río Biobío y de los afluentes Laja, Lonquimay, Pangué, Huequecura y Duqueco.
- E. Camping y recreación con contacto directo en más de veinte sectores con infraestructura dedicada, ubicados en el río y sus principales cuencas afluentes, así como también en innumerables sectores informales aprovechados para estos fines por turistas y comunidad ribera.
- F. Turismo de paseo que aprovecha la combinación del paisaje y el río, disponible en toda la extensión de la cuenca.

- G. Abastecimiento de agua para industria alimentaria, forestal, pisciculturas, petroquímica, curtiembre y siderúrgica, con una producción de miles de toneladas por día que aportan más del 50 % del PGB regional.
- H. Receptor de efluentes industriales (aprox.11 m³/s). y receptor de efluentes domésticos tratados provenientes de 17 localidades urbanas correspondientes a 756.000 habitantes, con un caudal medio descargado de 1,6 m³/s.

(Datos obtenidos del monitoreo para la vigilancia ambiental de la cuenca del río Biobío 2019-2020).

En las últimas tres décadas alrededor de 300 mil hectáreas de la cuenca del río Biobío han experimentado cambios en el uso del suelo. Los usos del suelo que han sufrido las mayores pérdidas corresponden a terrenos agropecuarios, cobertura de nieves, matorrales y bosque nativo adulto. En dirección contraria, las coberturas que registraron ganancias corresponden a plantaciones forestales, estepa andina, áreas desprovistas de vegetación y renoval de bosque nativo (EULA, 2020). Los usos del suelo en la cuenca del río Biobío destinados a la cobertura de plantaciones forestales se encuentra compuesta principalmente por plantaciones de *Pinus radiata* y *Eucalyptus sp* que sustituyeron tierras cubiertas por bosque nativo, matorrales y praderas, las plantaciones forestales en la cuenca aumentan cada año a una tasa de promedio anual de casi 6 mil hectáreas, los usos del suelo destinados a terrenos agropecuarios en la cuenca corresponden a terrenos agrícolas y ganaderos y de estos se han perdido aproximadamente 135 mil hectáreas hasta el año 2020 y de esta cantidad de hectáreas perdidas el 78% es producto de la forestación, el 18% corresponde al abandono de los terrenos y el 2% es debido a la urbanización en la cuenca, los usos del suelo destinados a bosque nativo en la cuenca se clasifica según el tipo de bosque nativo teniendo así; bosque nativo adulto y renovales de bosque nativo, y de estos se ha perdido entre 1997 y 2015 alrededor de 18 mil hectáreas de bosque nativo adulto y una ganancia de 35 mil hectáreas de renovales y respecto a la pérdida de bosque nativo adulto esta se ha visto reemplazada por matorrales, terrenos agropecuarios y plantaciones (que producen la liberación de varios compuestos como nitrógeno y fósforo), el uso de la

cuenca destinado a matorrales ha tenido una pérdida de 31 mil hectáreas en donde el 58% de esta pérdida corresponde a reemplazo por plantaciones forestales, 33% por regeneración de renovales de bosques nativos y el 10% por terrenos agropecuarios, el uso del suelo ocupado por nieves y glaciares debido al cambio climático ha sufrido una pérdida de 100 mil hectáreas, el uso del suelo que ocupa la estepa andina ha presentado debido al cambio climático una ganancia de 71 mil hectáreas que está ligada directamente al derretimiento de nieves y glaciares que produjo el espacio para que se poblara de estepa andina, y por último respecto a las otros tipos de coberturas que posee la cuenca cabe destacar que " las áreas urbanas aumentaron casi al doble respecto a la superficie del año 1997 ocupando, fundamentalmente, terrenos agrícolas, matorrales y humedales. Asimismo, los cuerpos de agua incrementaron su superficie debido a la construcción de embalse para generación hidroeléctrica en la parte media alta de la cuenca" (Stehr, Barra, Parra, Habit, Urrutia, Saavedra, Aguayo, Baeza, Nieto, Figueroa, Azócar, Cárdenas., 2020, p. 70), y los humedales han perdido alrededor de 1900 hectáreas en especial por reemplazo de la urbanización y la industrialización en la zona metropolitana de Concepción.

La principal carga industrial que evacúa al río corresponde a la industria forestal de celulosa y/o papel, localizada desde Negrete hasta la desembocadura con tres plantas de celulosa: CMPC Pacífico, CMPC Santa Fé, CMPC Laja (la cual ha duplicado su producción en los últimos años) que descarga efluentes que poseen compuestos como sólidos suspendidos, nutrientes, materia orgánica disuelta, AOX, compuestos organoclorados, agentes quelantes, compuestos metálicos, entre otros. Otra carga industrial que evacúa al río proviene de una fábrica de papel, Papeles Biobío. Asimismo, destacan IANSA S.A una de las principales compañías agroindustriales del país, que comercializa azúcar y coproductos de la remolacha, sin embargo, su evacuación no es constante y ENAP Refinerías Biobío que se localiza cerca de la desembocadura del río Biobío. Otro uso corresponde al del riego para 220.000 ha aproximadamente (Figueroa et al., 2020). Estas intervenciones antrópicas, a nivel de la cuenca Hidrográfica del Biobío, han generado riesgos para la protección y conservación del medio ambiente, por ejemplo: deforestación de

laderas; erosión y pérdida de suelo; extracción de áridos; cambios en el caudal y régimen fluvial debido a la generación hidroeléctrica y abastecimiento para riego; y las fuentes difusas y puntuales que vierten a cuerpos receptores de la cuenca (Parra et al., 2009, 2013). Las descargas de aguas industriales también han generado impactos sobre el río, no solo en la calidad de sus aguas sino también en sus sedimentos (Orrego et al., 2006).

De la dinámica anterior descrita en la cuenca del río Biobío es que se pueden estimar los impactos por los diversos usos del suelo, y como las diversas actividades antropogénicas alteran los ciclos biogeoquímicos que se desarrollan en las aguas del río Biobío que en consecuencia alteran las composiciones microbiológicas que hay en el agua y la capacidad de los microorganismos acuáticos para desarrollarse y sobrevivir. Múltiples estudios han determinado que el deterioro en la calidad del agua se debe principalmente al crecimiento urbano no planificado y a las actividades de agricultura intensiva, que tienden a aumentar los niveles de nitrógeno, fósforo y DQO en aguas superficiales, incrementando la concentración de nutrientes y favoreciendo eventos de floraciones algales y eutrofización de los cuerpos de agua (Ullah et al, 2018). Por lo tanto, las actividades antropogénicas son las principales causas que aportan elementos ajenos a los cuerpos de agua, contaminándolos con diversos compuestos químicos o microorganismos, es con nuestras acciones que provocamos alteraciones que después se revierten en contra de nosotros mismos como especie. Por ejemplo, cuando se vierten las aguas del drenaje o aguas residuales a los ríos, lagos y océanos, les aportamos microorganismos, además de materia orgánica y compuestos químicos como fertilizantes y plaguicidas.

En la actualidad producto del deterioro de las aguas a causa de la presencia de zonas densamente pobladas y los crecientes tipos de contaminación, es que existen a nivel mundial numerosas organizaciones y normas establecidas para garantizar su calidad y seguridad dependiendo de la situación del país. En la mayoría de los países industrializados el agua potable está clasificada como alimento, y existen numerosas normas, establecidas para garantizar su calidad y seguridad, en estos países se han propuesto una serie de recomendaciones a corto y largo plazo, incluyendo el aumento de la vigilancia de las fuentes de agua y aguas de consumo

y la introducción de equipos de medición automáticos y permanentes, además de garantía del cloro residual hasta el sitio de disposición, los estrictos requisitos microbiológicos, especifican que el contenido bacteriano debe ser muy bajo y que los patógenos deben ser detectados y eliminados, sin embargo, en países en vías de desarrollo los sistemas de registro, vigilancia y control enfermedades de origen hídrico están establecidos, pero existe una falta de documentación, subregistro de procesos y casos, unido a sistemas de abastecimiento de agua potable en su mayoría ineficientes o, en peor caso, inexistentes. Por lo tanto, la existencia de normativas y su creación requieren de un diseño más elaborado respecto al control de la calidad microbiológica producto de la falta de control, eficiencia y documentación de parámetros microbiológicos en los ecosistemas acuáticos. Las recientes directrices y legislación impartida por la OMS afirman que el agua potable debe contener microorganismos patógenos sólo en un número tan bajo que el riesgo de contraer infecciones transmitidas por el agua esté por debajo de un límite aceptable. El cumplimiento de estos requisitos exige la protección de los recursos y el riguroso tratamiento del agua cruda, así como el control de calidad exhaustivo del proceso.

1.1.1. Aspectos normativos

En el caso de Chile, este cuenta con la norma NCh 409/1-2005: Agua Potable Requisitos, oficializada en el año 2006 por decreto del Ministerio de Salud N° 446 de fecha 16.06.2016, que establece la calidad que debe cumplir el agua potable en todo el territorio nacional, en base a límites máximos permisibles para distintas sustancias esenciales, no esenciales, tóxicos y algunos contaminantes, compuestos y/o elementos de tipo microbiológico, físico, químico, radiactivo, organoléptico y de desinfección, de tal forma que pueda ser considerada apta para el consumo humano. En donde el agua distribuida por los servicios públicos de agua potable debe cumplir con la Norma Chilena NCh409 /1.Of. 2005, respecto a las partes:

- Parte 1: Requisitos, que establece los requisitos de calidad que debe cumplir el agua potable en todo el territorio nacional.

- Parte 2: Muestreo, que establece requerimientos del Muestreo que se debe exigir a las concesionarias para el control del agua potable suministrada.

En donde se destaca que dentro de la parte 1 y los requisitos de tipo microbiológicos, que estos solo exigen aguas exentas de *Escherichia coli* sin considerar otros tipos de bioindicadores para asegurar la calidad del recurso hídrico. También cabe destacar que la normativa chilena solo considera el estudio para consumo desde las plantas potabilizadoras y no cuenta con estudios microbiológicos que comprendan los cuerpos de agua dulce en sus estados naturales para mejorar la toma de decisiones con respecto al control de vertidos, tratamiento de las aguas, conservación de ecosistemas y la prevención de enfermedades de origen hídrico.

A nivel nacional también se cuenta con las Normas Secundarias de Calidad del Agua (NSCA), instrumentos regulatorios cuyo objetivo es conservar o preservar los ecosistemas acuáticos a través del mantenimiento o mejoramiento de la calidad de las aguas continentales y marinas, estas normas secundarias buscan controlar el impacto de contaminantes de fuentes puntuales y difusas en la calidad del agua y su impacto en los ecosistemas. Uno de los objetivos que poseen las normas secundarias son: el mantenimiento de las buenas condiciones en subcuencas con poca intervención antrópica y en aquellas de alto valor de biodiversidad, especialmente donde se encuentran especies nativas amenazadas, es decir, con problemas de conservación.

Las Normas Secundarias de Calidad del Agua para la Protección de las Aguas Continentales Superficiales de la Cuenca del Río Biobío, D.S. N°9/2015, del Ministerio del Medio Ambiente nacen desde la base normativa ambiental del país que en el año 1994 dicta la Ley 19.300, que establece la dictación de normas para la protección de la salud humana y ecosistémica, dictando normas primarias o secundarias que determinan límites máximos o mínimos de contaminantes permitidos en el ambiente que pudiesen generar daño a la salud de la población o al ecosistema respectivamente.

En la región del Biobío, Chile, la creación de una Norma Secundaria de Calidad Ambiental (NSCA) para la cuenca del Río Biobío (D.S. 9/15 del MMA) tiene como principal objetivo conservar o preservar los ecosistemas acuáticos y sus servicios ecosistémicos, a través de la mantención o mejoramiento de la calidad de las aguas de la cuenca, reconociendo que la calidad actual es reflejo de las condiciones del sistema natural, el uso del suelo de la cuenca y el uso múltiple del recurso agua en las diferentes subcuencas. Las NSCA-BB trabajan monitoreando y controlando el río Biobío para 23 parámetros fisicoquímicos estableciendo límites de calidad estudiando límites propuestos por el MMA como se observa en la tabla 1 en conjunto con datos internacionales y a través de la base de datos históricos de las variables ambientales monitoreadas por el PMBB como se observa en la tabla 2.

La cuenca del río Biobío también posee para la gestión de sus aguas el PMBB como se menciona anteriormente, este programa se creó en el año 1994 por el EULA-Chile y se desarrolló entre el año 1990-1993 con el objetivo de crear una línea base que permitiera seguir la evolución de la calidad de las aguas de la cuenca del río Biobío y mantener a las autoridades y la comunidad informada para una mejor toma de decisiones sobre este recurso, para esto se debió contar con las empresas usuarias del río que generaron aportes financieros y técnicos al programa, entre las que destacan: CMPC Celulosa S.A., Compañía Siderúrgica Huachipato S.A., ENAP Refinerías Bío Bío, ENDESA S.A., ESSBIO S.A., Gacel S.A. (Curtiembre), Iansagro S.A., entre otras. El PMBB entregó la información científica que sustentó la participación en la Norma de Calidad NSCA-BB para la protección de las aguas continentales superficiales y la formulación del proyecto Fondef.

El PMBB se destaca por haber sido gestado y desarrollado sobre una sólida base científica, está estructurado sobre una realidad ambiental regional que considera referencias normativas nacionales en conjunto con la experiencia científica y el conocimiento sobre la cuenca, permitiendo generar el espacio para la colaboración entre los sectores público, privado y universitario, generando un instrumento de gestión ambiental local. Este programa de monitoreo nace ante la necesidad de tener un sistema de clasificación de la calidad del agua ante el uso múltiple del río

Biobío, sin embargo, cabe destacar que el PMBB y los distintos parámetros fisicoquímicos que evalúa para las estaciones monitoreadas por la NSCA-BB no incluyen una clasificación de calidad para los microorganismos a excepción de la medición de Coliformes Fecales. El grupo de bacterias coliformes se aplica como prueba general de monitoreo de calidad del agua y se ha utilizado en todo el mundo para llevar a cabo estudios de agua potable, contaminación de sistemas acuáticos, fuentes de contaminación de aguas residuales crudas y sistemas de tratamiento de aguas residuales y aguas recreativas (Rose, Grimes., 2001).

Por lo tanto, el PMBB no incluye variables microbiológicas ni el estudio de la viabilidad para la detección de microorganismos posibles a encontrar en un río y que pudiesen clasificarse desde su función beneficiosa o perjudicial para quienes hagan uso directo o indirecto de las aguas superficiales del río.

Tabla 1. Clases de calidad propuesta por el MMA.

Parámetro	Unidad	Clase 1 Excelente	Clase 2 Buena	Clase 3 Regular	Clase 4 Mala	Clase 5 Muy mala
Aluminio total	mg/l	0,09	0,72	1,17	1,62	>1,62
Amonio	mg N/l	0,02	0,03	0,06	0,09	>0,09
AOX	mg/l	0,002	0,006	0,03	0,05	>0,05
Cloruro	mg/l	2	7	54	100	>100
Coliformes fecales	N MP/100ml	5	50	1000	10000	>10000
Conductividad	uS/cm	60	80	150	220	>220
DBO5	mg/l	1	2	5	8	>8
DQO	mg/l	3	10	15	20	>20
Fenoles totales	mg/l	0,002	0,004	0,007	0,01	>0,01
Fósforo total	mg/l	0,02	0,03	0,1	0,2	>0,2
Hierro total	mg/l	0,15	0,74	1,1	1,47	>1,47
Nitrato	mg N/l	0,02	0,04	0,2	0,4	>0,4
Nitrito	mg N/l	0,002	0,003	0,01	0,02	>0,02
Nitrógeno total	mg/l	0,1	0,2	0,6	1	>1
Ortofosfato	mg P/l	0,01	0,02	0,11	0,2	>0,2
Oxígeno disuelto	mg/l	≥10	≥9	≥7	≥5	<5
pH	-	6,5-8	6,5-8,5	6,3-8,7	6-9	<6;>9
Sól. Susp. totales	mg/l	2	15	35	55	>55
Sulfato	mg/l	4	6	53	100	>100

Tabla 2. Niveles de Calidad Ambiental normados por área de vigilancia en la cuenca del río Biobío (Fuente: Datos históricos del PMBB).

Variable	Unidad	BI-10	BI-20	BI-30	BI-40	BI-50	BI-60	BU-10	DU-10	LA-10	LA-20	LA-30	MA-10	RE-10	VE-10
Aluminio Total	mg/l	0,4	0,4	0,4	0,5	0,7	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4
Amonio(N-NH4)	mg N/l	0,02	0,02	0,02	0,02	0,03	0,06	0,02	0,03	0,02	0,03	0,02	0,02	0,02	0,03
Comp. Org. Halog.	mg/l	0,002	0,01	0,03	0,03	0,02	0,03	0,01	0,02	0,002	0,006	0,01	0,002	0,002	0,03
Cloruro	mg/l	3	7	7	8	8	-	4	4	3	3	3	4	5	6
Colif. Fecales	NMP/100ml	50	50	500	500	1000	1000	1000	1000	50	50	500	50	50	500
Conductividad	µS/cm	80	90	150	150	150	-	80	120	80	95	150	60	60	80
DBO	mg/l	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
DQO	mg/l	5	5	8	8	5	7	9	6	3	3	8	6	7	10
Fosforo Total	mg/l	0,03	0,02	0,04	0,05	0,05	0,07	0,05	0,05	0,02	0,02	0,1	0,03	0,02	0,06
Hierro Total	mg/l	0,3	0,3	0,3	0,5	0,7	0,3	0,3	0,4	0,3	0,3	0,3	0,3	0,4	0,4
Índice Fenol	mg/l	0,003	0,004	0,005	0,004	0,004	0,004	0,003	0,003	0,002	0,003	0,003	0,002	0,002	0,004
Nitrato(N-NO3)	mg N/l	0,03	0,03	0,15	0,15	0,15	0,2	0,2	0,2	0,04	0,03	0,15	0,04	0,03	0,2
Nitrito(N-NO2)	mg N/l	0,002	0,002	0,003	0,002	0,002	0,01	0,006	0,003	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,01
Nitrógeno total	mg/l	0,2	0,2	0,2	0,3	0,3	0,3	0,4	0,6	0,1	0,1	0,3	0,2	0,1	0,4
Ortofosfato (PO4)	mg/l	0,01	0,01	0,01	0,02	0,02	0,1	0,02	0,01	0,01	0,02	0,02	0,01	0,01	0,05
Oxígeno Disuelto	mg/l	10	10	9	9	8,7	8,7	9	9	9	8,7	8,7	10	9	9
pH		6,5-8,5	6,5-8,5	6,5-8,5	6,5-8,5	6,5-8,5	6,5-8,5	6,5-8,5	6,5-8,5	6,5-8,5	6,5-8,5	6,5-8,5	6,5-8,5	6,5-8,5	6,5-8,5
Sol. Susp. totales	mg/l	8	4	7	8	9	8	10	5	2	2	5	5	5	6
Sulfatos	mg/l	5	6	6	14	14	-	5	5	7	6	6	5	5	10

Tabla 3 Áreas de vigilancia establecidas por NSCA-BB (Fuente: D.S. 9/15, MMA).

Cauce	Identificación PMBB	Identificación NSCA-BB	Límites Área de Vigilancia	Coordenadas UTM (referenciales)		Huso
				N	E	
Biobío	-	BI-10	Desde: Naciente río Biobío Hasta: Aguas arriba río Llanquén (Ralco)	5.711.543 5.769.355	310.452 298.618	19 S 19 S
	BB0 BB1	BI-20	Desde: Aguas arriba río Llanquén (Ralco) Hasta: Rucalhue	5.769.355 5.822.557	298.618 243.987	19 S 19 S
	BB3 BB4	BI-30	Desde: Rucalhue Hasta: Aguas arriba confluencia río Vergara	5.822.557 5.848.551	243.987 706.514	19 S 18 S
	BB7 BB8	BI-40	Desde: Aguas arriba confluencia río Vergara Hasta: Aguas arriba confluencia río Gomero	5.848.551 5.881.166	706.514 692.791	18 S 18 S
	BB11	BI-50	Desde: Aguas arriba río Gomero Hasta: Puente Mecano	5.881.166 5.921.259	692.791 672.524	18 S 18 S
	BB13	BI-60	Desde: Puente Mecano Hasta: Desembocadura boca Norte	5.921.259 5.925.241	672.524 663.277	18 S 18 S
	Bureo	BU2	BU-10	Desde: Naciente Río Bureo Hasta: Aguas arriba confluencia río Biobío	5.795.898 5.838.106	265.051 721.500
Duqueco	DU1	DU-10	Desde: Naciente Río Duqueco Hasta: Río Duqueco 12 km aguas arriba confluencia río Biobío	5.848.968 5.841.594	282.470 737.483	19 S 18 S
Laja	LA1	LA-10	Desde: Naciente río Laja Hasta: Bajo descarga central Antuco	5.861.863 5.866.808	288.085 262.499	19 S 19 S
		LA-20	Desde: Bajo descarga central Antuco Hasta: Aguas arriba confluencia río Caliboro	5.866.808 5.875.026	262.499 721.479	19 S 18 S
		LA-30	Desde: Aguas arriba confluencia río Caliboro Hasta: Puente Laja (Aguas arriba confluencia río Biobío)	5.875.026 5.872.804	721.479 701.995	18 S 18 S
Malleco	-	MA-10	Desde: Naciente Río Malleco Hasta: Angol	5.765.971 5.816.045	258.634 702.790	19 S 18 S
Renaico	-	RE-10	Desde: Naciente río Renaico Hasta: Aguas arriba confluencia río Vergara	5.770.174 5.828.763	263.010 707.171	19 S 18 S
Vergara	VE2	VE-10	Desde: Naciente río Rehue Hasta: Aguas arriba confluencia río Biobío	5.778.334 5.847.741	707.245 706.470	18 S 18 S
Guaqui	GU1	-	No es considerada en la NSCA	-	-	-

A lo largo de la cuenca del río Biobío y para los distintos puntos de control que monitorea el PMBB y la NSCA-BB como se describe en la tabla 3 se menciona que, para los tramos del curso principal y sus principales afluentes, de manera general y con el paso del tiempo, la calidad de sus aguas ha sido clasificada de calidad excepcional: transparentes, oxigenadas, muy blandas y oligotróficas, donde solo algunos parámetros puntuales disminuyen su calidad en los tramos inferiores y la desembocadura. Con respecto a los afluentes o tributarios monitoreados (ríos Laja, Guaqui, Bureo, Duqueco y Vergara) estos presentan también en la mayoría de los parámetros, una clasificación de sus aguas de calidad de Excepción, Muy Buena a Buena calidad, salvo en algunos tramos y parámetros puntuales. Destacando que los parámetros fisicoquímicos influyen en la calidad del agua cuando exceden los límites establecidos en la tabla 2, afectando la calidad del ecosistema acuático y su biodiversidad.

1.1.2. Importancia de la comunidad microbiana

Poder estudiar y contemplar parámetros microbiológicos en la gestión del recurso hídrico es fundamental para mejorar su calidad y seguridad ante el consumo del agua por parte de todos los seres vivos. Los microorganismos son parte fundamental de la vida del planeta y son un componente esencial de las redes tróficas en los ecosistemas acuáticos de agua dulce y salada, tanto en actividad como en cantidad de biomasa, contribuyendo a la regeneración de nutrientes e interactuando con una amplia gama de organismos. Los microorganismos acuáticos autóctonos que son capaces de vivir y multiplicarse en el agua, intervienen en diversos procesos químicos y biológicos que allí ocurren como la mineralización, producción de nutrientes para microorganismos quimio autótrofos, intervención de las cadenas alimentarias interconectadas, transformación de sustancias tóxicas y recalitrantes, modificación de materiales insolubles, intervención de la formación de sedimentos, disolución de partículas suspendidas, transformación de los sedimentos, transformación de los sedimentos depositados, contribución en todos los ciclos hidro geoquímicos como la génesis de la turba, lignito y petróleo y son los

principales responsables de la autodepuración de las aguas contaminadas. El crecimiento y las interacciones bacterianas están regulados por factores como:

- (i) Tipo y concentración de nutrientes orgánicos e inorgánicos disponibles
- (ii) Tipo y la concentración de sustancias inhibidoras
- (iii) Presencia de depredadores, como protozoos e invertebrados
- (iv) Condiciones ambientales, como la temperatura del agua
- (v) Ubicación espacial de los microorganismos

La compleja composición de nutrientes en los ecosistemas acuáticos fluviales suele dar lugar a la presencia de una gran diversidad de especies bacterianas autóctonas (Pinto et al., 2012 ; Yin et al., 2013 ; Liu et al., 2014), bien adaptadas a la supervivencia y proliferación en ambientes oligotróficos. Se ha demostrado que las comunidades bacterianas con alta riqueza y uniformidad son potencialmente más resistentes al crecimiento de especies bacterianas intrusivas y al estrés ambiental (Wittebolle et al., 2009 ; De Roy et al., 2013 ; Van Nevel et al., 2013). Por lo tanto, para comprender su función en los nichos específicos, es esencial identificar y cuantificar a los tipos de microorganismos que conforman estas comunidades, así como las actividades metabólicas que presentan, por lo que la detección e identificación de estos microorganismos permite inferir sobre la diversidad poblacional en la muestra y el estado de salud de las aguas.

Se estima que tan solo se conoce alrededor del 0.1 al 10 % de las bacterias del medioambiente (Torsvik et al., 2002), debido principalmente a que la mayor parte de los microorganismos no pueden ser aislados e identificados con los métodos de cultivo tradicionales (Barer y Harwood 1999, Crosi et al., 2007), por lo que, poder profundizar en la microbiología del agua a través de técnicas de herramientas moleculares aplicadas en la ecología para estudiar la viabilidad microbiana permite mejorar la toma de decisiones que mejoren la conservación y restauración de los ecosistemas acuáticos.

Para poder estimar la presencia de microorganismos como índice de salud de en un ecosistema acuático de puede utilizar como indicador la determinación la viabilidad microbiana, en el lenguaje común, el uso de términos de términos viable

y viabilidad refleja nuestra expectativa de que entidades puedan sobrevivir, o algo que pueda llevarse a cabo durante un período respectivamente.

En microbiología se define como la habilidad de una población microbiana para multiplicarse y producir una colonia macroscópica en un medio sólido o líquido apropiado produciendo turbidez. Operacionalmente, en una colección de cultivos microbianos, para determinar la viabilidad en el tiempo, se utiliza la capacidad de los microorganismos para multiplicarse y crecer en medios de cultivo bajo condiciones de laboratorio. Una metodología que permite evaluar la viabilidad en cultivos líquidos es la espectrofotometría, la cual estima el crecimiento bacteriano al detectar el incremento de la densidad óptica. La viabilidad en aquellos microorganismos que no crecen en medios de cultivo se puede determinar evaluando la integridad de la membrana celular como criterio de viabilidad. La membrana celular sustenta prácticamente todos los procesos que ocurren dentro de la célula, por ejemplo, es vital para la generación del gradiente electroquímico que se origina durante la producción de energía y la cadena transportadora de electrones (Castro et al., 2020).

En la evaluación de viabilidad por microscopía de epifluorescencia se permiten realizar conteos directos de células con membrana íntegra, para ello se utilizan tinciones fluorescentes utilizando tintes con ácidos nucleicos fluorescentes que tiñen células microbianas viables de color verde y células microbianas en color rojo aquellas que tienen sus membranas celulares dañadas.

A través de las tinciones de viabilidad para determinar el recuento de células vivas y muertas y el recuento total, considerando un rango de entre 40-60% respecto a los porcentajes de viabilidad se puede tener una mirada al estado de salud de las aguas del ecosistema acuático al correlacionar estos datos con los parámetros fisicoquímicos para entender los factores y fuentes que tienen un efecto en la supervivencia de los microorganismos. Porcentajes de viabilidad sobre un 60% indican la presencia de agentes estimulantes que favorecen la supervivencia de los microorganismos y su desarrollo, por otro lado, los porcentajes de viabilidad bajo un 40% indica la presencia en el agua de agentes estresores que disminuyen la

supervivencia de los microorganismos y su desarrollo. La salud de los ecosistemas influye directamente en la salud humana, pero determinar esta condición posee grandes dificultades debido a las dinámicas físicas, químicas y biológicas, y a la complejidad de los componentes e interacciones que poseen, requiriendo acercamientos multidisciplinarios (Norris & Thoms, 1999).

La viabilidad de los microorganismos en un ecosistema acuático depende de indicadores dentro de los cuerpos de agua que son fundamentales para su desarrollo y que expresan ciertos patrones de comportamientos en el agua (eutrofización, toxicidad, etc.). Ciertos indicadores corresponden a factores ambientales como la temperatura, la humedad, la disponibilidad de oxígeno, pH y la disponibilidad de nutrientes en el ecosistema que es un factor determinante principal del número de microorganismos que pueden existir en un ecosistema. Aunque cada uno de estos factores es importante y puede limitar el crecimiento, son sus efectos combinados los que determinan generalmente si tendrá lugar el crecimiento y dadas las condiciones de crecimiento convenientes, que tipos de microorganismos crecerán y con que rapidez.

