



UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN



FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y OCEANOGRÁFICAS
INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA MARINA Y ACUICULTURA



TRAZABILIDAD DE LA CONTAMINACIÓN FECAL DE LA LAGUNA
GRANDE Y LAGUNA CHICA DE SAN PEDRO DE LA PAZ

SEMINARIO DE TÍTULO PARA OPTAR AL TÍTULO DE INGENIERO
EN BIOTECNOLOGÍA MARINA Y ACUICULTURA

CONCEPCIÓN-CHILE

Enero 2025

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y OCEANOGRÁFICAS
INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA MARINA Y ACUICULTURA

TRAZABILIDAD DE LA CONTAMINACIÓN FECAL DE LA LAGUNA GRANDE Y CHICA
DE SAN PEDRO DE LA PAZ

Por

TOMÁS ANTONIO MONARES MIRANDA

Profesor guía

Dr. RODRIGO RENÉ GONZÁLEZ SALDÍA

SEMINARIO DE TÍTULO PARA OPTAR AL TÍTULO DE
INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA MARINA Y ACUICULTURA

CONCEPCIÓN-CHILE

Abril, 2024

Universidad de Concepción

Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas

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

Profesor Guía:

Dr. Rodrigo González Saldía
Departamento de Oceanografía
Facultad de Ciencias Naturales y
Oceanográficas
Universidad de Concepción, Concepción

Comisión Evaluadora:

Dr. Fernando Cruzat Cruzat
Departamento de Oceanografía
Facultad de Ciencias Naturales y
Oceanográficas
Universidad de Concepción, Concepción

B.M. Claudia Yáñez Lemus
Dirección de Medio Ambiente, Aseo y Ornato
Ilustre Municipalidad de San Pedro de la Paz,
Concepción

Coordinador Seminario de Título:

Dr. Fernando Cruzat Cruzat
Departamento de Oceanografía
Facultad de Ciencias Naturales y
Oceanográficas
Universidad de Concepción, Concepción

Agradecimientos

Esta etapa universitaria ha sido un camino largo y exigente, marcado por innumerables desafíos tanto académicos como personales. A lo largo de estos años, enfrenté momentos de incertidumbre, esfuerzo y exigencia intelectual, pero también viví experiencias enriquecedoras que contribuyeron de manera profunda a mi formación académica y personal. Este proceso no solo implicó la adquisición de conocimientos, sino también el desarrollo de la capacidad para adaptarse a las dificultades que pueden surgir en este arduo camino. Culminar esta etapa representa el cierre de un ciclo importante en mi vida, cuyo valor va más allá de lo académico y que, sin duda, dejará una huella permanente en mi manera de enfrentar los desafíos futuros.

Quiero agradecer de manera especial a cada uno de mis familiares que me acompañaron durante este proceso. A mi padre, Ramón Monares; a mi madre, Sandra Miranda; y a mi hermana, Bárbara Monares, quienes fueron un pilar fundamental durante todo este exigente período. Gracias por sus consejos, sus risas y su consuelo en los altos y bajos que implicó esta etapa. A mi abuela, Ester González, por su amor incondicional y su constante apoyo: sin ella, no habría podido llegar hasta aquí. También agradezco a mi tío Cristian Miranda, a mi tía Nicolle Yori y a mi prima Antonia Miranda, por su confianza y por abrirme las puertas de su hogar al recibirme en Concepción.

También quiero expresar mi gratitud a cada uno de mis amigos que estuvieron presentes durante este arduo proceso. Su compañía, sus palabras de aliento y los momentos compartidos fueron fundamentales para sobrellevar las exigencias de esta etapa. En especial, agradezco a Jacqueline Aravena, cuyo apoyo constante y cercanía marcaron una diferencia significativa en este camino. Agradezco profundamente a Josefa Canales por abrirme las puertas de su hogar mientras finalizaba esta etapa, momento en donde tuvimos la oportunidad de reencontrarnos como amigos tras años de haber salido del colegio; y a Sebastián Cerda, por lo increíble que es como amigo y como persona. Ambos me acompañaron durante el cierre de este proceso, brindándome apoyo, comprensión y una amistad que valoro sinceramente. Cada conversación, cada gesto y cada encuentro significaron mucho más de lo que pueden imaginar, y guardo con especial aprecio todo lo vivido junto a ustedes durante este último año.

También quisiera agradecer a mi profesor tutor, Dr. Rodrigo González S., por acogerme en su laboratorio, por toda la paciencia que me brindó a lo largo de este proceso y por confiar en mis capacidades para llevarlo a término.

Agradezco a cada uno de los integrantes y al equipo de trabajo del Laboratorio de Bioquímica y Biotecnología de Organismos Marinos, por el trato y el grato ambiente que supieron mantener durante las jornadas en que desarrollábamos nuestras tesis. En especial, quiero destacar a Jacqueline Muñoz, sin cuya compañía, apoyo y compromiso no habría podido finalizar este proceso. Me siento eternamente agradecido.

Finalmente, agradecer a la Agencia Nacional de Investigación y Desarrollo (ANID), por el financiamiento brindado a través del proyecto IT23I0050. Asimismo, extiendo mis agradecimientos a la Ilustre Municipalidad de San Pedro de la Paz, por su valiosa colaboración en la presente tesis.

Índice

Índice de figuras y tablas	7
Resumen	11
Abstract	12
1. Introducción	13
1.1 Trazabilidad microbiana de la contaminación fecal (MST/FST).....	13
1.2 Contaminación fecal y su vínculo con la resistencia antimicrobiana	15
1.3 Interacción entre nutrientes, bacterias y eutrofización	16
1.4 Importancia ecológica y amenazas de los lagos urbanos	19
1.5 Contexto local: Laguna Grande y Chica de San Pedro de la Paz	20
2. Hipótesis	22
3. Objetivo general	22
3.1 Objetivos específicos	22
4. Metodología	23
4.1 Diseño del muestreo y recolección de muestras	24
4.2 Análisis microbiológico de coliformes por colimetría.....	24
4.3 Extracción de ADN ambiental	25
4.4 q-PCR para identificación de ADN mitocondrial.....	25
4.5 Cultivo y aislamiento de cepas resistentes a antibióticos.....	27
4.6 Determinación de nutrientes	28
4.7 Análisis estadísticos	29
5. Resultados.....	30
5.1 Análisis estacional de coliformes.....	30
5.2 Análisis estacional de marcadores moleculares	31
5.3 Análisis del índice Mar (Multi-Antibiotic Resistance Index)	33
5.4 Análisis estacional de parámetros físico-químicos	34
5.5 Correlaciones entre Coliformes, marcadores moleculares y parámetros fisicoquímicos	38
5.6 Análisis de regresión lineal para coliformes fecales y marcadores moleculares	39
5.7 Comparación espacio temporal coliformes totales y fecales, marcadores moleculares y nutrientes.....	41
5.8 Distribución porcentual estacional de los marcadores moleculares.....	47

5.9 Distribución espacial de coliformes fecales y marcadores moleculares	51
6. Discusión.....	57
7. Conclusiones	61
8. Bibliografía.....	62

Índice de figuras y tablas

Figura 1: Puntos de muestreo de Laguna Grande, San Pedro de La Paz. Imagen extraída de Google earth.

