



**UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES
Y OCEANOGRÁFICAS**



**ESTUDIO MORFOLÓGICO DE MACROBACTERIAS
ANAERÓBICAS FILAMENTOSAS MULTICELULARES DEL
HUMEDAL “LAGUNA VERDE”, COMUNA HUALPÉN, REGIÓN
DEL BIOBÍO, CHILE.**

ESTEFANIA ANTONIETA BARRERA UMAÑA

Seminario de Título presentado al
DEPARTAMENTO DE OCEANOGRAFÍA DE
LA UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN

Para optar al Título de
BIÓLOGA MARINA

Concepción – Chile

2026

UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN
DEPARTAMENTO DE OCEANOGRAFÍA

Este Seminario de Título ha sido realizado en el Departamento de Oceanografía de la Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas.

Profesor(a) Guía

Prof. Dr. Víctor Ariel Gallardo

Facultad de Cs. Naturales y Oceanográficas
Universidad de Concepción

Ha sido aprobada por la
Siguiete Comisión Evaluadora

Prof. Dr. Ciro Oyarzún

Facultad de Cs. Naturales y Oceanográficas
Universidad de Concepción

Prof. Dr. Billy Ernst

Facultad de Cs. Naturales y Oceanográficas
Universidad de Concepción

Dra. Nathaly Ruiz-Tagle Moena

Centro de Biotecnología
Universidad de Concepción

Jefe de Carrera

Dr. Ariel Valenzuela Saldías

Facultad de Cs. Naturales y Oceanográficas
Universidad de Concepción

“A mis grandes apoyos en este camino,

mi familia, novio y amigas.

No estaría aquí sin ustedes”

- Manifiesta.

AGRADECIMIENTOS

Quisiera iniciar agradeciendo a las dos personas que más me apoyaron en este proceso, a mi profesor guía Prof. Dr. Víctor Ariel Gallardo y la Prof. M. Sc. Carola Espinoza (del Laboratorio de Bentos y Exobiología), por sus enseñanzas, apoyo y confianza depositados en mí durante el transcurso de la tesis; por entregarme nuevas herramientas para mi desarrollo personal y profesional y por ayudarme durante la realización de este estudio.

También quisiera agradecer a todas las personas pertenecientes a diferentes laboratorios de la Universidad de Concepción, que ayudaron con la realización de los análisis: a la Dra. Sandra Ferrada del Laboratorio de Genética y Acuicultura de la Universidad de Concepción, por facilitarme el horno para secar las muestras de sedimento, esenciales para el análisis de MOT (materia orgánica total) y porosidad. Al Dr. Ricardo Oliva Carrasco, Jefe del Centro de Espectroscopía y Microscopía electrónica de barrido (CESMI), por realizar los análisis y micro-fotografiado de las muestras, previamente preparadas para la microscopía electrónica de barrido por el técnico, Sr. Alexis Estay.

También quisiera agradecer, a quienes permitieron llevar a cabo los muestreos, *i.e.*, el Dr. Carlos Baeza Perry, Director del Departamento de Botánica; al Sr. Pedro Arias Tamarín, encargado logístico de la Estación de Biología Terrestre de Hualpén}, por cursar los permisos de ingreso a la Estación de Biología Terrestre y apoyar las acciones dentro de la Estación. Agradezco igualmente a la Sra. Tatiana Quiñones, secretaria del Departamento de Zoología, así como a todo el Departamento de Zoología por facilitarnos la camioneta del Departamento, lo que nos permitió movilizarnos hasta el sitio de muestreo, la Estación de Biología Terrestre de Hualpén. También para el Sr. Ricardo León Suazo, cuidador encargado de la Estación de Biología Terrestre de nuestra Universidad en el Parque Hualpén, por ayudar en terreno con toda la logística.

Al Prof. Dr. Ciro Oyarzún González, por acompañarnos en el muestreo realizado en octubre del 2025 y así poder documentar el área de muestreo con su equipo Dron. Agradezco también al Sr. Marco Sepúlveda Osorio, miembro del personal

administrativo y auxiliar de la Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas por su importante ayuda logística dentro del campus de nuestra Universidad.

Finalmente, quiero agradecer a mi familia, por apoyarme en esta larga etapa, por motivarme y creer plenamente en mí, principalmente a mis padres y hermanos, Pablo Barrera B., Jacqueline Umaña S., David Barrera U., Isidora Barrera U. y Pablo Barrea U. Así mismo, agradecer a mi novio Matías Maldonado, por su apoyo incondicional, amor, comprensión y motivación. Finalmente quisiera agradecer a mis amigas, principalmente a Francisca Vilches, por su eterna motivación y apoyo.

Mil gracias a todos los que de alguna manera contribuyeron a la realización de la tesis, estaré eternamente agradecida, sus buenos deseos eran mi eterna motivación.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

ÍNDICE DE FIGURAS.....	viii
ÍNDICE DE TABLAS.....	x
ÍNDICE DE ANEXOS.....	xi
RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	3
1. INTRODUCCIÓN.....	5
1.1 Generalidades de las bacterias filamentosas multicelulares.....	5
1.2 Clasificación de Morfotipos.....	6
1.3 Comunidades del Sulfureto de Humboldt.....	7
1.4 Rol ecológico.....	10
1.5 Antecedentes de macrobacterias filamentosas en ambientes marinos y dulceacuícolas.....	12
1.6 Área de estudio: Humedal Laguna Verde	16
1.7 Justificación y planteamiento del problema.....	17
2. HIPÓTESIS.....	18
3. OBJETIVOS	18
3.1 Objetivo general.....	18
3.2 Objetivos específicos.....	18
4. METODOLOGÍA.....	19
4.1 Área de estudio.....	19
4.2 Toma de muestras.....	20
4.2.1 Toma de muestras en terreno.....	20
4.2.2 Preparación de muestras en el laboratorio.....	25
4.2.2.a Preparación de muestras para SEM.....	25
4.2.2.b Preparación de muestras para PCM.....	25
4.3 Análisis.....	26
4.3.1 Análisis morfológico.....	26

4.3.2	Análisis fisicoquímico.....	29
4.3.3	Análisis estadístico de los datos.....	31
4.3.4	Análisis comparativo.....	31
5.	RESULTADOS.....	32
5.1	Análisis morfológico.....	32
5.1.1	Microscopia de Contraste de Fase (PCM).....	32
5.1.2	Microscopia Electrónica de Barrido (SEM).....	40
5.2	Análisis fisicoquímico.....	41
5.3	Análisis estadístico.....	44
6.	DISCUSIÓN.....	51
7.	CONCLUSIONES.....	52
	REFERENCIAS.....	54

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura N°1: Clave morfológica para macrobacterias filamentosas multicelulares.....	6
Figura N°2: Distribución del “Sulfureto de Humboldt” (SH).....	9
Figura N°3: Diversos morfotipos de macrobacterias que habitan en el SH.....	9
Figura N°4: Diagrama eco-fisiología de <i>Candidatus</i> Marithioploca.....	12
Figura N°5: Morfología de las bacterias cable.....	15
Figura N°6: Ubicación del área y los puntos de muestreos.....	19
Figura N°7: Vista general del Humedal Laguna Verde (octubre).....	21
Figura N°8: Vista aérea del Humedal Laguna Verde.....	22
Figura N°9: Método de submuestreo a tubos pequeños (20cm).....	22
Figura N°10: Vista general del Humedal Laguna Verde (noviembre).....	24
Figura N°11: Vista general del Humedal Laguna Verde con punto M4.....	24
Figura N°12: Esquema general de análisis de PCM.....	27
Figura N°13: Esquema general de análisis de SEM.....	28
Figura N°14: Clasificación de morfotipos encontrados en L.V.....	32
Figura N°15: Principales morfotipos de macrobacterias en L.V (octubre).....	34
Figura N°16: Principales morfotipos de macrobacterias en L.V (noviembre).....	35
Figura N°17: Movimientos de un filamento en un minuto.....	36
Figura N°18: Morfotipos de macrobacterias de L.V durante octubre.....	37
Figura N°19: Morfotipos de macrobacterias colectas en lagunas de San Pedro.....	38
Figura N°20: Collage de morfotipos marinos.....	39
Figura N°21: Morfotipos lacustres en SEM.....	40

Figura N°22: Abundancia promedio por morfotipo (octubre).....	44
Figura N°23: Abundancia promedio por morfotipo (noviembre).....	45
Figura N°24: Densidad media total de filamentos en octubre de L.V.....	46
Figura N°25: Riqueza morfológica de L.V en octubre.....	46
Figura N°26: Densidad media total de filamentos en noviembre de L.V.....	47
Figura N°27: Riqueza morfológica de L.V en noviembre.....	48
Figura N°28: Abundancia relativa (composición) de la comunidad.....	49
Figura N°29: Dinámica temporal de la comunidad bacteriana.....	49
Figura N°30: Densidad promedio mensual en L.V.....	50

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA N°1: Registros de fechas y puntos de muestreos del lugar de estudio.....	20
TABLA N°2: Características organolépticas del sedimento.....	41-42
TABLA N°3: Parámetros fisicoquímicos del 1 cm de agua tomado <i>in situ</i> en Humedal Laguna Verde en noviembre.....	42
TABLA N°4: Parámetros fisicoquímicos del sedimento.....	43
TABLA N°5: Índices de diversidad de Shannon (H').....	50

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO N°1: Cantidad de morfotipos muestreados en octubre de 2025.....57

ANEXO N°2: Cantidad de morfotipos muestreados en noviembre de 2025.....57

RESUMEN

Si bien las morfologías aquí descritas de bacterias de fondos reducidos de lagunas de agua dulce habían sido ya descubiertas y descritas en ambientes anaeróbicos marinos similares, y también descubiertas en lagunas hipersalinas andinas y del Salar de Atacama, escasa atención se había puesto hasta ahora en la vida procariota filamentosa multicelular de cuerpos dulceacuícolas continentales.

El primer reportaje de este tipo de bacterias bentónicas de fondos reducidos en la VIII Región fue el correspondiente a las “Laguna Chica” (36°50'40"S 73°05'15"W) y “Laguna Grande” (36°50'51"S y 73°06'36"W) (“lagunas metropolitanas”), de la comuna de San Pedro de la Paz (Región del Biobío).

El presente documento informa sobre los resultados obtenidos del segundo registro de bacterias filamentosas multicelulares en fondos anaeróbicos reducidos en un cuerpo de agua dulce de la Región del Biobío. En este caso, de los fondos del Humedal Laguna Verde (36°47'46.5"S, 73°09'32.9"W), ubicada en la comuna de Hualpén al norte de la desembocadura del río Biobío.

El principal objetivo del presente trabajo fue investigar la presencia y características morfológicas de las macrobacterias filamentosas multicelulares del Humedal Laguna Verde (Hualpén), comparando su similitud con morfotipos marinos.

Junto con realizar campañas de muestreo de sedimentos lacustres reducidos en oxígeno disuelto en octubre y noviembre del año 2025, se evaluó la similitud entre los morfotipos contenidos en estas muestras y los morfotipos marinos y se registraron los parámetros fisicoquímicos del sedimento tales como pH, potencial redox y temperatura.

La metodología incluyó: la caracterización organoléptica *in situ* de las muestras de sedimento recolectadas, el análisis morfológico (conteo y agrupación de morfotipos) mediante Microscopía de Contraste de Fase (PCM) y Microscopía Electrónica de Barrido (SEM), además de un registro de los parámetros fisicoquímicos del sedimento.

Los resultados confirmaron la presencia de: seis morfotipos bacterianos filamentosos en el Humedal Laguna Verde, los que fueron “clasificados” según la clave morfológica de Gallardo & Espinoza (2007b).

Se registró una dominancia marcada del morfotipo cilíndrico con septos no visibles y sin accesorio apical (B.I.i.2) alcanzando una densidad de 10×10^3 filamentos/mL, además de hallarse morfotipos análogos a los marinos tales como el morfotipo con contricciones celulares (B.II.iv.7) y con gránulos simples (B.II.iii.4.c). En cuanto a datos cuantitativos, las mayores densidades se observaron en primavera (octubre) en la estación M1 de Laguna Verde, alcanzando promedios superiores a 8×10^4 filamentos/mL. Los valores de Índice de Shannon fueron parejos (entre 0,5 y 0,7), lo que indica un punto en el tiempo, y en un futuro se podrá comparar con otras estaciones del año. Los sedimentos se caracterizaron con una gran presencia de sulfuro de hidrógeno (H_2S).

Se confirma y concluye que Humedal Laguna Verde mantiene comunidades procariotas morfológicamente análogas a las marinas, como del denominado Sulfureto de Humboldt. Así mismo, la diversidad morfológica del sistema dulceacuícola del Humedal Laguna Verde representa el 54,5% de los morfotipos encontrados en el Sulfureto de Humboldt (marino).

Por otro lado, la presencia de estas bacterias en Humedal Laguna Verde, podría deberse a dos factores, uno marino (debido a su origen geológico) y otro de agua dulce (por su cercanía al río Biobío). Además, los resultados del presente estudio establecen las bases para futuros estudios más robustos.

ABSTRACT

Although the morphologies of bacteria from reduced freshwater lagoon bottoms described here had already been discovered and documented in similar marine anaerobic environments, as well as in hypersaline Andean lagoons and the Salar de Atacama, little attention has been paid until now to multicellular filamentous prokaryotic life in continental freshwater bodies.

The first report of this type of benthic bacteria from reduced bottoms in the VIII Region corresponded to "Laguna Chica" (36°50'40"S 73°05'15"W) and "Laguna Grande" (36°50'51"S y 73°06'36"W) ("metropolitan lagoons") in the commune of San Pedro de la Paz (Biobío Region).

This document reports the results obtained from the second record of multicellular filamentous bacteria in anaerobic reduced bottoms within a freshwater body in the Biobío Region. In this case, the study focuses on the benthos of the Laguna Verde Wetland (36°47'46.5"S, 73°09'32.9"W), located in the Hualpén commune, north of the mouth of the Biobío River.

The main objective of this work was to investigate the presence and morphological characteristics of multicellular filamentous macrobacteria in the Laguna Verde Wetland (Hualpén), comparing their similarity to marine morphotypes.

In addition to conducting sampling campaigns of lacustrine sediments reduced in dissolved oxygen during October and November 2025, the similarity between the morphotypes found in these samples and marine morphotypes was evaluated. Physicochemical parameters of the sediment, such as pH, redox potential, and temperature, were also recorded.

The methodology included: in situ organoleptic characterization of the collected sediment samples, morphological analysis (counting and grouping of morphotypes) using Phase Contrast Microscopy (PCM) and Scanning Electron Microscopy (SEM), and the recording of physicochemical parameters. The results confirmed the presence of

six filamentous bacterial morphotypes in the Laguna Verde Wetland, which were "classified" according to the morphological key of Gallardo & Espinoza (2007b).

A marked dominance of the cylindrical morphotype with non-visible septa and no apical accessory (B.I.i.2) was recorded, reaching a density of 10×10^3 filaments/mL. Additionally, morphotypes analogous to marine ones were found, such as the morphotype with cellular constrictions (B.II.iv.7) and the one with simple granules (B.II.iii.4.c). Regarding quantitative data, the highest densities were observed in spring (october) at station M1 of Laguna Verde, reaching averages exceeding 8×10^4 filaments/mL. Shannon Index values were consistent (between 0.5 and 0.7), indicating a specific point in time that can be compared with other seasons in the future. The sediments were characterized by a high presence of H₂S.

It is confirmed and concluded that the Laguna Verde Wetland maintains prokaryotic communities morphologically analogous to marine ones, such as those of the so-called Humboldt Sulfuretum. Likewise, the morphological diversity of the Laguna Verde Wetland freshwater system represents 54.5% of the morphotypes found in the (marine) Humboldt Sulfuretum.

Furthermore, the presence of these bacteria in the Laguna Verde Wetland could be due to two factors: one marine (due to its geological origin) and one freshwater (due to its proximity to the Biobío River). Finally, the results of this study establish the foundation for more robust future research.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Generalidades de las bacterias filamentosas multicelulares.

La ecología microbiana de ambientes acuáticos ha revelado la existencia de comunidades de bacterias filamentosas multicelulares, las que prosperan en condiciones de hipoxia y anoxia, condiciones predominantes en la hidrología de la Tierra temprana (Gallardo *et al.*, 2013). Dentro de este grupo de las grandes bacterias filamentosas multicelulares se reconocen dos grupos, donde las bacterias se dividen por tamaño en estas categorías no taxonómicas con nombres coloquiales que se les asignaron según Gallardo & Espinoza (2007b). Es decir, las “megabacterias” filamentosas (con diámetros entre *ca.* 20-40 μm), y las “macrobacterias” filamentosas (con diámetros entre *ca.* 1-8 μm) (Gallardo & Espinoza, 2007b).