La viabilidad de los microorganismos en el agua depende ciertos macronutrientes como C, O, N, P, S, K, Na, Ca, Fe y micronutrientes como Mn, Mg, Cu, Sn, Mo. Estos nutrientes están referidos a componentes químicos inorgánicos necesarios para sustentar la vida y suplir recursos para procesos biológicos. Estos nutrientes ingresan a los ríos mediante aguas subterráneas y escorrentías, o desde la atmósfera y son incorporados al sistema mediante la fijación biológica o asimilación. (Allan y Castillo, 2007)

La productividad de un sistema, referida a la velocidad de fijación de carbono durante la fotosíntesis, está limitada energéticamente por el carbono orgánico (C) disponible, y biológicamente por N y P, siendo estos los nutrientes con mayor influencia para la productividad algal bentónica. (Cabrera y Montecino, 1987; Allan y Castillo, 2007). En la actualidad, el aumento no deseado de nutrientes fosforados y nitrogenados debido a procesos antrópicos ha favorecido los procesos de eutrofización, estimulando el crecimiento de algas y plantas acuáticas y

disminuyendo la calidad de los cuerpos de agua. (Parra, 1989) y por lo tanto afectando la biodiversidad de los ecosistemas acuáticos.

Desde un punto de vista geológico, el cambio de estado trófico de un cuerpo de agua es un proceso natural que ocurre a escala de cientos a miles de años, conocido como eutrofización natural (Ryding & Rast, 1992). Sin embargo, la intervención antrópica, principalmente a través de cambios en el uso del suelo (ej. Deforestación, ganadería, agricultura, etc.), crecimiento urbano (descargas de aguas servidas) y expansión de actividades industriales (efluentes industriales, acuicultura, etc.), pueden acelerar este proceso, generando el cambio a una escala de años y/o décadas, denominándose eutrofización cultural (Parra, 1989).

Otro indicador para determinar la presencia de los microorganismos a considerar con respecto a su viabilidad deriva de las concentraciones de ADN que resultan de las extracciones y los resultados de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para detección de microorganismos. Los datos moleculares han permitido estudiar con mayor precisión los patrones de diversidad genética y su distribución; el comportamiento; la selección natural; las interacciones biológicas; la composición, funcionamiento y dinámica de comunidades microbianas; las relaciones filogenéticas, entre otros (Sunnucks 2000; Schlötterer 2004; Hudson 2008).

Estas técnicas moleculares son importantes para el monitoreo microbiológico del agua y su diagnóstico empleando la detección directa de los ácidos nucleicos. La extracción de ADN es un paso esencial en la aplicación de técnicas moleculares ya que su obtención exitosa otorga datos confiables y reproducibles, que dependen en gran medida, del procedimiento de extracción que arrojen resultados de un ADN íntegro y puro. Antes de comenzar con la extracción de ADN es fundamental aplicar a todo tipo de muestra el procedimiento de homogenización, mecánica o química, que consiste en romper las uniones entre las células para facilitar la interacción con las soluciones de lisis que ayudan a liberar el material genético. Una buena homogenización entregara resultados óptimos esperados.

En la actualidad, el estudio de la variación genética entre individuos, poblaciones y especies para explicar patrones y procesos ecológico-evolutivos se aborda

mediante marcadores moleculares, segmentos de ADN con o sin función conocida que proporcionan información sobre la variación alélica y permiten distinguir individuos (Schlötterer 2004). Estos marcadores se obtienen con técnicas como la PCR (por las siglas en inglés de Polymerase Chain Reaction). En una PCR, una secuencia específica de destino de interés en el genoma de una muestra se amplifica para producir múltiples copias que luego pueden caracterizarse utilizando una amplia variedad de diferentes técnicas como por electroforesis que es la técnica utilizada para este estudio.

Cabe destacar que la colecta de muestras y el manejo adecuado de éstas son indispensables para una extracción del ADN exitosa. Una colecta y manejo apropiado de la muestra permite obtener ADN integro y sin contaminantes, los cuales afectan la acción de las enzimas durante la reacción de PCR.

Por lo que determinar la presencia o aumento de bacterias, parásitos, virus y hongos en el agua a través de herramientas microbiológicas del agua aplicadas en la ecología permiten entender la relación que surge usualmente por efecto directo o indirecto de cambios en el medio ambiente y en la población tales como urbanización no controlada, crecimiento industrial, pobreza, ocupación de regiones antes deshabitadas, y la disposición inadecuada de excretas humanas y animales, contemplando distintos parámetros fisicoquímicos de calidad del agua.

Aunque la presencia de microorganismos de transmisión hídrica no está limitada a una región específica en el mundo, o a su nivel de desarrollo, los problemas de desplazamiento, la respuesta ineficiente de los servicios de salud, la poca inversión de los estados en la garantía de la potabilización del agua para toda la población, la falta de control de brotes y la falta de intervención de los sistemas de salud pública, favorecen la propagación, incidencia, morbilidad y mortalidad asociada a enfermedades relacionadas con el agua de consumo, principalmente en países en vía de desarrollo, de ahí la importancia de estudiar la microbiología de las aguas para mejorar la gestión del recurso y formular estrategias de manejo y conservación de la misma a partir del conocimiento de su diversidad y la definición de buenos indicadores biológicos de calidad, para así controlar las propagación de

enfermedades de origen hídrico producto de una serie de patógenos oportunistas higiénicamente relevantes, como *Pseudomonas aeruginosa*, *Legionella pneumophila*, *Mycobacteria*, *Aeromonas hydrophila*, *Klebsiella pneumoniae*, y *Campylobacter* tienen la capacidad de crecer a bajas concentraciones de nutrientes en los sistemas de distribución de agua potable y/o en los hogares (Szewzyk et al., 2000 ; Flemming et al., 2002 ; Vital et al., 2008 , 2012b ; Wang et al. , 2013a). Además de las especies bacterianas, ciertos protozoos tienen propiedades patógenas (p. ej. *Acanthamoeba*, *Cryptosporidium*, *Giardia lamblia*) o actúan como huéspedes de bacterias patógenas como *Legionella pneumophila* (Bichai et al., 2008 ; Thomas y Ashbolt, 2011 ; Wang et al. ., 2013a), mientras que se reconoció que los virus entéricos causan enfermedades gastrointestinales u otras enfermedades virales transmitidas por el agua (p. ej., norovirus, virus de la hepatitis A; Wingender y Flemming, 2011).

3. Pregunta de investigación

¿Tienen correlación las variables ambientales que evalúa la norma (NSCA) con la viabilidad microbiológica del agua del río Biobío?

4. Objetivos

1.1. Objetivo general

Estudiar la viabilidad microbiológica de muestras de agua del río Biobío correlacionarla con las variables ambientales de calidad del agua evaluadas por el PMBB

1.2. Objetivos específicos

1.1.1. Objetivo 1

Evaluar la viabilidad de los microorganismos de muestras de aguas de las estaciones de control del PMBB.

1.1.2. Objetivo 2

Detectar la presencia de bacterias y hongos mediante PCR.

1.1.3. Objetivo 3

Realizar la correlación de las variables ambientales que evalúa la NSCA con los datos de calidad de los microorganismos del río Biobío.

2. Metodología

2.1. Área de estudio

Antes de la división de la Región del Biobío de la recientemente creada Región de Ñuble, la cuenca correspondía al 54% de la superficie total de la Región del Biobío. Hoy en día producto de la división de la región, la cuenca del río Biobío pasó a constituir el 75% de la actual región del Biobío. El clima es extremadamente variable, ya que el área está influenciada por las fluctuaciones del centro de la alta presión del Pacífico Sur. La precipitación media anual, en la parte baja de la cuenca, era aproximadamente de 1.300 mm; en la parte alta alcanzaba en algunas áreas hasta 3.000 mm. La temperatura, a excepción de la Cordillera de los Andes, tiene un promedio anual entre 14 y 12 °C (de Norte a Sur), con temperaturas mínimas invernales del orden de -5°C en la depresión dental y de -1°C en la faja costera. La humedad relativa es comúnmente muy elevada en la zona costera y en la depresión central (EULA, 2020).

Por lo que los siguientes datos definidos para este estudio corresponden al período anterior a la creación de la región de Ñuble.

El territorio de la cuenca se divide en 24 comunas, que pertenecen a tres provincias de las regiones, del Biobío y de la Araucanía (Biobío, Concepción y Malleco). Las principales ciudades son: Concepción (capital de la Región del Biobío), Talcahuano, Los Ángeles (capital de la Provincia del Biobío), Angol (capital de la provincia de Malleco), Mulchén, Nacimiento y Laja.

La cuenca del Biobío forma parte de la VIII Región y está comprendida entre los paralelos 36°42' – 38°49' Latitud Sur y los meridianos 71° - 73°20' Longitud Oeste. Es una de las cuencas de mayor superficie (24.264 Km²) y caudal del país. Comprende parte de los territorios de las Provincias de Ñuble, Concepción, Bío Bío y Arauco. Además, abarca parte de las Provincias de Malleco y Cautín pertenecientes a la IX Región. El Biobío nace en la ribera oriental de la laguna

Gualletué en la cordillera de los Andes, y su curso superior se desarrolla en un valle intermontano de origen placial, generando numerosos meandros, a través de un paisaje estepario en el que abundan los coironales y matorrales bajos. Atraviesa la llanura central y luego vacía sus aguas en San Pedro, en el sector norte del golfo de Arauco, en las proximidades de Concepción.

El río Biobío es la fuente primordial de agua potable para gran parte de las comunas ribereñas, posee un total de 326 localidades pobladas, de las cuales 17 son ciudades y el resto conforman poblado con menor cantidad de habitantes y un número importante de 271 localidades rurales. La cuenca tiene alrededor de 17 centrales hidroeléctricas instaladas y operando a la fecha, siete de ellas en la Subcuenca del río Laja (Abanico, El Toro, Antuco, Quilleco, Rucúe, Laja y Diuto); dos en el río Duqueco (Mampil y Peuchén) y tres centrales en el curso principal (Centrales Pangué, Ralco y Angostura) y otras como Boquiamargo, Los Padres, Mapulcho, Renaico, todo lo anterior con una producción que supera los 2800 MW y que varía día a día con nuevos proyectos aprobados (EULA, 2020).

La cuenca hidrográfica contiene 15 subcuencas menores, sometidas a la influencia de distintos ambientes y factores geográficos; por lo tanto, la dinámica del sistema es muy variable desde el inicio de su curso hasta su desembocadura. De estas subcuencas, las principales corresponden a las del Alto Biobío y las de los ríos Duqueco, Bureo, Vergara y Laja. El régimen hidrológico de la hoya en el alto Biobío es más bien nival, pero ya en el curso medio recibe aportes pluviales importantes que vuelven a la cuenca de régimen mixto (Figueroa, Parra, 2020).

Cumple un recorrido de 380 km., ocupando el segundo lugar en Chile por su longitud, después del Loa (MOP, 2004). La cuenca del río Biobío tiene un caudal de 960 m³/s de promedio anual en su desembocadura, y a nivel nacional representa un importante centro de desarrollo económico, ligados al sector forestal, agropecuario, industrial (industrias de celulosa y papel, metalúrgicas, químicas y refinería de petróleo) e hidroeléctrico, constituyendo la principal fuente de suministro de energía a nivel nacional (Parra et al. 2013). La principal carga industrial que evacua al río corresponde a la industria forestal de celulosa/papel, localizada desde

Negrete hasta la desembocadura con tres plantas de celulosa: CMPC Pacífico, CMPC, Santa Fe, CMPC Laja (la cual ha duplicado su producción en los últimos años) y una fábrica de papel, Papeles Biobío. Asimismo, destacan Iansa S.A. una de las principales compañías agroindustriales del país, que comercializa azúcar y coproductos de la remolacha, sin embargo, su evacuación no es constante y Enap Refinerías Biobío que se localiza cerca de la Desembocadura del río Biobío.

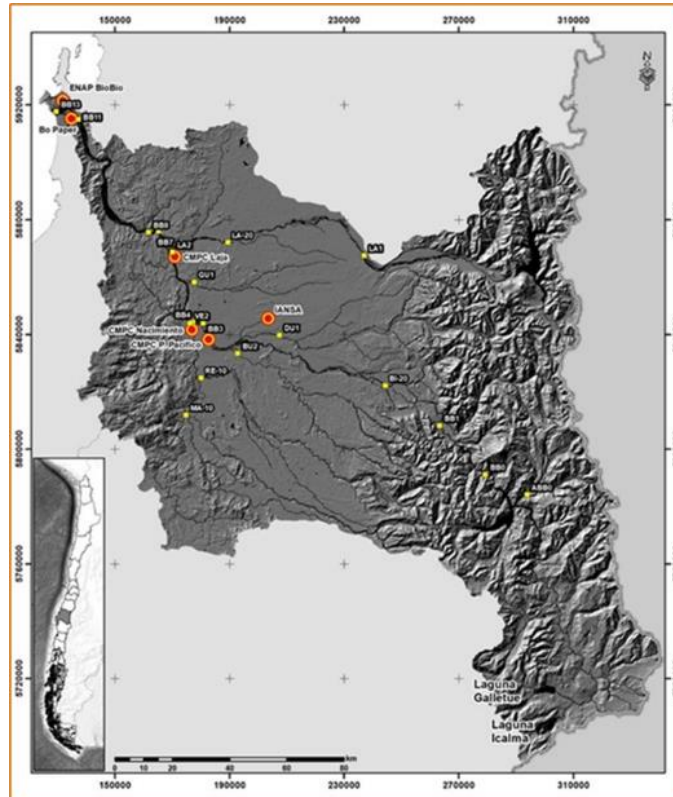


Figura. Principales industrias a lo largo de la cuenca del Río Biobío (Fuente: Programa de Monitoreo de la calidad del agua del sistema río Biobío).

Otro uso relevante del río corresponde al de riego con un caudal total cercano a los 220 m³/s y con una capacidad de riego de aproximadamente 220.000 ha. (Parra et al, 2009, 2013). De manera general la cuenca se puede dividir en tres zonas para describir los distintos usos del suelo que destacan a lo largo de la trayectoria del río Biobío:

- Zona alta de la cuenca: Usos de suelo naturalizados y cuya relación con la calidad microbiológica del agua se presenta por el aporte de nutrientes

derivados de la materia orgánica (factor esencial para el desarrollo microbiano) que entra al río sobre todo en el mes de agosto período de altas precipitaciones por escorrentía superficial.

- Zona media de la cuenca: Usos de suelo antropizados y naturalizados cuya relación con la calidad microbiológica del agua se presenta por la presencia de alta actividad industrial (CMPC Pacífico, CMPC Nacimiento, CMPC Laja y IANSA), agroindustrial, terrenos forestales y efluentes derivados de plantas de tratamiento de aguas servidas, cuyo aporte de efluentes con exceso de nutrientes y sustancias inhibidoras afectan la calidad microbiológica y su supervivencia producto de contaminación directa ligada a la actividad industrial y efluentes urbanos y contaminación difusa por fuentes agrícolas por procesos como escorrentía superficial, lixiviación, volatilización, erosión, entre otros.
- Zona baja de la cuenca: Gran presencia de usos de suelo antropizados, destacando la presencia de industrias como ENAP y BO Paper Biobío cuya relación con la calidad microbiológica del agua se presenta por el gran aporte de contaminantes industriales y de efluentes urbanos que afectan la supervivencia de los microorganismos.

El río Biobío es un hotspot de biodiversidad de agua dulce (Dyer et al. 2000; Habit et al. 2005, 2006a) y es el sistema de agua dulce más impactado en Chile, enfrentado a un creciente crecimiento urbano (Henriquez et al. 2006; Azocar et al. 2007). Es un río de octavo orden con la tercera mayor superficie (24.625 km²) y el segundo mayor caudal (1.943 m³/s durante el invierno) (Parra et al. 2009). La cuenca del río Biobío se enfrenta a múltiples expansiones para la energía hidroeléctrica y tiene demandas competitivas existentes de energía hidroeléctrica, urbanización, industria, agricultura e irrigación, silvicultura, acuicultura, turismo, recreación, y es un dominio regional de los pueblos indígenas (Parra et al. 2009). La cuenca del río Biobío es la cuenca más estudiada de Chile, múltiples amenazas al ecosistema fluvial que han generado un patrón decreciente de calidad del agua, desde cabeceras hasta la costa (Parra et al. 2009), que junto con toda la intervención física

sobre el Biobío río, podría llevarlo a una clasificación "fuertemente afectada" por la regulación del caudal y la fragmentación del cauce (Nilsson *et al.* 2005).

2.2. Muestreo y procesamiento de las muestras

La información entregada fue proporcionada por el Programa de Monitoreo de la Calidad del Agua del Río Biobío (PMBB) desarrollado por el Centro EULA-Chile que desde el año 1994 a la fecha, que permite obtener un primer mapa de calidad del agua (Parra *et al.*, 1993).

Para este estudio se contempló el uso de muestras que ya habían sido recolectadas por el PMBB, correspondientes al período de diciembre 2021, marzo 2022 y agosto 2022, para las 19 estaciones de control que son monitoreadas por el PMBB y a la vez reconocidas por el NSCA-BB.

Las muestras fueron recolectadas directamente desde la columna de agua del río Biobío de manera subsuperficial, desde las respectivas estaciones que examinan el río Biobío a lo largo de su cauce principal y sus principales tributarios. Se recolectaron desde las respectivas estaciones de muestreo en que el curso de agua tiene un ancho inferior a 100 metros y se tomaron muestras puntuales desde el centro del cauce para las estaciones BB0, BB1, DU1, GU1, LA1, LA2 y BU2 y para las estaciones VE2, BB3, BB4, BB7, BB8, BB11 y BB13 en que el río escurre por uno o más brazos, se tomaron en un cauce superior a 100 metros de ancho, se tomó cada muestra compuesta desde un bote zodiac contra el sentido de la corriente (ribera norte, ribera sur y centro del cauce). Las tres submuestras por estación que se tomaron en el muestreo fueron integradas *in situ*, excepto para los parámetros ambientales que son; Oxígeno Disuelto y Coliformes (EULA, 2020).

Las muestras corresponden a las 14 estaciones que son monitoreadas por el NSCA-BB (6 estaciones del curso principal y 8 estaciones de control en los principales tributarios), sin embargo, para este estudio se han incorporado las estaciones BI-20 para el caso del curso principal y las estaciones LA-20, MA-10 y RE-10 para el caso de los principales afluentes, estaciones que fueron acordadas para apoyar y

comparar con la NSCA-BB (D.S. 9/2015) en los futuros resultados que arroje el estudio.

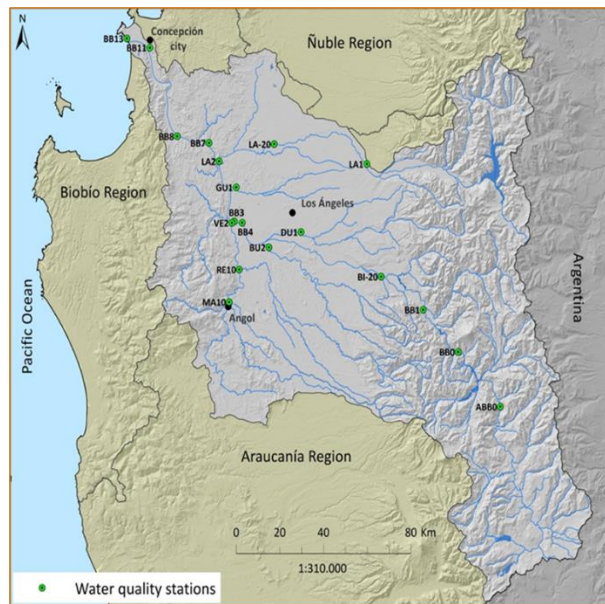


Figura 1. Ubicación de las 19 estaciones del PMBB con sus respectivos códigos (Fuente: Programa de Monitoreo de la calidad del agua del sistema río Biobío).

Las muestras por estación a analizar contienen tres meses de evaluación, es decir, por cada una de las 18 estaciones hay tres muestras correspondientes a los meses de diciembre del año 2021, marzo del año 2022 y agosto del año 2022, que son los meses que representan los extremos caudales del río Biobío a lo largo del año, de una manera estacional representativa; en primavera los máximos de deshielo (diciembre 2021) en verano el mínimo caudal (marzo 2022) y en invierno los inviernos máximos (agosto 2022).

En cada estación se cuenta con la información de alrededor 23 parámetros de calidad ambiental y sus niveles de calidad normativa propuesto por la Guía para la elaboración de Norma Secundaria de la Calidad de Aguas Superficiales (NSCA, CONAMA 2004). Parámetros fisicoquímicos que corresponden a: Temperatura °C, Color (Pt/Co), Clorofila a (mg/m³), Clorofila total (mg/m³), Aluminio total (mg/L), Amonio N-NH₄ (mg N/L), AOX (mg/L), Cloruro (mg/L), Col. Fecales (NMP/100ml), Conductividad (µS/cm), DBO₅ (mg/L), DQO (mg/L), Fósforo total (mg/L), Hierro total

(mg/l), Índice fenol (mg/l), Nitrato N-NO₃ (mg N/l), Nitrito N-NO₂ (mg N/l), Nitrógeno total (mg/L), Ortofosfato PO₄ (mg/L), Oxígeno disuelto (mg/L), pH, Sol. Susp. Totales (mg/L), Sulfatos (mg/L).

Las muestras una vez recolectadas, se trasladaron y se mantuvieron almacenadas en el cuarto de refrigeración a 4 °C que posee la Facultad de Ciencias Ambientales EULA, lugar donde el PMBB almacena todas sus muestras para posteriores análisis. Las muestras para ser analizadas se trasladaron y almacenaron en el cuarto de frío del Centro de Biotecnología (CB) de la Universidad de Concepción a 4 °C para poder realizar todos análisis necesarios en el laboratorio de Microbiología ambiental (BEM), laboratorio perteneciente al CB que cuenta con todos los equipos necesarios para llevar a los análisis de las muestras.

2.3. Análisis de muestras

2.3.1. Tinción de viabilidad

La Viabilidad celular es la proporción de células vivas y funcionales existentes en una población celular (López, 2019). La viabilidad celular es un marcador predictivo para un buen funcionamiento de una muestra sea de tipo vegetal, animal o ambiental, y uno de los métodos más utilizados para determinar la viabilidad celular y la detección de la proliferación celular es la evaluación de la integridad de la membrana celular a través del uso de sustancias colorantes o fluorescentes que permiten identificar a las células según la integridad de sus membranas celulares como criterio.

Para estudiar datos microbiológicos en ecosistemas acuáticos se utilizan metodologías fundamentadas en la detección específica de componentes celulares o productos metabólicos, es así como la concentración de la biomasa puede obtenerse indirectamente midiendo la concentración de proteínas, ATP y ADN. Otra de las formas para realizar recuentos bacterianos es utilizando tinciones específicas de ácidos nucleicos como las de Yoduro de Propidio y Syto 9 que permiten conocer la viabilidad bacteriana (Schumann, et al., 2003)

El recuento de viabilidad para este estudio tiene como función cuantificar las células de las muestras de agua a través de densidad óptica utilizando un microscopio de

epifluorescencia para tener una primera impresión de la calidad microbiológica de las muestras como índice de salud del río.

Para poder obtener las cuantificaciones de los recuentos de viabilidad de las muestras se debió realizar una tinción de viabilidad. Para aplicar esta metodología el primer paso consistió en separar 45 ml en un tubo Falcón 50 ml de cada muestra (bidones de 5 Litros), y someter a cada tubo a baño sónico durante 5 minutos a 1 °C a 60 Hertz para deshacer las biopelículas posiblemente formadas por microorganismos adheridos a la materia en suspensión y de manera de homogenizar las muestras. Los tubos luego se rotularon respectivamente según la estación y mes correspondiente y se llevaron al mesón de trabajo a temperatura ambiente, a cada tubo se le aplico Vortex durante 30 segundos para asegurar que la dispersión de los microorganismos en las muestras de agua se encontrara de la manera más homogénea posible.

Se procedió a armar el sistema de filtración correctamente y se limpió adecuadamente la columna de filtración con agua estéril para eliminar cualquier tipo de contaminación. Cabe destacar que desde este paso en adelante el procedimiento en el laboratorio se le realizó a cada muestra y se consideró mantener las luces apagadas para no afectar la eficiencia de los fluoróforos que contiene el Kit de viabilidad bacteriana LIVE/DEAD™ BacLight™.

Ya teniendo el equipo de filtración armado, se filtraron 4 ml de muestra (de los 45 ml de los tubos Falcón) a través de un filtro de policarbonato de 0,2 micras para retener células microbianas (bacterias) en el filtro. Luego de filtrar los 4 ml, se le agrego a la columna de filtración 200 µl del reactivo Backlight del kit de extracción de bacterias que contiene fluoróforos (sensible a la luz) para marcar a través de fluorescencia utilizando como criterio la integridad de la membrana celular a los células bacterianas viables a través de la tinción SYTO 9 (membrana integra) y muertas mediante la tinción de yoduro de propidio (membrana celular que ha perdido su integridad) para así luego poder observarlas en el microscopio de epifluorescencia aplicando densidad óptica poder cuantificar las células y obtener los recuentos y porcentajes de viabilidad.

Una vez agregado el reactivo de tinción Backlight (con luz apagada), se cubrió la columna de filtración con papel de aluminio durante 10 minutos para evitar completamente la presencia de luz que pudiese afectar el rendimiento de los fluoróforos. Ya cumplido el tiempo de activación para la tinción de las células bacterianas, se retiró el papel de aluminio de la columna, y con el uso de pinzas estériles se retiró el filtro de policarbonato para ser puesto en un portaobjeto y con la aplicación de una gota de aceite inmersión se cubrió luego el filtro con el cubreobjeto, las muestras ya listas se rotularon y se guardaron dentro de una caja que impedía la entrada de la luz para ser llevadas al microscopio.

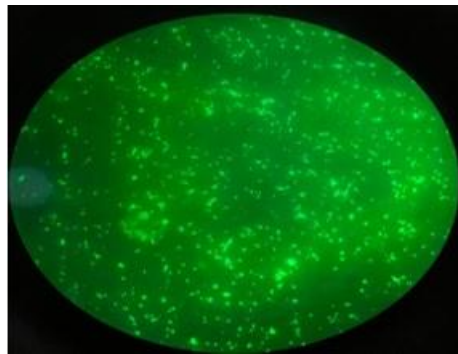


Figura 2. Visualización de bacterias vivas a través de densidad óptica.

En el microscopio de epifluorescencia se utilizó el objetivo 3 y 4, el objetivo 3 permite ver las células a través de fluorescencia con tinción verde para cuantificar por densidad óptica las células viables que tienen su membrana celular íntegra y con el objetivo 4 se observaron las células con tinción de color rojo para cuantificar las células muertas. El recuento de viabilidad celular directo en el microscopio para visualizar células vivas y muertas se realizó 5 veces para tener resultados más representativos (para células vivas y muertas respectivamente) con cada muestra y con el uso de una planilla en Excel se aplicaron los cálculos de manera inmediata para obtener; factor de dilución, factor de corrección, volumen filtrado, área foto, área filtro y volumen deseado.

Dentro del Excel el recuento de viabilidad y su fórmula se expresa como; $(N^{\circ} \text{ células (promedio)} \times \text{Factor de corrección} \times \text{Factor de dilución} \times \text{Volumen deseado}) /$

(Volumen filtrado final de la muestra), con estos resultados de recuento de viabilidad podemos obtener los respectivos valores pero que representan 1 ml de muestra, sin embargo para el estudio se trabajó con 4 ml por lo que respectivamente para el recuento de viabilidad de células vivas y muertas, los valores obtenidos se deben multiplicar por 4 para representar la cantidad de células en 4 ml.

Para obtener el porcentaje de viabilidad de manera propia de cada muestra sin las fórmulas que aportaba el Excel, se aplicó la fórmula:

% Porcentaje de viabilidad: (Recuento de células viables (verdes)) / (Recuento de células viables (verdes) + Recuento de células muertas (rojas))) x 100

Los porcentajes de viabilidad se pueden analizar considerando un rango de 40-60% como apto para el crecimiento y la supervivencia microbiana, si se obtienen valores sobre el 60% representa que la muestra evaluada posee un alto nivel de células vivas y pocas células muertas en 4 ml, por lo que la supervivencia de las células bacterianas dentro de la muestra se ve favorecida por la presencia de un agente estimulante y los porcentajes bajo el 40% representan que existe mayor cantidad de células muertas con respecto a las células vivas, lo que indica que la supervivencia de las células bacterianas dentro de la muestra se ven negativamente afectadas por la presencia de un agente estresor. De los porcentajes de viabilidad se puede tener una primera inferencia del estado de salud y la calidad microbiológica de las muestras de agua.

2.3.2. Filtración de muestras

Para el procedimiento de filtración, lo primero a realizar fue montar el equipo de filtración dentro de una cámara de bioseguridad con campana de extracción (captación de vapores inflamables, irritantes, corrosivos, carcinogénicos, etc.) para procurar trabajar en un ambiente libre de microorganismos volátiles o de cualquier tipo de contaminación en el área de trabajo dentro del laboratorio.