Figura 2: Puntos de muestreo de Laguna Chica, San Pedro de La Paz. Imagen extraída de Google earth.

Figura 3: Promedio de coliformes totales y fecales por estación del año 2024 en ambas la Lagunas de San Pedro de la Paz, expresado en NMP/100 mL. Las barras de error representan la desviación estándar. La línea roja indica el límite máximo permitido de 1000 NMP/100 mL según la norma chilena NCh1333. El asterisco (*) indica diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las concentraciones de coliformes fecales y totales a lo largo de las estaciones del año.

Figura 4: Concentración estacional promedio de los marcadores moleculares de origen humano y animal (N°copias/100 mL) en las lagunas de San Pedro de la Paz del año 2024. Las barras de error representan la desviación estándar. El asterisco (*) indica diferencias significativas ($p < 0,05$) entre estaciones y la presencia de los marcadores moleculares.

Figura 5: Índice de resistencia antimicrobiana múltiple (MAR) en distintos puntos de muestreo de la Laguna Grande de San Pedro de la Paz durante la primavera. Los valores de MAR se presentan para dos medios de cultivo: LB (azul) y MacConkey (verde). La línea roja representa el umbral de 0.2, que indica el límite por encima del cual se considera una alta presión de antibióticos en el ambiente. Los valores incluyen barras de error que representan la desviación estándar de las mediciones. El asterisco (*) indica diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los distintos puntos de muestreo en ambos medios.

Figura 6: Concentraciones promedio de nitrato, nitrito, amonio, fosfato ($\mu\text{mol/L}$) en las Lagunas de San Pedro de la Paz durante las estaciones del año 2024. Las barras de error representan la desviación estándar. El asterisco (*) indica diferencias significativas ($p < 0,05$) entre estaciones.

Figura 7: Variación estacional de pH y temperatura superficial de la Laguna Grande y Chica de San Pedro de la Paz, durante el año 2024. Las barras azules representan el valor promedio de pH, mientras que las naranjas corresponden a la temperatura promedio ($^{\circ}\text{C}$) registrada en cada estación. Las barras de error indican la desviación estándar. El asterisco (*) indica diferencias significativas ($p < 0,05$) entre estaciones para temperatura y pH.

Figura 8: Regresión lineal entre coliformes fecales y el marcador molecular Aviar (N°copias/100 mL). Se observa una asociación estadísticamente significativa (valor $p < 0,001$; $R^2 = 0,2201$)

Figura 9: Regresión lineal entre coliformes fecales y el marcador molecular Canino (N°copias/100 mL). Se observa una asociación estadísticamente significativa (valor $p < 0,001$; $R^2 = 0,1543$)

Figura 10: Regresión lineal entre coliformes fecales y el marcador molecular Hmt (N°copias/100 mL). Se observa una asociación estadísticamente significativa (valor $p < 0,001$; $R^2 = 0,4164$)

Figura 11: Regresión lineal entre coliformes fecales y el marcador molecular aviar (N°copias/100 mL). Se observa una asociación estadísticamente significativa (valor $p < 0,001$; $R^2 = 0,3404$)

Figura 12: Concentración promedio de coliformes totales y fecales de la Laguna Grande de San Pedro de la Paz, diferenciando la zona norte y sur. Los valores se expresan en NMP/100 mL. Las barras de error representan la desviación estándar. La línea roja indica el límite máximo permitido de 1000 NMP/100 mL según la norma chilena NCh1333. El asterisco (*) indica diferencias significativas ($p < 0,05$) entre zonas.

Figura 13: Comparación de los valores promedio de coliformes totales y fecales por zona de muestreo en ambas lagunas (Laguna grande= LG; Laguna Chica= LC). Los valores se expresan en NMP/100 mL Las barras de error representan la desviación estándar. La línea roja indica el límite máximo permitido de 1000 NMP/100 mL según la norma chilena NCh1333. Los asteriscos (*) indica diferencias significativas ($p < 0,05$) entre zonas.

Figura 14: Concentraciones promedio de ADN de origen fecal en N°copias/100 mL en la zona norte y zona sur de la Laguna Grande de San Pedro de la Paz. Se incluyen seis marcadores moleculares correspondientes a distintas especies: Aviar (azul), Bovino (naranja), Equino (gris), Canino (amarillo), Humano (celeste) y Porcino (verde). Las barras de error representan la desviación estándar de los datos. Los asteriscos (*) indica diferencias significativas ($p < 0,05$) entre zonas.

Figura 15: Concentraciones promedio de ADN de origen fecal en copias/100 mL en la zona norte de la Laguna Grande y zona norte de la Laguna Chica de San Pedro de la Paz. Se incluyen seis marcadores moleculares correspondientes a distintas especies: Aviar (azul), Bovino (naranja),

Equino (gris), Canino (amarillo), Humano (celeste) y Porcino (verde). Las barras de error representan la desviación estándar de los datos. Los asteriscos (*) indica diferencias significativas ($p < 0,05$) entre zonas.

Figura 16: Concentraciones promedio de nitrato, fosfato, nitrito y amonio ($\mu\text{mol/L}$) en la zona norte y sur de la Laguna Grande. Las barras de error representan la desviación estándar de los datos. El asterisco (*) indica diferencias significativas ($p < 0,05$) entre zonas.

Figura 17: Comparación de los valores promedio de los nutrientes ($\mu\text{mol/L}$) por zona de muestreo en ambas lagunas (Laguna grande= LG; Laguna Chica= LC). Las barras de error representan la desviación estándar de los datos. El asterisco (*) indica diferencias significativas ($p < 0,05$) entre zonas.