Estas últimas, se distinguen taxonómica y funcionalmente de las "megabacterias" multicelulares clásicas, *Thioploca araucae* (Maier & Gallardo, 1984) y *T. chileae* (Maier & Gallardo, 1984). Las cuales fueron las primeras bacterias de esta índole en ser descubiertas en el océano mundial, hecho que ocurrió durante la Expedición “Mar-Chile II” (Sievers, 2018). Los diámetros de estas bacterias filamentosas gigantes varían entre aproximadamente 40 y 20 micrones, y han sido ampliamente estudiadas en zonas de surgencia (Gallardo *et al.*, 2013).

Estos organismos habitan preferentemente en el fondo marino, donde actúan como ingenieros del ecosistema microbiano, facilitando el desarrollo de ciclos biogeoquímicos esenciales como el del azufre y cumpliendo con un rol ecológico primordial en ambientes anóxicos ricos en hidrógeno sulfurado como el Sulfureto de Humboldt (SH) (Gallardo *et al.*, 2013); es decir, los compuestos sulfurados, como el sulfuro de hidrógeno (H_2S), el que originalmente fue, y actualmente, sigue siendo aportado por volcanes, aporte que ha sido complementado por la evolución de la vida en la Tierra, por la descomposición de la materia orgánica (Dr. V. A. Gallardo, com. pers., diciembre 2025).

1.2 . Clasificación de Morfotipos.

En busca de dar una identidad a la diversidad de macrobacterias filamentosas multicelulares, los investigadores Gallardo & Espinoza, crearon una clave taxonómica práctica con el fin de agrupar a las macrobacterias por medio de sus características morfológicas. En el caso de estas bacterias, la morfología es una herramienta muy útil para discernirlas mientras se adquieren los equipamientos necesarios para describirlas e identificarlas específicamente (Fig. 1), ya que es una forma rápida, económica y fácil de agrupar bacterias según su morfotipo (Gallardo & Espinoza, 2007b). Sin embargo, su principal limitación radica en la posibilidad de confundir a estas macrobacterias con organismos que presenten estructuras celulares similares, como las cianobacterias (Durán *et al.*, 2025).

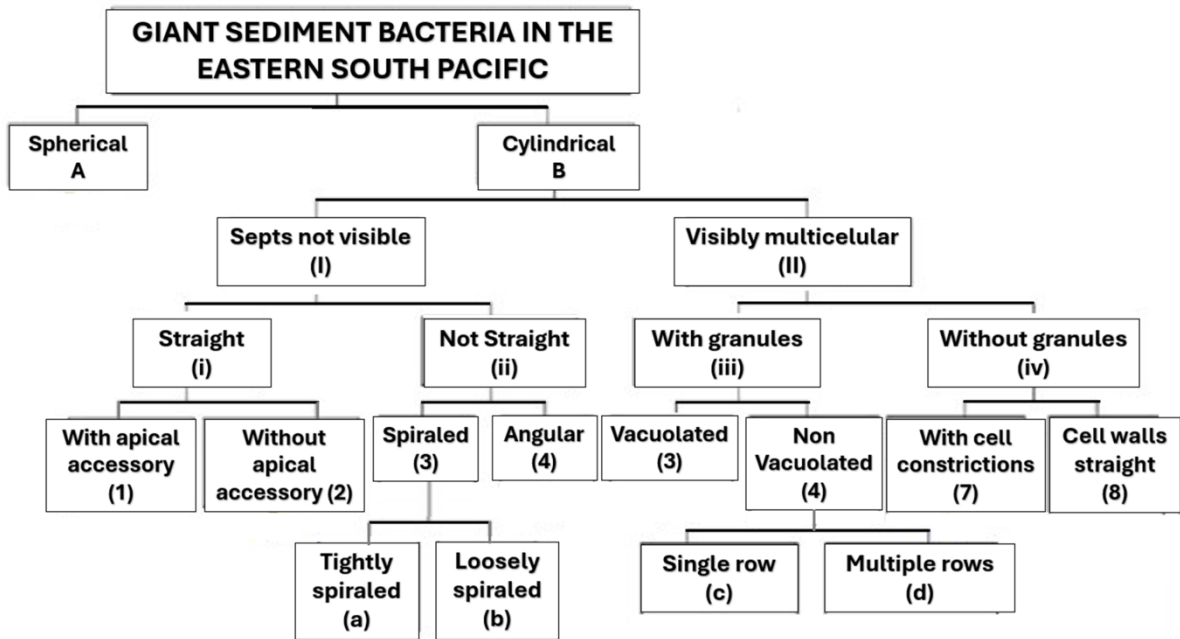


Figura 1. Clave morfológica para macrobacterias filamentosas multicelulares según Gallardo & Espinoza (2007b). Las imágenes provienen de muestras de sedimentos recolectados en el Sulfureto de Humboldt (SH), específicamente de los fondos anóxicos de la Bahía de Concepción, Chile central (~36° de latitud sur) durante el periodo 2004-2007 (Gallardo & Espinoza, 2007b).

Así mismo, según Gallardo & Espinoza (2007b): además de la variada morfología multicelular, algunos morfotipos muestran una interesante variación de movimientos que sugieren una transmisión de estímulos a lo largo de la cadena de células y mecanismos de coordinación fina.

Aunque con bastante lentitud, la mayoría de los morfotipos pueden deslizarse hacia adelante y hacia atrás; incluso hay filamentos capaces de doblarse en forma de arco y moverse en esta posición (generalmente los filamentos más largos). También, se ha observado la presencia de lo que parece ser glóbulos de azufre dentro de las células de algunas de las “macrobacterias”, sugiriendo una quimiosíntesis basada en el sulfuro. Sin embargo, gránulos de otros polímeros también podrían estar involucrados. Todo esto sugiere, que las “macrobacterias”, son verdaderos organismos multicelulares, en los que, diferentes células a lo largo de la cadena podrían diferir en su función (Gallardo & Espinoza, 2007b).

Incluso, el tamaño de estas macrobacterias, ofrece una ventaja competitiva porque ayuda a superar las limitaciones termodinámicas de la microescala, además de limitaciones impuestas por otras bacterias, ya que la relación área superficie-volumen de un cilindro no cambia mucho con el aumento de la longitud, permitiendo que las formas filamentosas delgadas tengan una mayor exposición a recursos ambientales (Gallardo & Espinoza, 2007b).

1.3 . Comunidades del Sulfureto de Humboldt.

Históricamente, el conocimiento sobre estas comunidades se ha centrado en el medio marino. Si bien las primeras bacterias sulfurosas gigantes fueron descubiertas en el denominado Sulfureto de Humboldt (SH) en el norte de Chile en la década de 1960 (Gallardo, 1963), la verdadera diversidad de los filamentos se encontró en una ventana de diámetros menor, las llamadas “macrobacterias”, las cuales no fueron consideradas durante décadas. No fue sino hasta la Expedición del “*Sorcerer II*”, organizada por el científico norteamericano Dr. J. Craig Venter (Rusch *et al.*, 2007), en la que el Dr. V. A.

Gallardo descubrió estos nuevos morfotipos de bacterias filamentosas multicelulares frente a Roca Redonda (Archipiélago de las Islas Galápagos, Ecuador).

En seguida de dicha expedición, estas bacterias fueron reconocidas con gran diversidad frente a Concepción; (Gallardo *et al.*, 2013) y son consideradas como parte integral del "SH".

Debido a esta experiencia, el Dr. V. A. Gallardo regresa a Chile y comienza muestreos intensivos frente a la costa de Concepción para luego, describir una vasta comunidad de bacterias filamentosas multicelulares de menor diámetro que las originales *Thioploca*, las que se denominaron en general “macrobacterias”, habitando el Sulfureto de Humboldt debajo del Sistema de Corrientes del mismo nombre y debajo la Zona de Mínima de Oxígeno (ZMO) (Gallardo *et al.*, 2013).

Esta zona, denominada el "Sulfureto de Humboldt" (SH) (Fig. 2), se extiende entre aproximadamente los 6°S y los 37°S, cubriendo potencialmente alrededor de 100.000 km² (Gallardo *et al.*, 2013), y se caracteriza por poseer concentraciones de oxígeno disuelto cercanas a cero, sedimentos ricos en sulfuro de hidrógeno (H₂S) y materia orgánica (Gallardo & Espinoza, 2007a). En este ambiente se han identificado diversos morfotipos (Fig. 3), donde la riqueza en la diversidad morfológica de estas comunidades incluye variadas formas como *Desulfonema*, *Spirochaeta*, entre otros géneros aún en estudio. Estos tipos de “macrobacterias filamentosas multicelulares”, forman extensas comunidades microbianas que regulan la química del sedimento y además se han visto asociadas a las vainas de *Thioploca* spp. (Gallardo *et al.*, 2013).

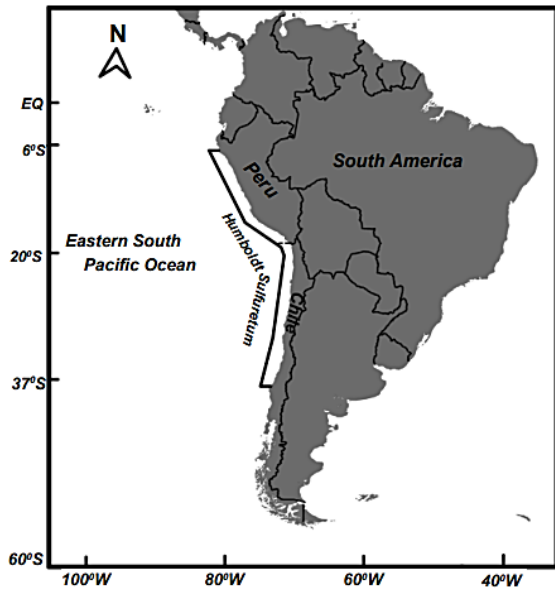


Figura 2. Distribución del “Sulfureto de Humboldt” (SH) a lo largo del borde oriental de la Corriente de Humboldt (Gallardo *et al.*, 2013b).

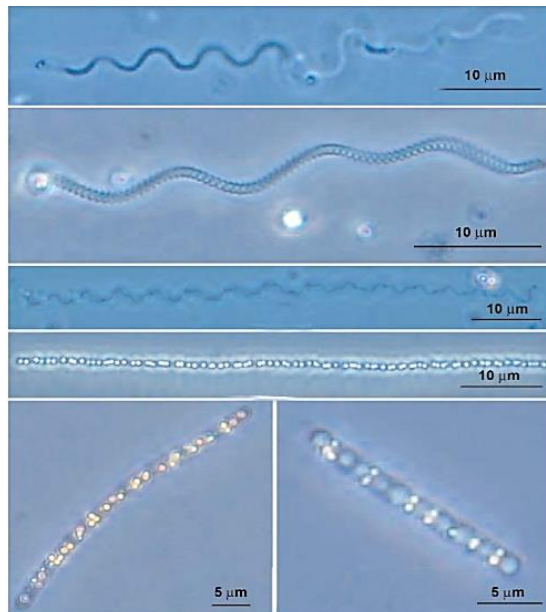


Figura 3. Diversos morfotipos de "macrobacterias"* que habitan en el SH. Distinguidas en la clave morfológica de la Fig. 1 (Gallardo & Espinoza, 2007b). (*Término utilizado para diferenciarlas de las “megabacterias”, *i.e.*, *Thioploca*, *Beggiatoa*).

1.4. Rol ecológico.

El rol de las macrobacterias, es fundamental, pues el metabolismo de éstas implica la oxidación de compuestos tóxicos, como el H₂S (Dr. V. A. Gallardo, com. pers., enero 2026).

El estudio de su morfología y metabolismo, ofrece las bases para entender cómo podría manifestarse la vida en otros cuerpos planetarios con condiciones fisicoquímicas similares a las de la Tierra primitiva, donde no había oxígeno y predominaba el sulfuro de hidrógeno (H₂S). Dichas condiciones encuentran hoy su representación más cercana en los ambientes anaeróbicos, específicamente en los denominados “sulfuretos”. Convirtiendo a estas bacterias, en un objetivo de estudio clave para tratar de comprender la evolución de la vida en el Universo (Gallardo & Espinoza, 2007a).

Poco se sabe aún del metabolismo de las macrobacterias (más allá de las características generales) y cómo éste influye en la ecología del ambiente. Sin embargo, gracias a recientes investigaciones se ha llegado a concluir que algunas de estas “macrobacterias” y “megabacterias”, poseen un modo mixotrófico de vida, obteniendo energía, tanto de fuentes de C inorgánico como orgánico. Además, la mayoría demostró la capacidad de crecer quimio-lito-autotróficamente, utilizando H₂ y CO₂ (Fonseca *et al.*, 2025). Es posible, por lo tanto, deducir que al poseer estas bacterias un modo mixotrófico de vida, actúan como un puente entre diferentes ciclos del carbono.

Así mismo, su capacidad para desarrollarse utilizando H₂ y/o H₂S, y CO₂ sería fundamental para la vida aeróbica de ecosistemas afóticos profundos, donde fijen el C inorgánico en biomasa orgánica, la que luego puede ser consumida por otros organismos. Además, al utilizar estos compuestos como fuente de energía y fuente de C, estas bacterias intervienen directamente en la regulación de gases de efecto invernadero y en el ciclo del hidrógeno del ambiente (sedimento o agua), en el que se encuentren (Jørgensen, 2006; Teske & Salman, 2014).

Por ello, este tipo de metabolismo sugiere que estas bacterias están adaptadas a interfaces biogeoquímicas donde coexisten donadores de electrones inorgánicos y materia orgánica, permitiéndoles colonizar nichos ecológicos que serían restringidos para organismos con metabolismos más generalistas (Schulz & Jørgensen, 2001).

En resumen, podrían actuar como agentes estabilizadores del ecosistema, capaces de mantener la productividad biológica independiente de si la “fuente de alimento” predominante, es orgánica o inorgánica. Sin embargo, gracias al trabajo del Dr. V. A. Gallardo y colaboradores, aspectos de este ampliado rol ecológico y fisiológico se han demostrado mayoritariamente para las “megabacterias”, en particular para *Thioploca* spp. (Fig. 4), mientras que para las macrobacterias aún faltan esfuerzos investigativos.

En cuanto a las “megabacteria”, se sabe que éstas poseen una gran vacuola intracelular que funciona como un reservorio de nitrato altamente concentrado (160-500 mM), por lo que el nitrato puede ser utilizado por las bacterias sulfuro-oxidantes como su único aceptor de electrones, o como una fuente alternativa, y, que la acumulación de nitrato en altas concentraciones permite a bacterias como *Thioploca* spp. transportar el nitrato como un aceptor de electrones hacia el interior del sedimento hasta encontrar H₂S, el dador de electrones (Gallardo *et al.*, 2013).

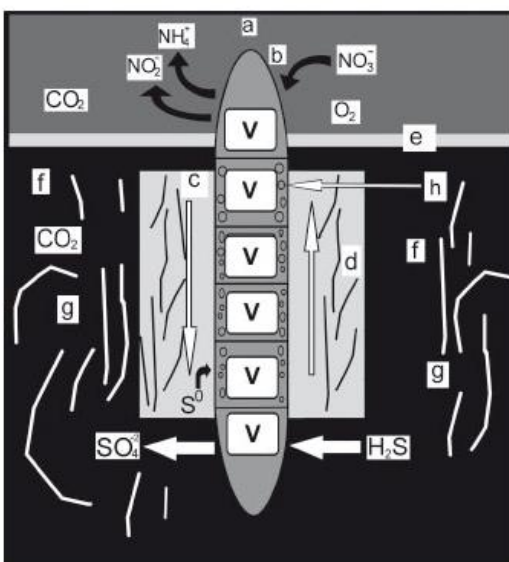


Figura 4. Diagrama que muestra la eco-fisiología de *Candidatus Marithioploca* (Gallardo *et al.* 2013) : (a) Agua de fondo con bajo contenido de oxígeno disuelto, normalmente $<0.5 \text{ mL L}^{-1}$ pero alto en nitrato ($\sim 10\text{-}38 \mu\text{M L}^{-1}$); (b) tricoma dentro de (c) vaina gelatinosa; (V) vacuola conteniendo nitrato en concentraciones de alrededor de 20,000 veces el nivel ambiental (160-500 mM); (d) epibiontes en vaina; (e) sedimento superficial ligeramente oxidado; (f) sedimento anóxico; (g) macrobacterias del sedimento circundante. Se muestran los productos del metabolismo, *i.e.*, el amonio y el nitrito resultante de la reducción del nitrato; el sulfato y el azufre elemental (glóbulos S_0) resultantes de la oxidación del sulfuro de hidrógeno.

1.5. Antecedentes de macrobacterias filamentosas en ambientes marinos y dulceacuícolas.

Si bien la presencia de estas bacterias en fondos marinos reducidos ricos en H_2S , los cuerpos de aguas continentales no salinos recién se comienzan a explorar con lo que los nuevos hallazgos sugieren que la distribución de estos microorganismos no está limitada por la salinidad, sino por la existencia de gradientes redox específicos: aguas deficientes en oxígeno suprayacentes a sedimentos reducidos (Gallardo & Espinoza, 2007b). Por ejemplo, se han descubierto este tipo de bacterias habitando en lagunas hipersalinas e incluso en el Salar de Atacama, sin embargo este hallazgo está en proceso de publicación (Dr. V. A. Gallardo, com. pers., enero 2026).