El equipo de filtración se conformó por; una bomba de vacío, los matraces Kitasato de filtración (2 Kitasato de 1 litro), una pinza de aluminio (para unir el tapón de filtración al vacío con el embudo de filtración), tapón para filtración en vacío, embudo

de filtración sin disco de vidrio sinterizado integrado ni tallo, filtros de éster de celulosa (5 μm y 0,22 μm), pinzas estériles para maniobrar los filtros y placas petri de plástico para guardar los filtros resultantes. Cabe destacar que antes de proceder al proceso de filtración, Todo el equipo de filtración (exceptuando la bomba al vacío) se debió esterilizar mediante rayos UV dentro de una cámara de bioseguridad durante 15 min para eliminar todo tipo de microorganismos contaminantes presentes en el material.



Figura 3. Sistema de filtración de muestras de agua del río Biobío.

Ya teniendo todo el material estéril para el proceso de filtración, se procedió a retirar el bidón de 5 Litros de muestra de agua (con rotulo de código estación y mes) de la sala de refrigeración a 4°C y se sometió a baño sónico durante 5 minutos a 1° C a 60 Hertz para romper y deshacer las biopelículas formadas por los microorganismos que se mantienen adheridos a los sólidos suspendidos para así poder obtener una mayor cantidad de microorganismos retenidos por el proceso de filtración.

Retirado y secado el bidón de muestra del baño sónico, este se llevó hasta la cámara de bioseguridad para proceder con el proceso de filtración. Para la filtración de la muestra se consideró el uso de filtros de éster celulosa de 5 micras y 0,22 micras para retener sólidos suspendidos y microorganismos respectivamente. Primero se filtraron aproximadamente 900 ml de muestra a través de un filtro de 5

micras para limpiar el agua de la muestra de los sólidos suspendidos, y el agua filtrada retenida dentro del matraz Kitasato se volvió a filtrar pero esta vez a través de un filtro de 0,22 micras para retener los microorganismos presentes en el agua de las muestras, este paso con respecto a filtrar 900 ml de muestra se repitió a través del uso de filtros de 5 micras y 0,22 micras hasta agotar el agua del bidón de muestra. Los filtros resultantes de 5 y 0,22 micras se guardaron dentro de una misma placa Petri que se rotulo cuidadosamente con la estación de control y su mes respectivo. Cabe destacar para este procedimiento, que la cantidad de filtros resultantes es relativo a las condiciones de la muestra, es decir, las muestras de agua para las estaciones de control que a simple vista poseen una alta carga de material disuelto o turbidez en el agua serán las muestras que al momento de filtrar necesitarán el uso reiterativo de filtros de 5 micras producto del taponamiento de los filtros.

Las placas Petri resultantes que contienen los filtros de 5 y 0,22 micras para cada muestra se sellaron con Parafilm y se almacenaron a - 80 °C con el propósito de prevenir contaminación y la alteración de la calidad del ADN de los microorganismos retenidos en los filtros. Los filtros se almacenaron para luego ser utilizados en el proceso de extracción de ADN utilizando el protocolo del kit comercial de extracción Qiagen, Kit DNeasy PowerSoil Pro.

Ahora bien, hay que destacar que no todas las muestras pasaron por el proceso de filtración, ya que las primeras dos muestras analizadas para este estudio correspondientes a; GU-1 (marzo 2022) y BB13 (marzo 2022), son las únicas muestras a las que se les realizo un proceso de centrifugación para la obtención de microorganismos, en el que se utilizaron 2 litros de agua del río que contenía el bidón con la muestra.

Para concentrar las muestras GU-1 (marzo 2022) y BB13 (marzo 2022) a través del método de centrifugación se utilizaron 3 frascos de 250 ml por muestra que se rellenaron solo hasta los 200 ml y por lo tanto el proceso se repitió casi 4 veces hasta completar los 2 L, los frascos resultantes se colocaron dentro de la centrifugadora (NO12 (roto), 8000 r/min, 9660 rg) y se centrifugaron durante 10 min

a 5 °C y entre cada repetición se descartó el sobrenadante de los frascos evitando que el pellet formado se desprendiera. Ya teniendo el pellet dentro de los 6 frascos (3 de la muestra GU-1 marzo y 3 de la muestra BB-13 marzo), se procedió a aplicarles baño sónico durante 5 minutos a 1 °C a 60 Hertz para desprender los microorganismos adheridos a los sólidos suspendidos y la formación de biopelículas. Luego de este paso se traspasaron las muestras resultantes a tubos falcón de 50 ml que fueron rotulados con el código y mes de muestra control y la fecha del procedimiento para evitar confusiones y estos se llevaron a centrifugar nuevamente ahora (NO9 (rotor), 6x50 ml, 12000 r/min) durante 10 min a 5°C. Como último paso para la obtención del concentrado de microorganismos a través de centrifugación, se descartó el sobrenadante y los tubos Falcón se depositaron en una gradilla para ser guardados a -80°C y así evitar alteraciones que pudiesen afectar el ADN presente en los microorganismos retenidos dentro de los tubos.

2.3.3. Extracción y cuantificación de ADN

La extracción de ADN tiene como funcionalidad extraer el ADN que esta retenido en todos los microorganismos adheridos en los filtros de éster celulosa de 0,22 µm y 5 µm provenientes del proceso de filtración.

Para el proceso de extracción de ADN fue de suma importancia adherirse a los pasos del protocolo del kit comercial de extracción Qiagen, Kit DNeasy PowerSoil Pro, debido a que el protocolo se basa en la extracción de ADN de muestras de suelo para este estudio se consideraron pequeñas modificaciones iniciales en el protocolo respecto a la manipulación de las muestras para adecuarlo a la extracción de ADN de muestras de agua.

Con respecto a la manipulación de las muestras que derivaron del proceso de centrifugación, las dos muestras (GU-1 (marzo 2022) y BB13 (marzo 2022)) para poder concentrarlas y poder pasar al proceso de extracción de ADN se re suspendieron con 800 µl de la primera solución de buffer de lisis CD1 que contiene el kit Qiagen, Kit DNeasy PowerSoil Pro y así poder continuar con los pasos del protocolo de extracción, y se introdujo la muestra dentro de los primeros tubos del kit de extracción (Power Bead Pro Tube).

Las muestras que derivaron del proceso de filtración y que estaban siendo previamente guardadas en placas petri a -80°C para poder pasar al proceso de extracción de ADN, se procedió a trozar los filtros ($5\ \mu\text{m}$ y $0,22\ \mu\text{m}$) de cada muestra en pequeños trozos con el uso de un bisturí 11 esterilizado para ser introducidos con ayuda de una espátula y pinza estéril (por cada tubo se agregaron aproximadamente 4 filtros trozados) en los primeros tubos que contiene el kit de extracción que corresponden a tubos con perlas de lisis (Power Bead Pro Tube) que permiten la lisis mecánica de los filtros. Una vez preparados los tubos que contienen los filtros de muestra trozados se le agregó $800\ \mu\text{l}$ de la primera solución de lisis CD1 del protocolo de extracción y luego fueron sometidos a lisis mecánica para romper las células microbianas y liberar el ADN, aplicando el uso del equipo Beadbeater durante 5 minutos como máximo de manera de generar la molienda de los filtros. Para la lisis mecánica, se utilizan soluciones básicas, detergentes o agentes caotrópicos que permiten disolver la membrana celular, así como inhibidores para inactivar las enzimas que degradan el ADN. Muchas soluciones de lisis contienen también EDTA, que forma un complejo con los iones de Mg^{2+} e impide el funcionamiento de las DNAsas (Sambrook et al. 1989)

Cuando ya se tuvieron todas las muestras rotuladas en los Power Bead Pro tube con sus respectivos códigos de muestreo, se les añadió $800\ \mu\text{l}$ con la solución CD1. Ejecutados los pasos de la manipulación de las muestras, se procedió a seguir con el paso a paso del protocolo del kit comercial de extracción Qiagen, Kit DNeasy PowerSoil:

- Se centrifugan los tubos Power Bead Pro tube a $13.400\ \text{rpm}$ durante 1 minuto en la centrifugadora Eppendorf Mini Spin y se transfirió $600\ \mu\text{l}$ del sobrenadante de cada tubo a un Microcentrifuge tube de $2\ \text{ml}$
- A los tubos Microcentrifuge tube se les añadieron $200\ \mu\text{l}$ de la solución de CD2 que había sido previamente refrigerada al iniciar el proceso a 4°C para su correcto funcionamiento. Luego los tubos se sometieron a Vortex para homogenizar la muestra durante 5 segundos

- Se centrifugaron los tubos Microcentrifuge tube a 13.400 rpm durante 1 minuto en la centrifugadora Eppendorf Mini Spin y luego se transfirió el sobrenadante evitando sustraer el pellet formado en el fondo del tubo, para este paso se transfirieron 700 µl de sobrenadante por tubo de muestra a un nuevo tubo Microcentrifuge tube de 2 ml
- Luego a cada tubo se le añadió 600 µl de la solución CD3 que previamente se había calentado hasta llegar a una temperatura de 60 °C (ya que a temperatura ambiente tiende a precipitar) y luego los tubos se sometieron a Vortex por 5 segundos para homogenizar
- A cada tubo Microcentrifuge de 2 ml resultante del paso anterior se le extrajo 650 µl de solución para ser introducidos en una columna MB Spin Column (que está dentro un Collection Tube de 2 ml)
- La columna MB Spin Column se centrifugo a 13.400 rpm durante 1 minuto, y luego se descartó el flujo que paso por la columna (proceso de lavado) en un recipiente. Este proceso último descrito se repite hasta cargar toda la muestra a través de la columna MB Spin Column
- Cuidadosamente se cambió la columna MB Spin Column a un nuevo Collection Tube de 2 ml y se agregaron 500 µl de la solución EA a la MB Spin Column y se centrifugo a 13.400 rpm durante 1 minuto. Después de centrifugar se descartó el flujo que paso por la columna y se volvió a colocar la columna MB Spin Column en el mismo Collection Tube de 2 ml usado en el paso anterior
- Se agregaron 500 µl de la solución C5 al MB Spin Column y se centrifugo a 13.400 rpm durante 1 minuto. Se volvió a descartar el flujo que paso por la columna que quedo de la centrifugación y se introdujo la columna MB Spin Column en un nuevo Collection tube de 2 ml
- Se repite de nuevo el proceso de centrifugación a 13.400 rpm esta vez por 2 minutos para secar la columna de cualquier humedad que quedase en ella y después con cuidado se sitúa la MB Spin Column en un Elution Tube de 1,5 ml

- Para el último paso del protocolo de extracción se requiere de mucho cuidado en la manipulación de la columna, considerando un ambiente estéril para evitar todo tipo de contaminación (nucleasas degradadoras de DNA), para esto se trabajó dentro de una cámara de bioseguridad y los Elution Tube de 1,5 ml se rotularon con el código y mes de estación de control respectivo
- Dentro de la cámara de bioseguridad se agregaron 50 µl de solución C6 con la pipeta posicionándola lo más al centro de la membrana del filtro y luego se procedió a centrifugar los tubos a 13.400 rpm durante 1 minuto, resultando 50 µl de ADN.
- Se descarto la MB Spin Column y los Elution Tube de 1,5 ml que contienen los 50 µl de ADN de muestra se almacenaron a -20 °C para ser utilizados en los siguientes análisis de muestras.

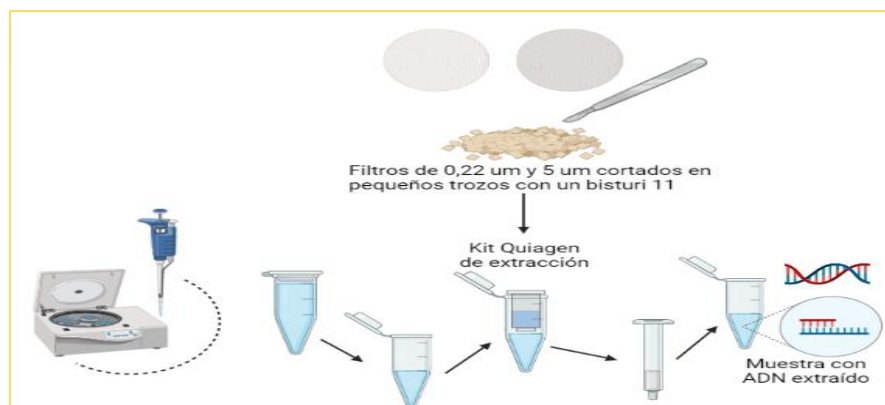


Figura 4. Esquema general del procedimiento de extracción de ADN a filtros de éster celulosa (Fuente: Elaboración propia mediante Biorender).

En el esquema 3, se puede observar de una manera general el funcionamiento del proceso de extracción de ADN, las extracciones de ADN se realizaron a cada muestra respectiva de las estaciones de control del PMBB para los 3 meses de evaluación correspondientes (diciembre 2021, marzo 2022 y agosto 2022), por lo que por día de trabajo se realizaron como máximo 4 extracciones de ADN para evitar confusiones y errores en el protocolo.

2.3.4. Ensayo experimental para modificaciones en el protocolo inicial de extracción de ADN

Debido a que el protocolo de extracción de ADN inicial presenta problemas en el cumplimiento y cuidado de mantener una buena integridad del ADN y es un protocolo específico para muestras de suelo, se consideró optimizar el protocolo de extracción de ADN anteriormente descrito enfocando generar modificaciones del protocolo a la etapa de la manipulación de las muestras, debido a que es la etapa en que se requiere de mayor cuidado para la obtención de buenos resultados de concentración, pureza e integridad del ADN.

Para este ensayo experimental se utilizó un medio líquido con carga bacteriana $\times 10^7$ (para simular la misma carga de las muestras del río Biobío) que se fue incubando a 20°C en una cámara incubadora con agitación orbital (MA 420, FIS GROUP) de manera de ir aumentando su cantidad bacteriana a través de un recuento celular en cámara de Neubauer hasta una concentración $\times 10^7$.

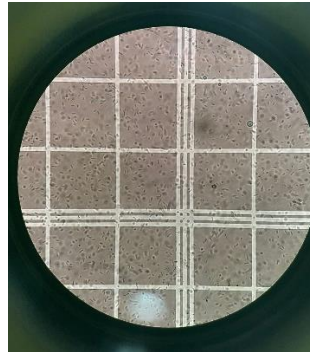


Figura 5. Recuento celular de medio líquido para ensayo experimental mediante Neubauer.

El medio líquido creado se filtró a través de filtros de éster celulosa de $5\ \mu\text{m}$ y $0,22\ \mu\text{m}$ y los 16 filtros resultantes del procedimiento se almacenaron a -80°C hasta el proceso de extracción de ADN utilizando el kit DNeasy PowerSoil.

Para el procedimiento de extracción de ADN utilizando el kit comercial DNeasy PowerSoil, se consideró trabajar con distintos tiempos de uso de lisis mecánica aplicando el equipo Beadbeater, mantener la cadena de frío en la manipulación de

los tubos con perlas de lisis (Power Bead Pro tube) a -80°C y limitar el ingreso de material utilizado a 2 filtros como máximo por tubo Power Bead Pro tube.

El protocolo para este ensayo experimental consistió en los siguientes pasos:

- Se trozaron en pequeños trozos 2 filtros con bisturí de manera rápida y controlada para luego introducirlos en un tubo Power Bead Pro tube. Cada tubo relleno fue llevado inmediatamente a -80°C hasta antes de agregar la primera solución de lisis CD1.
- El paso anterior que procura mantener la cadena de frío a -80°C se aplicó entre cada relleno de tubo (Power Bead Pro tube).
- La distribución de 2 filtros por Power Bead Pro tube genero; 6 tubos con perlas de lisis con 2 filtros de $0,22\ \mu\text{m}$ y 1 tubo de perlas de lisis con 1 filtro de $0,22\ \mu\text{m}$ y 1 filtro de $5\ \mu\text{m}$.
- Cuando ya se tuvieron todas las muestras retiradas de -80°C y rotuladas en los Power Bead Pro tube con sus respectivos códigos de muestreo, se les agrego $800\ \mu\text{l}$ de la solución CD1.
- Del total de tubos Power Bead Pro tube, 2 tubos se sometieron baño sónico y se describen como tubo S1 sometido a 3 minutos de baño sónico y luego 3 minutos en el equipo Bead Beater para lisis mecánica y el tubo S2 sometido a 5 minutos de baño sónico y luego 3 minutos en el Bead Beater.
- Los otros 5 tubos tuvieron solo se sometieron a distintos tiempos en el equipo Beadbeater descritos como; tubo 1 (1 min 45 seg), tubo 2 (2 minutos), tubo 3 (2 min 30 seg), tubo 4 (3 minutos) y tubo 5 (4 minutos).
- Cuando los tubos se retiraron del equipo Beadbeater, se procedió a agregar $500\ \mu\text{l}$ más de la solución CD1 debido a que los filtros luego de la molienda tendían a absorber el primer buffer de lisis.
- Desde este paso en adelante se siguió con cada paso igual al protocolo inicial de extracción de ADN anteriormente descrito del kit comercial de extracción Qiagen, Kit DNeasy PowerSoil.
- Los $50\ \mu\text{l}$ de ADN resultantes almacenados en un Elution Tube de $1,5\ \text{ml}$, se almacenaron a $-20\ ^{\circ}\text{C}$ para ser utilizados en los siguientes análisis de muestras.

2.3.5. Cuantificación del ADN

La cuantificación precisa del ácido nucleico es un paso crítico en los flujos de trabajo de preparación de muestras de ADN y ARN. A menudo, el éxito o el fracaso del análisis posterior depende de si se utiliza la cantidad y la calidad adecuadas de ácido nucleico de entrada.

Para cuantificar el ADN extraído por cada muestra, se almaceno en una gradilla; el ADN de interés a cuantificar que había sido previamente almacenado a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ en un tubo de 1,5 ml (Elution Tube) y agua libre de nucleasas contenida en un tubo Eppendorf de 2 ml.

Se procedió luego a encender el equipo Infinite 200 PRO, que permite leer placas de absorbancia para cuantificar ácidos nucleicos de bajo volumen o proteínas mediante espectrofotometría para determinar la concentración y la pureza de una muestra de ADN basándose en la capacidad de absorbancia de un compuesto presente en una solución a una longitud de onda determinada.

La concentración de la muestra de ADN se calcula teniendo en cuenta el valor de absorbancia obtenido a una longitud de onda de 260nm, considerando una concentración de ADN adecuada para posteriores análisis sobre 5-10 ng/ μl . Mientras que la relación de absorbancias A_{260}/A_{280} y A_{260}/A_{230} se utilizan para evaluar la pureza de las muestras. Con respecto a la pureza, la relación A_{260}/A_{280} es muy estable y se considera que un ADN de pureza óptima tiene un valor entre 1.8-2.0. Un ADN de pureza aceptable debe tener al menos una relación $A_{260}/A_{280} > 1.6$. Un valor $A_{260}/A_{280} < 1.6$ indica una posible contaminación por compuestos aromáticos como fenoles y proteínas y un radio $A_{260}/A_{280} > 2.1$ podría deberse a la presencia de ARN en la muestra.

Ya teniendo el equipo Infinite 200 PRO encendido se procuró un manejo muy cuidadoso de las delicadas piezas del equipo ya que algún mal manejo de estas puede significar daños en el equipo o un error en los datos. El equipo Infinite 200 PRO para poder funcionar necesita estar conectado a un computador que tenga

ingresado el software del equipo para cumplir con sus lecturas de cuantificación, por lo que aparte de encender el equipo Infinite 200 PRO luego es importante verificar que en el software i-control que le permite definir rápidamente una secuencia de trabajo para cada una de sus aplicaciones, este ingresado correctamente con respecto a el filtro de emisión y el de excitación para un correcto funcionamiento del equipo. Luego de tener el equipo en funcionamiento, lo siguiente es contemplar el correcto manejo de la Nano placa NanoQuant Plate (perteneciente al equipo) que se debe ingresar dentro del equipo para las cuantificaciones, este dispositivo permite el análisis y la cuantificación en paralelo de un máximo de 16 muestras de ácidos nucleicos o proteínas, en volúmenes de tan solo 2 μ l, y es de características delicadas y sensibles ya que pocillos sensibles a cualquier tipo de contaminación, que se encuentran divididos en 2 para las letras A, B, C, D, E, F, G y H, de manera vertical.

Luego de tener el equipo, computador y los dispositivos del equipo en funcionamiento, se procedió a poner la Nano placa sobre papel suave sin asperezas para limpiarla utilizando 10 μ l de agua nano purificada.

Para la lectura de muestras y que esta se realice de una manera ordenada se utilizaron las letras de los pocillos de manera vertical y por duplicado de cada muestra, el orden de las muestras en los pocillos se registró en un cuaderno para luego evitar confusiones. A cada pocillo en primera instancia se le agrego 1 μ l de agua nano purificada como blanco para la lectura de la Nano placa que se introdujo dentro del equipo como blanco y de esa manera tener una lectura de base en donde se seleccionan en el software i-control los pocillos (dependiendo de la letra) que se utilizaron con agua nano purificada. Lo siguiente consistió en retirar la placa con los blancos y se volvió a secar con papel suave sin asperezas para así agregar de manera vertical a cada letra por duplicado 1 μ l de cada muestra de ADN a cuantificar. La Nano placa ya teniendo 1 μ l de muestra en cada pocillo, se reincorporo de nuevo dentro del equipo Infinite 200 PRO para correr el software i-control que realiza la lectura de concentraciones y purezas de ADN, entregando aquellos parámetros en una tabla de Excel.

2.3.6. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La PCR surgió en 1971 cuando Gobind Khorana describe la técnica al explicar la replicación de un fragmento de ADN usando dos iniciadores (Kleppe et al. 1971). Pero fue en 1983 cuando Kary Mullis y sus compañeros de la compañía californiana Cetus Corporation la llevaron a cabo por primera vez mientras trabajaban en la fabricación de oligonucleótidos y en el uso de iniciadores para la secuenciación de ADN, Mullis y colaboradores usaron dos iniciadores que se alineaban con cada una de las hebras del ADN, adicionaron ADN polimerasa I de *Escherichia coli* y nucleótidos trifosfatados. Como resultado obtuvieron la replicación exponencial del fragmento de ADN flanqueado por los iniciadores (Mullis y Faloona 1987).

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se utiliza con el fin de amplificar (aumentar el número de copias) un segmento de ADN a través de una serie de ciclos repetitivos consistentes en tres etapas: desnaturalización, alineamiento o hibridación y elongación. La etapa de desnaturalización o separación de la doble hélice de ADN mediante el calentamiento de la muestra a una temperatura entre 94 y 96 °C para romper los puentes de hidrógeno que las unían, de esta manera cada cadena queda como molde para la síntesis de una nueva cadena complementaria de ADN. Una vez separadas las cadenas del ADN, se alinean los iniciadores a sitios específicos complementarios de las cadenas sencillas de la región que se va a amplificar, para que esto suceda se baja la temperatura entre 40 y 60 °C lo que permite la unión (alineamiento) de los iniciadores. Finalmente, se sintetiza una nueva cadena en sentido 5' a 3' para lo cual se incrementa la temperatura, por lo general a 72 °C, porque es la temperatura óptima a la cual la ADN polimerasa se une a los iniciadores y comienza la replicación.

Para la detección de microorganismos para este estudio mediante PCR se consideró la detección solo para bacterias y hongos debido a la disponibilidad de partidores en el laboratorio, considerando a la vez la predicción positiva de la posible detección de estos microorganismos desde las extracciones de ADN debido a que sus tamaños son menores al diámetro de poro de 0,22 micras del filtro de éster celulosa y son parte de los grupos más significativos en la microbiología del agua.

Tamaño		
Recuerde que los tamaños de los microorganismos y células, aunque varían ampliamente y existen excepciones se encuentran entre las siguientes cifras:		
Virus	Se necesitan microscopios electrónicos para observarlos (20.000 x – 10.000 x)	
De 10 a 300 nm de diámetro Ejemplos: Viruela 210 nm, Herpes 130 nm, Gripe 85 nm, Poliomiéllitis 27, Rhinovirus 22, Ébola (es uno de los más largos) hasta 1.000 nm		
Bacterias	Se requiere microscopio óptico con objetivo de inmersión	
El tamaño de las bacterias es muy variable. Los tamaños representativos son de 0,5 a 1 micra de diámetro para las bacterias esféricas, entre 0,5 y 1 micra de anchura por 1,5 a 3 micras de longitud para las cilíndricas (bastoncillos) y entre 0,5 y 5 micras de anchura a 6 a 15 micras de longitud en el caso de bacterias helicoidales (espirales):		
Levaduras y hongos filamentosos	Se pueden observar ya con objetivo fuerte seco	
Entre 8-10 micras de ancho		
Células humanas	Se pueden observar con objetivo fuerte seco	
Hemátiles 7-8 micras		
Aumentos		
Recuerde que los aumentos más habituales con los microscopios son los siguientes:		
Microscopios ópticos		
Objetivo débil seco	100 x	(lente objetivo 10 x) x (lente ocular 10 x)
Objetivo fuerte seco	400 x	(lente objetivo 40 x) x (lente ocular 10 x)
Objetivo aceite de inmersión	1.000 x	(lente objetivo 100 x) x (lente ocular 10 x)
Microscopios electrónicos		
Transmisión	~ 200.000 x	
Barrido	~ 10.000 x	

Figura 6. Microorganismos, tamaños y aumentos (Fuente: Curso microbiología del agua. (2019). Análisis microbiológico del agua: Laboratorio virtual y casos prácticos. Los microorganismos en la naturaleza (pp. 5-10). Universidad de Salamanca).

La Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la detección de bacterias y hongos de manera general, se consideró la utilización de los siguientes partidores universales:

- Para la detección de bacterias, se utilizaron los partidores del gen ADNr 16S descritos por Lane (1991);
 - 27F (5'–AGAGTTTGATCCTGGCTCAG–3')
 - 1492R (5'– GGTTACCTTGTTACGACTT–3')
- Para la identificación de hongos, se utilizando los espaciadores internos transcritos (ITS) del rADN (Buscott et al., 1996; Coates et al., 2002);
 - ITS1 (genes 18S-5.8S ARNr)
 - (5` - TCCGTAGGTGAACCTGCGG–3`)
 - ITS2 (genes 5.8S-28S ARNr)
 - (5` - GCTGCGTTCTTCATCGATGC – 3`)

Obteniendo los partidores a una concentración 10 molar, se preparó el máster mix que contiene agua Nano purificada, Buffer 5x, MgCl₂, dNTPs, Primer F, Primer R,

GO Taq y el ADN a amplificar, a las siguientes concentraciones para 1 Reacción de 40 µl para duplicado de dos reacciones de 20 µL:

- 23 µl Agua Nano purificada
- 8 µl Buffer 5x
- 2,4 µl MgCL₂ (cloruro de magnesio)
- 0,8 µl dNTPs (desoxinucleótidos)
- 2 µl Primer F
- 2 µl Primer R
- 0,2 µl GOTaq (polimerasa)
- 0,6 µl de ADN templado

La enzima más importante en la replicación es la polimerasa del ADN dependiente de ADN, comúnmente conocida como ADN polimerasa, porque es la encargada de incorporar nucleótidos durante la síntesis de las nuevas cadenas de ADN (Bohinski 1991). La polimerasa para la realización del PCR es la GoTaq que es la ADN polimerasa termoestable estándar utilizada en aplicaciones de la PCR, es una Taq polimerasa recombinante de longitud completa, que se suministra en tampones diseñados para mejorar la amplificación. La Taq ADN polimerasa, aislada de *Thermus aquaticus*, es una ADN polimerasa termoestable que cataliza la incorporación cebador-dependiente de nucleótidos en ADN doble hebra en la dirección 5'→3' en presencia de Mg²⁺. La Taq no posee actividad exonucleasa 3'→5', pero tiene actividad exonucleasa 5'→3'. Es idónea para la mayoría de las aplicaciones de la PCR que no requieren una enzima de alta fidelidad, como la detección de secuencias específicas de ADN o ARN.

La reacción en cadena de la polimerasa se trabajó dentro de una cámara de bioseguridad para evitar cualquier alteración de los compuestos que habían estado almacenados a -20°C y procurar que no se contaminen las muestras con proteínas degradadoras de ADN. El máster mix se preparó dentro de un tubo Eppendorf y luego se dividió en tubos de PCR de 0,2 ml previamente rotulados con cuidado dentro de la cámara de bioseguridad, estos se sometieron a vortex por 5 segundos y vortex/spin por 5 segundos para bajar el máster mix que pudiese estar pegado en

las paredes por una mala técnica de pipeteo de las muestras. Luego las muestras se introdujeron dentro del termociclador BIO-RAD T100 Thermal Cycler para realizar los ciclos del PCR, para la detección de bacterias se programó un ciclo inicial de 95 °C por 2 minutos, 35 ciclos con una temperatura de desnaturalización de 95 °C por 30 segundos, una temperatura de alineamiento de 54 °C por 30 segundos, una temperatura de extensión de 72 °C por 1 minuto 30 segundos y un ciclo final a 72 °C por 5 minutos, con respecto al PCR que determino la detección de hongos se programó un ciclo inicial de 95 °C por 6 minutos, 35 ciclos con una temperatura de desnaturalización de 95 °C por 30 segundos, una temperatura de alineamiento de 60 °C por 40 segundos, una temperatura de extensión de 72 °C por 40 segundos y un ciclo final a 72 °C por 5 minutos.