Figura 18: Distribución porcentual por zona (Norte y Sur) del ADN de origen humano y animal en la Laguna Grande de San Pedro de la Paz durante las campañas de verano y otoño de 2024. Gráficos elaborados utilizando los promedios de la detección de los marcadores moleculares específicos para cada especie.

Figura 19: Distribución porcentual por zona (Norte y Sur) del ADN de origen humano y animal en la Laguna Grande de San Pedro de la Paz durante las campañas de invierno y primavera de 2024. Gráficos elaborados utilizando los promedios de la detección de los marcadores moleculares específicos para cada especie.

Figura 20: Distribución porcentual del ADN de origen humano y animal en la zona norte de la Laguna Grande (LG) y la zona norte de la Laguna Chica (LC). Los valores corresponden a los promedios obtenidos a partir de la detección de los marcadores genéticos específicos para cada especie.

Figura 21: Distribución estacional de coliformes fecales ($\text{NMP}/100\text{mL}^{-1}$) en la Laguna Grande y Laguna Chica de San Pedro de la Paz. Los mapas muestran la interpolación espacial de la concentración de coliformes fecales ($\text{NMP}/100\text{ mL}$) en las cuatro estaciones del año. La escala de colores indica los niveles de contaminación, desde valores bajos en amarillo hasta valores altos en marrón oscuro. Los puntos rojos representan las estaciones de muestreo.

Figura 22: Distribución espacial de los seis marcadores moleculares (humano, equino, aviar, porcino, canino y bovino) en la Laguna Grande y Laguna Chica de San Pedro de la Paz durante la campaña de verano. Los mapas muestran la interpolación de la concentración de ADN mitocondrial (N°copias/100 mL), donde la escala de colores indica las variaciones en los niveles de detección. Los puntos rojos representan las estaciones de muestreo.

Figura 23: Distribución espacial de los seis marcadores moleculares (humano, equino, aviar, porcino, canino y bovino) en la Laguna Grande y Laguna Chica de San Pedro de la Paz durante la campaña de otoño. Los mapas presentan la interpolación de la concentración de ADN mitocondrial (N°copias/100 mL), donde la escala de colores indica los niveles de detección. Los puntos rojos representan las estaciones de muestreo

Figura 24: Distribución espacial de los seis marcadores moleculares (humano, equino, aviar, porcino, canino y bovino) en la Laguna Grande y Laguna Chica de San Pedro de la Paz durante la campaña de invierno. Los mapas presentan la interpolación de la concentración de ADN mitocondrial (N°copias/100 mL), donde la escala de colores indica los niveles de detección. Los puntos rojos representan las estaciones de muestreo

Figura 25: Distribución espacial de los seis marcadores moleculares (humano, equino, aviar, porcino, canino y bovino) en la Laguna Grande y Laguna Chica de San Pedro de la Paz durante la campaña de primavera. Los mapas presentan la interpolación de la concentración de ADN mitocondrial (N°copias/100 mL), donde la escala de colores indica los niveles de detección. Los puntos rojos representan las estaciones de muestreo

Tabla 1: Resumen de parámetros obtenidos durante el periodo de muestreo del año 2024 la Laguna Grande y Chica de San Pedro de la Paz (promedios \pm desviación estándar)

Tabla 2: Matriz de correlación de Pearson entre coliformes totales, coliformes fecales, nutrientes (nitrato, fosfato, nitrito, amonio), temperatura, pH y biomarcadores de origen humano y animal (canino, equino, porcino, aviar y bovino). Se presentan los coeficientes de correlación (r) y los valores de significancia (p).

Resumen

La contaminación fecal en los cuerpos de agua dulce es un problema creciente a nivel global, impulsado el crecimiento demográfico y la falta de urbanización. En Chile la Laguna Grande y Laguna Chica de la comuna de San Pedro de la Paz son un caso de estudio debido a la fuerte presión antropogénica, dado sus 103.808 habitantes y la constante expansión inmobiliaria.

Durante el 2024, se llevaron a cabo cuatro campañas estacionales (verano, otoño, invierno y primavera), para evaluar el grado, distribución de la contaminación fecal y trazar su fuente de origen. Para esto último se cuantificó mediante q-PCR el ADN mitocondrial Humano (HmtDNA), Aviar, Bovino, Canino, Equino y Porcino. En cada campaña fueron determinados los parámetros fisicoquímicos del agua superficial, nutrientes y amonio. Adicionalmente, se cultivaron bacterias provenientes de las colimetrías para evaluar la multiresistencia a sustancias antimicrobianas. La información obtenida fue analizada para determinar si existe una zonación debido a la actividad antrópica.

Los resultados indican que la temperatura y el pH poseen un comportamiento estacional con un máximo durante el verano 2024 para ambos parámetros. Los nutrientes revelan altas concentraciones de fosfato promedio para toda el área de estudio ($4,99 \pm 4,5 \mu\text{mol} /\text{L}$), con un incremento significativo especialmente durante el invierno y primavera de 2024, que clasificaría a las dos lagunas en un estado hipertrófico con respecto a este nutriente. Del total de muestras analizadas de coliformes fecales 66.1% estuvieron por sobre la Nch1333. De esto un 47,5% corresponde a la Laguna Grande y un 18,6% a la Laguna Chica. El análisis de correlación de Pearson para el total de los datos muestra una correlación positiva y significativa ($p < 0,05$), entre los coliformes fecales y el número de copias de ADN mitocondrial humano, equino, canino, porcino. Así también, existen diferencias significativas ($p < 0,05$), entre la zona norte y sur de la Laguna Grande para los coliformes fecales, ADN mitocondrial humano y nutrientes.

El análisis de multiresistencia a antibióticos mostró un rango de valores para índice MAR (Multi-Antibiotic Resistance Index) entre 0,1 y 0,9. El 85% de las muestras analizadas mostraron valores superiores a 0,22 y por lo tanto corresponden a bacterias multirresistentes, incluso a antibióticos de tercera generación.

Los análisis comparativos entre Laguna Grande y Laguna Chica permitieron identificar patrones comunes y diferencias en la dinámica estacional y la procedencia de la contaminación. Los resultados confirman que existe una zonación entre el norte y el sur de la Laguna Grande, posiblemente debido a la mayor actividad antropogénica de su ribera norte. La información obtenida en el presente trabajo pretende aportar como un insumo para el diseño de estrategias de manejo y mitigación de la contaminación fecal en contextos urbanos de rápido crecimiento.