En años recientes, se ha reportado una novedosa morfología de macrobacterias, las "bacterias cable" (finos filamentos multicelulares conductores de electrones cuyos diámetros varían generalmente entre 0,4 y 0,7 micrones) (Nielsen, L.P *et al.*, 2010; Pfeffer *et al.*, 2012).

Estas morfologías, si bien observadas previamente, incluso por los micropaleontólogos (Schopf, 1992) fueron originalmente reconocidas como "cables eléctricos" en sedimentos marinos, por el Dr. Lars Peter Nielsen, académico de la Universidad de Aarhus y colaboradores (Pfeffer *et al.*, 2012).

Hasta la fecha, se han encontrado además en sedimentos químicamente reducidos de agua dulce, manglares, y estuarios alrededor del mundo confirmando que la morfología filamentosa es una estrategia exitosa en diversos ambientes sedimentarios (Dong *et al.*, 2024).

Según la clave morfológica de Gallado & Espinoza (2007b), estas "bacterias cable" se podrían considerar como parte del morfotipo cilíndrico con septos no visibles y sin accesorio apical.

Las "bacterias cable" pertenecen a la familia de las Desulfobulbaceae. Son macrobacterias filamentosas multicelulares (Fig. 5), anaeróbicas facultativas que presentan un transporte electrónico de largo alcance (varios cm) debido a que poseen una red de fibras incrustadas en su envoltura celular que generan y transmiten corriente eléctrica. Se encuentran en sedimentos acuáticos ricos en sulfuros, tanto marinos como de agua dulce y en zonas de mínimo oxígeno (OMZ).

Han sido detectadas en ambientes templados, tropicales y polares. Requieren gradientes redox bien definidos y suelen colonizar la zona intermedia entre sedimentos anóxicos y la interfase oxigenada (Dong *et al.*, 2024).

En resumen, son el único grupo morfológico perteneciente a las macrobacterias que han sido ampliamente estudiadas en el mundo a pesar de que tan solo ha pasado poco más de una década desde su descubrimiento.

Así mismo, se cree que otros tipos de bacterias pertenecientes a las macrobacterias, podrían hallarse en cualquier cuerpo de agua que cumpla las condiciones necesarias como bajo nivel de oxígeno disuelto y la presencia de H₂S (Gallardo & Espinoza, 2007b), así como ha sido lo observado con las bacterias cable (aun no descritas en Chile).

En el contexto local, esta visión se ha visto reforzada por el reciente artículo de Durán-Garcés *et al.* (2025), quienes documentaron el primer registro de bacterias bentónicas filamentosas multicelulares en lagunas de agua dulce en Chile central, específicamente en “Laguna Chica” (36°50'40"S 73°05'15"W) y “Laguna Grande” (36°50'51"S y 73°06'36"W) (“lagunas Metropolitanas”), de la Comuna de San Pedro de la Paz (Región del Biobío). Este descubrimiento afectó el paradigma de la exclusividad marina, y plantea el problema de determinar qué tan extendidas están estas comunidades en los sistemas lacustres urbanos y periurbanos.

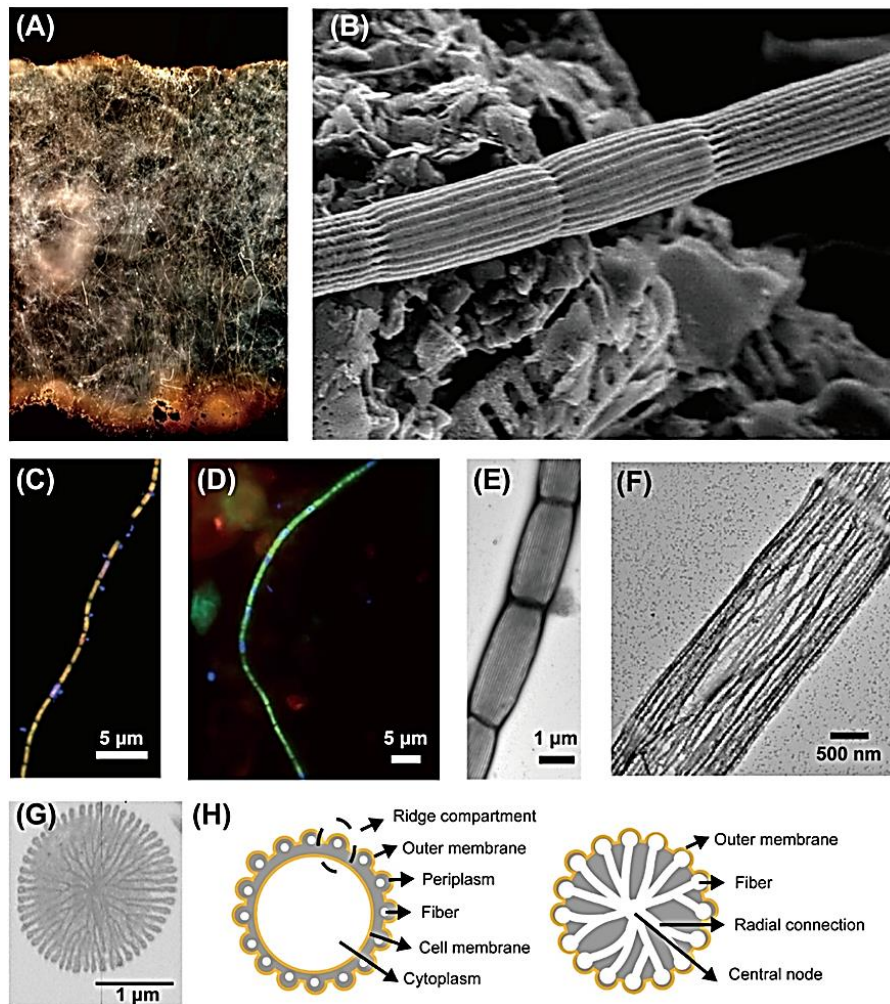


Figura 5. Morfología de las bacterias cable (Xiong *et al.*, 2024): (A) Los filamentos de bacterias cable están dispuestos a lo largo de un gradiente de sulfuro-oxígeno (Pennisi, 2020). (B) SEM de células de bacterias cable (Teske, 2019). (C) y (D) Desulfobulbaceae filamentosas identificadas por hibridación in situ de fluorescencia dirigida al ARNr 16S (sonda DSB706 y ELF654) (Pfeffer *et al.*, 2012). Las imágenes TEM muestran: (E) filamento de bacteria cable (Trojan *et al.*, 2016), (F) la estructura de la vaina de la fibra después de la eliminación del citoplasma y las membranas, y (G) la estructura de rueda de carro en la unión célula-célula (Cornelissen *et al.*, 2018). (H) Diagrama esquemático de la sección transversal de una célula de bacteria cable y en una unión, respectivamente (Cornelissen *et al.*, 2018).

1.6. Área de estudio: Humedal Laguna Verde.

Para abordar esta problemática, se seleccionó un cuerpo de agua del Área Metropolitana del Gran Concepción (AMGC) en la Región del Biobío, el Humedal Laguna Verde. Ya que no hay mucha información respecto a este humedal debido a la poca investigación y menos aún respecto a las bacterias, se consideran los siguientes aspectos generales como una descripción del área:

Humedal Laguna Verde (Hualpén: 36°47'46.5"S, 73°09'32.9"W):

Está ubicada en el interior del Parque Botánico de Hualpén, perteneciente a la Universidad de Concepción en la Península de Hualpén (36° 47'S, 73°09'W) y a unos 900 metros de la desembocadura del Río Bío-Bío en el Océano Pacífico (Rivera, 1974). Este cuerpo de agua es parte de un sistema de humedales costeros de gran importancia ecológica, se encuentra rodeado por un bosque esclerófilo costero de carácter relictual; es altamente productivo; alberga abundante fauna i.e., aves, insectos, peces, anfibios y mamíferos. De hecho, Laguna Verde es una de las zonas que alberga más diversidad de aves en cuanto a riqueza específica dentro del Área Metropolitana del Gran Concepción (AMGC) (Valdovinos, 2006). Así mismo, el área del humedal está dominada por pajonales de juncos pertenecientes a especies de las familias Juncaceae (e.g. *Juncus procerus*) y Cyperaceae (e.g. *Cyperus* spp y *Carex* spp), las cuales se distribuyen a modo de parches (Francois *et al.*, 2024).

Su origen geológico se remonta al Holoceno, asociado a la evolución de campos dunarios y variaciones del nivel del mar que modelaron la costa hace miles de años, creando barreras naturales que permitieron la acumulación de agua dulce (Francois *et al.*, 2024). La laguna se formó hace aprox. 4.000 años, mientras que el sector del humedal hace ~6.800 años (Francois *et al.*, 2024). Actualmente, es un ecosistema somero y eutrófico, vital para la biodiversidad local (Valdovinos, 2006). Sus sedimentos, ricos en materia orgánica producto de la vegetación ribereña y la productividad microalgal, generan condiciones de anoxia basal (Fuentes, 2015), condiciones que podrían ser favorables para el desarrollo de bacterias del ciclo del azufre. Sus

dimensiones varían según estación, llegando a medir hasta 400m de largo por 120m de ancho en las épocas de lluvia (Rivera, 1974), donde el agua llega hasta la zona del humedal, mientras que, para las épocas de verano, se reduce considerablemente de tamaño alcanzando una longitud de 290 m por 85 m de ancho. Así mismo, su profundidad máxima durante todo el año no supera más de los 3 m (Baeza *et al.*, 2023).

1.7. Justificación y Planteamiento del Problema.

La investigación de la microbiota bentónica en este sistema ha sido escasa. Si bien se conocen aspectos de su flora (Baeza *et al.*, 2023) y fauna de invertebrados (Fuentes, 2015), no existe ningún registro detallado de bacterias ni mucho menos macrobacterias filamentosas.

El problema de investigación radica en verificar si los sedimentos de esta laguna actúan como reservorios de una diversidad microbiana morfológicamente análoga a la del Sulfureto de Humboldt, es decir, las macrobacterias. Por tanto, la justificación de este estudio es doble. Primero, desde una perspectiva taxonómica y ecológica, valida el uso de la morfología bacteriana como una herramienta de identificación rápida y de bajo costo, crucial antes de implementar análisis genómicos complejos (Fonseca *et al.*, 2025). Segundo, el presente trabajo se convertiría en el segundo registro que confirma la presencia de estos morfotipos en agua dulce y el primero en registrar los morfotipos de un humedal inserto en la naturaleza (Humedal Laguna Verde). Esto apoyaría la hipótesis de que estas macrobacterias se podrían encontrar en cualquier lugar con aguas deficientes en oxígeno y sedimentos reducidos (sulfhídricos) presente (Gallardo & Espinoza, 2007b). En base a lo expuesto, se presentan las siguientes hipótesis y objetivos:

2. HIPÓTESIS

Hipótesis Nula (H0):

Los sedimentos anóxicos, reducidos (con bajo potencial redox) y ricos en materia orgánica del Humedal Laguna Verde (Hualpén), albergan bacterias filamentosas multicelulares morfológicamente similares a las descritas en comunidades bentónicas marinas, como el Sulfureto de Humboldt.

Hipótesis Alternativa (HA):

Los sedimentos anóxicos, reducidos (con bajo potencial redox) y ricos en materia orgánica del Humedal Laguna Verde (Hualpén), no albergan bacterias filamentosas multicelulares, o bien, las bacterias presentes no son morfológicamente similares a las bacterias filamentosas multicelulares descritas en comunidades bentónicas marinas, como el Sulfureto de Humboldt.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general.

Investigar la presencia y características morfológicas de las bacterias filamentosas multicelulares del Humedal Laguna Verde (Hualpén), comparando su similitud con morfotipos marinos.

3.2. Objetivos específicos.

1. Clasificar morfotipos de bacterias filamentosas multicelulares presentes en el sedimento lacustre de Humedal Laguna Verde (Hualpén).
2. Comparar los morfotipos encontrados con registros marinos previamente publicados.

4. METODOLOGÍA

4.1 Área de estudio

El área de muestreo del presente estudio se llevó a cabo en un ecosistema lacustre presente en el Área Metropolitana del Gran Concepción, VIII Región, Chile (Fig. 6). Específicamente en el Humedal Laguna Verde ($36^{\circ}47'46.5''\text{S}$, $73^{\circ}09'32.9''\text{W}$), ubicado en la zona costera de la comuna de Hualpén cercano a la desembocadura del río Biobío inmerso en el interior del Parque Botánico de Hualpén, perteneciente a la Universidad de Concepción. Una reserva natural alejada del núcleo urbano. El Humedal Laguna Verde es un cuerpo de agua superficial lacustre perteneciente a la Laguna Verde, cuya área está rodeada de un bosque nativo. Se caracteriza por componer el único humedal alejado de las zonas urbanas tanto de Talcahuano como de Concepción. Su singularidad radica en que durante las temporadas de lluvias se inunda el área del humedal y en temporadas de sequías se reduce drásticamente el nivel de agua del humedal a tal punto que prácticamente solo queda con agua la zona de la laguna.

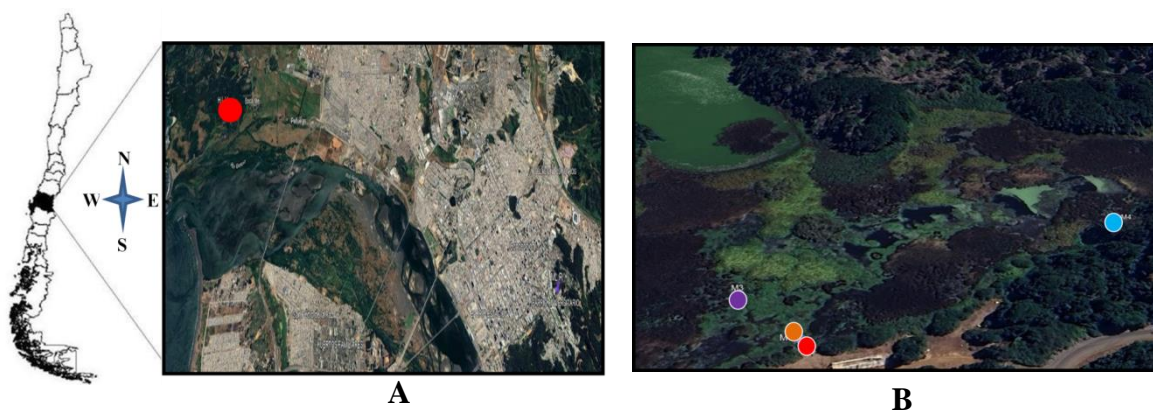


Figura 6. Ubicación del área y los puntos de muestreos: Donde **A** corresponde a la ubicación general del área de estudio dentro del Gran Concepción; mientras que **B** a la ubicación específica con sus puntos de muestreo. (Fuente: Editado de Díaz, 2018, utilizando el programa Google Earth Pro).

4.2. Toma de muestras

4.2.1. Toma de muestras en terreno

El estudio se dividió en dos campañas de muestreo en el área del Humedal Laguna Verde durante el segundo semestre de 2025 (Tabla 1).

TABLA 1. Registros de fechas y puntos de muestreo del lugar de estudio. (Fuente: elaboración propia).

Fecha de muestreo	Lugar	Punto de muestreo	Coordenadas
2025_10_06, 2025_11_12	Humedal Laguna Verde (L.V)	M1	36°47'50.0"S, 73°09'29.9"W
2025_10_06	Humedal Laguna Verde (L.V)	M2	36°47'50.0"S, 73°09'30.0"W
2025_10_06, 2025_11_12	Humedal Laguna Verde (L.V)	M3	36°47'48.8"S, 73°09'31.4"W
2025_11_12	Humedal Laguna Verde (L.V)	M2	36°47'49.9"S, 73°09'30.0"W
2025_11_12	Humedal Laguna Verde (L.V)	M4	36°47'46.3"S, 73°09'23.0"W

Se realizó el primer muestreo en el marco del término de la temporada de lluvias, el 6 de octubre de 2025. Donde, se recolectaron muestras de sedimento con agua de fondo en tres puntos seguidos consecutivamente del humedal (Fig.7), la primera muestra se obtuvo directamente con tubos de policarbonato (estériles) de 20 cm de longitud por 3 cm de ancho aperados con tapones de goma, la muestra se tomó a mano utilizando el tubo, en la orilla del humedal frente a la estación de biología terrestre (M1: 36°47'50.0"S, 73°09'29.9"W).

El segundo punto de muestreo se localizó, aproximadamente a cuatro (4) m de la orilla (M2: 36°47'50.0"S, 73°09'30.0"W) y el tercer punto de muestreo en la zona de los pajonales de juncos cerca de 50 m de la orilla (M3: 36°47'48.8"S, 73°09'31.4"W). En el segundo y tercer punto de muestreo, la recolección se realizó en tubos de policarbonato de 4.5 cm de diámetro por 60 cm a ~1 metro de largo, los que posteriormente fueron submuestreados en los tubos pequeños de 20 cm de policarbonato. Para dicho submuestreo se utilizó un extrusor de tubos para submuestreo, herramienta que permite transferir el sedimento de los tubos de mayor tamaño a uno más pequeño (Fig. 9).