Figura 7. Programación de ciclos para detección de bacterias mediante los partidores 27F y 1492R.

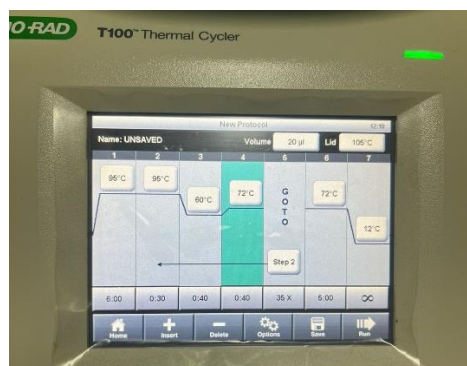


Figura 8. Programación de ciclos para detección de hongos mediante los partidores ITS1 y ITS2.

Las muestras cumplido el tiempo de los ciclos de aproximadamente 3 horas por cada PCR, se retiraron del termociclador y se almacenaron a -20°C para luego verificar los productos del PCR a través de electroforesis en gel de agarosa.

2.3.7. Verificación de integridad del ADN por electroforesis

Otro requisito importante que debe cumplir una muestra de DNA es la integridad, esta integridad se debe evidenciar en las extracciones de ADN y en el PCR para la detección de microorganismos. Para verificar la integridad del ADN por electroforesis, se preparó un gel de agarosa al 1,2% (30 ml de buffer TAE1X y 0,36 gramos de agarosa), en donde las cadenas del polímero de agarosa forman fibras helicoidales, que al solidificar forma una malla tridimensional de canales con diámetros entre 50 y >200 nm (Kirkpatrick 1990). Agregando luego al gel 2,5 µl de intercalante (Safeview), se forma una matriz de moléculas de agarosa de pequeños poros que se mantienen unidas por puentes de hidrógeno y que permite la visualización del ADN ante exposición de rayos UV.

El gel ya preparado se introdujo en una cámara de electroforesis y se le cargaron las muestras con 1 µl de buffer de carga 6X azul dejando un pocillo para el marcador de peso. La cámara de electroforesis se dejó correr por 80 Voltios durante 30 minutos contiene una solución amortiguadora con sales que permite conducir la corriente eléctrica, y través de electronegatividad producto de la carga negativa que posee el ADN este se traslada hacia el polo positivo en el gel de a través de los poros que forman las moléculas de agarosa.

Cumplido el tiempo, se retiró el gel de la cámara de electroforesis y se llevó al transiluminador UVITEC Platinum HD7 para analizar la integridad del ADN exponiéndolo a luz UV y fotografiarlo haciendo uso del equipo de documentación del transiluminador para guardar registro de la muestra de ADN.



Figura 9. Cámara de electroforesis para verificación del ADN por electroforesis en gel de agarosa.

2.4. Análisis bioestadístico

2.4.1. Análisis de componentes principales

El Análisis de Componentes Principales (PCA) consiste en encontrar transformaciones ortogonales de las variables originales para conseguir un nuevo conjunto de variables incorreladas, denominadas Componentes Principales, que se obtienen en orden decreciente de importancia y representan patrones de comportamiento.

La técnica de componentes principales tiene dos utilidades:

- Representa óptimamente en un espacio de dimensión pequeña, observaciones de un espacio general p -dimensional. En este sentido componentes principales es el primer paso para detectar variables “latentes” o no observadas, que están generando variabilidad en los datos.
- Permite transformar las variables originales, en general correladas, en nuevas variables incorreladas, facilitando la interpretación de los datos.

El problema que se desea resolver es cómo encontrar un espacio de dimensión más reducida que represente en forma adecuada los datos, esto puede abordarse desde tres perspectivas: Enfoque descriptivo, el cual desea encontrar un subespacio de

dimensión menor que p tal que al proyectar sobre él los puntos conserven su estructura con la menor distorsión posible. El enfoque estadístico, que al representar puntos p dimensionales con la mínima pérdida de información en un espacio de dimensión uno es equivalente a sustituir las p variables originales por una nueva variable, z_1 , que resuma óptimamente la información. Y el enfoque geométrico, en donde el problema puede abordarse desde un punto de vista geométrico con el mismo resultado final.

Luego, dada una matriz de datos $X_{n,p}$ con n filas (individuos) y p columnas (variables) generalmente transformada (centrada o estandarizada), calcular los valores y vectores propios.

En cuanto al número de dimensiones a retener existen diferentes criterios, uno de ellos sugiere seleccionar componentes hasta que se forme un "codo", es decir un punto a partir del cual los valores propios tomen un comportamiento similar. Un segundo criterio sugiere retener el número de componentes que tengan autovalores asociados mayor o igual a la unidad, en este estudio los primeros cinco componentes o dimensiones presentan autovalores mayores o igual a 1. Finalmente se aconseja seleccionar componentes que alcancen una proporción como el 80% o 90%, dicho criterio es arbitrario y se debe aplicar con cuidado. En el área de ecología los investigadores esperan una proporción de varianza explicada que cubra o supere el 30%.

Para la realización del Análisis de componentes principales (PCA) se ocuparon los softwares Excel y RStudio, la funcionalidad del PCA es reducir la dimensionalidad de un conjunto de datos consistentes en un gran número de variables interrelacionadas, reteniendo tanto como sea posible la variación de los datos originales. En Excel se limpiaron las tablas con los datos para 23 parámetros fisicoquímicos utilizando los datos de solo aquellas estaciones que contenían datos para todas las variables ambientales, por lo que no se consideraron los datos de la estación BB13 y RE-10.

Estac.	Fecha	pH	Conduct	Oxig.	Al Tot.	Cloro	Col Rec.	DBOS	DOO	Fe Tot.	P Tot.	Fenol	N NO2	N NO3	N NH4	N Tot.	P PO4	S Susp.	Sulfato	AOX	Temp.	Color	Clorofila a	Clorofila Tot	
			µS/cm	mg/L	mg/L	mg/L	NAP/DODM	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L	°C	PCU	µg/m³	µg/m³	
ABBO	dic-21		3.60	3.97	0.60	0.97	1.4	3.0	3.0	0.01	0.01	<0.01	<0.01	<0.0016	0.0180	<0.016	0.07	<0.004	19.2	19.42		<5.0			
BBO	dic-21	2.86	76	9.8	0.23	4.37	<1.8	1.5	2.0	0.16	0.01	<0.01	<0.0016	0.0230	<0.016	0.15	<0.004	1.9	8.94	<0.010	11	<5.0	0.4	0.75	
BB1	dic-21	2.85	87	9.2	0.15	2.62	<1.8	1.0	2.0	0.05	0.02	<0.01	<0.0016	0.0020	0.018	0.03	<0.004	1.3	6.24	<0.010	14.4	<5.0	0.34	0.49	
B-20	dic-21	7.41	79	9.2	0.23	2.69	<1.8	1.0	3.0	0.25	0.06	<0.01	<0.0016	0.0042	0.016	0.03	<0.004	5.2	18.00	<0.010	15.2	<5.0	2.69	3.78	
BB3	dic-21	7.8	125	8.3	0.20	4.87	10	1.5	3.0	0.23	0.03	<0.01	<0.0016	0.0150	<0.016	0.21	<0.004	6.3	11.54	0.010-0.010	17.8	14.0	0.41	0.52	
BB4	dic-21	8.12	115	8.8	0.17	4.97	27	<1.0	2.0	0.18	0.03	<0.01	<0.0016	0.01010	<0.016	0.22	<0.004	2.3	11.2	0.010-0.010	19.8	13.0	0.55	1.18	
BB7	dic-21	7.5	184	8.3	0.20	6.27	184	1.8	3.0	0.21	0.06	<0.01	<0.0016	0.0240	<0.016	0.41	<0.004	4.8	17.74	0.011	21.4	10.0	2.01	2.17	
BB8	dic-21	7.45	168	8.2	0.20	6.64	2100	1.5	3.0	0.25	0.06	<0.01	<0.0016	0.0230	<0.016	0.23	<0.004	5.2	18.00	0.015	22.2	9.9	2.69	3.31	
BB11	dic-21	7.76	154	8.4	0.23	9.13	45	1.0	3.0	0.23	0.06	<0.01	<0.0016	0.0130	<0.016	0.23	<0.004	4.9	18.37	0.010-0.010	17.7	6.0	2.41	2.71	
BB13	dic-21	7.84	266	8.6	0.12		119	1.3	3.0	0.11	0.06	<0.01	<0.0016	0.0096	<0.016	0.23	<0.004	5.2		0.042	18.8	7.0	2.87	3.43	
B02	dic-21	7.52	77	9.7	0.34	2.62	1000	1.0	3.0	0.45	0.04	<0.01	<0.0016	0.0190	<0.016	0.35	0.004	4.1	8.94	<0.010	18.5	9.0	0.19	0.47	
D03	dic-21	7.45	143	9.6	0.22	3.44	25	1.5	3.0	0.25	0.05	<0.01	<0.0016	0.0080	0.021	0.29	0.004	5.3	9.4	<0.010	15.5	7.0	0.7	0.95	
LA1	dic-21	7.43	76	9.7	0.11	1.17	170	1.1	2.0	0.12	0.03	<0.01	<0.0016	0.0170	<0.016	0.06	0.005	1.9	6.78	<0.010	16.1	<5.0	0.26	0.52	
LA20	dic-21	7.47	142	8.6	0.14	1.83	460	1.6	2.0	0.13	0.05	<0.01	<0.0016	0.0210	<0.016	0.14	0.018	1.9	4.89	<0.010	21.8	<5.0	1.11	1.35	
LA2	dic-21	7.43	159	8.1	0.48	2.34	7.8	1.7	4.0	0.46	0.07	<0.01	<0.0016	0.011	0.2140	<0.016	0.46	0.007	10.8	5.8	<0.010	27.1	6.0	3.75	4.5
MA10	dic-21	7.21	88	8.8	0.31	3.49	380	<1.0	3.0	0.52	0.07	<0.01	<0.0016	0.0230	0.017	0.34	0.004	7.4	2.98	0.010-0.010	19.5	14.0	1.47	2.74	
RE-10	dic-21	7.1	89	8.5	0.31	2.80	14	<1.0	2.0	0.42	0.04	<0.01	<0.0016	0.0670	<0.016	0.26	0.018	2.4	2.82	<0.010	20.2	9.0	0.24	0.71	
VF2	dic-21	8.05	112	8.4	0.23	3.67	125	1.3	2.0	0.28	0.05	<0.01	<0.0016	0.0014	0.2810	<0.016	0.44	0.009	5.1	4.34	0.010-0.010	25.9	12.0	2.26	2.84
Q10	dic-21	7.41	119	8.9	0.54	3.32	15	1.6	4.0	0.61	0.47	<0.01	<0.0016	0.0085	1.1470	<0.016	1.20	0.008	19.0	8.00	0.010-0.010	21.5	9.0	0.7	0.68
ABBO	mar-22	7.51	106.5	9.2	0.104	3.44	<1.8	3	4	0.914	0.06	<0.01	<0.0016	0.007	0.016	0.02	7.7	24.08		<0.010	11.5	<5	2.82	3.34	
BBO	mar-22	7.42	82.2	8.7	0.438	4.87	1.8	3	3	0.18	0.03	<0.01	<0.0016	0.002	0.087	0.016	0.09	0.004	2.2	9.53	0.01	14.2	5.0	0.83	1.47
BB1	mar-22	7.56	81.3	9.1	0.103	3.7	1.8	3	4	0.18	0.06	<0.01	<0.0016	0.002	0.001	0.016	0.07	0.004	1	7.95	0.01	16.3	5.0	1.85	2.24
B-20	mar-22	7.92	84.8	8.6	0.074	3.91	1.8	3	4	0.10	0.06	<0.01	<0.0016	0.002	0.002	0.01	0.04	0.004	1	9	0.01	16.7	5.0	0.95	1.18
BB3	mar-22	7.18	111.1	9.2	0.124	6.18	132	3	4	0.18	0.06	<0.01	<0.0016	0.002	0.139	0.03	0.25	0.004	1.40	13.80	0.013	16.2	15.0	0.82	2
BB4	mar-22	7.50	156.2	9.7	0.143	8.96	15	3	5	0.18	0.08	<0.01	<0.0016	0.002	0.166	0.03	0.25	0.004	2.60	23.92	0.067	17.4	19.0	1.12	2.17
BB7	mar-22	7.40	119.5	9.9	0.19	6.5	277	3	5	0.24	0.11	<0.01	<0.0016	0.002	0.194	0.02	0.27	0.021	2.80	15.29	0.042	14.9	12.0	2.46	2.86
BB8	mar-22	7.49	148.6	9.5	0.183	7.96	119	2	3	0.60	0.07	<0.01	<0.0016	0.002	0.149	0.02	0.25	0.013	3.20	13.12	0.046	19.3	12.0	3.21	3.6
BB11	mar-22	7.51	140.3	8.8	0.196	8.08	617	2	3	0.20	0.07	<0.01	<0.0016	0.002	0.121	0.02	0.17	0.012	4.60	19.95	0.035	13.9	9.0	4.31	4.61
BB13	mar-22	7.33	235.8	8.8	0.137		303	3	2	0.13	0.1	<0.01	<0.0016	0.014	0.142	0.11	0.27	0.049	2.60		0.044	15.2	10.0	2.01	2.66
B02	mar-22	6.85	77.5	7.5	0.354	3.62	8	3	4	0.47	0.07	<0.01	<0.0016	0.003	0.206	0.016	0.25	0.004	2.9	5.3	0.01	15.9	6.0	0.36	1.29
D03	mar-22	6.94	143.6	8.345	0.343	4	6	3	3	0.28	0.07	<0.01	<0.0016	0.003	0.158	0.016	0.94	0.233	4.5	5.69	0.01	15.0	6.0	0.34	0.46
LA1	mar-22	7.36	75.1	75.1	0.077	1.46	2	3	4	0.07	0.04	<0.01	<0.0016	0.002	0.023	0.016	0.007	1.3	6.87	0.01	14.1	5.0	0.7	1.11	
LA20	mar-22	7.28	88.9	88.9	0.275	1.62	240	3	4	0.16	0.05	<0.01	<0.0016	0.002	0.018	0.016	0.05	0.01	1	4.9	0.01	15.1	12.0	0.65	1.03
LA2	mar-22	7.28	123.2	123.2	0.229	1.4	240	3	4	0.17	0.06	<0.01	<0.0016	0.001	0.018	0.016	0.08	0.02	4	5.43	0.01	21.5	8.0	1.54	1.99
MA10	mar-22	7.07	101.7	101.7	0.167	3.49	110	3	4	0.44	0.05	<0.01	<0.0016	0.002	0.204	0.016	0.27	0.035	3.2	4.3	0.01	16.3	16.0	0.68	1.24
RE-10	mar-22	6.88	86.3	86.3	0.122	3.58	33	3	4	0.31	0.05	<0.01	<0.0016	0.002	0.203	0.016	0.07	0.004	1.5	4.04	0.01	17.3	13.0	0.77	1.42
VF2	mar-22	7.48	107.5	107.5	0.088	4.24	12	3	4	0.23	0.08	<0.01	<0.0016	0.003	0.200	0.016	0.31	0.004	1.8	6.23	0.01	17.7	12.0	2.33	3.39
Q10	mar-22	7.41	140	140	0.35	5.08	1600	3	10	0.17	0.16	<0.01	<0.0016	0.008	1.011	0.16	1.63	0.06	5.4	7.88	0.002	15.4	12.0	0.79	1.52
ABBO	ago-22	7.59	51.1	12.5	0.209	3.69	17	<1	<2	0.261	0.02	<0.0010	<0.0002	0.14	<0.016	0.15	<0.012	2.6	8.51		7.7	<5	2.29	3.01	
BBO	ago-22	7.65	54.5	13.1	0.242	2.91	1.8	<1	<2	0.11	<0.02	<0.0010	<0.0002	0.001	<0.016	0.08	<0.012	2	6.18	0.012	7.10	5.0	1.55	1.97	
BB1	ago-22	7.56	41.5	13	0.085	1.6	4.5	<1	<2	0.082	0.01	<0.0010	<0.0002	0.003	<0.016	0.06	<0.012	<1	3.41	0.004	7.80	5.0	2.19	2.55	
B-20	ago-22	7.94	37.6	12.7	0.228	3.45	23	<1	<2	0.216	0.03	<0.0010	<0.0002	0.041	<0.016	0.05	<0.012	3	3.82	0.004	7.20	5.0	0.99	1.18	
BB3	ago-22	7.2	37.4	12.4	0.209	1.62	9.6	<1	<2	0.238	0.01	<0.0010	<0.0002	0.154	<0.016	0.21	<0.012	1.9	3.44	0.004	8.53	5.0	0.66	0.97	
BB4	ago-22	7.07	47.7	12.2	0.238	1.94	10.9	<1	<2	0.256	0.01	<0.0010	<0.0002	0.168	<0.016	0.2	0.018	2.9	4.61	0.005	8.60	5.0	0.84	1.42	
BB7	ago-22	7.25	54.9	11	0.291	2.3	6.4	<1	<2	0.357	0.03	<0.0010	<0.0002	0.294	<0.016	0.31	<0.012	4.1	4.96	0.007	10.20	5.0	0.5		

período dic-21, mar-22 y ag-22 con respecto a las estaciones de monitoreo, que permite interpretar los datos para determinar las variables con respecto a las estaciones que mejor representen patrones de comportamiento.

3. Resultados y discusiones

3.1. Análisis de muestras

3.1.1. Recuentos de viabilidad

Los recuentos de viabilidad se determinaron a través de la cuantificación por densidad óptica utilizando un microscopio de fluorescencia a base de utilizar el Kit de viabilidad bacteriana LIVE/DEAD™ BacLight™, en donde se obtuvieron los resultados que se observan en la tabla 4, respecto al recuento de células bacterianas viables, el recuento de células bacterianas muertas, el recuento total de células bacterianas y los porcentajes de viabilidad. Cabe destacar que para las estaciones correspondientes al mes de diciembre hay falta de registro de datos, ya que las muestras no estaban disponibles para su análisis en el laboratorio.

Tabla 4. Recuentos y porcentajes de viabilidad para estaciones de monitoreo pertenecientes al PMBB.

Estaciones	Rec. Células vivas	Rec. Células muertas	Rec. Total	Rec. Total (log 10)	Porcentajes de viabilidad (%)
BB0-Dic-21	2550000	2470000	5020000	6,7	51
BB4-Dic-21	510000	2700000	3210000	6,5	16
BB8-Dic-21	3020000	2870000	5890000	6,8	51
BB11-Dic-21	2060000	2350000	4410000	6,6	47
LA1-Dic-21	1800000	4420000	6220000	6,8	29
MA-10-Dic-21	3790000	3440000	7230000	6,9	52
RE-10-Dic-21	4920000	4350000	9270000	7,0	53
GU1-Dic-21	1190000	4180000	5370000	6,7	22
BB0-Mar-22	2400000	3280000	5680000	6,8	42
BB1-Mar-22	2610000	2090000	4700000	6,7	56
BI-20-Mar-22	296000	2220000	2516000	6,4	12
BB3-Mar-22	5300000	4910000	10210000	7,0	52
BB4-Mar-22	5590000	5590000	11180000	7,0	50
BB8-Mar-22	4630000	3640000	8270000	6,9	56
BB11-Mar-22	7400000	2770000	10170000	7,0	73
BU2-Mar-22	1900000	3360000	5260000	6,7	36
DU1-Mar-22	6560000	5420000	11980000	7,1	55
LA1-Mar-22	2520000	1960000	4480000	6,7	56
LA-20-Mar-22	4870000	4410000	9280000	7,0	52
LA2-Mar-22	5420000	2430000	7850000	6,9	69
MA-10-Mar-22	1680000	564000	2244000	6,4	75
RE-10-Mar-22	1490000	260000	1750000	6,2	85
VE2-Mar-22	5240000	2720000	7960000	6,9	66
GU1-Mar-22	977000	415000	1392000	6,1	70
BB0-Ag-22	2510000	1850000	4360000	6,6	58
BB1-Ag-22	3760000	3090000	6850000	6,8	55
BI-20-Ag-22	2150000	2720000	4870000	6,7	44
BB3-Ag-22	4420000	2750000	7170000	6,9	62
BB4-Ag-22	431000	177000	608000	5,8	71
BB7-Ag-22	3660000	3540000	7200000	6,9	51
BB8-Ag-22	3170000	5620000	8790000	6,9	36
BB11-Ag-22	2280000	3250000	5530000	6,7	41
BU2-Ag-22	1870000	3220000	5090000	6,7	37
DU1-Ag-22	2840000	4830000	7670000	6,9	37
LA1-Ag-22	2520000	3180000	5700000	6,8	44
LA-20-Ag-22	4110000	2720000	6830000	6,8	60
LA2-Ag-22	5490000	4530000	10020000	7,0	55
MA-10-Ag-22	3210000	3880000	7090000	6,9	45
RE-10-Ag-22	2070000	3290000	5360000	6,7	39
VE2-Ag-22	4310000	3490000	7800000	6,9	55
GU1-Ag-22	5740000	4980000	10720000	7,0	54

De la tabla 4 se puede observar que todas las estaciones para sus respectivos meses poseen un recuento total de células bacterianas que es alto, lo que indica que en los puntos de muestreo existen las condiciones para que exista vida microbiana. Ahora bien, evaluando la capacidad de supervivencia de las bacterias en los respectivos puntos de control se observan los porcentajes de viabilidad, para la evaluación de los porcentajes de viabilidad se consideró un rango de entre 40-60% como porcentajes estables de viabilidad.

Los porcentajes de viabilidad sobre un 60% indican que en aquellas muestras analizadas existen agentes estimulantes que favorecen las condiciones para la capacidad de supervivencia y desarrollo de los microorganismos, por otro lado, los porcentajes que están bajo un 40% indican que en aquellas muestras existen agentes estresores que dificultan la capacidad de supervivencia de los microorganismos y su desarrollo.

Se puede observar en la tabla 5, que la mayoría de los porcentajes sobre un 60% corresponden a estaciones para el mes de marzo que es el período en que el río Biobío tiene menor caudal para la estación de verano. De manera general para los porcentajes sobre un 60% que corresponden a estaciones del mes de marzo, debido a que para aquel período de menor caudal (período de estiaje) la entrada de nutrientes al río se concentra más y por lo tanto en ciertos puntos de control a lo largo de la trayectoria del río Biobío la entrada y mayor disponibilidad de nutrientes favorece el desarrollo de los microorganismos y por lo tanto su capacidad de supervivencia es mayor. Con respecto los porcentajes bajo un 40% estos se ven reflejados para estaciones en los tres meses de evaluación (diciembre, marzo y agosto), por lo que no se puede justificar un tipo de comportamiento estacional y más bien la causa se debe a que son estaciones donde hay presencia de compuestos diversos que entran al río y que derivaran de distintos tipos de contaminación como, por ejemplo: industrial, urbana, agroindustrial, etc., que causan un impacto negativo frente al crecimiento y supervivencia microbiana. Los microorganismos vivos son muy sensibles y se ven afectados por factores

ambientales con los que interactúan, tales como el pH, oxígeno, temperatura, etc. (Chávarri et al., 2012; Kailasapathy, 2014).

Tabla 5. Porcentajes de viabilidad menores a 40% y mayores a 60% para las respectivas estaciones de control pertenecientes al PMBB

% < 40%: Agentes estresores	% > 60%: Agentes estimulantes
GU-1 Dic (22,21%)	GU-1 Mar (70,2%)
LA-1 Dic (29%)	BB13 Mar (60,6%)
BB4 Dic (15,8%)	BB11 Mar (73%)
BB4 Mar (24,1%)	BB4 Ag (70,8%)
DU-1 Ag (37,13%)	RE-10 Mar (85,2%)
BI-20 Mar (12%)	MA-10 Mar (74,8%)
ABB0 Mar (15%)	BB3 Ag (61,7%)
RE-10 Ag (38,72%)	VE2 Mar (66%)
BU2 Mar (36,2%)	LA2 Mar (69%)
BU2 Ag (36,7%)	
BB8 Ag (36%)	

De la tabla 5 se puede observar que el porcentaje de viabilidad más bajo corresponde a la estación BI-20 para el mes de marzo y el porcentaje más alto de viabilidad corresponde a la estación RE-10 para el mes de marzo. Lo anterior se puede deber a que la estación BI-20 se encuentra en la parte alta de la cuenca donde hay mayor contacto con terrenos naturalizados y centrales hidroeléctricas, por lo tanto la carga de nutrientes de entrada es baja en comparación a estaciones de control que están en contacto con terreno antropizados, la baja entrada de nutrientes se acentúa más en el periodo de marzo para las estaciones que se posicionan en la parte media-alta de la cuenca debido a que al ser el periodo de menor caudal y donde hay bajas precipitaciones, la entrada de nutrientes de las zonas ribereñas por escorrentía superficial y lixiviación del suelo es menor. Por otro lado en relación a la estación RE-10 para el mes de marzo, esta se encuentra posicionada en la parte media de la cuenca y en contacto con terreno antropizados ligados a la actividad agroindustrial, por lo que recibe una mayor carga de nutrientes

derivados de compuestos nitrogenados utilizados en fertilizantes y de origen animal, es por eso que a menor caudal para el período de verano y producto de la erosión del suelo, la concentración de nutrientes que entra al río se concentra más y favorece la disponibilidad de nutrientes para la supervivencia de los microorganismos bacterianos.

3.1.2. Cuantificaciones de ADN

La cuantificación del ADN para la obtención de concentraciones y purezas se determinó utilizando el equipo Infinite 200 PRO como se observa en la siguiente tabla:

Tabla 6 Cuantificaciones de ADN y porcentajes de viabilidad de muestras pertenecientes a las estaciones de control del PMBB

Estación de control		Concentración (ng/μl)	Pureza (A260/280)	%Viabilidad
ABB0	Dic-21	-	-	-
	Mar-22	109,2	1,89	55,6
	Ag-22	64,9	1,82	54,9
BB0	Dic-21	71,5	1,71	51
	Mar-22	68	1,49	43
	Ag-22	88,2	1,73	57,8
BB1	Dic-21	-	-	-
	Mar-22	109,2	1,89	55,6
	Ag-22	64,9	1,82	54,9
BB4	Dic-21	39,2	1,85	15,8
	Mar-22	169,4	1,82	24,1
	Ag-22	128,5	1,7	70,8
BB3	Dic-21	-	-	-
	Mar-22	107	1,86	52
	Ag-22	94	1,8	61,7
BI-20	Dic-21	-	-	-
	Mar-22	58,6	1,78	12
	Ag-22	63,2	1,85	44,1
BB7	Dic-21	-	-	-
	Mar-22	-	-	41,8
	Ag-22	208,1	1,78	50,9
BB8	Dic-21	97,1	1,5	51,3
	Mar-22	116,5	1,87	56
	Ag-22	116	1,87	38,6
BB11	Dic-21	248,4	1,51	46,87
	Mar-22	16,9	1,9	73
	Ag-22	147,7	1,91	41,2
BB13	Dic-21	-	-	-
	Mar-22	4,7	1,68	60,6
	Ag-22	74,6	1,64	40,6

Estación de control		Concentración (ng/μl)	Pureza (A260/280)	%Viabilidad
GU-1	Dic-21	71	1,8	22,21
	Mar-22	3,5	2,69	70,2
	Ag-22	54,7	1,57	53,5
DU-1	Dic-21	-	-	-
	Mar-22	103	1,85	54,7
	Ag-22	110,2	1,75	37,13
BU-2	Dic-21	-	-	-
	Mar-22	77	1,91	36,2
	Ag-22	60,1	1,84	36,7
LA-1	Dic-21	97,1	1,84	29
	Mar-22	40,6	1,51	56,3
	Ag-22	116	1,8	44,3
LA-2	Dic-21	-	-	-
	Mar-22	137,2	1,74	69
	Ag-22	85,7	1,61	54,7
LA-20	Dic-21	-	-	-
	Mar-22	93,2	1,74	54,7
	Ag-22	53,6	1,4	60
MA-10	Dic-21	144,6	1,75	52,4
	Mar-22	251,1	1,75	74,8
	Ag-22	189,2	1,6	45,2
RE-10	Dic-21	96,6	1,9	53
	Mar-22	15,1	1,7	85,2
	Ag-22	68,1	1,75	38,7

Para la interpretación de resultados se consideró un volumen mínimo de muestra que ha de ser al menos de 5-10 ng/μl, y rangos de pureza de aceptable a óptima considerando un ADN con pureza óptima tiene un valor entre 1.8-2.0. Un ADN de pureza aceptable debe tener al menos una relación A260/280 > 1.6. Un valor A260/280 < 1.6 indica una posible contaminación por compuestos aromáticos como fenoles y proteínas. Un radio A260/280 > 2.1 podría deberse a la presencia de ARN en la muestra.