Abstract

Fecal contamination in freshwater bodies is a growing global problem, driven by population growth and the lack of urbanization. In Chile, Laguna Grande and Laguna Chica in the city hall of San Pedro de la Paz are a case study due to strong anthropogenic pressure, given their 103,808 inhabitants and the constant real estate expansion.

During 2024, four seasonal campaigns (summer, fall, winter, and spring) were conducted to assess the degree and distribution of fecal contamination and trace its source. For this purpose, human mitochondrial DNA (HmtDNA), avian, bovine, canine, equine, and porcine mitochondrial DNA were quantified using q-PCR. In each campaign, the physicochemical parameters of surface water, nutrients, and ammonium were determined. Additionally, bacteria from colimetry tests were cultured to evaluate multi-resistance to antimicrobial substances. The information obtained was analyzed to determine if zonation exists due to human activity. The results indicate that temperature and pH exhibit seasonal behavior, with a maximum during the summer of 2024 for both parameters. Nutrients reveal high average phosphate concentrations for the entire study area ($4.99 \pm 4.5 \mu\text{mol} / \text{L}$), with a significant increase especially during the winter and spring of 2024, which would classify the two lagoons in a hypertrophic state with respect to this nutrient. Of the total fecal coliform samples analyzed, 66.1% were above Nch1333. Of this, 47.5% corresponded to Laguna Grande and 18.6% to Laguna Chica. Pearson's correlation analysis for the total data shows a positive and significant correlation ($p < 0.05$) between fecal coliforms and the number of copies of human, equine, canine, and porcine mitochondrial DNA. Likewise, there are significant differences ($p < 0.05$) between the northern and southern zones of Laguna Grande for fecal coliforms, human mitochondrial DNA, and nutrients.

The analysis of multi-antibiotic resistance showed a range of values for the MAR (Multi-Antibiotic Resistance Index) between 0.1 and 0.9. Eighty-five percent of the samples analyzed showed values greater than 0.22 and therefore correspond to multi-resistant bacteria, even to third-generation antibiotics.

Comparative analyses between Laguna Grande and Laguna Chica identified common patterns and differences in seasonal dynamics and the source of contamination. The results confirm that there is zonation between the north and south of Laguna Grande, possibly due to greater anthropogenic activity on its northern shore. The information obtained in this study is intended to contribute to the design of fecal contamination management and mitigation strategies in rapidly growing urban contexts.

1. Introducción

La contaminación fecal en los cuerpos de agua es una problemática vigente debido al aumento de enfermedades infecciosas relacionadas con las descargas de aguas residuales al medio ambiente (GI., 2023; González-Saldía et al. 2019). Dichas enfermedades son catalogadas como infecciones de origen talasogénico (González-Saldía et al. 2019) y están estrechamente vinculadas a la contaminación microbiológica generada por actividades antropogénicas cercanas a los cuerpos de agua (GI., 2023; González-Saldía et al., 2019; González-Saldía et al., 2023). Los indicadores microbiológicos fecales (FIB, por sus siglas en inglés) permiten evaluar la calidad del agua y detectar la presencia de contaminación fecal de manera indirecta (Da Le et al., 2024). Estos indicadores son fundamentales para monitorear cuerpos de agua que se encuentran afectados por descargas residuales domésticas e industriales, así como por fuentes no puntuales, como la escorrentía agrícola (Da Le et al., 2024). Sin embargo, los FIB tienen limitaciones importantes, ya que no proporcionan información específica sobre si la fuente de contaminación es de origen humano o animal, lo que es crucial para la salud pública y la gestión ambiental (Díaz-Gavidia et al., 2022; Lagos., 2022).

Dentro de la actividad bacteriana que se encuentra presente en los cuerpos de agua dulce se encuentran los coliformes. Estos microorganismos representan el alrededor de 10% del microbiota intestinal de los organismos homotermos y desempeñan un papel crucial como bioindicadores de contaminación fecal, así como también del estado microbiológico en el que se encuentra el cuerpo de agua en estudio (Ishii et al., 2008; Jang et al., 2017). Dentro de este grupo de microorganismos se encuentra *E. coli*, la cual ha sido ampliamente utilizada debido a su presencia en las heces humanas y animales. Si bien, no todas las cepas de *E. coli* son patógenas, algunas de estas se encuentran asociadas a infecciones graves. (GI., 2013; Ishii et al., 2008; Jang et al., 2017).

1.1 Trazabilidad microbiana de la contaminación fecal (MST/FST)

Para abordar la necesidad planteada anteriormente, el monitoreo de fuentes de contaminación fecal (Faecal Source Tracking, FST) o de contaminación microbiana (Microbial Source Tracking, MST) ha destacado como una herramienta clave (Díaz-Gavidia et al., 2022). Estas técnicas permiten identificar si la contaminación fecal proviene de humanos o de animales, ya que las fuentes humanas suelen contener patógenos específicos como el virus de la hepatitis A, que representan un riesgo

significativo para la salud (Díaz-Gavidia et al., 2022; González-Saldía et al., 2023; González-Saldía et al., 2019; Karkman et al., 2019). En entornos urbanos, el impacto de las aguas residuales no tratadas incrementa los problemas relacionados con la contaminación fecal. Por ejemplo, en ciudades como Hanói, se descargan diariamente aproximadamente 1.200.000 m³ de aguas residuales, de las cuales solo el 20,6 % recibe tratamiento adecuado (Da Le., 2024). Este vertido afecta gravemente la calidad del agua de ríos y lagos urbanos, aumentando la presencia de coliformes y el riesgo de enfermedades infecciosas (Da Le., 2024). Además, las técnicas de MST (Microbial Source Tracking) han avanzado mediante el uso de marcadores moleculares que permiten diferenciar entre fuentes humanas y animales de contaminación (González-Saldía et al., 2023; Nevers et al., 2018). Por ejemplo, los protozoarios *Cryptosporidium* spp. y *Giardia* spp. son útiles para identificar la especificidad del huésped, proporcionando información crítica para mejorar la gestión de los recursos hídricos (Díaz-Gavidia et al., 2022).

Para identificar de manera precisa las fuentes de contaminación fecal que afectan a los cuerpos de agua, es necesario implementar estrategias efectivas de mitigación y control (Lagos, 2022). La contaminación de origen humano o animal no solo tiene implicaciones en la salud pública, sino que también permite la determinación de la fuente contaminante, lo que impulsa la gestión de políticas públicas específicas para su reducción. En particular, las fuentes de contaminación fecal humana representan un riesgo latente para la población debido a la presencia de patógenos como el virus de la hepatitis A y otros microorganismos potencialmente dañinos para la salud (González-Saldía et al., 2023; González-Saldía et al., 2019; Lagos, 2022; Karkman et al., 2019).