Cada muestra se tomó con sumo cuidado procurando tomar una cantidad adecuada de sedimento (al menos 10cm). Finalmente se realizó una caracterización organoléptica *in situ* de los sedimentos, en la que se registró cualitativamente la coloración mediante inspección visual, la textura mediante tacto y el olor para detectar la posible presencia de compuestos sulfurosos indicativos de procesos de reducción, como H₂S, el cual tiene el característico olor a “huevo podrido”. Los tubos ya con muestras se guardaron en un “cooler” hermético para conservar su temperatura y fueron transportados al Laboratorio de Bentos y Exobiología (LBE) de la Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas de la Universidad de Concepción, para su posterior análisis.



Figura 7. Vista general de Humedal Laguna Verde, la vegetación que la rodea y los puntos de muestreo M1, M2 y M3 del mes de octubre. (Fuente: captura propia).



Figura 8. Vista aérea del Humedal Laguna Verde. Donde **A** muestra una panorámica general del recorrido de la orilla (M1) a M3; **B** muestra el área de M2 y **C** corresponde al punto de muestreo M3. Las fotografías fueron una gentileza del Dr. Ciro Oyarzún, docente del Departamento de Oceanografía de la Universidad de Concepción



Figura 9. Método de submuestreo (**A**), de tubos grandes (**C**) a tubos pequeños (**B**) (20cm) de policarbonato utilizando un extrusor de tubos (el tubo celeste de PVC). (Fuente: captura propia).

La campaña de muestreo final en el Humedal Laguna Verde (Fig. 10), se realizó al comienzo de la estación seca, el 12 de noviembre de 2025. En dicha ocasión se tomaron las muestras M1, M2 y M3 en los mismos puntos previamente mencionados (Tabla 1), sin embargo, esta vez se recolectaron todas estas muestras directamente con los tubos de 20 cm de largo por 3 cm de ancho, además de que M2 ($36^{\circ}47'49.9''\text{S}$, $73^{\circ}09'30.0''\text{W}$), se recolectó ~3 m más lejos del punto de muestreo designado para M2 en el muestreo anterior y a 7 m de la orilla. Asimismo, esta vez se muestreó en un cuarto punto, correspondiente a M4 ($36^{\circ}47'46.3''\text{S}$, $73^{\circ}09'23.0''\text{W}$) (Fig. 11), muestra que fue recolectada a aproximadamente 200 m al Este del primer punto de muestreo (M1), en una zona cercana al final del cercado del predio.

Para M4 se tomaron dos muestras, una tomada directamente con un tubo pequeño de policarbonato, de 20 cm longitud (M_4) y una recolectada con un tubo de policarbonato de aproximadamente 60 cm de largo de la cual luego se traspasó la muestra a un tubo pequeño de 20 cm (M_4). Durante el muestreo, se realizó *in situ* una caracterización de los datos organolépticos (método ya descrito con anterioridad), además de una medición, también *in situ* de las características fisicoquímicas del primer centímetro de agua para M1, M2 y M3, mientras que para M4 se realizó más tarde en el laboratorio, destacando que para la medición de estas características fisicoquímicas se utilizaron diferentes instrumentos portátiles descritos en la sección 4.3.3 del presente documento.

Ya con todas las muestras recolectadas, se transportaron cuidadosamente en un *cooler* hermético hasta el LBE de la Universidad de Concepción. Cada tubo de muestra de 20 cm en cada muestreo, fue rotulado y registrado, con una codificación exacta para cada uno, que contenía la fecha del muestreo, el lugar y el número de muestra.

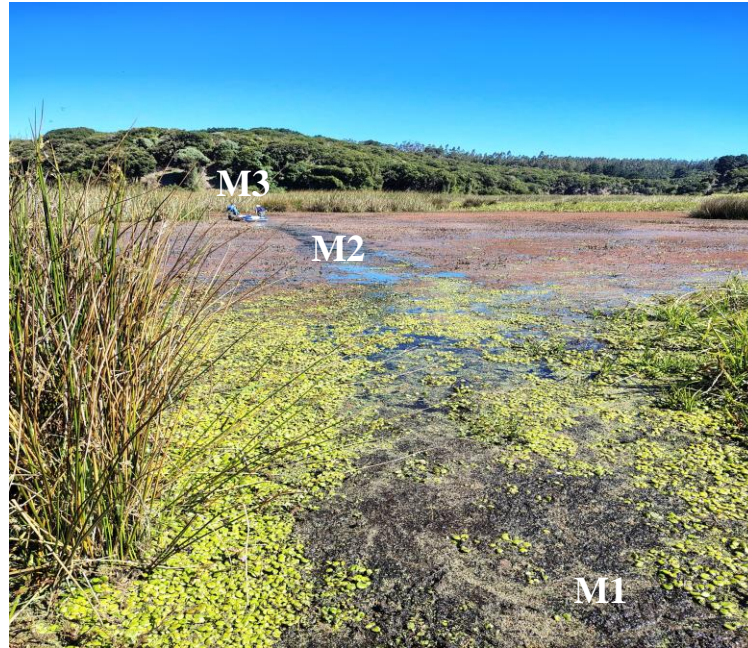


Figura 10. Vista general del Humedal Laguna Verde con los puntos de muestreo M1, M2 y M3 durante el mes de noviembre. (Fuente: captura propia)



Figura 11. Vista general del Humedal Laguna Verde con el punto de muestreo M4 durante el mes de noviembre. (Fuente: captura propia)

4.2.2. Preparación de muestras en el laboratorio.

Una vez en las dependencias del LBE de la Universidad de Concepción, se realizó un submuestreo a cada muestra recolectada en terreno, para la preparación de muestras correspondientes a cada análisis respectivo. Destacar que para la obtención de muestras de M4 (recolectadas en noviembre) para Microscopía electrónica de barrido (SEM), solo se submuestreó el tubo M₄, es decir, la muestra que se obtuvo muestreando directamente con el tubo de 20cm; mientras que para Microscopía de contraste de fases (PCM) se tomó sedimento en ambas muestras de M4, en la del muestreo directo y en la muestra submuestreada.

4.2.2.a. Preparación de muestras para SEM.

En cuanto al procedimiento de las muestras destinadas al análisis de SEM, se rotularon tubos Eppendorf de 2 mL con una codificación que incluía el número de la muestra, el análisis, la fecha y el lugar de muestreo. También, se rotularon pipetas Pasteur de 3 mL a utilizar. Luego se tomaron alícuotas de ~1,5 mL de sedimento con agua de fondo dentro de los primeros 5 cm de cada tubo contenedor de muestra apoyándose en pipetas de 3 mL. Estas alícuotas fueron trasladadas hasta los tubos de 2 mL correspondientes según la muestra, donde posteriormente se rellenó cada tubo con un fijador denominado “Karnovsky” compuesto por paraformaldehído al 2% y glutaraldehído al 2,5%. Luego se trasladaron estas muestras al Centro de Espectroscopia y Microscopía de la Universidad de Concepción para su posterior análisis en microscopía electrónica de barrido (SEM). Este procedimiento se realizó en el laboratorio luego de cada muestreo y para cada muestra.

4.2.2.b. Preparación de muestras para PCM

Finalmente, para la preparación de muestras para PCM, se inició rotulando tubos Falcón de 15 mL con una codificación con número de muestra (M1, M2, M3, M4, M. LP), fecha de muestreo y lugar de muestreo. Asimismo, se rotularon las pipetas Pasteur de 3 mL para utilizar en cada muestra. Luego se llenaron estos tubos con muestras de

sedimento y agua de fondo tomadas con las pipetas de cada muestra correspondiente (de los tubos de 20 cm) dentro de los primeros 5 cm de sedimento y se guardaron en un *cooler* de tamaño pequeño para que no hubiera cambios drásticos en su temperatura y, para posteriormente realizar el conteo y análisis morfológico a través de PCM. Este procedimiento se realizó en laboratorio luego de cada muestreo y para cada muestra, con excepción de que para las muestras de noviembre se utilizaron tubos Eppendorf de 2 mL en vez de los tubos Falcón de 15 mL.

4.3. Análisis

4.3.1. Análisis morfológico

El análisis morfológico se realizó en las dependencias del Laboratorio de Bentos y Exobiología, donde se desarrolló bajo un enfoque mixto, es decir, cuantitativo, basado en el recuento y el análisis estadístico, y cualitativo, mediante microscopía electrónica de barrido (SEM). Destacar que las microfotografías obtenidas por ambos métodos se compararon con morfotipos marinos publicados con anterioridad y con los hallazgos de Durán *et al.*, 2025, para determinar su similitud.

Microscopía de Contraste de Fase (PCM)

Para el análisis de microscopía de contraste de fase se tomó una alícuota de 45µL de sedimento con agua de fondo, la cual es colocada sobre un portaobjetos de 7,5 cm de largo por 2,5 cm de ancho, y cubierta por cubreobjetos de 5 cm de largo por 2,4 cm de ancho para su posterior observación en microscopio Zeiss Axio (Lab.A1) de contraste de fase usando como objetivo 40x (Fig. 12). En seguida, con ayuda de una planilla de conteo donde se iba dejando su registro, se realizó el conteo de cada filamento por morfotipo *in vivo*. Simultáneamente, se tomaban microfotografías de los morfotipos más relevantes. Cada imagen fue tomada por una cámara Canon DS126291 montada sobre el mismo microscopio y mediante el programa Eos Utility. Para medir la escala de

cada morfotipo se utilizó el software AxioVision L. E64 versión 4.9.1 Cabe destacar que cada conteo se realizó por triplicado para cada muestra.

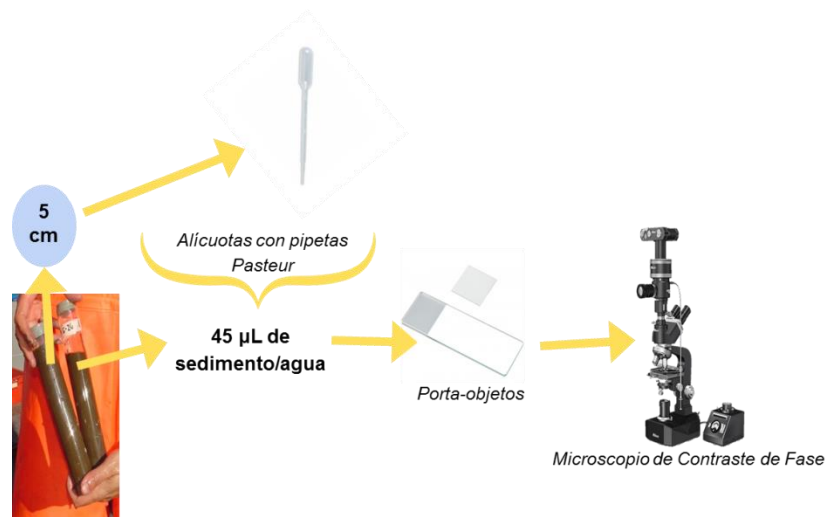


Figura 12. Esquema general de Análisis de PCM (Fuente: creación propia).

Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)

El protocolo de preparación y análisis para SEM se realizó en el Centro de Espectroscopía y Microscopía de la Universidad de Concepción y estuvo a cargo del personal especializado (mencionados en agradecimientos), donde se parte con la fijación y deshidratación química, donde se estabiliza la estructura con glutaraldehído y se elimina el agua mediante una escala gradual de alcohol (30% al 90%, 10 minutos por etapa) finalizando con tres cambios de alcohol al 100%. Posteriormente, se realiza el secado de punto crítico mediante un equipo secador de punto crítico Quorum K850, intercambiando el solvente por CO₂ líquido mediante 4 o 5 mezclas a menos de 4°C, para luego elevar la temperatura a 31°C y permitir que el gas se libere lentamente sin dañar la muestra. El método de “punto crítico” utiliza el fenómeno en el que el límite de cambio del estado líquido a gaseoso desaparece cuando se alcanza la presión y temperatura crítica más allá del punto crítico, es decir las

densidades entre el líquido y el gas son iguales (esto significa que el límite entre el líquido y el gas desaparece). Finalmente, utilizando este método de sacado, se obtienen muestras totalmente secas y fijas que no se deforman, gracias a que el método permite reemplazar el agua por alcohol y al ser desplazado este último por medio de un gas, se mantiene la forma de la muestra, además de que el fijador previo también ayuda a mantener la estructuras internas.

Luego viene una fase de montaje y conductividad, donde la muestra se adhiere con cinta de carbono y se somete a un proceso de metalizado (*sputtering*) con plasma de Argón y oro puro de 24 quilates para crear una capa conductora en un equipo recubridor por pulverización catódica (módulo “Sputter Coater” de la marca SPI Supplies). Finalmente, en la observación y análisis, la muestra se introduce en un microscopio electrónico de barrido Zeiss GeminiSEM 360 para ajustar el haz de electrones, capturar microfotografías morfológicas y, de ser necesario, realizar un análisis elemental para detectar componentes específicos (Fig. 13).

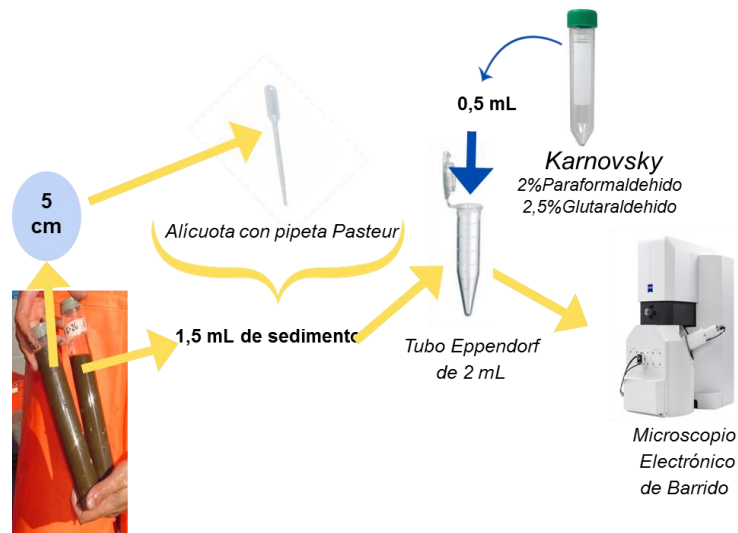


Figura 13. Esquema general de Análisis de SEM (Fuente: creación propia).

4.3.2 Análisis fisicoquímico

Caracterización del sedimento

La caracterización organoléptica se realizó tanto *in situ* como en laboratorio, donde se documentaron principalmente el olor, el color y la textura de cada muestra.

VARIABLES FISICOQUÍMICAS DEL SEDIMENTO Y EL AGUA

Las variables tanto de sedimento como de agua se tomaron utilizando dos instrumentos portátiles, un medidor multiparámetro 4 en 1, marca BLE-9908 para medir pH y T° y un medidor de la marca ORP-969 para medir el Potencial Redox. Para el agua se tomaron dentro del primer cm de agua de las muestras recolectadas solo en noviembre, mientras que para sedimento se midieron en todas las muestras (octubre y noviembre) en los primeros tres (3) centímetros de profundidad del sedimento.

Porosidad y Materia Orgánica Total (MOT)

Para la determinación de Porosidad y MOT se basó en la pérdida de peso después de la ignición en un horno siguiendo el procedimiento de Postman (1954). Es decir, determinación mediante secado (evaporación de agua), donde, se partió con el procedimiento de Porosidad. Para ello se cortaron trozos de papel aluminio de *ca.* 20x20 cm, los que se rotularon con la codificación exacta para cada muestra. En seguida se pesaron en la balanza analítica (Precisa XB-320M). Una vez identificados y pesados los papeles, se prosiguió a cortar el sedimento de los primeros 3 centímetros de este. Luego se pesó el papel con el sedimento y se llevaron al horno de secado (Mettler LM-III-01) a 60°C por 24 horas (proceso de secado). Después de las 24 horas se retiraron las muestras del horno y se volvieron a pesar, cada dato pesado se iba anotando en la planilla de porosidad y a partir de estos datos posteriormente se calculó el porcentaje de porosidad, para ello se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{Fórmula de Porosidad } (\phi): = \left(\frac{\frac{W_w}{pw}}{\frac{W_w}{pw} + \frac{W_s}{ps}} \right) \times 100\%$$

Dónde:

- **Ww:** Peso (masa) del agua en la muestra.
- **Ws:** Peso (masa) del sedimento seco (sólido).
- **pw:** Densidad del agua (1,000 g/cm³), o sea (1g/cm³).
- **ps:** Densidad del sólido (2,65 g/cm³).