A partir de la consideración de los rangos mencionados anteriormente para la evaluación de concentración y pureza, se puede observar que las estaciones de control del PMBB como BB13 para el mes de marzo y GU-1 para el mes de marzo, son estaciones con concentraciones de ADN bajo 5 ng/μl por lo que se detectaron fallas en el protocolo de extracción de ADN utilizando el kit comercial DNeasy PowerSoil Pro. Otro punto por considerar es la evaluación de la pureza de las extracciones de ADN, se puede observar cómo BB0 marzo, BB8 diciembre, BB11 diciembre, GU-1 agosto, LA-1 marzo y LA-20 agosto, tienen purezas bajo un 1,6 lo

que indica contaminación por proteínas y compuestos aromáticos, y la muestra GU-1 marzo tiene una pureza sobre 2,0 lo que indica que el ADN se contaminó con ARN. La causa de las bajas o altas purezas indicaron fallas en el protocolo de extracción de ADN, ya que se destaca que los kits de extracción favorecen la pureza de las muestras, sin embargo, se destaca que el protocolo de extracción es específico para muestras de suelo y no para muestras de agua. A través de revisión previa se verificó que la mayoría de los estudios que trabajan con muestras de agua para extracción de ADN, utilizan kits de extracción de ADN específicos para muestras de agua o muestras de sangre y tejidos, que entregan mejores resultados de concentración, pureza e integridad al evaluar el ADN extraído.

3.1.3. Verificación de integridad del ADN extraído con el protocolo inicial por electroforesis en gel de agarosa

Una vez extraído el ADN se verificó su integridad por electroforesis en gel de agarosa al 1,2% a 80 Voltios durante 30 minutos y se visualizó mediante el uso de un agente intercalante SafeView en el transiluminador UVITEC Platinum HD7.

Lo que se espera ver de una muestra de ADN íntegro en un gel de agarosa al evaluar su integridad, es la visualización de una banda diana estrecha cercana al pozo en que se colocó la mezcla de ADN. Sin embargo, en los geles A, B y C se puede observar como la mayoría de las muestras muestra un "chorreado" o un tipo de estela en donde los fragmentos de corto tamaño a través de electronegatividad viajaron a mayor velocidad por el gel que forma malla tridimensional, es decir, el ADN está fragmentado en pequeñas secuencias de pares de bases y se observa una banda de más de un cm de ancho o un sendero luminoso en el carril de la muestra. El ADN fragmentado dificulta la amplificación de productos de PCR de alto peso molecular y afecta la reproducibilidad de las técnicas. La obtención de ADN íntegro y puro es una parte fundamental para el buen desempeño de las técnicas utilizadas en biología molecular (Tang et al. 2005, Wang et al. 2005).

Los problemas de integridad en el ADN derivan de fallas en el protocolo de extracción de ADN mediante el uso del kit comercial DNeasy PowerSoil Pro. Estos métodos son susceptibles de contaminación, variación y errores por los múltiples

pasos de manipulación (Störmer et al. 2007). Los problemas en la manipulación de las muestras al inicio del protocolo de extracción usando el protocolo DNeasy PowerSoil Pro se deben a posibles errores en el uso del equipo beadbeater debido a un tiempo excesivo en el uso del equipo que daño la integridad del ADN, fragmentando las cadenas de pares de bases en pequeños trozos, otro error cometido fue no considerar la cadena de frío en la manipulación de los filtros ya que es recomendable mantener las muestras en una cama de hielo lo cual evita que el ADN se fragmente por el calor que se produce durante el tiempo de trozado de los filtros anterior a ser introducidos en los tubos con perlas de lisis en la extracción de ADN. La extracción de ADN íntegro y sin contaminantes es esencial para tener éxito en la obtención de datos genéticos, es el primer paso en la lista de técnicas moleculares que nos llevarán a comprender mejor y conservar la diversidad biológica a partir del conocimiento de genes y genomas que anteriormente era inaccesible.

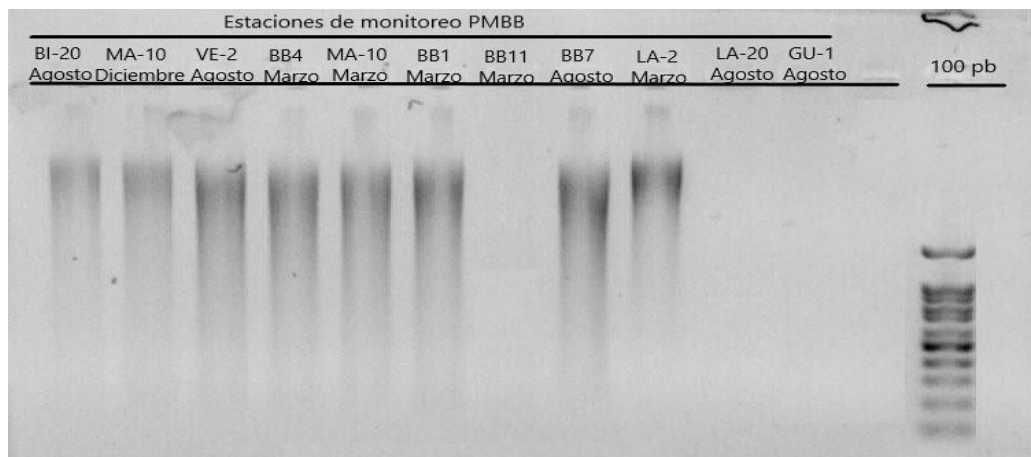


Figura 11 Gel de agarosa al 1,2% corrido por 40 min a 80V para muestras pertenecientes al PMBB

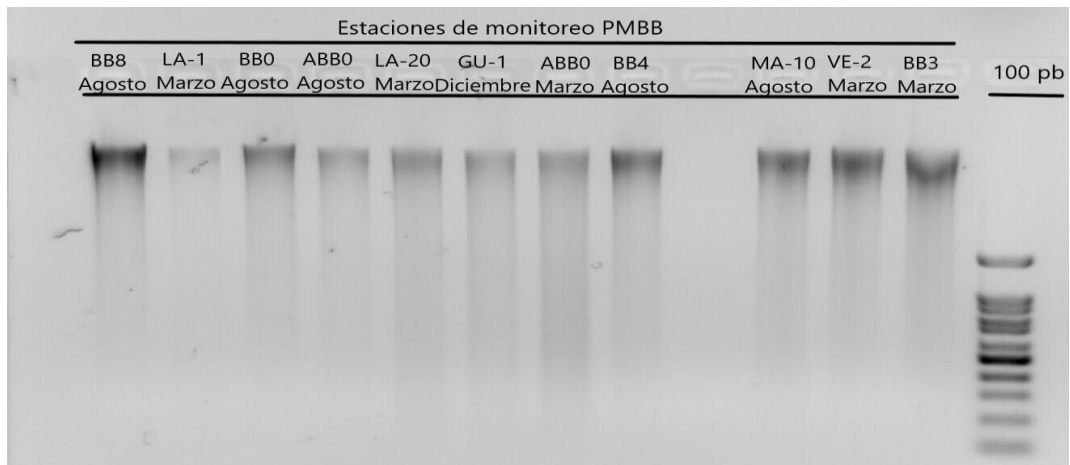


Figura 12 Gel de agarosa al 1,2% corrido por 40 min a 80V para muestras pertenecientes al PMBB

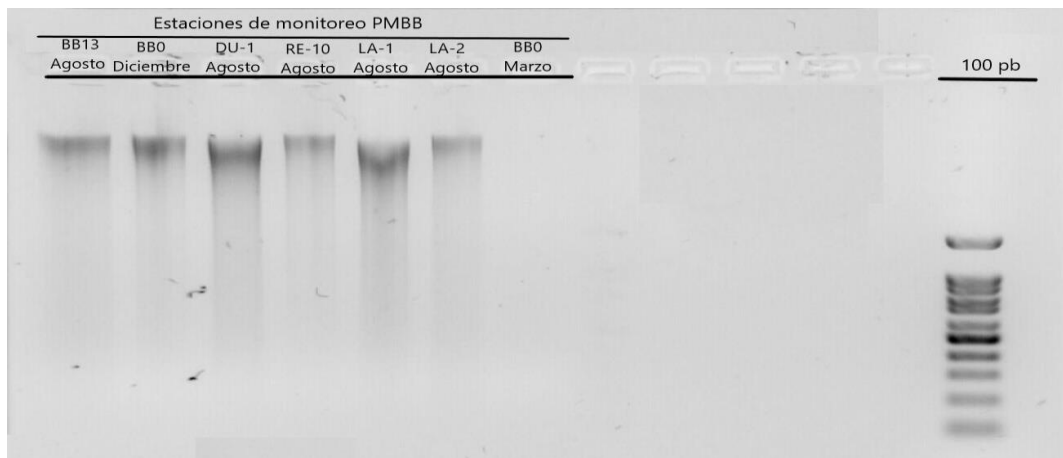


Figura 13 Gel de agarosa al 1,2% corrido por 40 min a 80V para muestras pertenecientes al PMBB

Se debe considerar que en muestras ambientales como las muestras de agua del río Biobío, se extrajo el ADN de microorganismos de tamaño menor a la porosidad de 0,22 μm del filtro de éster celulosa utilizado en el proceso de filtración, por lo que en el ADN extraído se puede llegar a detectar microorganismo como: Bacterias (0,5-1 x 2,-5 μm), Hongos levaduriformes (unicelulares 2-6 μm), Actinomicetos (2-5 μm),

Protozoos (3-1000 μm), Microalgas (10-200 μm), Nematodos (0,25-1 mm) y Colémbolos (0,2-10 mm), por lo tanto, en la verificación de la integridad del ADN la visualización de una banda diana fija en la parte superior del gel como en el caso de la extracción de ADN de una cepa pura bacteriana, es de difícil obtención ya que en el ADN extraído hay distintos tamaños de pares de bases que conforman el ADN pertenecientes a distintos microorganismos.

Es importante contemplar modificaciones en la manipulación de las muestras para mejores obtenciones de integridad del ADN adecuadas a muestras de agua utilizando un kit de extracción DNeasy PowerSoil Pro que está especializado en extraer ADN de muestras de suelo.

3.1.4. Resultados de ensayo experimental para modificación del protocolo inicial de extracción de ADN

Producto de las fallas en la verificación del ADN utilizando el protocolo inicial de ADN, se procedió a crear un ensayo experimental en el laboratorio con un medio líquido de características similares a las muestras de agua del río Biobío.

Para el ensayo experimental se consideró someter a los tubos Power Bead Pro tube con un máximo de 2 filtros a baño sónico a solo 2 de los tubos resultantes y a distintos tiempos de lisis mecánica en el equipo beadbeater a todos los tubos, quedando así una distribución de: Tubo S1 sometido a 3 minutos de baño sónico y luego 3 minutos en el equipo Bead Beater para lisis mecánica, Tubo S2 sometido a 5 minutos de baño sónico y luego 3 minutos en el Bead Beater, Tubo 1 (1 min 45 seg.), Tubo 2 (2 minutos), Tubo 3 (2 min 30 seg.), Tubo 4 (3 minutos) y Tubo 5 (4 minutos). De los cuales se obtuvieron los siguientes resultados con respecto a concentraciones y purezas:

Tabla 7 Resultados de concentraciones y purezas de ensayo experimental para modificaciones al protocolo inicial de extracción de ADN.

Tiempo	Tubo 1 1.45 min	Tubo 2 2 min	Tubo 3 2.30 min	Tubo 4 3 min	Tubo 5 4 min	Tubo S1 (3 min BS +3 min BB)	Tubo S2 (5 min BS + 3 min BB)
Conc. (ng/μl)	358,2	414,1	579,2	365,6	628	532,2	578,5
Pureza	1,87	1,88	1,86	1,9	1,9	1,89	1,89
Rec.Neubauer	2,0E7						

Los resultados muestran muy buenos resultados con respecto a concentraciones y purezas, cabe mencionar que estos resultados derivan de la filtración de un medio líquido ficticio creado en el laboratorio utilizando cepas puras de bacterias disponibles en el laboratorio para alcanzar la misma composición microbiana de las muestras de agua del río Biobío.

En la verificación de la integridad del ADN mediante electroforesis se puede apreciar una mejor integridad de las muestras en comparación con los geles que resultaron del uso del protocolo inicial de extracción, se puede observar la banda superior de color negro de un gran tamaño producto de la gran cantidad de ADN resultante para todas las muestras y un menor tipo de "chorreado" de las muestras que indico una menor presencia de fragmentos degradados en pequeños pares de bases que se movilizaron hacia la parte inferior del gel por electronegatividad en comparación con los geles resultantes para la verificación del ADN utilizando el protocolo inicial de extracción.

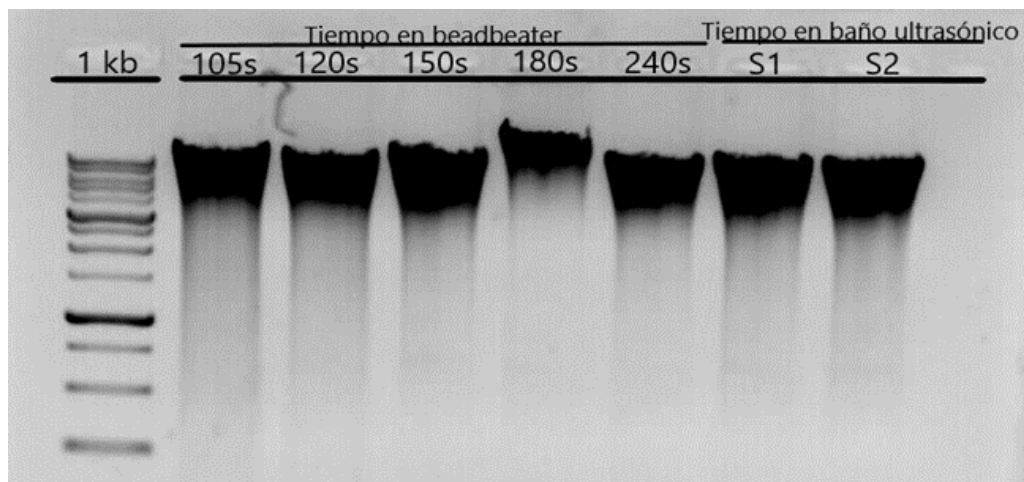


Figura 14 Gel de agarosa al 1,2% corrido por 40 min a 80V.

Producto de los buenos resultados a través de las modificaciones descritas en la metodología para el ensayo experimental, es que aquellas modificaciones se consideraron para la creación de un protocolo optimizado de extracción de ADN considerando como punto central la modificación de los pasos en la manipulación de las muestras con respecto al limitar el material (filtros de éster celulosa) ingresado por casa tubo Power Bead Pro tube a un máximo de 2 filtros, procurar la mantención de la cadena de frío a -80°C entre cada relleno de tubo, someter a un máximo de 3 minutos beadbeater para lisis mecánica a las muestras y entre los 2 minutos cumplidos de beadbeater con solo 800 μl de CD1, luego volver a agregar 500 μl más de la solución buffer CD1 para luego someter por otro minuto más los tubos a lisis mecánica utilizando el equipo beadbeater. Estas modificaciones se explican más en detalle para los resultados en la formación del protocolo optimizado de extracción de ADN.

3.1.5. Protocolo optimizado de extracción de ADN

Se generó un protocolo optimizado de extracción de ADN derivado del ensayo experimental, que dio buenos resultados respecto a las concentraciones, purezas e integridad del ADN, para la obtención de buenos resultados en las extracciones de ADN a las muestras de agua del río Biobío faltantes.

El protocolo optimizado de extracción de ADN consideró limitar la cantidad de filtros de éster celulosa ingresados por tubo con perlas de lisis (Power Bead Pro tube) a un máximo de 2 filtros trozados por tubo, ya que un exceso de filtros trozados por tubo disminuía la capacidad de molienda al someter los tubos a lisis mecánica producto de un sobrelleno por tubo, se consideró también un tiempo máximo de uso del equipo beadbeater de 3 minutos, pero que en primera instancia al agregar 800 µl del primer buffer de lisis (CD1) a cada tubo con perlas de lisis (Power Bead Pro tube) se sometió a lisis mecánica utilizando el equipo beadbeater por 2 minutos y producto de que los filtros durante la molienda absorbieron en gran medida el primer buffer de lisis se procedió a agregar 500 µl más del primer buffer de lisis (CD1) para someter los tubos Power Bead Pro tube a otro minuto de lisis mecánica en el equipo beadbeater con un total máximo de 3 minutos como se mencionó anteriormente. Otro aspecto que se modificó del protocolo inicial de extracción de ADN para la generación del protocolo optimizado de extracción para muestras de agua del río Biobío es la mantención de la cadena de frío en la manipulación de las muestras, es decir, al retirar los filtros de -80°C, considerando solo dos filtros de muestra se volvió a almacenar a -80°C el resto de los filtros para que no perdieran la cadena de frío. Los dos filtros retirados se cortaron con un bisturí en pequeños trozos de manera rápida en un mesón de trabajo estéril y se introdujeron en un primer tubo de Power Bead Pro tube que luego fue llevado a -80°C. Este paso se repite reiteradamente hasta agotar todos los filtros almacenados a -80°C de dos en dos, considerando siempre mantener los filtros trozados dentro de los tubos con perlas de lisis en cadena de frío hasta antes de agregar el primer buffer de lisis CD1.

Tabla 8 Diferencias entre protocolo inicial de extracción de ADN y protocolo optimizado de extracción de ADN.

Protocolo inicial de extracción de ADN	Protocolo optimizado de extracción de ADN
Filtros se retiraron de -80°C para ser cortados e introducidos en tubos Power Bead Pro tube (4 filtros por tubo)	Filtros se retiraron de -80°C para ser cortados e introducidos en tubos Power Bead Pro tube (2 filtros por tubo)
Durante la manipulación de los tubos Power Bead Pro tube estos se fueron almacenando en una gradilla a temperatura ambiente	Durante la manipulación de los tubos Power Bead Pro tube estos se fueron almacenando a -80°C antes de agregar el primer buffer de lisis
Se les agrego 800 µl del primer buffer de lisis (CD1) del protocolo de extracción	A los tubos Power Bead Pro tube se les agrego 800 µl del primer buffer de lisis (CD1) del protocolo de extracción
Beadbeater por 5 min para la lisis celular	Beadbeater a los tubos por 2 min para la lisis celular
Se siguió con cada paso del protocolo de extracción usando el kit comercial Qiagen	Se les agrego a los tubos 500 µl del primer buffer de lisis (CD1) y se llevaron a beadbeater por 1 min más
Los 50 µl de ADN resultantes se almacenaron a -20°C y se cuantifico 1 µl para obtener concentración y pureza por espectrofotometría	Se siguió con cada paso del protocolo de extracción usando el kit comercial Qiagen (se modificaron las soluciones de los buffers)
	Los 50 µl de ADN resultantes se almacenaron a -20°C y se cuantifico 1 µl para obtener concentración y pureza por espectrofotometría

Este protocolo optimizado se realizó a través del ensayo experimental anteriormente descrito para mejorar la calidad de las muestras y la obtención de buenos resultados en la verificación de la integridad del ADN de las muestras de aguas del río Biobío, el protocolo optimizado de extracción se aplicó a 13 muestras que no habían pasado aún por el protocolo inicial de extracción de ADN.

3.1.6. Verificación de integridad del ADN de muestras usando protocolo optimizado de extracción a través de electroforesis en gel de agarosa

A través de la aplicación del protocolo inicial de extracción y el protocolo optimizado de extracción de ADN se obtuvieron en su mayoría buenos resultados de concentraciones y purezas, por lo que el requisito de interés a evaluar consistió en la verificación de la integridad del ADN a partir de la aplicación del protocolo optimizado de extracción de ADN.

En los geles se puede observar que la muestra BB4 diciembre es la muestra que mejor integridad presento en comparación a todas las muestras incluyendo las que resultaron del protocolo inicial de extracción de ADN, ya que refleja una banda diana fija en la parte superior del gel y no presenta una estela o un tipo de "chorreado" en comparación a las demás muestras. La muestra DU-1 marzo también representa una franja de gran tamaño marcada en la parte superior por lo que su integridad también está en mejor estado en comparación a las demás muestras, algo similar, pero en menor cantidad sucede con la muestra BB11 agosto y BB8 marzo que tienen una franja medianamente marcada en la parte superior, pero que a la vez reflejan ADN degradado de pequeño tamaño de pares de bases que se deslizo a mayor velocidad por el gel por el carril de la muestra hacia la parte inferior del gel.

A pesar de la obtención de mejores resultados respecto a la verificación de la integridad del ADN, se observa que las muestras de igual manera tienen baja integridad al presentar fragmentos de ADN degradados de pequeños pares de bases que se arrastraron por el gel por el carril de muestra hacia la parte inferior del gel, por lo que se indica que más allá de ser una falla en el protocolo de extracción existen problemas con la procedencia de las muestras del PMBB ya que como se menciona en la descripción del muestreo, las muestras analizadas ya habían sido recolectadas por el PMBB por lo que el estado de procedencia de la muestras afecto la calidad del ADN de las muestras analizadas a través de las técnicas de biología molecular.

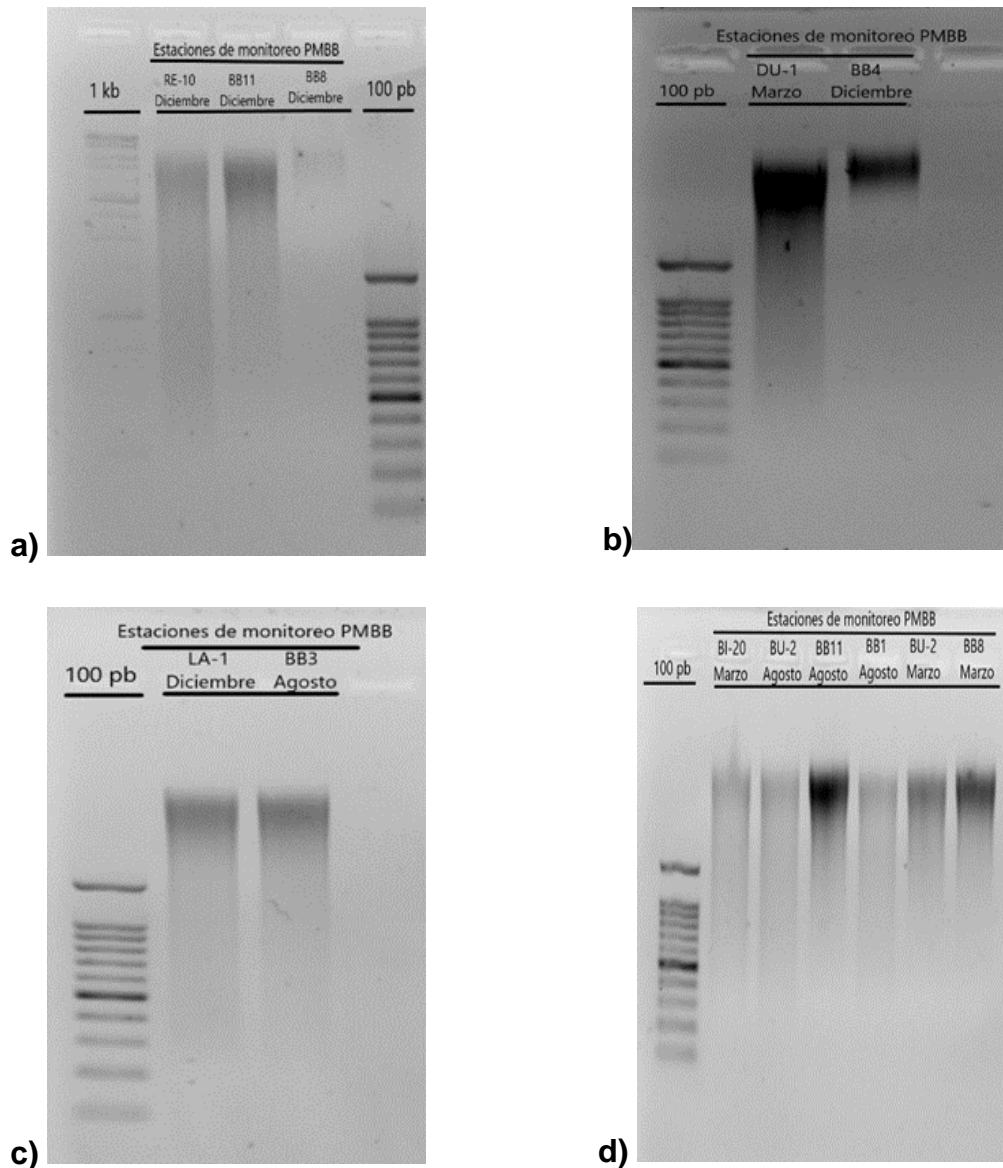


Figura 15 Geles A, B, C y D de agarosa 1,2%, corrido por 40 min a 80V para 13 muestras estudiadas usando el protocolo final de extracción.

Las fallas en la procedencia de las muestras recaen en la falta de mantención de cadena de frío de las muestras desde su muestreo, producto de que la temperatura es uno de los parámetros ambientales más importantes que condicionan el crecimiento y la supervivencia de los microorganismos, la temperatura afecta la velocidad de crecimiento y, por lo tanto, al tiempo de generación ya que cada microorganismo posee una tasa de crecimiento característica en función de la

temperatura. A pesar de que todos los microorganismos poseen distintos rangos de temperatura que permiten su viabilidad, es importante aplicar una cadena de frío a temperaturas mínimas como 4°C, -20°C y -80°C, ya que estas temperaturas permiten ralentizar todos los procesos vitales de modo que la multiplicación será más lenta, los nutrientes disponibles en la muestra duraran más y por lo tanto será mayor la capacidad de supervivencia de los microorganismos en buen estado de conservación, permitiendo así una mejor calidad de muestras para buenos resultados de análisis microbiológicos.

3.1.7. Detecciones de bacterias y hongos por reacción en cadena de la polimerasa

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es un método que permite la detección de microorganismos por amplificación del ADN y posterior detección y comprobación del producto amplificado.

Mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) podemos detectar ADN de todo tipo de organismos vivos o muertos ya se encuentren aislados o no, a través de la disponibilidad de partidores que permiten amplificar un gen de interés a partir de una muestra analizada.

A través del uso de los partidores 27F y 1492R para la detección de bacterias, ITS1 y ITS2 para la detección de hongos de las muestras de agua pertenecientes al río Biobío se aplicaron distintas temperaturas para los ciclos de desnaturalización, alineamiento y elongación dentro del termociclador BIO-RAD T100 Thermal Cycler, para así poder determinar y verificar la presencia de bacterias y hongos a través de electroforesis en gel de agarosa. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se realizó para muestras de las estaciones BB4 para los meses de marzo, agosto y diciembre, que se localiza en la parte media de la cuenca y a la estación BB11 para los meses de marzo, agosto y diciembre, que se localiza en la parte baja de la cuenca. Estas estaciones se escogieron de manera de detectar microorganismos de manera general en dos puntos objetivos de la cuenca del río Biobío que se

encuentran en presencia de terrenos donde se realizan actividades antropogénicas ligadas a industrias, zonas urbanas, terrenos agropecuarios y forestales, de manera de observar el efecto de aquellas actividades sobre la supervivencia y la detección de aquellos microorganismos.

De los geles 17 y 18 se puede confirmar la detección de bacterias y hongos en las estaciones de muestreo BB4 y BB11 para los meses de diciembre 2021, marzo 2022 y agosto 2022, sin embargo, se debe destacar la baja resolución de imágenes producto del uso de un transiluminador Bi-O-Vision de luz blanca/UV que no incluye cámara fotográfica para la obtención de fotos profesionales mediante el uso de un software por lo que las fotos fueron tomadas desde un celular y luego se editaron en Paint 3D. Se puede observar en los geles que a pesar de la detección de bacterias y hongos mediante la visualización de la banda diana marcada para cada muestra, se observa como en la parte inferior del gel se forma una especie de nube producto de la presencia de ADN degradado proveniente de las extracciones que es de pequeño tamaño y que no pudo replicarse correctamente en el PCR al no adherirse correctamente a los partidores por lo que se formaron pequeños dímeros que se desplazaron hasta la parte inferior del gel.