Para determinar si la contaminación fecal es de origen animal o humano, se han desarrollado técnicas que utilizan marcadores químicos y moleculares. Los marcadores químicos se basan en la detección de compuestos como drogas, medicamentos y cafeína, entre otras sustancias que se encuentran en la materia fecal humana debido a su consumo habitual en la población (González-Saldía et al., 2023; Lagos, 2022; González-Saldía et al., 2019). Por otra parte, los marcadores moleculares, como el ADN mitocondrial humano (HmtDNA), son una de las herramientas más eficaces para rastrear la contaminación fecal de origen humano, ya que presentan alta especificidad al detectar material genético en cuerpos de agua que reciben descargas contaminadas (González-Saldía et al., 2023; Lagos, 2022; González-Saldía et al., 2019). Además, las técnicas de MST han avanzado mediante el uso de estos marcadores moleculares, lo que permite diferenciar entre fuentes humanas y animales de contaminación (González-Saldía et al., 2023; Lagos, 2022; González-Saldía et al., 2019; Nevers et

al., 2018). Por ejemplo, los protozoarios *Cryptosporidium* spp. y *Giardia* spp. son útiles para identificar la especificidad del huésped, proporcionando información crítica para mejorar la gestión de los recursos hídricos (Díaz-Gavidia et al., 2022).

El uso conjunto de marcadores químicos y moleculares ha creado nuevas oportunidades para mejorar la gestión de los recursos hídricos. Estas herramientas no solo identifican las fuentes de contaminación, sino que también permiten evaluar su impacto y diseñar estrategias específicas para su mitigación (Lagos, 2022; González-Saldía et al., 2019). En un contexto de creciente presión sobre los recursos hídricos debido a las actividades humanas y el aumento de la población, estas técnicas representan un paso esencial para proteger la calidad del agua y la salud pública.

1.2 Contaminación fecal y su vínculo con la resistencia antimicrobiana

Sumado a lo anterior, diversos autores han identificado una relación directa entre la contaminación fecal humana y la abundancia de genes de resistencia a agentes antimicrobianos (ARGs, siglas en inglés) (Rizzo et al., 2013, Karkman et al., 2016). Estos genes otorgan resistencia a diferentes clases de antibióticos, los cuales suelen llegar a los cuerpos de agua a través de las descargas de aguas residuales. Sin embargo, la contaminación fecal humana es la causa principal de la presencia de ARGs en el medio acuático, más que la exposición directa de los antibióticos a los cuerpos de agua que reciben diversos tipos de descargas de agua residual (Rizzo et al., 2013; Karkman et al., 2019). Este fenómeno se ha vuelto un tema relevante a nivel global en el ámbito de la salud pública, aumentando los costos de atención y tasas de mortalidad (Osińska et al., 2020; González-Saldía et al., 2023). Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), las bacterias resistentes a los antibióticos representan una de las diez principales amenazas para la salud pública mundial (WHO., 2018; González-Saldía et al., 2023). Este fenómeno tiene un impacto transversal, afectando no solo a la salud humana, sino, también a la salud animal y al medio ambiente. Además, la resistencia a los antibióticos genera un aumento en los costos de atención médica y en las tasas de mortalidad asociadas a infecciones resistentes (Osińska et al., 2020; González-Saldía et al., 2023).

La resistencia a los antibióticos es un fenómeno que presenta una dinámica compleja que requiere estudios multidisciplinarios a nivel global. La falta de comprensión y estudios ante esta problemática a nivel humano y ambiental resalta la urgencia de una acción inmediata (WHO, 2018). Factores como el manejo deficiente en la prevención y control de infecciones, las prácticas inadecuadas de

saneamiento ambiental y la falta de acceso a agua potable en algunas regiones del mundo agravan la situación (Pradhan et al., 2018). Además, el uso indiscriminado de antibióticos en la salud humana, la veterinaria y la agricultura contribuye significativamente a la propagación de microorganismos resistentes (Papajová et al., 2022).

Las plantas de tratamientos de aguas residuales (PTAR) presentan un rol fundamental en la dispersión de genes de resistencia a los antibióticos (AGRs) en el medio ambiente (Rizzo et al. 2013, Karkman et al. 2016). Aunque estos sistemas están diseñados para reducir contaminantes, los residuos de antibióticos presentes en las aguas residuales generan una presión selectiva que fomenta la selección y proliferación de bacterias resistentes (Karkman et al., 2016; Wang et al., 2021). La presión selectiva ejercida por los desechos de antibióticos presentes en las aguas residuales, en conjunto con la diversidad de microorganismos presentes en los lodos activos favorece la transferencia horizontal de genes de resistencia (Mutuku et al. 2022). Sin embargo, Karkman determina que este fenómeno es menor en comparación con la presión selectiva que se ejerce en el tracto digestivo del ser humano y los animales de cría tratados con antibióticos (Karkman et al. 2016). La presencia de este tipo de desechos en las aguas residuales genera un entorno óptimo para la selección y proliferación bacteriana resistente a antibióticos (Karkman et al. 2016). El uso indiscriminado de antibióticos ha provocado el incremento de la resistencia a los antibióticos en los ecosistemas, tanto por los microorganismos liberados en los efluentes de agua como por los organismos que se encuentran aledaños a los efluentes (Rizzo et al. 2013, Karkman et al. 2016). Esto crea un entorno óptimo para la selección y proliferación bacteriana resistente, lo que incrementa los riesgos para la salud pública y ambiental (Rizzo et al. 2013, Karkman et al. 2016; WHO., 2018).

1.3 Interacción entre nutrientes, bacterias y eutrofización

Existe una interacción relevante entre los nutrientes y la actividad microbiana en los cuerpos de agua dulce, lo cual sería un aspecto crítico a considerar. Las bacterias cumplen funciones importantes dentro de los ciclos biogeoquímicos, como la descomposición de materia orgánica y la transformación de nutrientes (Fenchel et al., 2012; Maier., 2015). Las bacterias nitrificantes convierten el amoníaco en nitrato, mientras que las bacterias desnitrificantes reducen los nitratos a nitrógeno gaseoso. Por lo tanto, ambos tipos de bacterias eliminan los excesos de nitrógeno en los sistemas acuáticos (Fenchel et al., 2012; Maier., 2015). Además, las bacterias también participan en la mineralización del fósforo

elemental y liberan fósforo inorgánico, el cual es absorbido por algas y plantas acuáticas (Tian et al., 2021).