En cuanto, el procedimiento para la Materia Orgánica Total (MOT), el análisis se realizó por calcinación o pérdida de peso por ignición (a altas temperaturas). Para ello, primeramente se realizaron crisoles con papel aluminio y se rotularon con un número específico por muestra. Se utilizaron las mismas muestras secas previamente utilizadas para el análisis de porosidad. Luego se molieron las muestras con ayuda de un mortero y se fueron traspasando a su crisol correspondiente (previamente pesado), se volvieron a pesar los crisoles pero ya con las muestras molidas dentro y se llevaron a la mufla (Dinko, Electric Furnace HM-9) por 5 horas (precalentada por minutos a 450°C). Finalmente se pesaron las cenizas de las muestras calcinadas y se calculó el porcentaje de MOT en los sedimentos a partir de los datos (pesos) que se fueron registrando en la planilla de MOT y utilizando la siguiente formula obtenida por diferencias de pesos:

$$\text{Fórmula de \%MOT: } \% \text{MOT} = \left(\frac{W_s - W_c}{W_s} \right) \times 100\%$$

Dónde:

- **Ws:** Peso del sedimento seco.
- **Wc:** Peso del sedimento calcinado.

Cabe destacar que se siguió el mismo procedimiento de MOT y Porosidad tanto para las muestras de octubre como las de noviembre.

4.3.3. Análisis estadístico de los datos

Los análisis de diversidad, abundancia y riqueza morfológica se realizaron a partir de los datos obtenidos en el conteo de morfotipos (Anexo 1 y 2), es decir los datos crudos, utilizando las herramientas del programa Microsoft Excel para Windows y el programa RStudio. Cabe destacar que para los cálculos de densidad (abundancia formal) se dividieron la cantidad de morfotipos en cuestión (dependiendo de la muestra) por el área total donde se observaron, en este caso, sería el volumen contenido dentro de los portaobjetos, que serían 45 μL , es decir, los datos para abundancia formal se dividieron por 0,045 mL.

4.3.4. Análisis Comparativo

Finalmente se realizó una comparación morfológica de los morfotipos registrados en Humedal Laguna Verde (Hualpén) con morfotipos marinos registrados de publicaciones previas (Fig.20), y con los resultados de Durán *et al.*, 2025 (Fig.18), para observar similitud entre los morfotipos. Para la comparación con Durán y colaboradores, se contrastaron las fotografías del presente estudio con los morfotipos registrados en dicho artículo. Mientras que para el contraste con morfotipos marinos, se utilizaron los registros publicados, comparando la morfología del humedal con estos (Gallardo & Espinoza, 2007b; Gallardo *et al.*, 2013).

5. RESULTADOS

5.1. Análisis morfológico

5.1.1. Microscopía de Contraste de Fase (PCM)

Las observaciones realizadas a todas las muestras obtenidas, al microscopio, arrojaron un total de seis morfotipos para el Humedal Laguna Verde (L.V). Como se mencionó anteriormente, para identificar a los diversos morfotipos se utilizó la Clave Morfológica de Gallardo & Espinoza (2007b), además de respaldar la elección con una colección de fotografías impresas de morfotipos entregada por cortesía de la M. Sc. Carola Espinoza.

Los nombres designados se abreviaron como códigos siguiendo la tabla (clave morfológica), y se eligieron para un mayor dinamismo a la hora de los análisis estadísticos, ya que facilita el análisis. Sin embargo no se debe olvidar a qué tipo de morfotipo representan, por ello, la importancia de la aclaración en la Fig. 14. Donde, los morfotipos registrados en L.V corresponden a los siguientes:

- Morfotipos encontrados en Laguna Verde.**
- B.I.i.1: Con accesorio apical
 - B.I.i.2: Sin accesorio apical
 - B.I.ii.3.b: Suavemente espiralada
 - B.II.iii.4.c: Con gránulos (simples)
 - B.II.iv.7: Con contricciones celulares
 - B.II.iv.8: Paredes celulares rectas.

Figura 14. Clasificación de morfotipos encontrados en L.V según la Clave Taxonómica de Gallardo & Espinoza (2007b).

Los principales morfotipos encontrados en el presente estudio en el sector Humedal Laguna Verde, corresponden a los siguientes morfotipos descritos según la clave taxonómica de Gallardo & Espinoza (2007b): el morfotipo más visto fue el “B.I.i.2.” cilíndrica, con septos no visibles, recta y sin accesorio apical, como los filamentos **A**, **D** y **P**; Al morfotipo “B.I.ii.3.b” (espiralada) como el filamento **O**; Al morfotipo “B.II.iii.4.c”, con gránulos y no vacuoladas, como los filamentos **B**, **C**, **J**, **Q**, entre otros; Y al morfotipo “B.II.iv.7”, con contricciones celulares (cilíndrica, septos visibles), como los filamentos **F**, **K**, **L**, **N**, entre otros (Fig. 15).

Como bien se puede observar, la diversidad de morfotipos y filamentos fue bastante significativa, ya que se encontraron filamentos hasta 0,29 μm de diámetro (Fig. 15, filamento P). Además, de cada morfotipo se encontraron filamentos de diferente longitud de un mismo tipo, llegando a encontrarse morfotipos con una longitud mayor a 100 micrones (Fig. 15, filamento R), asumiendo que había organismos que representaban diferentes etapas de su ciclo de vida, es decir, algunos (los más pequeños) deben haber pasado recientemente por la división del filamento “madre”.

Además, la mayoría de los filamentos de un mismo tipo no variaban tanto de tamaño en cuanto al diámetro, sino más bien en longitud es donde había una mayor diferencia, reafirmando que el diámetro de un filamento no depende de la longitud.

Así mismo, los morfotipos registrados tanto en octubre (Fig.15) como en noviembre (Fig.16) en Humedal Laguna Verde fueron los mismos.

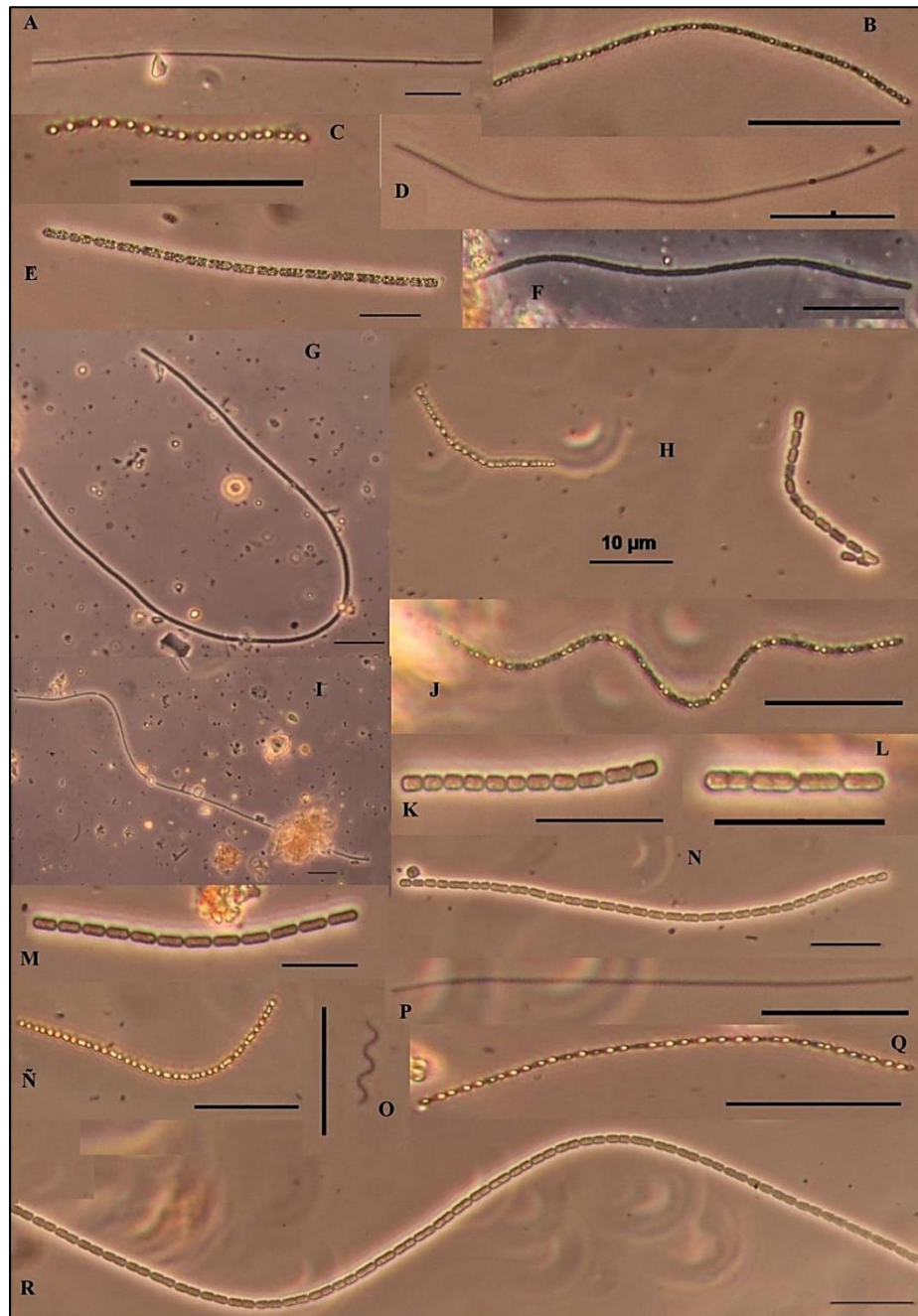


Figura 15. Principales morfotipos de macrobacterias filamentosas multicelulares recolectadas en Humedal Laguna Verde (Hualpén) durante el mes de octubre. Donde los filamentos **A-R** se han encontrado también en el SH. Se aplicó una escala de medición de 10µm para todas las fotografías (barra/línea negra). Fotografías capturadas por Estefanía Barrera y editadas con escala, gentilmente por M. Sc. Carola Espinoza.

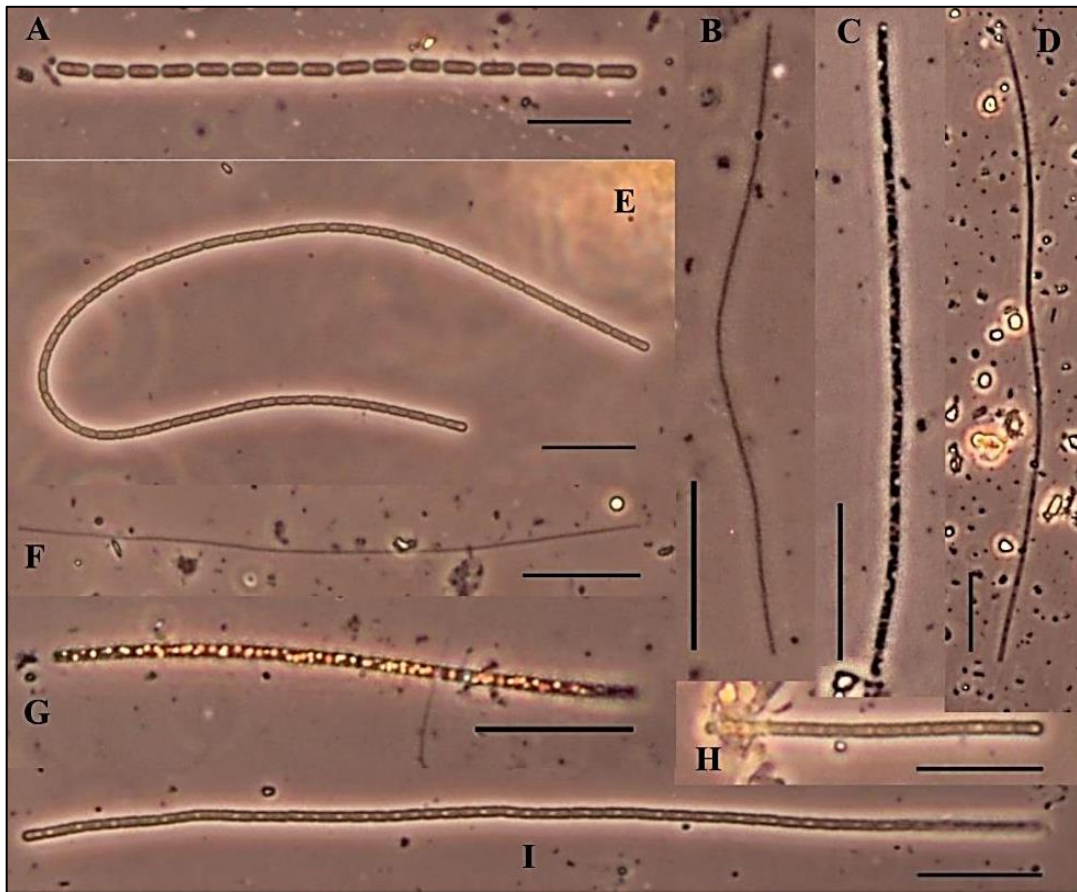


Figura 16. Principales morfotipos de macrobacterias filamentosas multicelulares recolectadas en Humedal Laguna Verde (Hualpén) durante el mes de noviembre. Donde los filamentos **A-G** se han encontrado también en el SH. Se aplicó una escala de medición de 10 μ m para todas las fotografías (barra/línea negra). Fotografías capturadas por Estefanía Barrera y editadas con escala, gentilmente por M. Sc. Carola Espinoza.

En cuanto al movimiento, la mayoría de los filamentos presentaba un libre movimiento bidireccional, es decir se podían desplazar en ambas direcciones y cambiar el rumbo de su desplazamiento si lo requerían (por ejemplo al topar un obstáculo, como cúmulos de sedimento) (Fig. 17), sobre todo los filamentos pertenecientes al morfotipo **B.II.iv.7** (con contricciones celulares).

En síntesis, hay muchos tipos de movimientos así como la rapidez de estos, un mismo morfotipo puede presentar tanto diferente desplazamiento como ritmo, usualmente los

filamentos más largos de un morfotipo se trasladan más lento que las de menor longitud con un movimiento más limitado.

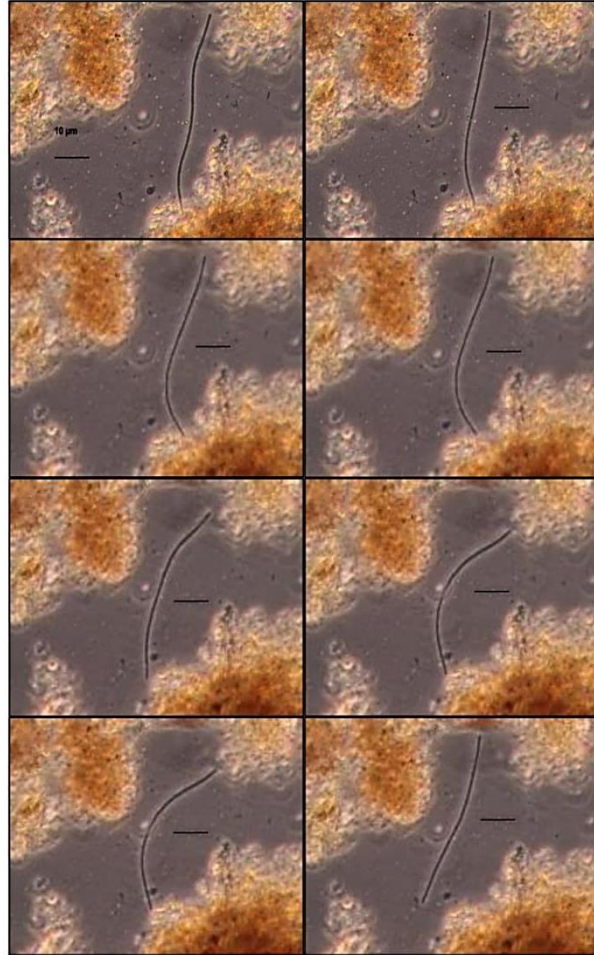


Figura 17. Movimiento de un filamento en el transcurso de un minuto. Se aplicó una escala de medición de 10 μ m para todas las fotografías (barra/línea negra). El filamento corresponde al morfotipo **B.II.iv.7** (con contricciones) pero en la presente figura no se puede apreciar (ver Fig. 15, filamento F). Fotografías capturadas por Estefania Barrera y editadas con escala, gentilmente por M.Sc. Carola Espinoza.

Por ejemplo, hubo filamentos bastante rápidos, que se desplazaron hasta cerca de 40 micrones en solo 8 segundos (Fig. 18, filamento A), toda una hazaña para los filamentos que suelen ir más lento. Sin embargo, los filamentos con más rapidez en cuanto a su desplazamiento son los pertenecientes al morfotipo **B.I.ii.3.b** (espiraladas) (Fig. 18, filamento D), donde se encuentran las *Spiroquetas*, suelen ser tan rápidas que incluso

dificulta fotografiarlas, aunque en ocasiones se encontraron filamentos pertenecientes a este grupo en etapa de “letargo”.