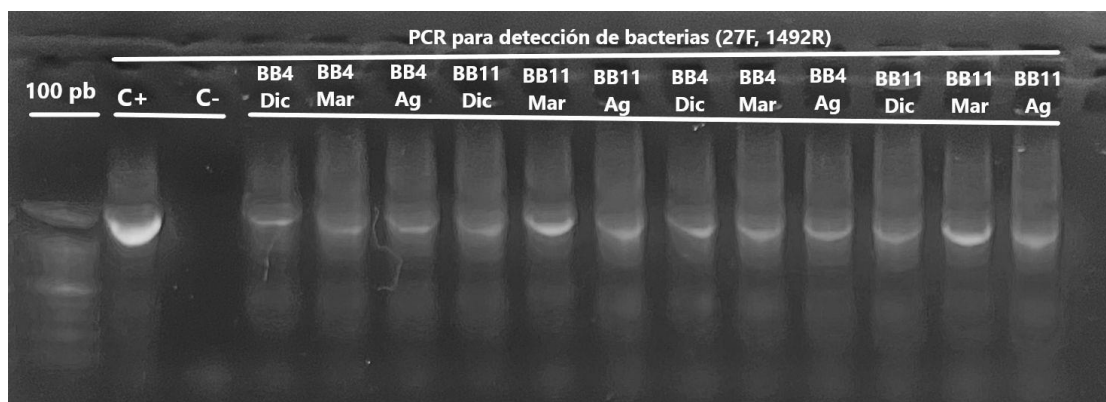


Figura 16. Gel de agarosa al 1,2%, corrido por 30 min a 80V para muestras estudiadas usando protocolo de PCR para detección de bacterias.

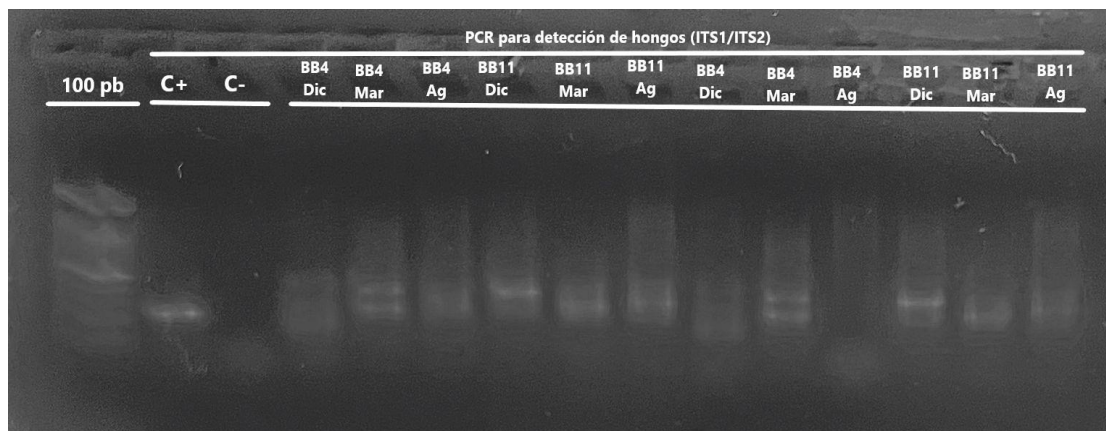


Figura 17 Gel de agarosa al 1,2%, corrido por 30 min a 80V para muestras estudiadas usando protocolo de PCR para detección de hongos.

La detección de hongos y bacterias permitió complementar el estudio de viabilidad de células bacterianas, al detectar la presencia de bacterias y también de hongos para estaciones de monitoreo pertenecientes al PMBB ubicadas en la parte central y baja de la cuenca del río Biobío.

3.2. Análisis bioestadístico

3.2.1. Análisis de componente principales

Para la realización del Análisis de componentes principales (PCA), lo primero que se realizó fue una limpieza de datos a la base de datos perteneciente al PMBB para diciembre 2021, marzo 2022 y agosto 2022 para las 23 variables ambientales monitoreadas por las NSCA-BB, eliminando todas aquellas estaciones que no contenían datos para todas las variables como en el caso de la estación RE-10 y ABB0. También se eliminaron los datos de la estación BB13 producto de que es una estación ubicada en la parte más baja de la cuenca casi en la desembocadura del río Biobío y por lo tanto sus valores correspondientes no son del todo representativos al evaluar patrones de comportamiento en relación a la viabilidad del río Biobío.

Estac.	Fecha	pH	Conduct	Oxig.	Al Tot.	Cloru	Col Fec.	DBOS	DOO	Fe Tot.	P Tot.	Fenol	N NO2	N NO3	N NH4	N Tot.	P PO4	S Susp.	Sulfato	ADX	Temp.	Color	Clorofila a	Clorofila Tot	
			µS/cm	mg/L	mg/L	mg/L	NMFI/DOMI	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L	°C	PCU	µg/m ³	µg/m ³	
ABBO	dic-21		0.60	3.97			1.4	3.0	0.69	0.04	<-0.001	<-0.0016	0.0180	<-0.016	0.07	<-0.004	19.2	19.42				<5.0			
BBO	dic-21	2.86	76	9.8	0.23	4.37	<1.8	1.5	2.0	0.16	0.01	<-0.001	<-0.0016	0.0230	<-0.016	0.15	<-0.004	1.9	8.94		<0.10	11	<5.0	0.4	0.75
BB1	dic-21	2.85	67	9.2	0.15	2.62	<1.8	1.0	2.0	0.05	0.02	<-0.001	<-0.0016	0.0020	0.018	0.03	<-0.004	1.3	6.24		<0.10	14.4	<5.0	0.34	0.49
B-20	dic-21	7.45	79	9.2	0.22	2.69	<1.8	1.0	1.0	0.10	0.02	<-0.001	<-0.0016	0.0040	<-0.016	0.03	<-0.004	3.3	7.85		<0.10	15.2	<5.0	0.81	1.78
BB3	dic-21	2.8	125	8.3	0.20	4.87	10	1.5	3.0	0.23	0.03	<-0.001	0.0003	0.1150	<-0.016	0.21	<-0.004	6.3	11.04	0.010-0.030	17.8	14.0	0.41	0.52	
BB4	dic-21	8.12	115	8.8	0.17	4.97	27	<1.0	2.0	0.18	0.03	<-0.001	0.0003	0.1010	<-0.016	0.22	<-0.004	2.3	11.2	0.010-0.030	19.8	13.0	0.55	1.18	
BB7	dic-21	7.5	184	8.3	0.20	6.27	184	1.8	3.0	0.21	0.06	<-0.001	0.0043	0.2340	<-0.016	0.41	<-0.004	4.8	17.74	0.011	21.4	10.0	2.01	2.17	
BB8	dic-21	7.45	168	8.2	0.20	6.44	2180	1.5	3.0	0.25	0.06	<-0.001	0.0057	0.2330	<-0.016	0.23	<-0.004	5.2	18.00	0.016	22.2	9.0	2.69	3.31	
BB11	dic-21	7.76	154	8.4	0.23	9.13	45	1.0	3.0	0.23	0.06	<-0.001	0.0038	0.1330	<-0.016	0.23	<-0.004	4.9	18.37	0.010-0.030	17.7	6.0	2.41	2.71	
BB13	dic-21	7.84	266	8.6	0.12		119	1.3	3.0	0.11	0.06	<-0.001	0.0046	0.0700	<-0.016	0.23	<-0.004	5.2		0.042	18.8	7.0	2.87	3.43	
BUD	dic-21	7.59	77	8.7	0.34	2.62	1000	1.0	3.0	0.05	0.04	<-0.001	0.0004	0.2180	<-0.016	0.05	0.004	4.1	8.94		<0.10	18.5	10.0	0.15	0.47
DUS	dic-21	7.45	113	9.6	0.22	3.44	25	1.5	3.0	0.25	0.05	<-0.001	0.0015	0.7880	0.031	0.03	0.004	5.3	5.4		<0.10	15.5	7.0	0.7	0.85
LA1	dic-21	7.43	76	9.7	0.11	1.17	170	1.1	2.0	0.12	0.03	<-0.001	<-0.0016	0.0170	<-0.016	0.06	0.005	1.9	6.79		<0.10	16.1	<5.0	0.26	0.52
LA20	dic-21	7.47	142	8.6	0.14	1.83	460	1.6	2.0	0.13	0.05	<-0.001	<-0.0016	0.0210	<-0.016	0.14	0.018	1.9	4.89		<0.10	21.8	<5.0	1.11	1.35
LA2	dic-21	7.43	159	8.1	0.48	2.34	7.8	1.7	4.0	0.46	0.07	<-0.001	0.0021	0.2140	<-0.016	0.46	0.007	10.8	5.8		<0.10	27.1	8.0	3.75	4.5
MA10	dic-21	7.21	88	8.8	0.31	2.49	380	<1.0	3.0	0.52	0.07	<-0.001	0.0032	0.1730	0.017	0.34	0.004	7.4	2.98	0.010-0.030	19.5	14.0	1.47	3.24	
RE-10	dic-21	7.1	89	8.9	0.31	2.80	14	<1.0	2.0	0.42	0.04	<-0.001	<-0.0016	0.0670	<-0.016	0.26	0.018	2.4	2.82		<0.10	20.2	9.0	0.24	0.71
VE2	dic-21	8.05	112	8.4	0.23	3.67	125	1.3	2.0	0.28	0.05	<-0.001	0.0014	0.2810	<-0.016	0.44	0.009	5.1	4.34	0.010-0.030	25.9	12.0	2.26	2.84	
GU1	dic-21	7.41	119	8.9	0.54	3.32	15	1.6	4.0	0.61	0.47	<-0.001	0.0085	1.4470	<-0.016	1.20	0.008	19.0	8.00	0.010-0.030	21.5	9.0	0.3	0.68	
ABBO	mar-22	7.51	195.5	9.2	0.104	3.44	<1.8	3	4	0.914	0.007	<-0.001	<-0.0016	0.007	0.016	0.02		7.7	24.08		<0.10	11.5	<5	2.82	3.34
BBO	mar-22	7.42	82.2	8.7	0.438	4.87	1.8	3	3	0.18	0.03	<-0.001	0.002	0.067	0.016	0.09	0.004	2.2	9.53	0.01	14.2	5.0	0.83	1.47	
BB1	mar-22	7.56	81.3	9.1	0.103	3.7	1.8	3	4	0.18	0.06	<-0.001	0.002	0.001	0.016	0.07	0.004	1	7.95	0.01	16.3	5.0	1.85	2.24	
B-20	mar-22	7.31	143.8	8.6	0.074	3.81	1.8	3	4	0.10	0.06	<-0.001	0.002	0.002	0.016	0.04	0.004	1	9	0.01	16.7	5.0	0.95	1.18	
BB3	mar-22	7.18	111.1	9.2	0.124	6.18	132	3	4	0.18	0.06	<-0.001	0.002	0.139	0.03	0.25	0.004	1.40	13.80	0.033	16.2	15.0	0.82	2	
BB4	mar-22	7.50	156.2	9.7	0.143	8.96	15	3	5	0.18	0.08	<-0.001	0.002	0.166	0.03	0.25	0.004	2.60	23.92	0.067	17.4	19.0	1.12	2.17	
BB7	mar-22	7.40	119.5	9.0	0.19	6.3	277	3	5	0.24	0.11	<-0.001	0.002	0.194	0.02	0.27	0.021	3.80	15.29	0.042	14.9	12.0	2.46	2.86	
BB8	mar-22	7.49	148.6	9.5	0.193	7.96	119	2	3	0.60	0.07	<-0.001	0.002	0.149	0.02	0.25	0.013	5.20	13.12	0.046	19.3	12.0	3.21	1.6	
BB11	mar-22	7.51	140.3	8.8	0.196	8.08	617	2	3	0.20	0.07	<-0.001	0.002	0.121	0.02	0.17	0.012	4.60	19.95	0.035	13.9	9.0	4.31	4.61	
BB13	mar-22	7.33	235.8	8.8	0.137		303	3	2	0.13	0.11	<-0.001	0.014	0.142	0.11	0.27	0.049	2.60		0.044	15.2	10.0	2.01	2.66	
BUD	mar-22	6.83	77.5	7.5	0.354	3.62	8	3	4	0.47	0.07	<-0.001	0.003	0.206	0.016	0.25	0.004	2.9	5.3	0.01	15.9	8.0	0.36	1.29	
DUS	mar-22	6.94	143.6	143.6	0.343	4	6	3	3	0.28	0.07	<-0.001	0.003	0.758	0.016	0.94	0.233	4.5	5.69	0.01	15.0	6.0	0.34	5.46	
LA1	mar-22	7.36	75.1	75.1	0.077	1.46	2	3	4	0.07	0.04	<-0.001	0.002	0.023	0.016	0.03	0.007	1.3	6.87	0.01	14.1	5.0	0.7	1.11	
LA20	mar-22	7.28	88.9	88.9	0.275	1.62	240	3	4	0.16	0.05	<-0.001	0.002	0.018	0.016	0.05	0.01	1	4.9	0.01	15.1	12.0	0.65	1.03	
LA2	mar-22	7.28	123.2	123.2	0.229	1.4	240	3	4	0.17	0.06	<-0.001	0.001	0.018	0.016	0.08	0.02	4	5.43	0.01	11.3	8.0	1.54	5.99	
MA10	mar-22	7.07	101.7	101.7	0.167	3.49	110	3	4	0.44	0.05	<-0.001	0.002	0.204	0.016	0.27	0.035	3.2	4.3	0.01	16.3	16.0	0.68	1.24	
RE-10	mar-22	6.88	86.3	86.3	0.122	3.58	33	3	4	0.31	0.05	<-0.001	0.002	0.233	0.016	0.07	0.004	1.5	4.04	0.01	17.3	13.0	0.77	1.42	
VE2	mar-22	7.48	107.5	107.5	0.088	4.74	12	3	4	0.23	0.08	<-0.001	0.003	0.290	0.016	0.31	0.004	1.8	6.23	0.01	17.7	12.0	3.33	3.39	
GU1	mar-22	7.41	140	140	0.35	5.08	1000	3	10	0.17	0.16	<-0.001	0.008	1.011	0.016	1.63	0.006	5.4	7.88	0.001	14.4	12.0	0.79	1.52	
ABBO	ago-22	7.59	51.1	12.5	0.209	3.09	17	<1	<2	0.261	0.02	<-0.001	<-0.002	0.14	<-0.016	0.15	<-0.012	2.6	8.51		7.7	<5	2.29	3.01	
BBO	ago-22	7.65	54.5	13.1	0.242	2.91	1.8	<1	<2	0.11	<0.02	<-0.001	<-0.002	<-0.001	<-0.016	0.08	<-0.012	2	6.18	0.012	7.10	5.0	1.55	1.97	
BB1	ago-22	7.56	41.5	13	0.085	1.5	4.5	<1	<2	0.082	0.01	<-0.001	<-0.002	0.053	<-0.016	0.06	<-0.012	<1	3.41	0.004	7.90	5.0	2.19	2.55	
B-20	ago-22	7.94	37.6	12.7	0.238	1.45	23	<1	<2	0.216	0.03	<-0.001	<-0.002	0.045	<-0.016	0.05	<-0.012	3.2	3.81	0.004	7.20	5.0	0.99	1.18	
BB3	ago-22	7.2	37.4	12.4	0.209	1.62	9.6	<1	6	0.258	0.01	<-0.001	<-0.002	0.164	<-0.016	0.21	<-0.012	1.9	3.44	0.004	8.53	5.0	0.66	0.97	
BB4	ago-22	7.07	47.7	12.2	0.238	1.94	10.9	<1	4	0.256	0.01	<-0.001	<-0.002	0.188	<-0.016	0.2	0.018	2.9	4.61	0.005	8.60	5.0	0.84	1.42	
BB7	ago-22	7.25	54.9	11	0.291	2.3	6.4	<1	4	0.187	0.03	<-0.001	<-0.002	0.244	<-0.016	0.31	<-0.012	4.1	4.96	0.007	10.20	5.0	0.51	0.87	
BB8	ago-22	7.27	51	11.1	0.388	2.36	8.8	<1	<2	0.284	0.04	<-0.001	<-0.002	0.231	<-0.016	0.24	<-0.012	4.7	4.69	0.004	9.90</				

Tabla 9. Rangos de correlación según su nivel de fuerza (Fuente: Peña, D. (2002). *Análisis de datos multivariantes*. McGraw Hill.)

$0.00 \leq r_{xy} < 0.10$	Correlación nula
$0.10 \leq r_{xy} < 0.30$	Correlación débil
$0.30 \leq r_{xy} < 0.50$	Correlación moderada
$0.50 \leq r_{xy} < 1.00$	Correlación fuerte

variables	pH	Conduct	Onig	Al_Tot	Cloru	Col_Fec	DBO5	DQO	Fe_Tot	P_Tot	Fenol	N_NO2	N_NO3	N_NH4	N_Tot	P_PO4	S_Susp	Sulfato	AOX	Temp	Color	Clorofila_a	Clorofila_Tot
pH	1.0																						
Conduct	0.4	1.0																					
Onig	-0.2	0.2	1.0																				
Al_Tot	-0.2	0.2	0.0	1.0																			
Cloru	0.4	0.7	0.0	0.0	1.0																		
Col_Fec	-0.1	0.3	0.1	0.1	0.2	1.0																	
DBO5	0.1	0.4	0.6	-0.2	0.4	0.0	1.0																
DQO	-0.3	0.1	0.2	0.3	0.0	0.0	0.2	1.0															
Fe_Tot	-0.2	0.2	0.1	0.7	0.1	0.1	-0.1	0.4	1.0														
P_Tot	0.0	0.4	0.1	0.4	0.3	0.1	0.2	0.2	0.4	1.0													
Fenol	-0.3	-0.1	-0.1	0.0	-0.1	0.3	-0.2	-0.2	-0.2	0.0	1.0												
N_NO2	0.2	0.5	0.3	0.3	0.5	0.5	0.3	0.2	0.3	0.7	-0.1	1.0											
N_NO3	-0.2	0.2	0.2	0.6	0.1	0.2	0.0	0.3	0.6	0.7	0.1	0.6	1.0										
N_NH4	0.0	0.3	0.2	-0.3	0.4	-0.1	0.6	0.1	-0.1	0.1	0.1	0.1	1.0										
N_Tot	-0.1	0.3	0.2	0.6	0.2	0.2	0.0	0.3	0.6	0.7	0.1	0.7	1.0	0.0	1.0								
P_PO4	-0.1	0.2	0.5	0.3	0.1	0.3	0.2	0.4	0.4	0.6	0.0	0.6	0.6	0.0	0.7	1.0							
S_Susp	0.1	0.4	-0.1	0.7	0.3	0.1	-0.1	0.1	0.6	0.8	0.0	0.6	0.6	-0.1	0.7	0.4	1.0						
Sulfato	0.4	0.7	-0.2	-0.2	0.9	0.2	0.4	0.0	-0.1	0.2	-0.2	0.3	-0.1	0.4	0.0	-0.1	0.1	1.0					
AOX	0.2	0.6	-0.1	-0.1	0.8	0.2	0.3	0.0	0.0	0.3	0.0	0.3	0.0	0.5	0.1	0.1	0.2	0.9	1.0				
Temp	0.4	0.7	0.1	0.1	0.4	0.2	0.4	0.0	0.2	0.4	-0.1	0.5	0.1	0.2	0.2	0.1	0.4	0.3	0.3	1.0			
Color	0.0	0.4	0.2	0.1	0.4	0.2	0.2	0.3	0.4	0.2	-0.1	0.3	0.2	0.3	0.2	0.2	0.3	0.5	0.4	1.0			
Clorofila_a	0.2	0.5	0.3	0.0	0.3	0.1	0.3	0.0	0.0	0.0	-0.1	0.1	-0.1	0.1	0.0	0.0	0.1	0.3	0.2	0.4	0.0	1.0	
Clorofila_Tot	0.1	0.5	0.4	0.0	0.3	0.1	0.4	0.1	0.0	0.1	-0.1	0.1	0.0	0.2	0.0	0.0	0.1	0.3	0.3	0.4	0.1	1.0	1.0

Figura 19. Matriz de correlaciones entre variables ambientales correspondientes a Dic-2021, Mar-2022 y Ag-2022 (Fuente: Elaboración propia utilizando datos pertenecientes al PMBB).

De la matriz de correlación se observa como las variables de Sulfatos y Conductividad (0,7), Temperatura y Conductividad (0,7), Hierro total y Aluminio total (0,7), Sólidos suspendidos y Aluminio total (0,7), Sulfato y Cloruros (0,9), AOX y Cloruros (0,8), NO2 y Fósforo total (0,7), NO3 y Fósforo total (0,7), Nitrógeno total y Fósforo total (0,7), Sólidos suspendidos y Fósforo total (0,8), PO4 y Nitrógeno total (0,7), Sólidos suspendidos y Nitrógeno total (0,7) y Clorofila total y Clorofila a (1.0), son las variables que mejor se correlacionan entre si con valores cercanos a 1.00 o incluso 1.00 en el caso de las clorofilas, significando correlaciones fuertes a evaluar.

Luego de identificar las correlaciones más fuertes entre las variables ambientales se obtuvo el gráfico de sedimentación considerando los datos de 16 variables

fisicoquímicas que mejor se correlacionaban entre sí y que posiblemente mejor expresaran patrones de comportamiento y también se consideró los datos de la estación GU-1. De la figura 21 se puede observar como el primer componente explica un 34,4% de la varianza con un valor propio asociado igual a 5.51, el segundo componente un 19.8% con un valor asociado igual a 3.17, explicando en conjunto un 54,2%.

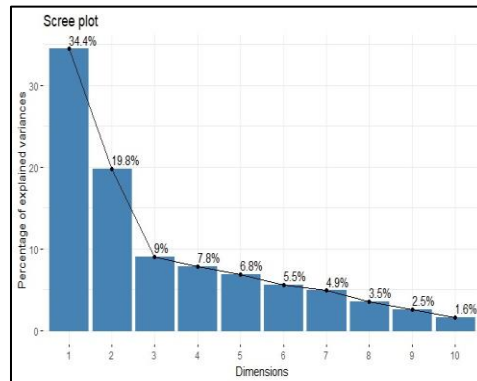


Figura 20. Gráfico de sedimentación.

Dimensión	Eigenvalue	Variance percent	Cumulative variance percent
Dim.1	5.51	34.42	34.42
Dim.2	3.17	19.79	54.21
Dim.3	1.45	9.04	63.25
Dim.4	1.25	7.81	71.06
Dim.5	1.09	6.81	77.87
Dim.6	0.88	5.53	83.39
Dim.7	0.78	4.87	88.27
Dim.8	0.56	3.50	91.77
Dim.9	0.40	2.51	94.27
Dim.10	0.25	1.57	95.85
Dim.11	0.20	1.28	97.13
Dim.12	0.18	1.11	98.24
Dim.13	0.13	0.79	99.03
Dim.14	0.08	0.48	99.51
Dim.15	0.05	0.32	99.82
Dim.16	0.03	0.18	100.00

Figura 21. Varianza explicada de las dimensiones.

En cuanto a los pesos de las variables los resultados muestran que la primera dimensión se define por Sólidos suspendidos, NO₂, Temperatura y Conductividad, en donde esta dimensión 1 o componente principal 1 se define por patrones de comportamientos asociados a nutrientes y estacionalidad, y en donde se observa como las cargas de todas estas variables ambientales son positivas. La segunda dimensión se caracteriza por las variables Aluminio total, Hierro total, Sulfatos y AOX, en donde esta dimensión 2 o componente principal 2 se define por patrones de comportamiento asociados a caudal y erosión, y en donde se observa como las cargas de Aluminio y Hierro totales poseen cargas positivas y las cargas de Sulfatos y AOX poseen cargas negativas.

Explicando los comportamientos de las variables se explica como en el componente principal 1 identificado con color verde, se asocia a variables que se mueven de manera estacional aumentando sus cargas a medida que aumenta la temperatura y en el componente principal 2 identificado con color azul se explica como a mayor caudal hay mayor presencia de compuestos como Aluminio y Hierro total, y como a menor caudal producto del menor caudal y erosión del río Biobío hay mayor carga de variables asociadas a Sulfatos y AOX.

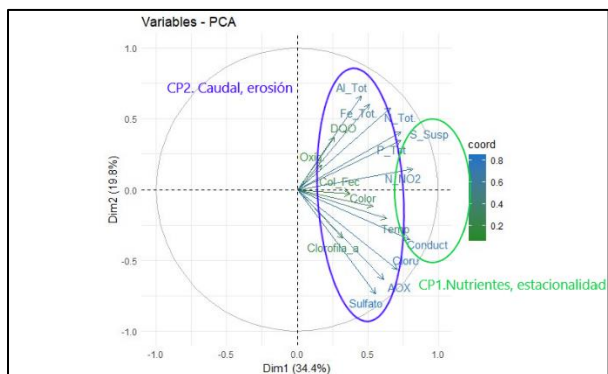


Figura 22. Representación gráfica de los pesos de las variables (incluyendo datos de GU-1).

Tabla 10. Cargas de las variables pertenecientes al PMBB y NSCA-BB.

Variables	Dim.1	Dim.2
Conduct	0.80	-0.35
Oxíg.	0.17	0.17
Al_Tot	0.45	0.66
Cloru	0.71	-0.56
Col_Fec	0.37	-0.03
DQO	0.26	0.37
Fe_Tot.	0.51	0.60
P_Tot	0.73	0.35
N_NO2	0.82	0.14
N_Tot.	0.66	0.58
S_Susp	0.74	0.41
Sulfato	0.56	-0.73
AOX	0.61	-0.63
Temp	0.63	-0.21
Color	0.54	-0.12
Clorofila_a	0.32	-0.34

Ya obtenido el gráfico de carga se procedió a obtener el gráfico y puntuaciones de los individuos que corresponden a las estaciones de monitoreo del PMBB, en donde se obtuvieron los resultados representados en la figura 24 y la tabla 11.

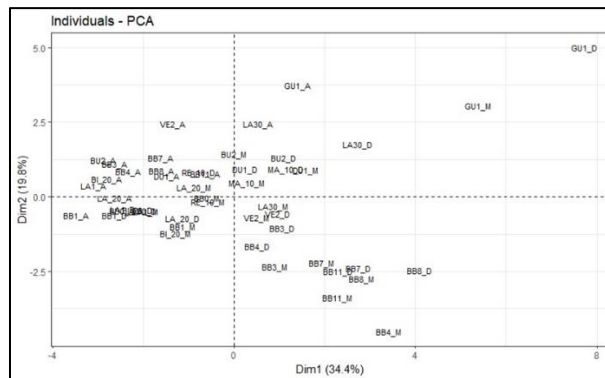


Figura 23. Representación gráfica las puntuaciones de las estaciones para los meses marzo, agosto y diciembre (Incluyendo la estación de Guaqui).

Tabla 11. Puntuaciones de los individuos correspondientes a las estaciones de monitoreo pertenecientes al PMBB (incluyendo Guaqui).

Estac.	Fecha	Dim.1	Dim.2
BB0	diciembre	-1.98	-0.47
BB1	diciembre	-2.63	-0.61
BI_20	diciembre	-2.13	-0.44
BB3	diciembre	1.06	-1.05
BB4	diciembre	0.51	-1.66
BB7	diciembre	2.75	-2.39
BB8	diciembre	4.09	-2.45
BB11	diciembre	2.30	-2.48
BU2	diciembre	1.10	1.32
DU1	diciembre	0.24	0.92
LA1	diciembre	-2.44	-0.41
LA_20	diciembre	-1.14	-0.72
LA2	diciembre	2.72	1.76
MA_10	diciembre	1.14	0.92
RE_10	diciembre	-0.79	0.84
VE2	diciembre	0.96	-0.56
GU1	diciembre	7.72	5.01
BB0	marzo	-0.60	-0.04
BB1	marzo	-1.13	-0.98
BI_20	marzo	-1.29	-1.23
BB3	marzo	0.90	-2.32
BB4	marzo	3.42	-4.52
BB7	marzo	1.93	-2.20
BB8	marzo	2.82	-2.74
BB11	marzo	2.27	-3.37
BU2	marzo	0.01	1.43
DU1	marzo	1.59	0.91
LA1	marzo	-1.96	-0.48
LA_20	marzo	-0.88	0.32
LA2	marzo	0.86	-0.31
MA_10	marzo	0.29	0.48
RE_10	marzo	-0.56	-0.16
VE2	marzo	0.50	-0.69
GU1	marzo	5.39	3.05
BB0	agosto	-2.46	-0.47
BB1	agosto	-3.47	-0.61
BI_20	agosto	-2.80	0.60
BB3	agosto	-2.63	1.11
BB4	agosto	-2.34	0.85
BB7	agosto	-1.61	1.30
BB8	agosto	-1.60	0.87
BB11	agosto	-0.63	0.78
BU2	agosto	-2.88	1.23
DU1	agosto	-1.49	0.69
LA1	agosto	-3.10	0.38
LA_20	agosto	-2.63	-0.03
LA2	agosto	0.54	2.45
VE2	agosto	-1.34	2.44
GU1	agosto	1.41	3.73

Ya obtenidos el gráfico de cargas de las variables ambientales y el gráfico de los individuos que representa las posiciones con respecto a las dimensiones 1 y 2 de las estaciones de control pertenecientes al PMBB para los meses de diciembre-21, marzo-22 y agosto-22, se procedió a superponer ambos gráficos y así poder identificar los patrones de comportamiento como se observa en la figura 25.