El impacto en la dinámica de los nutrientes es particularmente relevante en los cuerpos de agua dulce, donde la acumulación de compuestos nitrogenados indicaría una fuerte influencia de fuentes externas (Korajkic., et al 2019). En estos ecosistemas, los altos niveles de amonio suelen estar relacionados con el aporte de materia orgánica en descomposición como la contaminación fecal, lo que sugiere una contribución significativa de actividades antropogénicas (Korajkic., et al 2019). Sin embargo, la actividad bacteriana se puede ver afectada por factores ambientales como la disponibilidad de oxígeno y temperatura del agua, lo que impactaría en la dinámica de los nutrientes y la eutrofización de los cuerpos de agua (Gilbert., 2017; Jeppsen et al., 2010).

Finalmente, la actividad bacteriana se puede ver intensificada por la presencia excesiva de nutrientes, y materia orgánica. Así, el aumento del metabolismo de las bacterias heterótrofas puede conducir a un consumo excesivo de oxígeno, provocando condiciones hipóxicas o anóxicas que afectan a la fauna acuática, causando la muerte de peces y otros organismos acuáticos (Pörtner., 2002; Ahmad et al., 2024). Las condiciones anóxicas también pueden favorecer a la actividad de bacterias anaeróbicas, estas bacterias pueden liberar compuestos tóxicos como sulfuro de hidrógeno, agravando los problemas en la calidad del agua (Gilbert., 2017). Sumado a lo anterior, el cambio climático puede amplificar estas dinámicas, lo que podría acelerar las tasas metabólicas bacterianas y modificar los patrones de precipitación, afectando tanto a la escorrentía como a la distribución de nutrientes y comunidades bacterianas presentes en el medio (Costa et al., 2022).

La eutrofización se considera una de las formas más importantes de contaminación de los lagos debido a la intensidad de su impacto en la calidad del agua de los lagos (Guzmán.,2021; Sanhueza.,2021; EEA, 2012; OCDE, 2012). Este fenómeno es causado por la carga excesiva de nutrientes, principalmente nitrógeno (N) y fósforo (P) en las aguas superficiales, lo que conduce a una mayor producción primaria (Guzmán.,2021; Sanhueza.,2021). Dentro de las fuentes de contaminación más importantes que llegan a los ecosistemas dulceacuícolas son las descargas de aguas residuales provenientes de los hogares, sectores agrícolas aledaños al ecosistema y las descargas industriales (Van Puijenbroek et al., 2019). En muchos países, los hogares son las principales fuentes puntuales de nutrientes en áreas urbanas densamente pobladas, la presión ambiental que causan está determinada por el nivel de saneamiento, la conexión a los sistemas de

alcantarillado o la falta de ellos, la presencia y el nivel de tratamiento de aguas residuales (Carpenter.,2005; WHO.,2018; Unicef, 2017).

En diversos estudios se ha señalado al fósforo como principal factor de eutrofización. Sin embargo, tanto las proporciones de nutrientes como la relación nitrógeno-fósforo N:P y el estado en el que se encuentran presentes en el medio, pueden jugar un papel importante para la biodiversidad acuática (Pérez-Martín.,2023). Existen diversos casos en donde el proceso de eutrofización se encuentra relacionado con la presencia o el incremento de nitrógeno en el agua (Carpenter., 2005; Wu et al., 2022), lo que contradice la idea de que el fósforo se encuentra únicamente vinculado a este proceso (Carpenter., 2005).

El fósforo puede ser transportado desde suelos agrícolas sobre enriquecidos hacia los cuerpos de agua a través de procesos de erosión y escorrentía (Carpenter., 2005; Wu et al., 2022; Fanzo et al., 2021). Este proceso es particularmente común en zonas agrícolas donde la aplicación excesiva de fertilizantes ha resultado en una acumulación de fósforo en los suelos (Carpenter., 2005; Wu et al., 2022; Fanzo et al., 2021). Incluso tras reducir los aportes externos de este nutriente, los suelos enriquecidos pueden seguir aportando a la eutrofización de los lagos durante años (Carpenter., 2005). Esta problemática no es reversible a menos que se implementen cambios en la gestión de los suelos que se encuentran afectados, tecnologías que logren mitigar el contenido de fósforo en las zonas que se encuentran sobre enriquecidas o reducir las tasas de erosión (Carpenter.,2005; Kakade et al., 2021).

Existen diversas formas en las que el nitrógeno puede ingresar a los ecosistemas acuáticos. Por ejemplo, la deposición atmosférica se produce como resultado de la volatilización del amoníaco proveniente de la actividad agrícola y ganadera, mientras que la escorrentía transporta el nitrógeno inorgánico de los fertilizantes aplicados en los campos hacia los cuerpos de agua, lo que contribuye de manera significativa a la carga de nitrógeno presente en los ecosistemas acuáticos que se encuentran aledaños a estas zonas de producción (Gilbert., 2017).

Sumado a lo anterior, el cambio climático tiene un impacto directo en el suministro y transportes de nutrientes a los cuerpos de agua (Gilbert., 2017). El aumento de la temperatura y la alteración en los patrones de precipitación tienen implicancia en estos procesos (Gilbert., 2017; Suresh et al., 2023). Por ejemplo, el aumento de las temperaturas favorece al crecimiento de algas y microorganismos como cianobacterias (Gilbert., 2017; Paerl., et al 2013). Asimismo, el cambio en los patrones de precipitación puede aumentar eventos como sequías o inundaciones, lo que afectaría la

disponibilidad, como también el transporte de nutrientes a los cuerpos de agua receptores (Gilbert., 2017).

1.4 Importancia ecológica y amenazas de los lagos urbanos

Los lagos urbanos se definen como sistemas lénticos, los cuales pueden ser de origen natural o artificial, estos cuerpos de agua tienden a ser pequeños presentando una superficie de <10 km² y una profundidad en promedio de <5 m (Almanza-Marroquín et al., 2016; Beltrán., 2024; Birch & McCaskie, 1999; Guzmán., 2021). Sin embargo, existen lagos que presentan una mayor superficie y profundidad que se encuentran aledaños a las zonas urbanas debido al crecimiento urbano y poblacional de las ciudades (Almanza-Marroquín et al., 2016). Sin importar el tamaño, estos lagos presentan un papel clave para las ciudades que los rodean, ya que contribuyen a la regulación del clima urbano, almacenamiento y captación de agua lluvia, desarrollo de actividades como deportes acuáticos, pesca e incluso en algunos casos acuicultura (Almanza-Marroquín et al., 2016; Cooke et al., 2016; Torres., 2023). Sumado a lo anterior, estos cuerpos de agua funcionan como hábitat para diversas especies de flora y fauna, incrementan la calidad de vida de los habitantes y aportan a la creación de espacios recreativos, paisajísticos y culturales beneficiosos para la población (Guzmán.,2021; Torres., 2023; Sanhueza.,2021).