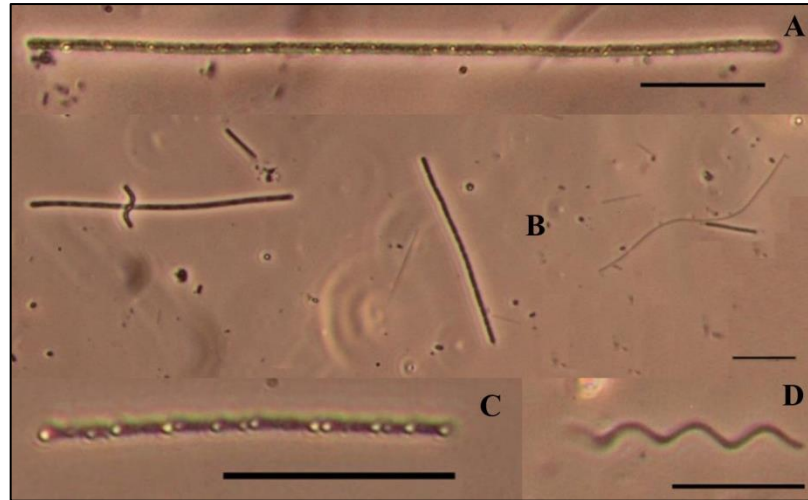


Figura 18. Morfotipos de macrobacterias filamentosas multicelulares recolectadas en Humedal Laguna Verde (Hualpén) durante el mes de octubre. Donde los filamentos A-D se han encontrado en el SH. Donde en **B** se pueden apreciar distintos filamentos con diversos diámetros pertenecientes al morfotipo “B.I.i.2”.

En cuanto a la comparación morfológica con Durán *et al.*, 2025 (lagunas de San Pedro) y morfotipos marinos, se realizó un contraste visual entre morfotipos. Se halló similitud entre los morfotipos de Laguna Chica y Grande de San Pedro con los de Humedal Laguna Verde, lo mismo aplico para los morfotipos marinos.

Es decir, en contraste con los morfotipos de las lagunas dulceacuícolas registrados por Durán *et al.*, 2025 (Fig.19), las macrobacterias del Humedal Laguna Verde, tienen bastante similitud con estas, observándose incluso, al parecer, los mismos ejemplares de morfotipos, correspondientes en su mayoría al morfotipo “B.II.iv.7” (con constricciones celulares), *i.e.* a los filamentos **b**, **h** y **e** de la Fig.19.

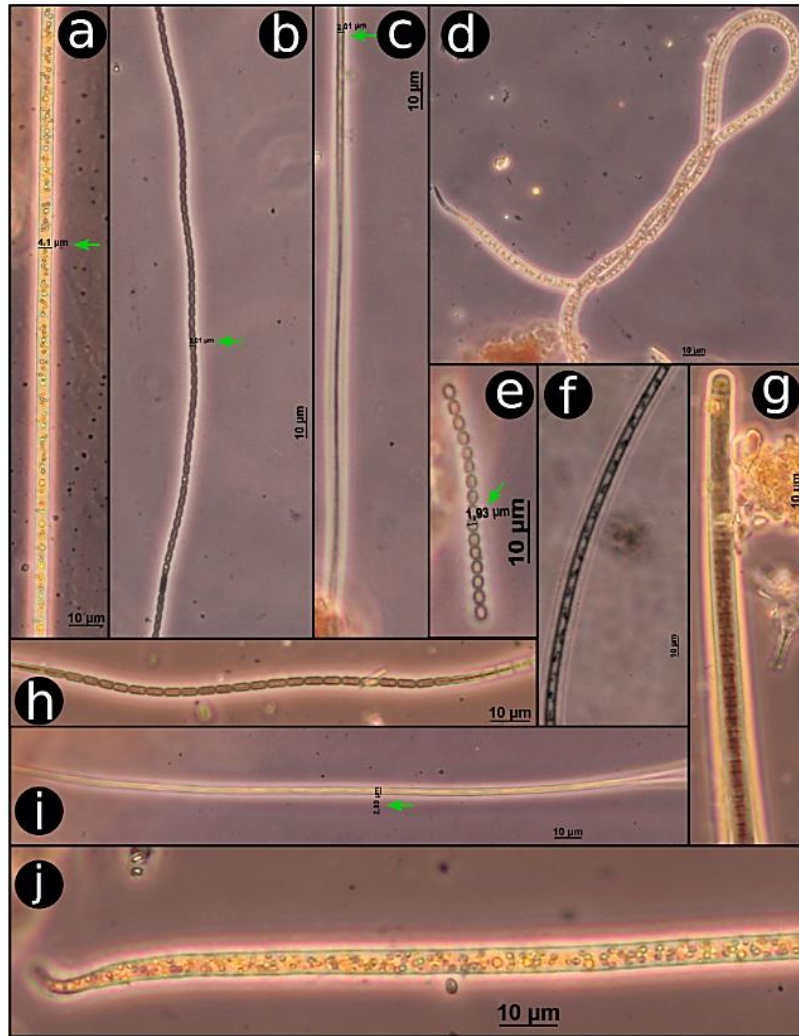


Figura 19. Morfotipos de macrobacterias filamentosas bentónicas incoloras recolectadas Laguna Chica (a-e) y Laguna Grande (f-j) de San Pedro de la Paz (Región del Biobío), Morfotipos publicados en Durán *et al.*, 2025. (Durán *et al.*, 2025).

En comparación con los morfotipos marinos (Fig.20), los morfotipos registrados en Humedal Laguna Verde coinciden en muchos tipos de ejemplares, confirmando que los morfotipos registrados en agua dulce son análogos a los marinos. En su mayoría, los filamentos más similares entre el humedal con los ejemplares marinos, correspondían al morfotipo B.II.iv.7 (con contracciones celulares) y B.I.i.2 (cilíndrico, sin accesorio apical).

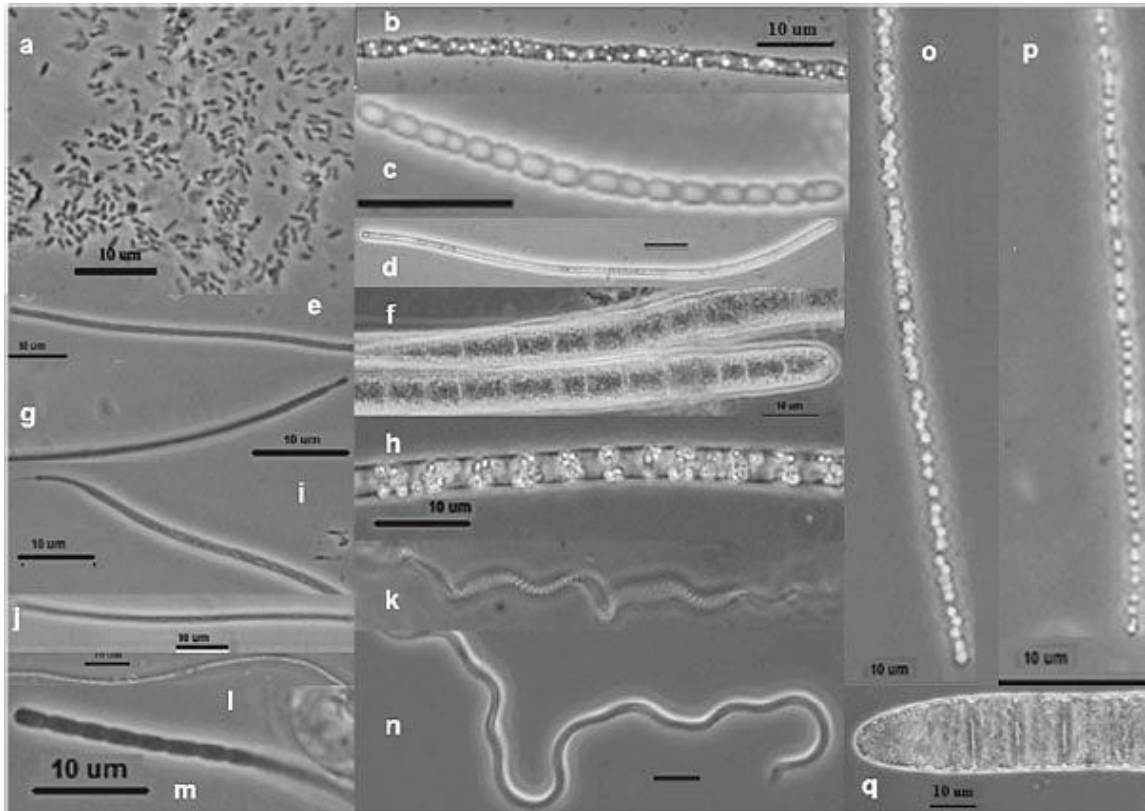


Figura 20. Collage mostrando (a) microbacterias clásicas; (b-p) un conjunto de diferentes tipos de macrobacterias comunes en el Sulfuretum de Humboldt; (q) células apicales de una *Candidatus Marithioploca araucae* sin vaina. (Gallardo *et al.*, 2013).

5.1.2. Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)

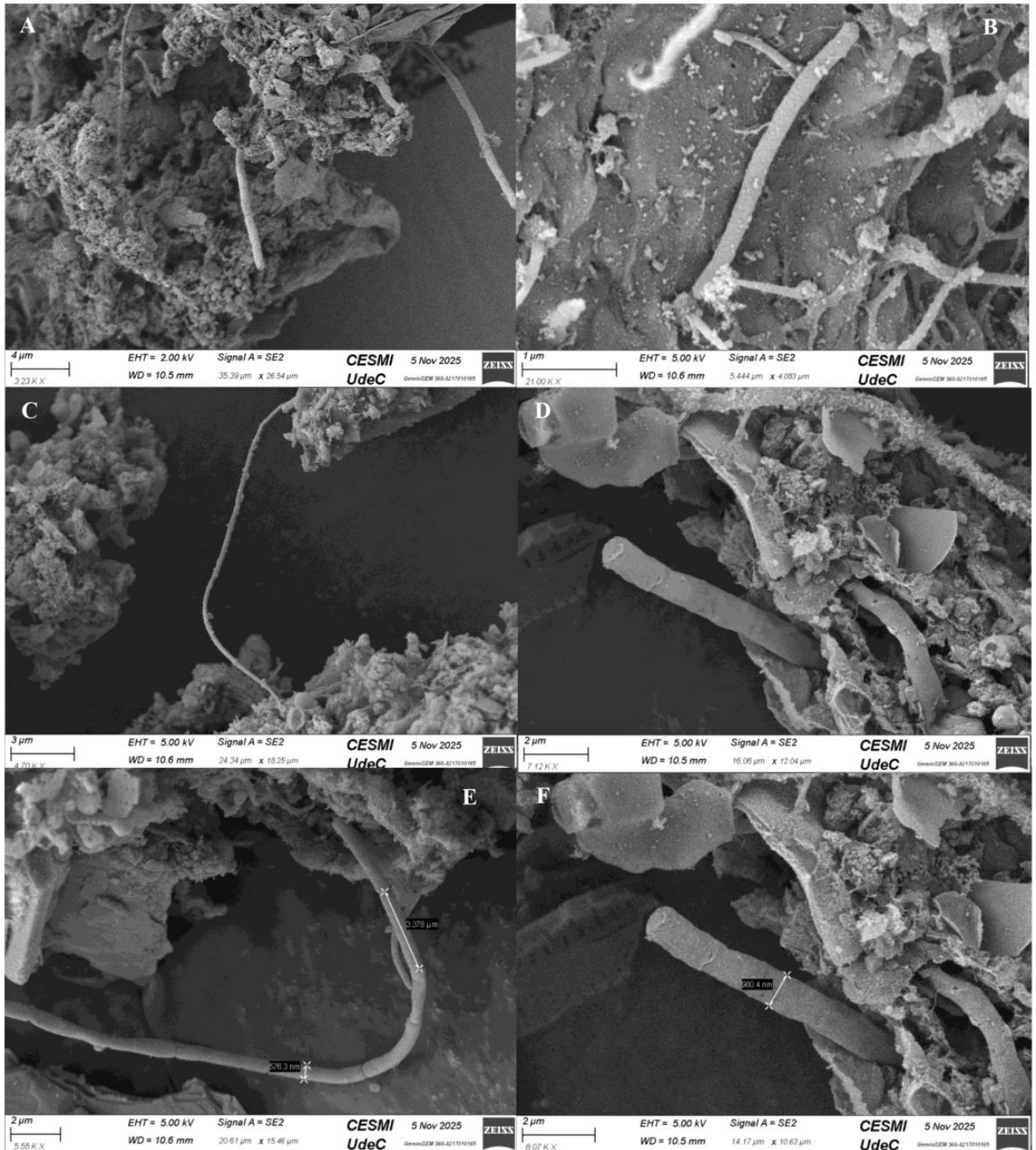


Figura 21. Morfotipos lacustres en microscopía de contraste de fase del Humedal Laguna Verde. Se pueden apreciar diversos morfotipos.

De acuerdo al análisis de SEM, se confirma que los filamentos observados en las lagunas L.V efectivamente correspondían a bacterias filamentosas multicelulares, ya que se pueden apreciar en las imágenes las estructuras de estas, como la separación entre cada célula.

5.2. Análisis fisicoquímico

Caracterización del sedimento.

Se obtuvieron los siguientes datos del análisis organoléptico. Destacar que los sedimentos del muestreo de Noviembre en el Humedal Laguna Verde estaban mucho más compactos que los muestreados en octubre, los cuales se sentían más suaves.

TABLA 2. Características organolépticas del sedimento.

Muestra	<i>In situ</i>				En laboratorio		
	Olor	Color	Tipo de sedimento	Presenta vegetación / fauna	Olor	Color	Presenta vegetación/ fauna
M1_Oct	Mucho olor a H ₂ S	Negro	Fango	La vegetación no se observa. Se observan muchos gusanos, posiblemente nemátodos	Olor fuerte a H ₂ S	Negro	Abundante No se observa “nematodos”. Se observa un pequeño coleóptero (escarabajo).
M2_Oct	Olor a H ₂ S	Pardo	Fango	NA	Olor a H ₂ S Débil	Pardo oscuro	Presenta Mucha vegetación
M3_Oct	Poco olor a H ₂ S	Pardo claro	Fango	NA	En superficie no	Pardo oscuro	Bastante fibra vegetal

					presenta olor a H ₂ S, en el fondo mucho.		
M1_Nov	Fuerte olor a H ₂ S	Negro	Fango	No	Mucho olor a H ₂ S	Pardo oscuro	Se observa un poco de fibras vegetales
M2_Nov	Con olor a H ₂ S	Pardo oscuro	Fango	Se observa fibras vegetales	Poco olor a H ₂ S	Pardo oscuro	Se observa fibras vegetales
M3_Nov	Olor a H ₂ S	Pardo	Fango	No	Mucho olor a H ₂ S	Pardo, el agua era muy amarilla	Se observa un pequeño coleóptero (escarabajo).
M4_Nov	Poco olor a H ₂ S	Pardo	Fango	Se observaron larvas de zancudos	Poco olor a H ₂ S		Se observaron larvas de zancudos y fibras vegetales

VARIABLES FÍSICOQUÍMICAS DEL AGUA.

TABLA 3. Parámetros fisicoquímicos del 1 cm de agua tomados *in situ* en Humedal Laguna Verde en noviembre. Nota: Para M4 los datos se tomaron en laboratorio.

Muestra	Nivel	pH	Redox (mV)	T (°C)
M1	1	5,87	-5	17,4
M2	1	6,6	169	17,7
M3	1	6,27	85	18
M4 (m.directa)	1	6,6	145	20,4
M4 (m.subm.)	1	7,02	167	20,4

Se observó una gran reducción del potencial Redox en el agua de la muestra M1. Seguramente debido a que en la orilla el ambiente tiende a ser más reducido por la acumulación de materia orgánica, lo que favorece su escasa oxigenación.

Variables fisicoquímicas del sedimento.

TABLA 4. Parámetros fisicoquímicos tomados en los primeros 3 niveles del sedimento. Todas las variables se tomaron en laboratorio. Para M4 se utilizó la muestra recolectada directamente, la submuestra se reservó para análisis morfológicos a futuro.

Fecha muestreo	Muestra	Nivel	pH	Redox (mV)	Temperatura (°C)	% MOT	% Porosidad
2025_10_06	M1	0 al 1	6,39	110	19	36,16	95,34
2025_10_06	M1	1 al 2	7,06	100	19	26,17	88,76
2025_10_06	M1	2 al 3	7,16	55	19	16,76	80,28
2025_10_06	M2	0 al 1	5,9	29	19	47,97	94,61
2025_10_06	M2	1 al 2	5,82	47	19	40,58	91,65
2025_10_06	M2	2 al 3	5,7	50	19	38,65	90,83
2025_10_06	M3	0 al 1	5,98	18	19	66,21	97,15
2025_10_06	M3	1 al 2	5,8	39	19	61,61	95,74
2025_10_06	M3	2 al 3	5,7	40	19	62,45	95,25
2025_11_12	M1	0 al 1	6,09	213	21,7	39,33	94,41
2025_11_12	M1	1 al 2	5,98	192	21,7	38,61	93,01
2025_11_12	M1	2 al 3	5,93	178	21,8	34,31	90,11
2025_11_12	M2	0 al 1	5,92	78	21,8	30,53	90,57
2025_11_12	M2	1 al 2	5,78	49	21,8	34,95	88,91
2025_11_12	M2	2 al 3	5,74	34	21	54,21	91,44
2025_11_12	M3	0 al 1	6,3	32	21	72,91	96,64
2025_11_12	M3	1 al 2	6,17	18	21	73,69	94,45
2025_11_12	M3	2 al 3	6,09	12	21	60,46	91,87
2025_11_12	M4	0 al 1	6,23	41	21,3	46,84	91,93
2025_11_12	M4	1 al 2	6,14	35	21,3	38,46	90,57
2025_11_12	M4	2 al 3	6,1	29	21,3	34,19	86,13

NOTA: Se observó un alto porcentaje de porosidad y materia orgánica en todas las muestras de ambos meses. Donde M3 lideró tanto en porosidad como en MOT en ambos muestreos, seguramente debido a la gran cantidad de junquillo presente en aquella estación de muestreo.