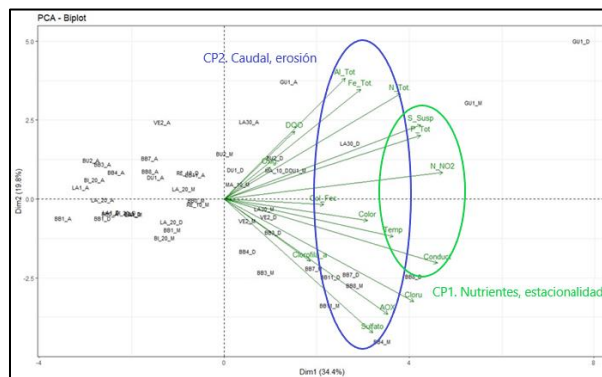


Figura 24. Biplot del Análisis de Componentes Principales de variables ambientales para el período dic-21, mar-22 y ag-22 con respecto a las estaciones de monitoreo (incluyendo Guaqui).

Del Biplot se pueden observar nuevamente el comportamiento de los componentes principales identificados, y ahora la asociación que existe entre las cargas de las variables y las estaciones. La estación GU-1 para los meses de diciembre, marzo y agosto, representa un dato atípico con respecto a las demás estaciones debido a que posee datos en las variables fisicoquímicas más altas con respecto a las demás variables, ya que se esta estación de control se encuentra en un punto de la cuenca del río Biobío donde drena todo el abanico de las arenas del río Laja y recibe alta carga de compuestos que derivan de contaminación agroindustrial y efluentes urbanos producto de las plantas de tratamiento de aguas servidas que provienen de zonas urbanas como la ciudad de Los Ángeles. Por lo tanto, la estación GU-1 al actuar como dato atípico no permite observar con claridad los patrones de comportamiento al estar muy asociada a las cargas de las variables como sólidos suspendidos, fósforo total, aluminio total, hierro total y nitrito (NO₂), al estar

impactando a la estación en mayor medida en comparación con las demás estaciones.

Por lo tanto, para observar de manera más clarificada los patrones de comportamiento asociados a las variables ambientales, se realizó otro análisis de componentes principales sin considerar la estación de GU-1 (Guaqui).

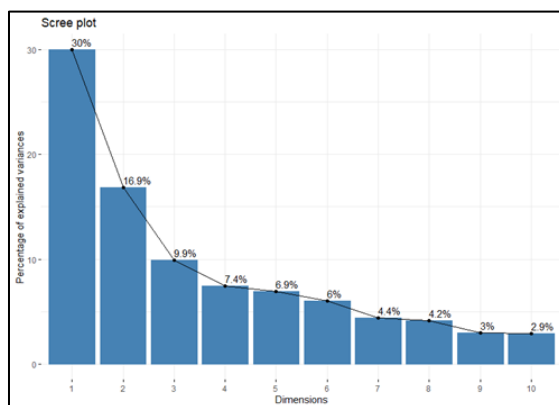


Figura 25. Gráfico de sedimentación.

Tabla 12. Cargas de las variables pertenecientes al PMBB y NSCA-BB.

Dimensión	Eigenvalue	Variance percent	Cumulative variance percent
Dim.1	6.00	29.98	29.98
Dim.2	3.37	16.86	46.84
Dim.3	1.99	9.94	56.78
Dim.4	1.49	7.43	64.21
Dim.5	1.38	6.92	71.13
Dim.6	1.20	6.02	77.15
Dim.7	0.89	4.43	81.58
Dim.8	0.83	4.17	85.74
Dim.9	0.59	2.97	88.71
Dim.10	0.58	2.91	91.62
Dim.11	0.41	2.04	93.66
Dim.12	0.33	1.64	95.30
Dim.13	0.25	1.26	96.56
Dim.14	0.20	1.02	97.58
Dim.15	0.17	0.83	98.42
Dim.16	0.12	0.61	99.03
Dim.17	0.09	0.45	99.48
Dim.18	0.07	0.36	99.84
Dim.19	0.02	0.09	99.93
Dim.20	0.01	0.07	100.00

Para el nuevo análisis de componentes principales, analizando el gráfico de la figura 27 se puede observar como el primer componente explica un 30% de la varianza con un valor propio asociado igual a 6.00, el segundo componente un 16.9% con un

valor asociado igual a 3.37, explicando en conjunto un 46,9% de la varianza de los datos.

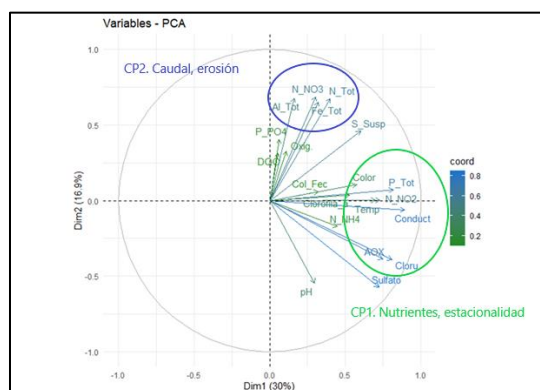


Figura 26. Representación gráfica de los pesos de las variables (sin datos de la estación GU-1).

Tabla 13. Cargas de las variables pertenecientes al PMBB y NSCA-BB.

Variables	Dim.1	Dim.2
pH	0.30	-0.55
Conduct	0.89	-0.06
Oxíg.	0.11	0.33
Al_Tot	0.16	0.68
Cloru	0.81	-0.39
Col_Fec	0.32	0.06
DQO	0.05	0.31
Fe_Tot	0.32	0.65
P_Tot	0.82	0.07
N_NO2	0.73	0.00
N_NO3	0.31	0.69
N_NH4	0.45	-0.17
N_Tot	0.40	0.67
P_PO4	0.06	0.40
S_Susp	0.60	0.46
Sulfato	0.72	-0.57
AOX	0.75	-0.39
Temp	0.70	0.00
Color	0.57	0.10
Clorofila_a	0.53	0.04

Ya obtenido el gráfico de carga se procedió a obtener el gráfico y puntuaciones de los individuos que corresponden a las estaciones de monitoreo del PMBB, en donde se obtuvieron los resultados representados en la figura 28 y la tabla 14.

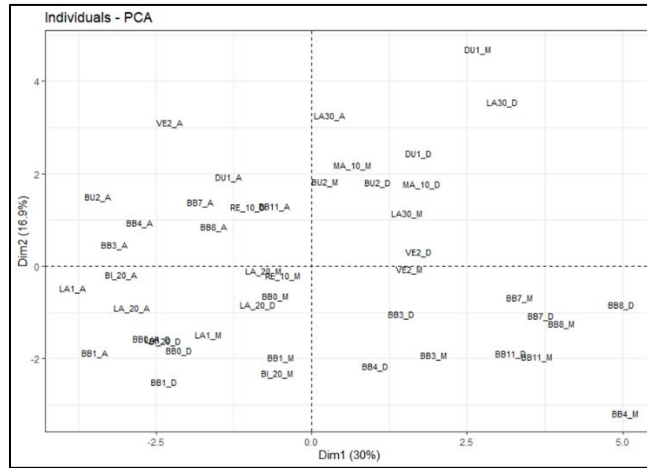


Figura 27. Representación gráfica las puntuaciones de las estaciones para los meses marzo, agosto y diciembre (sin incluir la estación de Guaqui).

Tabla 14. Puntuaciones de los individuos correspondientes a las estaciones de monitoreo pertenecientes al PMBB (sin incluir Guaqui).

Estac.	Dim.1	Dim.2
BB0_D	-2.13	-1.81
BB1_D	-2.37	-2.50
BI_20_D	-2.36	-1.62
BB3_D	1.45	-1.03
BB4_D	1.02	-2.16
BB7_D	3.69	-1.06
BB8_D	4.98	-0.82
BB11_D	3.21	-1.89
BU2_D	1.07	1.83
DU1_D	1.72	2.46
LA1_D	-2.47	-1.57
LA_20_D	-0.86	-0.83
LA30_D	3.07	3.55
MA_10_D	1.77	1.78
RE_10_D	-1.03	1.29
VE2_D	1.72	0.32
BB0_M	-0.58	-0.63
BB1_M	-0.49	-1.97
BI_20_M	-0.55	-2.30
BB3_M	1.96	-1.92
BB4_M	5.04	-3.18
BB7_M	3.35	-0.67
BB8_M	4.01	-1.23
BB11_M	3.62	-1.94
BU2_M	0.21	1.84
DU1_M	2.67	4.70
LA1_M	-1.66	-1.48
LA_20_M	-0.77	-0.09

LA30_M	1.53	1.16
MA_10_M	0.66	2.20
RE_10_M	-0.45	-0.19
VE2_M	1.57	-0.07
BB0_A	-2.67	-1.56
BB1_A	-3.49	-1.86
BI_20_A	-3.05	-0.18
BB3_A	-3.16	0.48
BB4_A	-2.77	0.94
BB7_A	-1.79	1.39
BB8_A	-1.57	0.86
BB11_A	-0.59	1.31
BU2_A	-3.43	1.51
DU1_A	-1.33	1.94
LA1_A	-3.84	-0.46
LA_20_A	-2.89	-0.89
LA30_A	0.29	3.26
VE2_A	-2.29	3.11

Ya obtenidos el gráfico de cargas de las variables ambientales y el gráfico de los individuos que representa las posiciones con respecto a las dimensiones 1 y 2 de las estaciones de control pertenecientes al PMBB para los meses de diciembre-21, marzo-22 y agosto-22, se procedió a superponer ambos gráficos y así poder identificar los patrones de comportamiento como se observa en la figura 29.

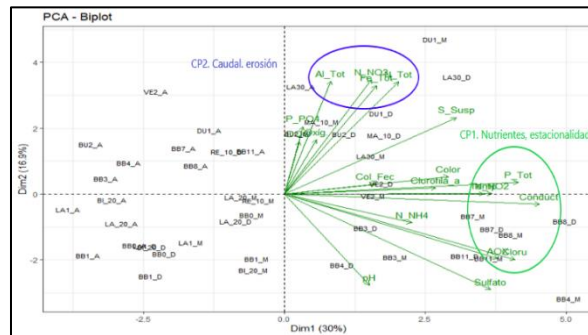


Figura 28. Biplot del Análisis de Componentes Principales de variables ambientales para el período dic-21, mar-22 y ag-22 con respecto a las estaciones de monitoreo (sin incluir Guaqui).

En cuanto a los pesos de las variables los resultados muestran que la primera dimensión se define por Fósforo total, AOX, Cloruro, NO2, Temperatura y

Conductividad, en donde este componente principal 1 se define por patrones de comportamiento asociados a nutrientes y estacionalidad, y en donde se observa como las cargas de todas estas variables ambientales son positivas y representan mediante estacionalidad que a mayores temperaturas hacia el periodo de primavera-verano la presencia de compuestos que derivan de contaminación industrial como plantas de celulosa y papel y también de contaminantes provenientes de efluentes urbanos. La segunda dimensión se caracteriza por las variables Aluminio total, Hierro total, Nitrato (NO₃) y Nitrógeno total, en donde este componente principal 2 se define por patrones de comportamiento asociados a caudal y erosión, y en donde se observa como las cargas son todas también positivas y se identifican a patrones de mayor caudal y producto de la erosión se presentan en mayor cantidad en las aguas del río Biobío al derivar de contaminación agroindustrial como por el uso de fertilizantes nitrogenados y de origen animal.

Del PCA se pudo observar cómo se presentan dos tipos de contaminación, un tipo ligada a contaminación agroindustrial donde a mayor caudal producto de las altas precipitación causa la entrada de los compuestos por erosión y escorrentía superficial y la otra ligada a contaminación industrial donde a menor caudal hacia el período de primavera-verano hay mayor concentración de compuestos que derivan de la contaminación industrial. De manera general se observa como hacia el izquierdo del PCA hay mejor calidad respecto a las estaciones asociadas a nutrientes en el periodo de invierno para las estaciones en el mes de agosto y como hacia el lado derecho hay peor calidad respecto a las estaciones asociadas a nutrientes hacia el periodo de primavera-verano con respecto a las estaciones en el mes de marzo y diciembre.

3.3. Relación entre variables ambientales y datos de viabilidad microbiológica

3.3.1. Correlación entre datos de viabilidad y variables fisicoquímicas

Ya obtenidos los datos microbiológicos con respecto a recuentos de células bacterianas viables, recuento células bacterianas muertas, recuento total de células bacterianas, y también considerando las concentraciones de ADN extraídas, se procedió a correlacionar aquellos datos con las variables identificadas dentro del análisis de componentes principales que mejor definieron patrones de comportamiento y que por lo tanto mayor impacto pudiesen tener frente a la viabilidad de los microorganismos.

Tabla 15. Matriz de correlación para datos de variables ambientales pertenecientes a las estaciones de control del PMBB considerando Guaqui (dic-21, mar-22 y ag-22) con datos de calidad microbiológica (dic-21, mar-22 y ag-22) con datos de calidad microbiológica.

	Concentración	Rec. Cél. Bacterianas vivas	Rec. Cél. Bacterianas muertas	Recuento total	Conduct	Al. Tot.	Cloru	DQO	Fe Tot.	P.Tot.	N_NO2	N_NO3	Temp.	DBO5	N.Tot.
Concentración de DNA	1														
Rec. Cél. Bacterianas vivas	0,07	1													
Rec. Cél. Bacterianas muertas	0,14	0,54	1												
Recuento total	0,11	0,90	0,84	1											
Conduct	0,07	0,27	0,08	0,21	1										
Al. Tot.	0,09	0,10	0,25	0,19	0,11	1									
Cloru	0,10	0,20	0,02	0,14	0,79	0,05	1								
DQO	0,05	0,12	-0,06	0,05	0,03	0,28	0,01	1							
Fe Tot.	0,17	0,18	0,18	0,20	0,21	0,73	0,07	0,48	1						
P.Tot.	-0,13	-0,10	0,13	0,00	0,38	0,43	0,32	0,11	0,38	1					
N_NO2	-0,09	-0,23	-0,14	-0,21	0,51	0,36	0,47	0,29	0,30	0,76	1				
N_NO3	-0,08	0,02	0,24	0,13	0,16	0,66	0,08	0,37	0,62	0,66	0,59	1			
Temp.	0,03	0,05	0,01	0,04	0,71	0,02	0,56	-0,05	0,14	0,46	0,55	0,04	1		
DBO5	-0,10	0,14	-0,19	-0,01	0,50	-0,24	0,45	0,10	-0,14	0,22	0,29	-0,08	0,53	1	
N.Tot.	-0,11	-0,03	0,16	0,06	0,28	0,64	0,18	0,39	0,58	0,75	0,72	0,94	0,17	0,01	1

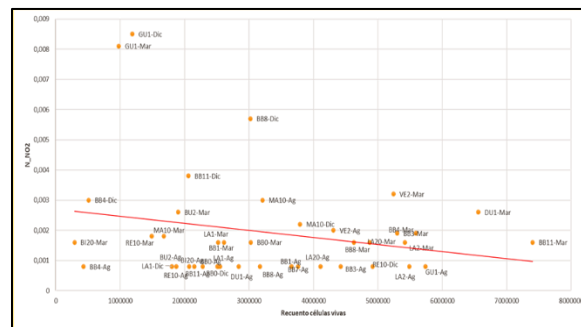


Figura 29. Gráfico de dispersión con línea de tendencia lineal para Nitrato y recuento de células bacterianas viables (Incluyendo datos de Guaqui).

De la primera matriz de correlación entre los datos de viabilidad, concentraciones de ADN y variables ambientales se puede observar que las correlaciones son todas débiles y no son significativas estadísticamente, por lo tanto, la matriz y sus correlaciones no permitieron identificar efectos entre la relación de las variables ambientales y los datos de viabilidad.

A pesar de las bajas correlaciones se menciona el impacto que tiene el Nitrito sobre el recuento de células viable cuando se consideran los datos de la estación GU-1. Se observa en el gráfico de dispersión la correlación negativa que existe entre nitrito NO_2^- y el recuento de células bacterianas viables, explicando que a medida que aumenta el nitrato disminuye la cantidad de células bacterianas vivas. El Nitrito está definido por la oxidación de los NO_2^- para la obtención de energía generando NO_3^- como producto final, utilizando Nitrato Dehidrogenasa como catalizador. La oxidación del NO_2^- puede ser realizada por cuatro géneros de bacteria hasta ahora descritos: nitrobacter, nitrospina, nitrococcus y nitrospira (Yuan et al., 2008), quimiolitautótrofos facultativos.

Un exceso de Nitrito causa un efecto toxicológico para los microorganismos a exposiciones prolongadas, disminuyendo la respuesta inmunológica de los organismos acuáticos induciendo a patologías que pueden conducir a la muerte de las especies, provocando en organismos la reducción de la habilidad de osmorregulación manifestándose en inhibición de los ciclos reproductivos. Sin embargo, esta correlación no es significativamente estadística y por lo tanto lo que se observa es la variabilidad que genera el dato de la estación Guaqui con respecto a las demás estaciones, es decir es la estación que más valores altos posee de Nitrito y por lo tanto este efecto de alguna forma solo influye en esta estación al comparar la correlación que genera el Nitrito con los datos microbiológicos en la tabla 15 y 16.

Las correlaciones débiles se explican producto de la inclusión de los datos de la estación de Guaqui ya que al ser un dato atípico al recibir una alta carga de compuestos que derivan de contaminación agroindustrial, industrial y efluentes

urbanos, posee valores altos en comparación a las demás estaciones y por lo tanto disminuye los valores de las correlaciones que se pudiesen establecer entre las estaciones y los parámetros fisicoquímicos. Debido al efecto que causa el dato atípico de la estación de Guaqui (GU-1), se realizó otra matriz de correlación que no incluye los datos de la estación de Guaqui para observar si las correlaciones mejoraban.

Tabla 16 Matriz de correlación para datos de variables ambientales pertenecientes a las estaciones de control del PMBB sin considerar Guaqui (dic-21, mar-22 y ag-22) con datos de calidad microbiológica

	Concentración	Rec. Cél. Bacterianas vivas	Rec. Cél. Bacterianas muertas	Recuento total	Conduct	Al. Tot-	Cloru	DQO	Fe Tot.	P Tot.	N_NO2	N_NO3	Temp.	DBO5	N Tot.
Concentración de ADN	1														
Rec. Cél. Bacterianas vivas	0,03	1													
Rec. Cél. Bacterianas muertas	0,10	0,52	1												
Recuento total	0,07	0,90	0,84	1											
Conduct	0,16	0,37	0,14	0,30	1										
Al. Tot-	0,28	0,16	0,23	0,22	0,01	1									
Cloru	0,15	0,28	0,04	0,20	0,79	-0,03	1								
DQO	0,24	0,20	0,03	0,14	-0,08	0,17	-0,05	1							
Fe Tot.	0,44	0,21	0,14	0,20	0,14	0,63	0,02	0,39	1						
P Tot.	0,10	0,36	0,27	0,37	0,70	-0,03	0,58	-0,09	0,24	1					
N_NO2	0,20	0,04	-0,04	0,01	0,58	0,14	0,57	0,12	0,17	0,49	1				
N_NO3	0,26	0,22	0,42	0,35	-0,02	0,48	-0,06	0,16	0,38	0,22	0,17	1			
Temp.	0,06	0,16	0,02	0,11	0,72	-0,07	0,55	-0,06	0,15	0,68	0,63	-0,14	1		
DBO5	-0,07	0,24	-0,11	0,09	0,49	-0,27	0,45	0,06	-0,14	0,61	0,30	-0,19	0,54	1	
N Tot.	0,31	0,30	0,47	0,43	0,15	0,53	0,08	0,18	0,40	0,26	0,24	0,89	0,01	-0,13	1

De la siguiente matriz de correlación que no incluye los datos de la estación de Guaqui (GU-1) se puede observar como las correlaciones pasaron de tener valores débiles en la matriz anterior de la tabla 15 a convertirse en correlaciones con valores moderados cercanos a ser fuertes, como en el caso de la correlación entre concentración de ADN y Hierro total que es de 0,44 y es estadísticamente significativa con una significancia de 0,006 ($p < 0,05$), la correlación entre recuento de células muertas y nitrato (NO3) que es de 0,42 y es estadísticamente significativa con una significancia de 0,009 ($p < 0,05$), la correlación entre recuento total y fósforo total que es de 0,37 y es estadísticamente significativa con una significancia de 0,022 ($p < 0,05$) y la correlación de recuento total y nitrógeno total que es de 0,43 y que es estadísticamente significativa con una significancia de 0,006 ($p < 0,05$), todas estas correlaciones anteriormente descritas, explican el efecto que generan estos parámetros fisicoquímicos sobre los datos microbiológicos.

En los siguientes diagramas se explica la correlación positiva que existe entre Nitrógeno total y Recuento bacteriano total, que explica que a medida que aumenta el nitrógeno total disponible aumenta el recuento total de bacterias viables y muertas, debido a que el Nitrógeno es un compuesto esencial para formar proteínas, componentes de la pared celular y ácidos nucleicos y por lo tanto es muy necesario por las bacterias para su desarrollo, crecimiento y capacidad de sobrevivencia. Por otro lado también se observa de una manera más específica la relación entre los compuestos nitrogenados y los recuentos de viabilidad, ya que el aumento de Nitrato (NO_3^-) aumenta a la vez la cantidad de células bacterianas muertas, por lo tanto genera un efecto toxicológico frente a la viabilidad bacteriana de muestras de agua del río Biobío, y esto se debe de manera general a que un exceso de nitrato que deriva del uso de fertilizantes nitrogenados que luego se arrastran a las aguas del río, cuando entran de manera excesiva disminuyen la disponibilidad de oxígeno del agua y por lo tanto afectan la estructura microbiana y su capacidad de sobrevivencia de las bacterias en el sistema acuático.

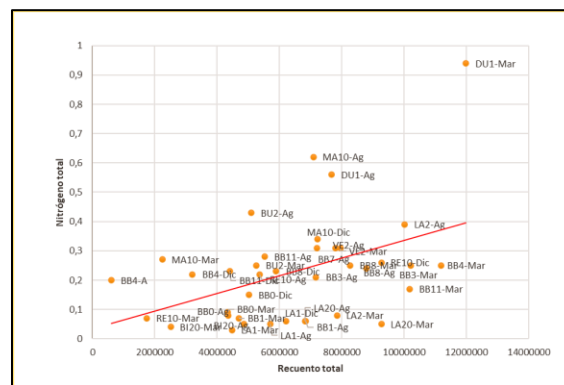


Figura 30. Diagrama de dispersión con línea de tendencia lineal para recuento total bacteriano y nitrógeno total (Sin datos de estación Guaqui).

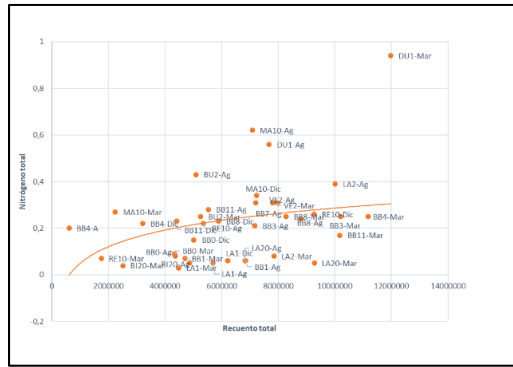


Figura 31. Diagrama de dispersión con línea de tendencia exponencial para recuento total bacteriano y nitrógeno total (Sin datos de estación Guaqui).

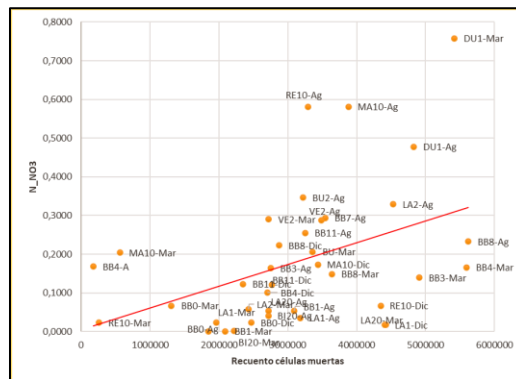


Figura 32. Diagrama de dispersión con línea de tendencia lineal para recuento células bacterianas muertas y nitrato (NO3) (Sin datos de estación Guaqui).

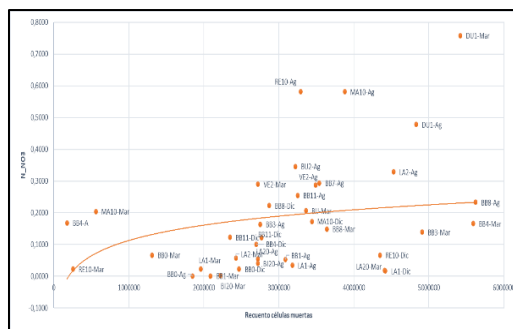


Figura 33. Diagrama de dispersión con línea de tendencia exponencial para recuento células bacterianas muertas y nitrato (NO3) (Sin datos de estación Guaqui).

Se explican ahora en adelante ambas relaciones que causan el Nitrógeno total y el Nitrato (NO_3^-) ante los recuentos de viabilidad.

El nitrógeno es un nutriente primario crítico para la supervivencia de todos los organismos vivos y en específico para la viabilidad de los microorganismos; ya que forma parte de biomoléculas, proteínas, ADN y clorofila. Alrededor del 12% del peso seco de las bacterias (biomasa) es contribución del N (Madigan et ál., 2004).

Un aspecto fundamental del ciclo del nitrógeno es su importancia y participación en la vida, es decir, su rol primario de producción de biomasa (Gruber y Galloway, 2008), siendo nutriente esencial de todos los organismos e indispensable en las estructuras y los procesos bioquímicos que definen la vida (Francis et ál., 2007).

El nitrógeno inorgánico está constituido por las formas solubles como nitrito (NO_2^-) y nitrato (NO_3^-), amonio (NH_4^+) intercambiable y no intercambiable fijado en las arcillas (Rutherford et al., 2007). Bajo condiciones aeróbicas ocurre el proceso de nitrificación, que corresponde a la oxidación biológica del NH_4^+ a nitrito (NO_2^-) y a nitrato (NO_3^-), donde el O_2 actúa como aceptor de electrones. Esta oxidación, realizada por bacterias autotróficas, utilizan una fuente de carbono inorgánico (CO_2 , bicarbonato o HCO_3^-) para su metabolismo. En la etapa de oxidación del NH_4^+ a NO_2^- , donde la fuente de energía es el NH_4^+ , las principales bacterias encargadas son bacterias amonio oxidantes, pertenecen al género *Nitrosomonas*, aunque se han encontrado otros géneros asociados a esta etapa, como: *Nitrospira*, *Nitrosovibrio*, *Nitrosococcus* y *Nitrosolobu* (Pambrun y col., 2008). El oxígeno disuelto puede ingresar hasta cierta profundidad en el ecosistema acuático, donde la nitrificación ocurre. En estratos más profundos en condiciones anóxicas las bacterias desnitrificantes utilizan el nitrato producido por las bacterias nitrificantes reduciéndolo a N_2 (Helness y Odegaard, 2001).

En el agua, los compuestos nitrogenados inorgánicos más comunes son amonio, nitrito y nitrato; de ellos el principal es el amonio que se origina por la descomposición de materiales proteicos. Sin embargo, en algunos casos cuando la

contaminación es producida por fertilizantes inorgánicos o por algún proceso industrial, pueden encontrarse cantidades significativas de nitritos y nitratos (Singer et al., 2008) y afectar la biodiversidad del ecosistema. Tanto la producción industrial de NH_4^+ y NO_3^- como fertilizantes, como la combustión de hidrocarburos fósiles, la descarga de aguas residuales y algunas otras acciones antropogénicas, han acelerado y des-balanceado considerablemente el ciclo del nitrógeno, con efectos negativos como la eutrofización de los cuerpos de agua receptores, el efecto invernadero por la generación de óxido nitroso (N_2O), y los riesgos para la salud humana como el consumo de nitratos (NO_3^-) en el agua potable (Towsend et ál., 2003). Un aspecto fundamental del ciclo del nitrógeno es su importancia y participación en la vida, es decir, su rol primario de producción de biomasa (Gruber y Galloway, 2008), siendo nutriente esencial de todos los organismos e indispensable en las estructuras y los procesos bioquímicos que definen la vida (Francis et ál., 2007).

La presencia de compuestos nitrogenados se debe a causas naturales como la disolución atmosférica o de depósitos geológicos ricos en estos materiales, escorrentías superficiales y subterráneas, fijación de organismos procariotas y descomposición de materia orgánica; y a causas antropogénicas provenientes de usos domésticos e industriales, así como a la deposición atmosférica fruto de la contaminación del aire (Camargo et al., 2007). Entre las transformaciones a gran escala se destacan: la fijación biológica, lumínica e industrial, la combustión de hidrocarburos fósiles y los procesos biológicos de óxido-reducción. La fijación industrial para la producción de fertilizantes nitrogenados (100 Tg año^{-1} de 355 totales fijados globalmente, 250 por microorganismos y 5 por tormentas), ha permitido el incremento de productos agrícolas, sosteniendo el incremento de la población humana, lo cual sería literalmente imposible sin el uso de estos fertilizantes. Por otro lado, esta misma producción ha desbalanceado notablemente el ciclo global (Gruber y Galloway, 2008).