A pesar de su importancia, los lagos urbanos se encuentran entre los sistemas más amenazados debido a las alteraciones del régimen hídrico, la introducción de especies invasoras y la degradación de la calidad del agua producto de las actividades antrópicas desarrolladas en toda su cuenca hidrográfica (Guzmán.,2021; Sanhueza.,2021; Torres.,2023; Hughes et al., 2014). La urbanización modifica la mayoría de los componentes de la cuenca hidrográfica de estos ecosistemas acuáticos, alterando especialmente su hidrología, calidad del agua, calidad del hábitat físico, conectividad hidrológica, procesos ecológicos y la biodiversidad (Guzmán., 2021; Sanhueza.,2021; Chin, 2006; Hughes et al., 2014). Las actividades antrópicas que se encuentran relacionadas con la urbanización cercana a estos ecosistemas, incluyen la descarga de aguas residuales, el uso excesivo de fertilizantes en la agricultura, la deforestación y la urbanización descontrolada, que contribuyen a la contaminación difusa y al proceso de eutrofización de los cuerpos de agua (Guzmán., 2021; Mazzeo et al., 2002; Hughes et al., 2014). La eutrofización, en particular, es un fenómeno caracterizado por el enriquecimiento excesivo de nutrientes, que puede ser de origen natural o antrópico. Este proceso desencadena efectos negativos como la reducción de la biodiversidad, la aparición de zonas anóxicas

y la pérdida del valor estético y recreativo de los lagos (Guzmán.,2021; Sanhueza.,2021; Smith & Schindler, 2009).

1.5 Contexto local: Laguna Grande y Chica de San Pedro de la Paz

Considerando los antecedentes que se mencionaron anteriormente, dentro de esta investigación se utilizó como objeto de estudio la Laguna Grande y Laguna Chica de San Pedro de la Paz. Ambas lagunas se encuentran inmersas en el sistema lacustre de San Pedro de La Paz y son parte de un ecosistema con gran relevancia ambiental y sociocultural que corresponde al Área Metropolitana de Concepción (AMC) (Guzmán., 2021). Estos cuerpos de agua dulce se encuentran dentro de la cuenca del río Biobío, hacia el sur del AMC, el cual es el segundo centro urbano con más importancia de Chile, con una población que supera al millón de habitantes (INE., 2017; Rojas.,2018).

La Laguna Grande y Laguna Chica se encuentran ubicadas aproximadamente a 5 km de la ciudad de Concepción y forma parte de los lagos “Nahuelbutanos” (Parra et al., 2003). La Laguna Grande posee una cuenca hidrográfica de $12,7 \text{ km}^2$, con un espejo de agua de $1,55 \text{ km}^2$ y una profundidad máxima de 13,5 m, mientras que la Laguna Chica cuenta con una cuenca hidrográfica de $4,5 \text{ km}^2$, un espejo de agua de $0,82 \text{ km}^2$ y una profundidad máxima de 18 m (Cisternas et al., 2000; Guzmán., 2021; Parra., 2003). Ambos cuerpos de agua son receptores de principalmente de precipitaciones y escorrentías. En las últimas décadas, la comuna de San Pedro de La paz a tenido un crecimiento demográfico acelerado, posicionándola como una de las comunas con el mayor crecimiento urbano (INE., 2017). Según el CENSO realizado el año 2017, la comuna de San Pedro de La Paz alcanzo una población de 131.808 personas, presentando una tasa de crecimiento anual del 1,7 % y un 3,3% entre los años 1992-2002-2017, respectivamente (INE., 2017). Este crecimiento acelerado ha traído consigo la ocupación de la rivera de ambas lagunas donde se han establecido balnearios, clubes náuticos, residencias privadas y centros recreativos. Considerando lo anterior, este tipo de actividades ha contribuido a la contaminación del agua de ambas lagunas a través de la eutrofización producto de las descargas de aguas residuales en conjunto con las escorrentías urbanas (Guzmán., 2021; Parra., 2013).

La contaminación fecal en cuerpos de agua cercanos a centros urbanos está fuertemente influenciada por las actividades antrópicas en su entorno. Por ello, evaluar su distribución espacial es fundamental

para comprender su dinámica y posibles fuentes. En Chile, la normativa NCh1333 establece límites estrictos para la calidad del agua en cuerpos de agua destinados a actividades recreativas, a través del Decreto 144/2009, que fija un máximo de 1000 NMP/100 mL de coliformes fecales. Además, el artículo 4 de esta norma indica que valores superiores a este umbral constituyen una situación de emergencia ambiental. En este contexto, y considerando el aumento de la población aledaña a la Laguna Grande y Laguna Chica de San Pedro de la Paz, el cumplimiento de estos estándares podría verse comprometido, afectando tanto la salud pública como la integridad del ecosistema. Dado que la presencia y concentración de contaminación fecal pueden estar moduladas por la distribución de las actividades antrópicas en la ribera, surge la hipótesis de que la Laguna Grande presenta una zonación en su contaminación fecal, reflejando la influencia diferencial de las fuentes de contaminación a lo largo de su borde.

2. Hipótesis

La contaminación fecal de la Laguna Grande posee una zonación debido a la distribución de la actividad antrópica en su ribera.

3. Objetivo general

Trazar el origen de la contaminación fecal presente en la Laguna Grande y Laguna Chica, considerando los aportes debido a la zonación que existe para la población humana que habita su ribera.

3.1 Objetivos específicos

3.1.1 Analizar la dinámica estacional y zonación de los coliformes totales, fecales y nutrientes (Amonio, Fosfato, Nitrato y Nitrito) en la Laguna grande y Laguna Chica de San Pedro de la Paz.

3.1.2 Determinar la relación existente del ADN mitocondrial Humano (Hmt), Aviar, Canino, Bovino, Equino, Porcino, determinado mediante q-PCR con los coliformes fecales, para trazar el origen de la contaminación antropogénica y animal en ambas lagunas.