5.3. Análisis estadístico.

Abundancia y Distribución:

Se observa la abundancia promedio de morfotipos por punto de muestreo en el mes de Octubre, ajustada en escala logarítmica base 10 dada la gran abundancia del morfotipo B.I.i.2 (septos no visibles y sin accesorio apical) por sobre los demás (Fig.22). Se observa que la estación M1 presenta la mayor cantidad de individuos por morfotipos.

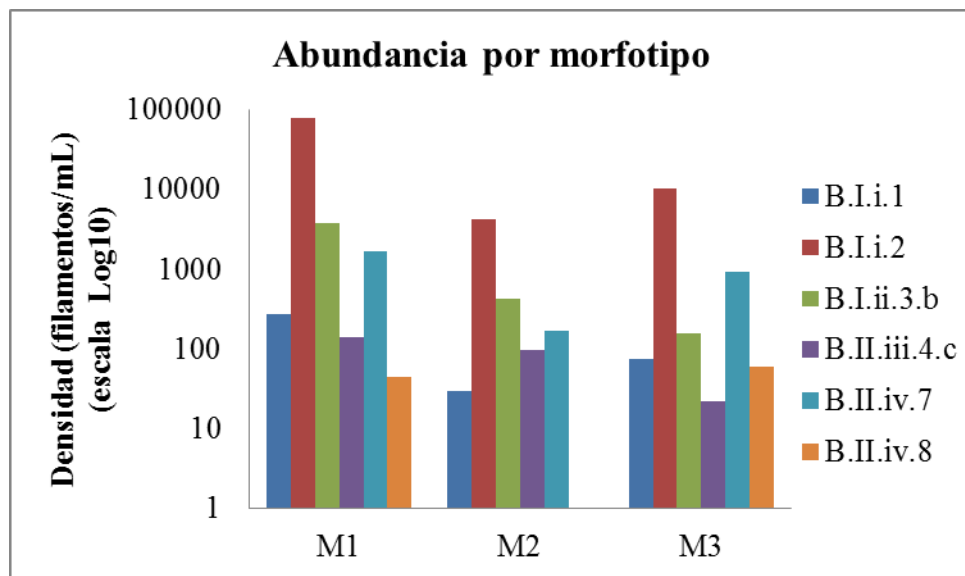


Figura 22. Abundancia promedio por morfotipo de los filamentos bacterianos multicelulares recolectados en Humedal Laguna Verde, cuerpo de agua colindante con la desembocadura del río Bío-Bío, ubicado dentro del Parque “Pedro del Ríos Zañartu”, comuna de Hualpén, durante el mes de octubre. Nota: en escala logarítmica de base 10.

Los datos de abundancia del mes de noviembre fueron ajustados a escala logarítmica base 10 dada a la gran abundancia del morfotipo B.I.i.2 por sobre los demás. La estación M1, en noviembre también presenta la mayor cantidad de individuos por morfotipos y fue constante entre puntos de muestreo dentro de Humedal Laguna Verde (Fig. 23).

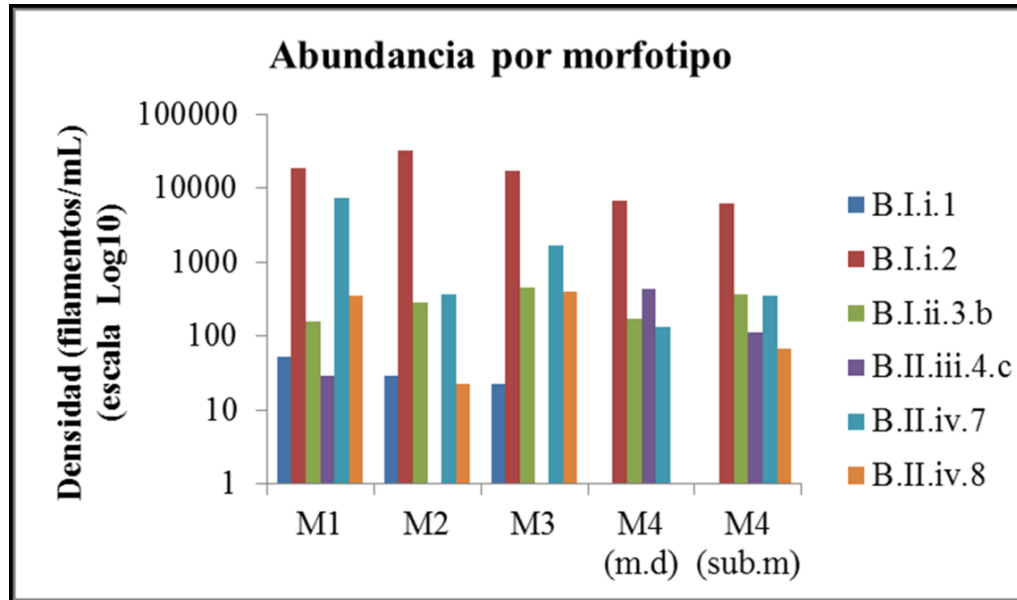


Figura 23. Abundancia promedio por morfotipo de los filamentos bacterianos multicelulares recolectados desde los fondos, del Humedal Laguna Verde por punto de muestreo en el mes de noviembre. Nota: en escala logarítmica de base 10.

En cuanto a la abundancia promedio de macrobacterias (filamentos/mL) con sus respectivas desviaciones estándar para los puntos M1, M2 y M3 en el Humedal Laguna Verde en el mes de octubre. Se observó que la estación M1 presenta la mayor densidad y variabilidad durante este periodo de muestreo (Fig. 24).

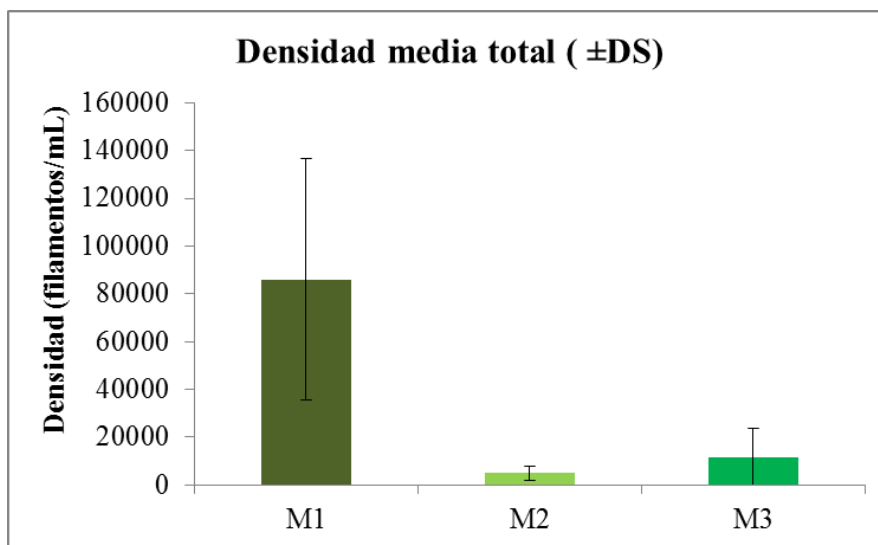


Figura 24. Densidad media total de filamentos bacterianos por estación de muestreo (octubre 2025) en Humedal Laguna Verde.

En el mes de octubre (Fig. 25), en cuanto a la riqueza morfológica, los puntos de muestreo M1 y M3 alcanzaron el valor máximo de 6 morfotipos, mientras que M2 registro 5.

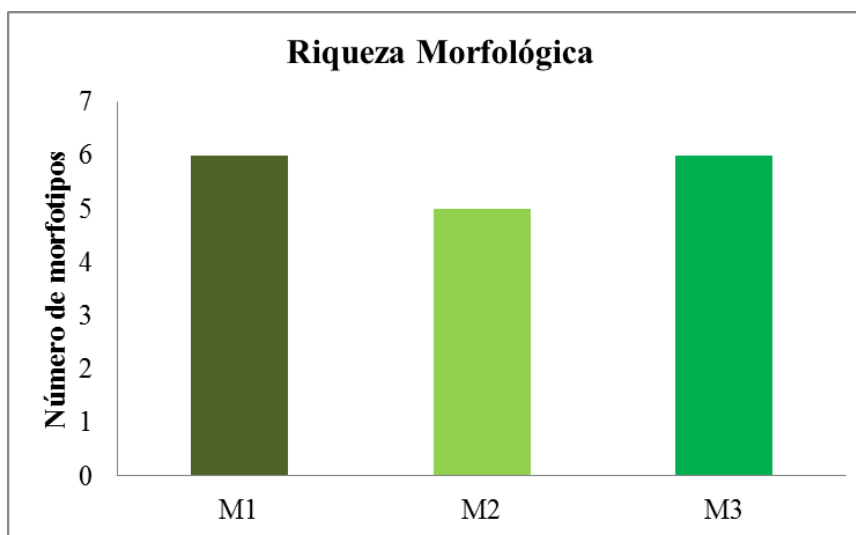


Figura 25. Riqueza morfológica de morfotipos identificados en los puntos de muestreo de L.V. (octubre 2025).

Así mismo, en noviembre, respecto a la abundancia promedio de macrobacterias (filamentos/mL) del Humedal Laguna Verde. (Fig. 26), se observa que la Est. M2 presenta la mayor densidad y variabilidad durante este periodo de muestreo.

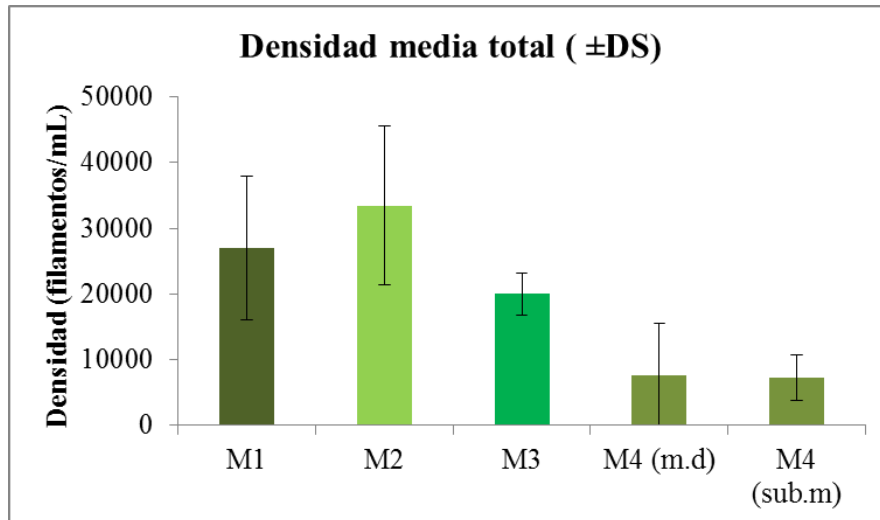


Figura 26. Densidad media total de filamentos bacterianos por estación de muestreo para Humedal Laguna Verde (noviembre 2025), con sus respectivas desviaciones estándar para los puntos de muestreo M1, M2, M3 y M4.

Mientras que en noviembre (Fig.27), en cuanto a riqueza morfológica, el punto M1 alcanzó el valor máximo de 6 morfotipos, mientras que M2, M3 y M4 (sub.m) tuvieron 5, y la muestra directa de M4 obtuvo la menor riqueza morfológica, encontrándose solo 4 morfotipos. Cabe considerar que ambas réplicas de M4 se obtuvieron en el mismo punto de muestreo, solo que una se obtuvo a más profundidad ya que se tomó con un tubo largo que luego se submuestreo a uno pequeño.

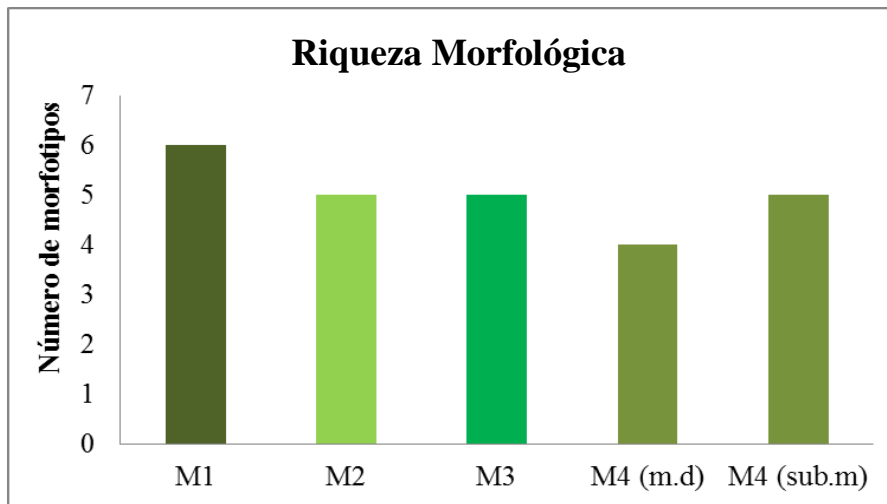


Figura 27. Riqueza morfológica de morfotipos identificados en los puntos de muestreo de Humedal Laguna Verde durante el mes de noviembre, 2025.

Composición de la Comunidad

En base a la composición, que ilustra la contribución porcentual de cada morfotipo en las distintas muestras de octubre y noviembre (Fig. 28). Se observa la dominancia de ciertos grupos, como el morfotipo B.I.i.2, y la distribución equitativa o sesgada de otros morfotipos entre los puntos de muestreo. Como bien se observa, el morfotipo B.I.i.2, es decir, los filamentos cilíndricos, con septos no visibles, rectos y sin accesorio apical, estos dominaron por sobre otros filamentos con distintos morfotipos, tanto en octubre como noviembre. Así mismo, los morfotipos menos abundantes (en ambos meses), fueron los morfotipos B.I.i.1, (con accesorio apical) y B.II.iv.8 (con septos visibles y paredes celulares rectas).

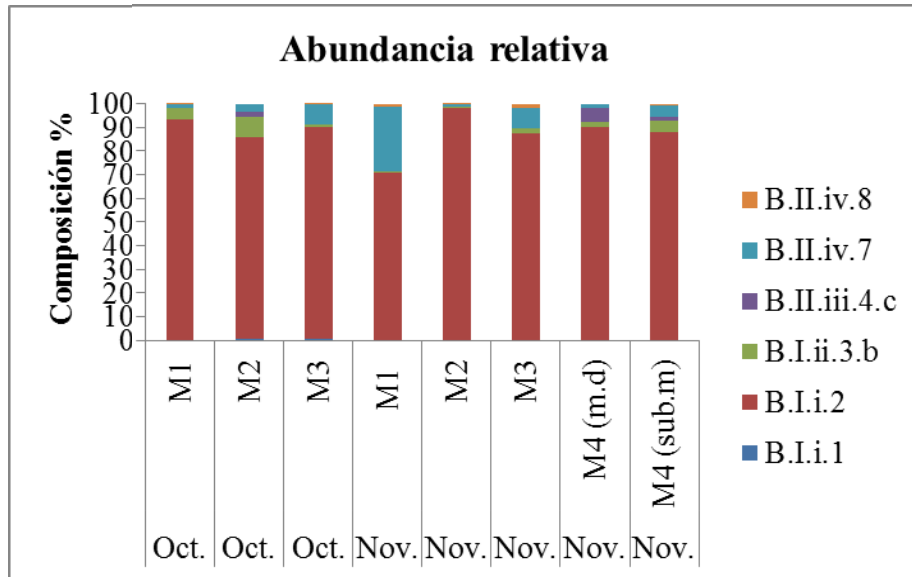


Figura 28. Abundancia relativa y composición de la comunidad de macrobacterias por morfotipo en los distintos puntos de muestreo en Humedal Laguna Verde, durante octubre y noviembre de 2025.

Dinámica Temporal

Las densidades registradas fueron comparadas en todas las estaciones entre los meses de octubre y noviembre de 2025 (Fig.29). Se identifican cambios en la biomasa microbiana asociados posiblemente a la transición entre la temporada de lluvias y la estación seca.