La entrada de nitrógeno al río Biobío se debe en gran parte producto de la actividad industrial (NO_2) y agroindustrial (NO_3), en donde las actividades antrópicas generan

niveles cada vez mayores de contaminación del recurso hídrico. Los contaminantes que con mayor frecuencia se ha pretendido remover de las aguas del río Biobío son: los sólidos por su rápido efecto sobre la apariencia del líquido, la materia orgánica (MO) por el alto consumo de oxígeno necesario para su estabilización y los microorganismos por la posible transmisión de enfermedades por agentes patógenos. Sin embargo, no menos importantes que los anteriores, nutrientes como el nitrógeno (N) y el fósforo generan importantes impactos sobre los cuerpos de agua ya que pueden incidir en la estabilidad de los ecosistemas acuáticos, la eutrofización y la incorporación de niveles tóxicos que pueden afectar a las comunidades biológicas y a la salud humana, inclusive en muy bajas concentraciones.

Los compuestos nitrogenados pueden alcanzar en el agua niveles tóxicos que alteren la capacidad de los microorganismos para sobrevivir, crecer y reproducirse, en algunos casos su presencia se debe a vertimiento directo de contaminantes o sustancias, aunque también puede darse por deposición atmosférica. Por un lado, el nitrito se encuentra presente como ión nitrito (NO_2^-) o como ácido nitroso (HNO_2); la concentración de cada uno de ellos depende del pH del agua de manera directa para el ión y de manera inversa para el ácido; ambos compuestos son extremadamente tóxicos, pero en la naturaleza el ión es más común (Lewis et al., 1987). Los efectos toxicológicos en exposiciones prolongadas disminuyen la respuesta inmunológica de los organismos acuáticos induciendo a patologías que pueden conducir a la muerte de las especies, en organismos reduce la habilidad de osmoregulación manifestándose en inhibición de los ciclos reproductivos (Shimura et al., 2002).

En relación con el compuesto nitrogenado Nitrato NO_3 , se puede observar en el diagrama de dispersión entre el recuento de células bacterianas muertas y Nitrato (NO_3) el efecto negativo que causa la presencia de este compuesto nitrogenado ya que a mayor cantidad de nitrato hay mayor presencia de bacterias muertas. Esto se explica debido a que el nitrato (NO_3^-) es el producto final de la nitrificación, y a grandes cantidades en el agua disminuye la disponibilidad de oxígeno, favoreciendo

el crecimiento de ciertos grupos de microorganismos como cianobacterias o algas, que pueden causar problemas como la proliferación de algas y la eutrofización del agua. Estos cambios en la estructura de la comunidad microbiana pueden alterar el equilibrio ecológico y afectar a los microorganismos presentes en el agua. El exceso de nitratos en el agua genera una serie de problemas para el entorno y la biodiversidad de la zona afectada por esta contaminación. Además, producen que el agua contaminada quede inservible para otros usos.

Los niveles elevados de nitrato pueden sugerir la posible presencia de otros contaminantes, tales como bacterias que podrían causar problemas de salud. Una amplia variedad de microorganismos puede estar presentes en el agua, incluyendo bacterias, protozoos o virus, muchos de los cuales, son patógenos para el ser humano. Las bacterias coliformes son relativamente fáciles de identificar, ya que se desarrollan en colonias de tamaño visible (Turco., 1994; Picone et al., 2003).

Por lo tanto, a pesar de que el nitrógeno es un macronutriente esencial para el funcionamiento de la vida microbiana ya que conforma parte de las proteínas, forma componentes de la pared celular y ácidos nucleicos, un exceso de nitrato (NO_2) y nitrito (NO_3) en el agua causa efectos tóxicos que alteren la capacidad de los microorganismos y seres vivos para sobrevivir, crecer y reproducirse. Los compuestos nitrogenados representan un contaminante ambiental debido a su influencia en la eutrofización, su efecto en el contenido de oxígeno disuelto (demanda nitrogenada) y la toxicidad sobre las especies acuáticas y en los seres humanos (Kadlec y Knight, 1996).

El siguiente efecto que se describe entre las correlaciones, es la relación entre fósforo total y recuento total bacteriano de células viables y muertas, en donde se observa la relación positiva que existe, es decir, a medida que aumenta el fósforo aumenta también el recuento total de células bacterianas, esto se debe a que el fósforo es un sustrato clave en la generación de energía (ATP) y es un compuesto que forma parte de los ácidos nucleicos, azúcares, ácidos orgánicos y lípidos, por lo que es de importancia para los microorganismos para su crecimiento y

reproducción. En adelante, se explica de manera más detallada la relación entre fósforo total y recuento total bacteriano.



Figura 34. Diagrama de dispersión con línea de tendencia lineal para recuento total y fósforo total (Sin datos de estación Guaqui).



Figura 35. Diagrama de dispersión con línea de tendencia exponencial para recuento total y fósforo total (Sin datos de estación Guaqui).

La entrada de fósforo total actúa como un sustrato clave para la viabilidad de las células bacterianas, a mayor cantidad de fósforo aumentara a la vez la cantidad de células bacterianas totales debido a que es fundamental para la supervivencia de las bacterias. El fósforo (P) es un elemento esencial para la vida, siendo fundamental en el metabolismo de los organismos. Además de participar en innumerables rutas

metabólicas, el P es un componente de las moléculas esenciales de la célula, tales como los fosfolípidos, ARN, ADN y del principal cofactor nucleotídico (ATP), requerido para la transferencia de energía y catálisis celular (White y Metcalf, 2007).

El fósforo es esencial para el desarrollo de todos los microorganismos. Interviene en diferentes sistemas enzimáticos y es particularmente importante en la fermentación de los carbohidratos estructurales (Durand et al., 1983; Komisarczuk y Durand, 1991), principalmente de la celulosa (Komisarczuk et al., 1986, 1987a; Broudiscou et al., 1999); forma parte del material celular, como ácidos nucleicos, ATP, fosfolípidos de la membrana celular y ácido teicoico de las paredes celulares de las bacterias Gram⁺ (Durand et al., 1983; Komisarczuk y Durand, 1991).

El fósforo inorgánico se encuentra formando parte de minerales de calcio, hierro y aluminio originados por mecanismos de precipitación y pueden liberar fósforo muy lentamente por medio de la meteorización. Los compuestos de fósforo inorgánico pueden encontrarse en forma de sales en solución, sales cristalinas o sales absorbidas por los coloides del suelo, también pueden formar enlaces de gran estabilidad con hidróxidos de hierro, aluminio o manganeso y son menos solubles que los compuestos de fósforo orgánico (Bobadilla et al., 2008). Las bacterias suelen requerir el fósforo en forma de fosfatos, sea orgánicos o inorgánicos. Las bacterias que pueden usar los fosfatos orgánicos (merced a la posesión de fosfatasa) no dependen absolutamente de ellos, ya que pueden recurrir igualmente a los fosfatos inorgánicos. Los fosfatos orgánicos son hidrolizados por fosfatasas extracelulares o (en las Gramnegativas) periplásmicas (p.ej., la fosfatasa alcalina). El fósforo y sus formas pueden llegar a las aguas del río a través de escorrentía superficial, erosión del suelo, lixiviación etc., producto de las actividades agrícolas que se desarrollan en la cuenca. Dentro de los organismos responsables de la mineralización o la degradación de los compuestos fosfóricos en los sistemas de tratamiento, se encuentran los actinomicetos como *Streptomyces*, bacterias del género *Arthrobacter*, *Bacillus* y hongos como *Aspergillus* y *Penicillium*. Estos organismos producen fosfatasa, una enzima que libera ortofosfato de los compuestos que contiene fósforo (Gerardi, 2006). El fósforo disponible como

nutriente para el crecimiento de la biomasa se encuentra en forma de ortofosfato, el que es asimilado entre 1 y 3 % del peso seco de la bacteria.

Si bien en algunos países la agricultura genera solo el 20% de la contaminación por P (la actividad humana es responsable del 60% y la industria del 20% restante; Hénin y Sebillote, 1990), el uso de fertilizantes fosfatados en la producción de cultivos constituye otra fuente de contaminación para los cuerpos acuícolas. Adicionalmente, el manejo inadecuado de las excretas animales en las producciones pecuarias contribuye (Ekelund et al., 2003; Satter, 2003) al depósito de este elemento en el suelo.

Cabe mencionar que un exceso de fósforo en forma de ortofosfato, si este compuesto se presenta en mayor concentración a lo necesario para el crecimiento de la biomasa, este es descargado a través del efluente, constituyéndose en el nutriente limitante en el crecimiento de vegetación en cuerpos de agua. De esta manera concentraciones de 0,5 mg/L de ortofosfato provocan el crecimiento excesivo de algas las que rápidamente provocan un deterioro en la calidad del agua, produciendo un desequilibrio en la vida acuática conocido como eutrofización, provocando menor disponibilidad de oxígeno para organismos como peces y crustáceos, reduciendo así la biodiversidad y aumentando la sedimentación (Haygarth y col., 2005; Gerardi, 2006).

De manera general los ríos como el río Biobío, tienen una capacidad natural de autodepuración y auto regeneración. Esto significa que los ecosistemas acuáticos poseen mecanismos naturales, que disminuyen las cargas contaminantes. Sin embargo, si se produce un aporte importante y mantenido en el tiempo de nitrógeno y fósforo (procedente de vertidos), y aumenta la concentración de estos elementos, se producen alteraciones que hacen que los microorganismos existentes en el agua y los aportados por el vertido degraden la calidad del agua. Se ve así superada la capacidad de autodepuración natural del medio receptor, y esto conlleva a la aparición de procesos de eutrofización.

La otra relación que se identificó se refiere a la correlación positiva que existe entre Hierro total y Concentración de ADN, ya que a medida que aumenta el Hierro

aumentan las Concentraciones (ng/μl) de ADN que se cuantificaron de las extracciones de ADN. El Hierro es un componente esencial para los microorganismos y sus ciclos reproductivos, ya que está implicado en la síntesis y replicación del ADN.

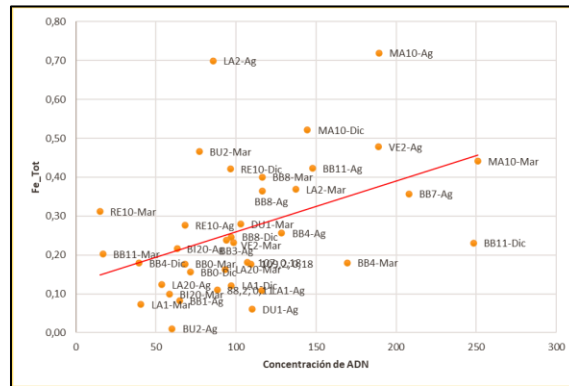


Figura 36. Diagrama de dispersión con línea de tendencia lineal para concentración de ADN y hierro total (Sin datos de estación Guaqui).



Figura 37. Diagrama de dispersión con línea de tendencia exponencial para concentración de ADN y hierro total (Sin datos de estación Guaqui).

El Hierro es un factor de crecimiento esencial para prácticamente todas las bacterias, puesto que forma parte de algunas proteínas, como catalasas, peroxidasas, oxidasas y citocromos; participa en la síntesis de pirimidinas y aminoácidos, en el ciclo de los ácidos carboxílicos, en la cadena de transporte de electrones y es un cofactor importante debido a su potencial redox (Braun & Killmann, 1999; Crosa, 1997; Ratledge & Dover, 2000). Las bacterias necesitan una concentración de hierro de entre $10e-6$ y $10e-8$ M (Pradel et al., 2000) para su crecimiento, lo cual significa que una célula requiere alrededor de $10e5-10e6$ iones de hierro por generación (Wandersman & Stojiljkovic, 2000).

Por lo tanto, como se observa en el gráfico de dispersión, a medida que aumenta el hierro aumenta la concentración de ADN extraído de las muestras de agua del río Biobío, ya que es uno de los micronutrientes esenciales para prácticamente todos los seres vivos (Weinberg, 1997). Este metal es esencial para el metabolismo celular como cofactor numerosas enzimas (Wandersman y Delepelaire, 2004), además de cumplir diversas funciones en procesos biológicos esenciales, como transporte de oxígeno, síntesis de ADN, fijación de nitrógeno, respiración y fotosíntesis (Greenshields *et al.*, 2007).

Se puede relacionar esta correlación moderada positiva, debido a lo mencionado anteriormente ya que el Hierro es fundamental para la síntesis y transcripción de ADN, por lo tanto, a mayor disponibilidad de este metal favorece el proceso de replicación del ADN y por lo tanto las extracciones de ADN aumentan en las muestras donde hay mayor presencia de Hierro.

Cabe destacar que un exceso en la concentración intracelular de hierro puede ser tóxico para las células, ya que estimula la formación de formas reactivas de oxígeno, generándose radicales hidroxilos mediante la reacción de Haber-Weiss (Ratledge & Dover, 2000). Por ese motivo las bacterias también han desarrollado mecanismos para controlar los niveles de hierro intracelular.

4. Discusión

La obtención de ADN integro y puro es una parte fundamental para el buen desempeño de las técnicas utilizadas en biología molecular (Tang et al. 2005, Wang et al. 2005). Los problemas de integridad en el ADN derivan de fallas en el protocolo de extracción de ADN mediante el uso del kit comercial DNeasy PowerSoil Pro. Estos métodos son susceptibles de contaminación, variación y errores por los múltiples pasos de manipulación (Störmer et al. 2007). A través de este estudio se logró generar un protocolo optimizado de extracción de ADN para obtener buenos resultados con respecto a concentraciones y pureza y mejorar los resultados de la verificación de la integridad del ADN con respecto a los resultados del protocolo inicial de extracción de ADN.

El protocolo optimizado de extracción se basó en modificar pasos en la etapa de manipulación de las muestras utilizando el kit comercial de extracción DNeasy PowerSoil, procurando la mantención de la cadena de frío en la etapa de la manipulación, la limitación del material utilizado y el uso del equipo para lisis mecánica de las muestras a un tiempo preciso que no dañase la integridad de las muestras.

La realización del protocolo optimizado de extracción de ADN para muestras de agua genera un aporte para optimizar los resultados en los análisis utilizando técnicas de biología molecular para las muestras de las estaciones de control pertenecientes al río Biobío que ya han sido recolectadas por el PMBB y que durante el muestreo habían perdido la cadena de frío, por lo que en consecuencia la calidad de las muestras no era la óptima para buenos resultados.

Este estudio a través de los análisis de componentes principales realizados permitió la identificación de patrones de comportamiento que se identificaron a través de patrones como nutrientes y estacionalidad y por caudal y erosión del suelo. Estos patrones con respecto a las estaciones de monitoreo del PMBB permitieron identificar cambios en la viabilidad de los recuentos de células bacterianas al identificar dos tipos de comportamiento respecto a los compuestos nitrogenados,

Nitrito (NO_2^-) y Nitrato (NO_3^-) derivados de la actividad industrial, efluentes residuales urbanos y la actividad agroindustrial en la cuenca del río Biobío. Los resultados demostraron que los cambios estacionales y espaciales en las variables ambientales tienen un efecto significativo en la viabilidad de la comunidad microbiana.

Este estudio permitió identificar de manera más específica a través de la matriz de correlación entre los parámetros fisicoquímicos y las variables microbiológicas, el efecto toxicológico que causan los compuestos nitrogenados frente a los recuentos de viabilidad bacteriana, en donde se pudo determinar que a un exceso de Nitrato (NO_3) hay mayor recuento de células bacterianas muertas, efecto que se puede justificar debido a un exceso de nitrato favorece el crecimiento de ciertos grupos de microorganismos, como las cianobacterias o algas que pueden causar problemas como la proliferación de algas y la eutrofización del agua. Estos cambios en la estructura microbiana alteran el equilibrio ecológico y afectan a los organismos presentes en el agua. Este efecto toxicológico ha sido demostrado ante diversos estudios de la Unión Europea que indican que el aumento de nitrato en el medio acuático es peligroso, ya que degrada el agua de abastecimiento y genera un aumento de la eutrofización (Rodríguez-Eugenio, N., McLaughlin, M., & Pennock, D. 2018).

La biomasa y actividad microbiana son cruciales para el funcionamiento de los ecosistemas, indicando la calidad del recurso (Cerón y Melgarejo, 2005; Doran y Safley, 1997). El estudio de las comunidades bacterianas presentes en el medioambiente tiene una enorme relevancia en cuanto al conocimiento de la diversidad biológica global y de los ciclos biogeoquímicos que tienen lugar en el planeta (López y Zaballos 2005) y el análisis de las comunidades bacterianas permite inferir sobre las funciones positivas y negativas de los gremios o poblaciones que la conforman (Huber et al. 2004, Domínguez et al. 2006, Aly et al. 2008), por lo que entender la relación entre datos microbiológicos y los parámetros fisicoquímicos del río Biobío genera herramientas para en un futuro

implementar o crear nuevas medidas de gestión que busquen mejorar la calidad del recurso hídrico en nuestro país y sus cuencas hidrográficas.

Sin embargo, para conocer los vínculos entre la estructura de las comunidades microbianas y la dinámica del N y del P se requiere de más investigación (Chen et al., 2008). Recientemente el estudio de las comunidades microbianas, su diversidad y estatus metabólico era difícil, debido a que la mayoría de los microorganismos no son cultivados mediante el uso de las técnicas tradicionales de la microbiología. Esto obedece a diversas razones, condiciones ambientales, requerimientos nutricionales, desconocimiento de la fisiología del microorganismo de interés y fundamentalmente, a causa del amplio desconocimiento de las interacciones que tienen lugar en la comunidad microbiana. En la actualidad la aplicación de técnicas moleculares, permiten el análisis de las secuencias de genes específicos e incluso de genomas completos, permitiendo grandes avances en el estudio de los microorganismos en poco tiempo (Giraffa y Neviani 2001, Torsvik y Ovreas 2002, Croci et al. 2007).

Esta aproximación del impacto de las variables ambientales frente a datos microbiológicos del agua, respecto a la evaluación de la viabilidad y las concentraciones de ADN, también permitió la detección de hongos y bacterias en el río Biobío mediante un PCR. Se propone que si estas relaciones y estudios quisieran analizarse de manera más específica en relación con las variables ambientales que evalúa la NSCA-BB es necesario una secuenciación de próxima generación de las extracciones de ADN, para obtener las especies de microorganismo que componen las composiciones microbianas del río Biobío, que permita despejar el vínculo entre los patrones de comportamiento y la estructura de los microorganismos presentes en los cursos de agua en la cuenca del río Biobío.

Con respecto al aporte a los ODS, este estudio se relaciona con el ODS 6, para agua limpia y saneamiento que propone garantizar la disponibilidad de agua y su gestión sostenible y el saneamiento para todos y todas. Se relaciona en específico con la meta 6.3. que persigue: “De aquí a 2030, mejorar la calidad del agua

reduciendo la contaminación, eliminando el vertimiento y minimizando la emisión de productos químicos y materiales peligrosos, reduciendo a la mitad el porcentaje de aguas residuales sin tratar y aumentando considerablemente el reciclado y la reutilización sin riesgos a nivel mundial”, y la meta 6.6. que persigue: “De aquí a 2020, proteger y restablecer los ecosistemas relacionados con el agua, incluidos los bosques, las montañas, los humedales, los ríos, los acuíferos y los lagos” (Cepal, N. U. (2019). Este estudio propone nuevos desafíos en la gestión del agua, para reducir la contaminación del recurso hídrico, mejorar el control de la calidad para consumo y saneamiento y prevenir las condiciones ambientales de los ecosistemas acuáticos, con respecto a mejorar la toma de decisiones que intervienen en el control de vertidos, tratamiento de las aguas, conservación de los ecosistemas y prevenir la propagación de enfermedades origen hídrico.

5. Conclusiones

1. Este estudio aproximativo propone herramientas microbiológicas que complementen información para la gestión del agua en la cuenca del río Biobío.
2. Establece la relación entre variables fisicoquímicas y datos microbiológicos, identificando efectos toxicológicos que alteran la viabilidad bacteriana del río Biobío.
3. Se generó un protocolo optimizado de extracción de ADN adecuado a la procedencia de las muestras provenientes del PMBB.
4. A través del ADN extraído se proponen nuevas aplicaciones de metodologías de biología molecular, como secuenciación masiva de cuarta generación para la identificación de las especies de microorganismos presentes en el río Biobío que permitirán un estudio avanzado sobre la relación que existe entre variables ambientales y microbioma del agua.

6. Referencias

- ABC.es. (2014, 12 de diciembre). La larga batalla por el hierro entre las bacterias y el sistema inmune. Blogs ABC. <https://abcblogs.abc.es/abcncalse/otros-temas/la-larga-batalla-por-el-hierro-entre-las-bacterias-y-el-sistema-inmune.html?ref=https%3A%2F%2Fwww.google.cl%2F>
- Alarcón, M. A., Beltrán, M., Cárdenas, M. L., & Campos, M. C. (2005). Recuento y determinación de viabilidad de *Giardia* spp. y *Cryptosporidium* spp. en aguas potables y residuales en la cuenca alta del río Bogotá. *Biomédica*, 25(3), 353-365.
- Aroca Aguilera, M. C. (2021). Estandarización de detección de mesamphiagrion laterale como modelo de monitoreo de macroinvertebrados de agua dulce con adn ambiental.
- Aroca Aguilera, M. C. (2021). Estandarización de detección de mesamphiagrion laterale como modelo de monitoreo de macroinvertebrados de agua dulce con adn ambiental.
- Avilés Aguirre, D., & Ortiz Tirado, J. C. Caracterización de la microbiota intestinal de *Andinoacara rivulatus* (vieja azul) y *Cichlasoma festae* (vieja roja) provenientes del proyecto multipropósito “Baba”, en la Cuenca alta del río Guayas.
- Bolaños-Alfaro, J. D., Cordero-Castro, G., & Segura-Araya, G. (2017). Determinación de nitritos, nitratos, sulfatos y fosfatos en agua potable como indicadores de contaminación ocasionada por el hombre, en dos cantones de Alajuela (Costa Rica). *Revista Tecnología en Marcha*, 30(4), 15-27.
- Cárdenas Calvachi, G. L., & Sánchez Ortiz, I. A. (2013). Nitrógeno en aguas residuales: orígenes, efectos y mecanismos de remoción para preservar el ambiente y la salud pública. *Universidad y Salud*, 15(1), 72-88.
- Cepal, N. U. (2018). Agenda 2030 y los Objetivos de Desarrollo Sostenible: una oportunidad para América Latina y el Caribe.

- Cepal, N. U. (2019). La Agenda 2030 y los Objetivos de Desarrollo Sostenible: una oportunidad para América Latina y el Caribe. Objetivos, metas e indicadores mundiales.
- Chiang, G., Munkittrick, K. R., McMaster, M. E., Barra, R., & Servos, M. (2014). Marco conceptual de Monitoreo Regional de Efectos Acumulativos: Brechas y desafíos para la Cuenca del río Biobío en el centro-sur de Chile. *Gayana (Concepción)*, 78(2), 109-119.
- Corrales Ramírez, L. C., Sánchez Leal, L. C., & Quimbayo Salamanca, M. E. (2018). Microorganismos potencialmente fitopatógenos en aguas de riego proveniente de la cuenca media del río Bogotá. *Nova*, 16(29), 71-89.
- Cruz-Leyva, MCDL, Zamudio-Maya, M., Corona-Cruz, AI, González-de la Cruz, JU, & Rojas-Herrera, RA (2015). Estudios e importancia de las comunidades microbianas en los recursos y productos pesqueros. *Ecosistemas y recursos agropecuarios*, 2 (4), 99-115.
- Culturaedáfica. (2015, 29 de junio). El tamaño de los microorganismos. *Agrología*. <https://agrologia.wordpress.com/2015/06/29/el-tamano-de-los-microorganismos/>.
- Díaz, A. S., Rentería, L. F., Cortez, J. A., & Palacios, E. S. (2008). PCR: reacción en cadena de la polimerasa. *Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos*, 53.
- Fierro, F. F. (2014). Electroforesis de ADN. *Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos*, 27.
- Guerra P., Matias y Castro F., Jean Franco (2020) Evaluación de viabilidad de microorganismos [en línea]. Chillan: Boletín INIA - Instituto de Investigaciones Agropecuarias. no. 428. p. 139-153. Disponible en: <https://hdl.handle.net/20.500.14001/67168> (Consultado: 25 julio 2023).
- Habit, E., Parra, O., & Valdovinos, C. (2005). Ictiofauna de un sistema fluvial receptor de aguas servidas: Respuestas a una nueva planta de tratamiento (Río Quilque, Chile central). *Gayana (Concepción)*, 69(1), 94-103.
- Hernández-Pérez, A., & Labbé, J. I. (2014). Microalgas, cultivo y beneficios *Microalgae, culture and benefits*. 49, 157–173.

- Kumar, G., Eble, JE y Gaither, MR (2020). Una guía práctica para la conservación de muestras y el procesamiento previo a PCR de ADN ambiental acuático. Recursos de ecología molecular, 20 (1), 29-39.
- LOPEZ, E. (2019). Métodos para determinar la viabilidad celular con aplicación en odontología.
- Másmela-Mendoza, J. E., Lizarazo-Forero, L. M., & Aranguren Riaño, N. J. (2019). Bacterias nitrificantes cultivables de la zona limnética del lago de Tota, Boyacá. Revista UDCA Actualidad & Divulgación Científica, 22(2).
- Másmela-Mendoza, J. E., Lizarazo-Forero, L. M., & Aranguren Riaño, N. J. (2019). Bacterias nitrificantes cultivables de la zona limnética del lago de Tota, Boyacá. Revista UDCA Actualidad & Divulgación Científica, 22(2).
- Peña, D. (2002). Análisis de datos multivariantes. McGraw Hill.
- PMBB, (2014). Seminario la gestión integrada de cuencas hidrográficas ante escenarios de alta demanda y efectos del cambio climático: agudización y nuevos conflictos entre actores y desafíos futuros. 1-35.
- PMBB, (2021). PROGRAMA DE MONITOREO DE LA CALIDAD DEL AGUA DEL SISTEMA RIO BIOBIO (Chile Central). Informe de Resultados Campaña 81 (Anual 2021). 1-37
- Prest, EI, Hammes, F., Van Loosdrecht, MC y Vrouwenvelder, JS (2016). Estabilidad biológica del agua potable: factores de control, métodos y desafíos. Fronteras en microbiología, 7, 45.
- Rincón, L. E. C., & Muñoz, L. M. M. (2005). Enzimas del suelo: indicadores de salud y calidad. Acta Biológica Colombiana, 10(1), 5-18.
- Ríos-Sánchez, E., Calleros, E., González-Zamora, A., Rubio, J., Martínez, O. C., Martínez, A., & Pérez-Morales, R. (2016). Análisis comparativo de diferentes métodos de extracción de DNA y su eficiencia de genotipificación en población mexicana. Acta universitaria, 26(4), 56-65.
- Ríos-Tobón, S., Agudelo-Cadavid, R. M., & Gutiérrez-Builes, L. A. (2017). Pathogens and microbiological indicators of the quality of water for human consumption. Revista Facultad Nacional de Salud Pública, 35(2), 236-247.

- Rivera, N. R., Encina, F., Muñoz-Pedrerros, A., & Mejias, P. (2004). La calidad de las aguas en los ríos Cautín e Imperial, IX Región-Chile. *Información tecnológica*, 15(5), 89-101.
- Rodríguez, S., Gauna, L., Martínez, G., Acevedo, H., & Romero, C. (2012). Relación del nitrato sobre la contaminación bacteriana del agua. *Terra Latinoamericana*, 30(2), 111-119.
- Rodríguez-Eugenio, N., McLaughlin, M., & Pennock, D. (2018). La contaminación del suelo: una realidad oculta.
- Sánchez, J., & Sanabria, J. (2009). Metabolismos microbianos involucrados en procesos avanzados para la remoción de Nitrógeno, una revisión prospectiva. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 11(1), 114-124.
- Servicios Sanitarios, S., & Echeverría, O. (2021). Estudio de la Norma NCh 409: Agua Potable Requisitos Estándares Internacionales Símiles, Cuantificación de Parámetros Nuevos y Modificados, y Factibilidad de Remoción en PTAP Existentes.
- Van Huynh, V., Ngo, MTT, Itayama, T., Nguyen, MB, Le, VG, You, SJ, ... & Bui, XT (2023). Dinámica de la comunidad microbiana en el proceso simultáneo de nitrificación y desnitrificación: una revisión. *Informes de tecnología de biorecursos*, 101415.
- Velázquez, L. P. A., Martínez, M. D. C. A., & Romero, A. C. (2014). Extracción y purificación de ADN. *Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos*, 1.
- Xue Wang, Guoyu Zhang, Aizhong Ding, Lei Zheng, En Xie, Dongdan Yuan, Qiuyang Tan, Yuzi Xing, Haoming Wu, Nitrite-resistance mechanisms on wastewater treatment in denitrifying phosphorus removal process revealed by machine learning, co-occurrence, and metagenomics analysis, *Environmental Pollution*, Volume 327.