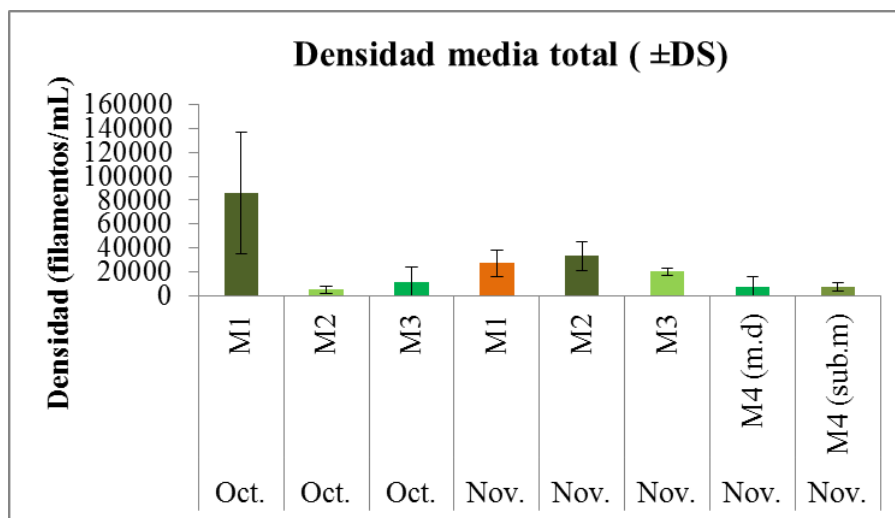


Figura 29. Dinámica temporal de la densidad media total de filamentos bacterianos.

Por otro lado, el humedal tuvo una mayor abundancia promedio total (Fig.30) durante octubre a comparación de noviembre, esto incluso considerando que en octubre solo se muestreo en 3 puntos y en noviembre en 4 puntos con uno de los puntos resultando en 2 réplicas (M4).

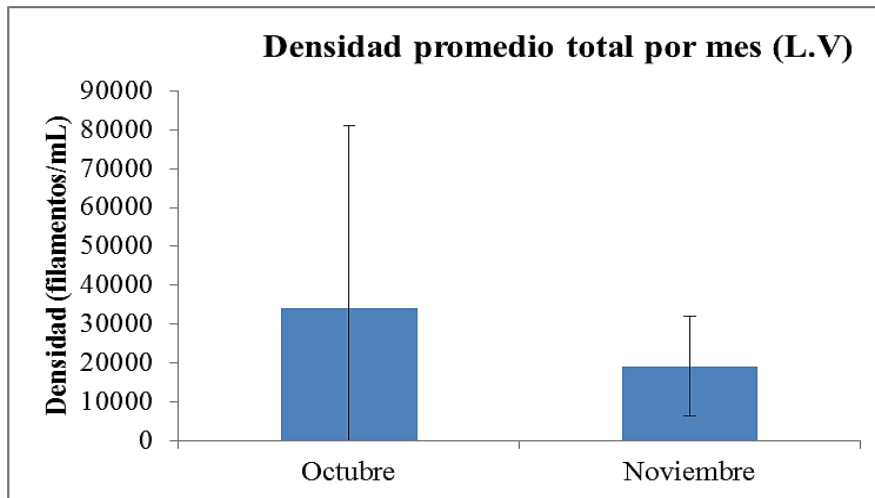


Figura 30. Densidad promedio total mensual en el Humedal Laguna Verde.

TABLA 5. Índices de diversidad de Shannon (H') para las comunidades de macrobacterias. Registro de los valores del índice de Shannon calculado para cada muestra, comparando la complejidad de la comunidad entre los meses de octubre y noviembre.

Mes	Muestra	Índice Shannon (H')
Octubre	M1	0,604
Octubre	M2	0,584
Octubre	M3	0,574
Noviembre	M1	0,695
Noviembre	M2	0,124
Noviembre	M3	0,496
Noviembre	M4m.d	0,509
Noviembre	M4sub.m	0,542

En general los resultados del H', arrojaron valores bajos, indicando que la comunidad de macrobacterias no es equilibrada y existe una dominancia por parte de una especie o morfotipo en este caso, el cual sería el morfotipo B.I.i.2, sugiriendo una baja equidad. Sin embargo estuvieron parejos, lo que indica un punto en el tiempo, y en un futuro se podrá comparar con otras estaciones del año.

6. DISCUSIÓN

Este estudio constituye el primer registro detallado para el Humedal Laguna Verde, sumándose a los recientes hallazgos en Chile central que rompen el paradigma de la exclusividad marina de estos organismos (Durán *et al.*, 2025).

La clasificación morfológica es una forma rápida, económica y fácil de agrupar bacterias según su morfotipo, sin embargo, su principal limitación radica en la posibilidad de confundir a estas macrobacterias con organismos que presenten estructuras celulares similares, como las cianobacterias (Durán *et al.*, 2025).

La presencia de estas bacterias en cuerpos de agua de origen contrastante es notable. Mientras que en el Humedal Laguna Verde la colonización podría explicarse por su historia paleoambiental y proximidad costera (hace 4,000-6,800 años la zona estuvo bajo influencia marina) o por su cercanía con el río Biobío (Francois *et al.*, 2024).

La gran diferencias diámetros y longitudes de un mismo tipo de filamento registrados, como los filamentos pertenecientes al morfotipo “**B.II.iv.7**” (con contricciones celulares) (ver Fig. 15), confirman que el diámetro de un filamento no depende de la longitud como lo mencionan Gallardo & Espinoza (2007b).

La dominancia del morfotipo **B.I.i.2** (cilíndrico, septos no visibles sin accesorio apical), y la identificación de filamentos con diámetros menores a 2 μm sugieren la presencia de "bacterias cable", las cuales podrían estar operando como conductores eléctricos en el sedimento para optimizar la oxidación de sulfuros en condiciones de hipoxia (Xiong *et al.*, 2024).

La diversidad morfológica del sistema dulceacuícola en Humedal Laguna Verde representa el 54,5% de los morfotipos encontrados en el Sulfureto de Humboldt (ecosistema marino) descritos en la clave morfológica de Gallardo & Espinoza (2007b).

No obstante, la variabilidad morfológica observada subraya que la identificación visual es solo el primer paso; se requiere de secuenciación genómica para resolver la identidad taxonómica de estas bacterias, que han sobrevivido en refugios anóxicos continentales continuando linajes ancestrales (Gallardo *et al.*,2013).

Destacar que muchos de los tópicos mencionados y discutido en el presente documento, fueron conversados personalmente con el Prof. Dr. Víctor A. Gallardo, muchos temas aún no se han publicado formalmente.

7. CONCLUSIONES

Los hallazgos de este estudio respaldan la hipótesis nula presentada, confirmando que los sedimentos anóxicos y ricos en materia orgánica de lagunas de agua dulce albergan macrobacterias multicelulares filamentosas morfológicamente análogas a las descritas en el ambiente marino del Sulfureto de Humboldt.

Los resultados de este estudio indican que el factor principal para el desarrollo de la vida prokaryota filamentosas-multicelular es la molécula H₂O y que el contenido de sal no es un factor limitante para la presencia y posiblemente también de la diversidad de la vida procariota filamentosas multicelular.

La existencia de estas comunidades en el Humedal Laguna Verde valida que su distribución depende primordialmente de la presencia de gradientes redox específicos, caracterizados por sedimentos ricos en H₂S (sulfhídricos) con una alta carga de materia orgánica.

El siguiente paso será realizar los mismos análisis en muestras bentónicas del Sulfureto de Humboldt.

La investigación permitió identificar una alta diversidad morfológica en este sistema dulceacuícola, registrando un total de seis morfotipos en el Humedal Laguna Verde.

El Humedal Laguna Verde presentó una gran riqueza morfológica y densidad biológica, especialmente durante el muestreo de octubre (transición de término de lluvias), donde la estación M1 alcanzó densidades superiores a los 80,000 filamentos/mL demostrando que estos ecosistemas actúan como reservorios críticos de biomasa microbiana.

También, los valores del Índice de Shannon sugieren que algunos morfotipos dominan la comunidad y no hay una distribución uniforme de individuos entre todas las especies presentes.

Además, los valores fisicoquímicos del sedimento (pH, potencial redox y temperatura) reportaron varios cambios entre sí en las diferentes fechas y entre muestras, posiblemente debido a que las muestras se oxidaron mientras se reservaron o cuando tuvieron contacto con el aire al submuestrear para SEM y PCM.

Por último, el hallazgo de morfotipos con diámetros inferiores a 1 micrón sugiere la posible presencia de "bacterias cable", lo que abre una nueva línea de investigación sobre la conducción eléctrica en sedimentos continentales de la región y en el país.

Asimismo, se espera realizar a futuro un análisis microbiológico a partir de un análisis de ADN genómico de las muestras, para estudios de secuenciación genómica que permitan la descripción formal de nuevas especies y una comprensión más profunda de este linaje evolutivo ancestral en ambientes de agua dulce. Finalmente, el presente estudio establece las bases para futuros estudios más robustos.

REFERENCIAS

- Baeza, C., Rodríguez, R., Thielemann, E., & Kottirsch, G. (2023). Guía de Campo: Árboles del Campo Botánico de Hualpén.
- Díaz, G. V., Vázquez, V. S., & Machuca, M. Ángel H. (2018). Análisis del cambio temporal y espacial del uso del suelo en la región centro-sur de Chile. *Ciencia Florestal*, 28(4), 1831–1844.
- Dong, M., Nielsen, L. P., Yang, S., Klausen, L. H., & Xu, M. (2024). Cable bacteria: widespread filamentous electroactive microorganisms protecting environments. *Trends in microbiology*, 32(7), 697-706.
- Durán-Garcés, F., Espinoza, C., & Gallardo, V. A. (2025). Primer registro de bacterias bentónicas filamentosas multicelulares en lagunas de agua dulce en Chile central. *Gayana (Concepción)*, 89(1), 66-72.
- Fuentes Aranda, R. A. (2015). Ácaros acuáticos (Hydrachnidiae) en cuatro lagunas interurbanas del Gran Concepción y su comparación con el humedal Laguna Verde. Tesis para optar al grado de Biólogo, Universidad de Concepción. 55 pp.
- Fonseca, A., Ishoey, T., Espinoza, C., Marshall, I. P., Nielsen, L. P., & Gallardo, V. A. (2025). Large Filamentous Bacteria Isolated from Sulphidic Sediments Reveal Novel Species and Distinct Energy and Defense Mechanisms for Survival. *Environmental Microbiology*, 27(3), e70083.
- Fonseca, A., Espinoza, C., Nielsen, L.P., Marshall, I.P. y Gallardo, V. A. (2022). Bacterial community of sediments under the Eastern Boundary Current System shows high microdiversity and a latitudinal spatial pattern. *Frontiers in Microbiology*, 13, 1016418.
- Francois, J. P., Hernández-Lazcano, P., Schneider-Valenzuela, I., & Cerda, J. (2024). Nuevos datos en torno a la historia paleoambiental del centro-sur de Chile. El registro sedimentario y palinológico del “Humedal Laguna Verde” (36° 47’S),

- Península Hualpén, Región del Biobío, Chile. *Revista de Geografía Norte Grande*, (87).
- Gallardo, V. A. (1963). Notas sobre la densidad de la fauna bentónica en el sub-litoral del norte de Chile. *Gayana*, 10, 3-15.
- Gallardo, V. A., & Espinoza, C. (2007a). Large multicellular filamentous bacteria under the oxygen minimum zone of the Eastern South Pacific: a forgotten biosphere. In *Instruments, Methods, and Missions for Astrobiology X* (Vol. 6694, pp. 501-511). SPIE.
- Gallardo, V. A., & Espinoza, C. (2007b). New communities of large filamentous sulfur bacteria in the eastern South Pacific. *International Microbiology*, 10(2), 97.
- Gallardo, V. A., Espinoza, C., Fonseca, A., & Musleh, S. (2013). Las grandes bacterias del Sulfureto de Humboldt. *Gayana (Concepción)*, 77(2), 136-170.
- Gallardo, V. A., Fonseca, A., Musleh, S. S., & Espinoza, C. (2013b). Extrapolations of standing stocks of big bacteria in Humboldt eastern boundary current ecosystem (HEBCE). *Oceanography*, 1(110), 2.
- Gallardo, V. A., Fonseca, A., Espinoza, C. *et al.* (2016). Las bacterias del Humboldt sulfuretum cumplen con los principios macroecológicos unificadores. *Mar Biodiv* 46 , 399–406.
- Jørgensen, BB (2006). Bacterias y biogeoquímica marina. En HD Schulz y M. Zabel (Eds.), *Marine Geochemistry* (pp. 169-206). Springer Berlin, Heidelberg.
- Maier, S., & Gallardo, V. A. (1984). *Thioploca araucae* sp. nov. and *Thioploca chileae* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 34(4), 414-418.
- Nielsen, L., Risgaard-Petersen, N., Fossing, H. *et al.* (2010). Las corrientes eléctricas acoplan procesos biogeoquímicos espacialmente separados en sedimentos marinos. *Nature* 463, 1071–1074.

- Pfeffer, C., Larsen, S., Song, J. *et al.* (2012). Las bacterias filamentosas transportan electrones a distancias de centímetros. *Nature* 491, 218-221.
- Rivera, R. (1974). Diatomeas de la Laguna Verde del Parque Hualpén, Chile: I. Interesantes representantes del género *Attheya* (West, 1860). *Bol Soc. Biol. de Concepción*, tomo XLVII, pp. 87-91
- Rusch, D.B., Halpern, A.L., Sutton, G., Heidelberg, K.B., Williamson, S., Yooseph, S., & Venter, J.C. (2007). Expedición global de muestreo oceánico Sorcerer II: del Atlántico noroccidental al Pacífico tropical oriental. *PLoS Biology* , 5 (3), e77.
- Sievers Czischke, H. (2018). La oceanografía en Chile: historia de un desarrollo imperativo.
- Schopf, J. W., & Klein, C. (1992). Atlas of representative Proterozoic microfossils. *The Proterozoic Biosphere*, 1055-1118.
- Schulz, H. N., & Jørgensen, B. B. (2001). Big bacteria. *Annual Review of Microbiology*, 55(1), 105–137.
- Teske, A., & Salman, V. (2014). The family beggiatoaceae. In *The prokaryotes* (pp. 93-134). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Teske, A. (2019). Cable bacteria, living electrical conduits in the microbial world. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 116(38), 18759-18761.
- Valdovinos, C. (2006). Humedales dulceacuícolas y biodiversidad. En: Atlas social y ambiental del área metropolitana de Concepción. Región del Bío-Bío, Chile. Editores: J. Rojas, G. Azócar, M.D. Muñoz, C. Vega, A. Kindler & S. Kabisch, pp. 104-124. Editorial Universidad de Concepción, Concepción, Chile.
- Xiong, X., Li, Y., & Zhang, C. (2024). Cable bacteria: living electrical conduits for biogeochemical cycling and water environment restoration. *Water Research*, 121345.

ANEXO

Anexo N°1. Cantidad de morfotipos muestreados el 2025_10_06 en L.V. Formato data detallada del muestreo, “datos crudos”.

Cantidad por morfotipo									
Zona	Replica	A	B	C	D	E	F	Total	Densidad total
M1	1	14	1.017	128	14	134	3	1310	29111,11111
M1	2	20	4.322	225	3	56	1	4627	102822,2222
M1	3	3	5.470	159	2	33	2	5669	125977,7778
M2	1	3	250	26	3	10	0	292	6488,888889
M2	2	0	57	4	5	3	0	69	1533,333333
M2	3	1	265	28	5	10	0	309	6866,666667
M3	1	1	51	1	1	25	2	81	1800
M3	2	0	287	3	0	35	3	328	7288,888889
M3	3	9	1.044	17	2	65	3	1140	25333,33333

Anexo N°2. Cantidad de morfotipos muestreados el 2025_11_12 en L.V. Formato data detallada del muestreo, “datos crudos”.

Cantidad por morfotipo									
Muestra	Replica	A	B	C	D	E	F	Total	Densidad total
M1	1	4	1.391	15	0	350	21	1781	39577,77778
M1	2	0	633	2	1	218	24	878	19511,11111
M1	3	3	549	4	3	424	3	986	21911,11111
M2	1	2	1492	29	0	19	1	1543	34288,88889
M2	2	0	2004	4	0	16	2	2026	45022,22222
M2	3	2	919	5	0	15	0	941	20911,11111
M3	1	1	853	15	0	91	32	992	22044,44444
M3	2	2	859	21	0	72	15	969	21533,33333
M3	3	0	640	25	0	64	8	737	16377,77778
M4 (m.d)	1	0	60	0	16	4	0	80	1777,77778
M4 (m.d)	2	0	185	4	14	10	0	213	4733,333333
M4 (m.d)	3	0	689	19	30	4	0	742	16488,88889
M4 (sub.m)	1	0	121	12	2	7	4	146	3244,444444
M4 (sub.m)	2	0	386	22	9	23	2	442	9822,222222
M4 (sub.m)	3	0	356	15	4	17	3	395	8777,77778