3.1.3 Identificar riesgos microbiológicos mediante la determinación a gentes antimicrobianos en bacterias aisladas para la Laguna Grande, empleando antibiogramas.

4. Metodología

El área de estudio corresponde a los lagos Laguna Grande (36°50'51"S 73°06'36"O) y Laguna Chica (36°50'40"S 73°05'15"O) ubicados en la comuna de San Pedro de la Paz, la cual limita al sur con la comuna de Coronel, situadas aproximadamente a cinco kilómetros de la ciudad de Concepción. (tabla con coordenadas)



Figura 1: Puntos de muestreo de Laguna Grande, San Pedro de La Paz. Imagen extraída de Google earth.



Figura 2: Puntos de muestreo de Laguna Chica, San Pedro de La Paz. Imagen extraída de Google earth.

4.1 Diseño del muestreo y recolección de muestras

Para evaluar el grado de contaminación fecal y determinar su distribución, se realizaron cuatro campañas estacionales durante el año 2024, analizando un total de 59 muestras. Las muestras fueron recolectadas en botellas estériles de 1000 mL por duplicado. En terreno, se midió la temperatura y el pH utilizando un pHmetro Hanna. Posteriormente, las muestras fueron transportadas al Laboratorio de Bioquímica y Biotecnología de Organismos Marinos del Departamento de Oceanografía de la Universidad de Concepción, donde fueron analizadas dentro de un rango de 2 a 3 horas tras su obtención.

4.2 Análisis microbiológico de coliformes por colimetría

Para determinar el número más probable (NMP) de coliformes totales y fecales, se aplicó la técnica de colimetría, basada en el protocolo PRT-712.03-005 (ISP-2010) para agua dulce. Se realizó un test presuntivo en medio Lauril, utilizando 25 tubos de ensayo por muestra (quintuplicado con 5 diluciones) e incubación a 35 °C durante 48 horas. Los tubos que presentaron gas y turbidez fueron transferidos, con un asa estéril de 10 µL, a medio BBV para coliformes totales y medio EC para coliformes fecales, con incubación a 35 °C y 44.5 °C respectivamente, durante 48 horas.

Adicionalmente, se filtraron volúmenes de 0.05 L para la determinación de nutrientes utilizando pirinolas con filtros 0.22 µm, 0.5 L y 1 L de cada muestra y su duplicado a través de tamices de nytex con filtros de membrana de polietersulfona y éster de celulosa mixto (Millipore, 0.22 µm). Estos filtros se reservaron para futuros análisis de ADN mitocondrial humano y ADN canino mediante q-PCR.

4.3 Extracción de ADN ambiental

La extracción de ADN ambiental será realizada mediante un protocolo modificado utilizando Wizard® Genomic DNA purificación kit. El cual consiste, en resumen; al tubo Eppendorf con el filtro, descrito anteriormente, se agregan 900 µl solución lisis celular, se mezcla por inversión e incuba a temperatura ambiente por 20 min. Posteriormente se centrifuga a 14000 rpm x 5 minutos, se descarta el sobrenadante y se agregan 500 µl de solución nuclear lisis. Se mezcla por inversión y se añade 200 µl de solución precipitación de proteínas. Se mezcla en vortex por 1min traspasando el sobrenadante a un nuevo tubo para centrifugar a 14000 rpm x 3 minutos. Nuevamente se transfiere el sobrenadante a un tubo nuevo y agrega 550 µl de isopropanol absoluto. Se mezcla por inversión y se precipita del ADN a -20°C por 12 horas. Posteriormente se centrifuga 2 min, se descarta el sobrenadante y agregan 550 µl de etanol frío al 70%. Se centrifuga por 2 min a 14000 rpm y se descarta el sobrenadante. Luego se deja secar 15 min a temperatura ambiente y se agregan 50 µl de solución de rehidratación dejándose solubilizar por 12 horas a 4°C.

4.4 q-PCR para identificación de ADN mitocondrial

La amplificación del ADN mitocondrial humano y canino mediante q-PCR se realizó utilizando el termociclador Rotor-Gene 6000, siguiendo un protocolo optimizado para garantizar la especificidad y eficiencia de la reacción. El programa térmico incluyó una fase de activación inicial a 95°C durante 15 minutos, seguida de 40 ciclos de amplificación. Cada ciclo consistió en una etapa de desnaturalización a 95°C por 20 segundos y una etapa de alineamiento y extensión a 60°C durante 60 segundos. Estos parámetros fueron seleccionados para favorecer la amplificación específica del ADN de todas las especies.

Para la amplificación del ADN mitocondrial humano y el resto de los otros ADN's se utilizaron las siguientes secuencias provenientes de la investigación de B. Schill., et al 2008

Humano:	<ul style="list-style-type: none"> ● Forward: AGT CCC ACC CTC ACA CGA TTC TTT ● Reverse: AGT AAG CCG AGG GCG TCT TTG ATT ● Probe: ACC CTT CAT TAT TGC AGC AGC ACT
Bovino:	<ul style="list-style-type: none"> ● Forward: AAT GCA TTC ATC ACA CTT CCA GCC ● Reverse: ACG TCT CGG CAG ATA TGG GTA ACA ● Probe: TCG GTT CCC TCC TGG GAA TCT GCC T
Porcino:	<ul style="list-style-type: none"> ● Forward: CGA CAA AGC AAC CCT CAC ACG ATT ● Reverse: TAG GGT TGT TGA TGC TTT CGT ● Probe: ATC CTG CCA TTC ATC ATT ACC GCC CT
Aviar:	<ul style="list-style-type: none"> ● Forward: TAG CCA TGG ACT ACA CAG ACA ● Reverse: TTT GCG TGG AGA ATG AGT ● Probe: ACT TGC GCT CTC TAC TGC GC
Equino	<ul style="list-style-type: none"> ● Forward: AGG AGC AAC AGT CAT CAC GAA CCT ● Reverse: AAA TGT ACG ACT ACC AGG GCT GTG ● Probe: ATC GGT ACT ACC CTC GGA TGA AT
Canino:	<ul style="list-style-type: none"> ● Forward: CCA CAG CAT TCA TGG GCT ATG TAC T ● Reverse: AGC TGC GAT GAT GAA AGG GAG GAT ● Probe: CAG TGG ACA AAG CCA CCC TAA CAC GA

La cuantificación del número de copias de ADN mitocondrial humano, canino, bovino, porcino, aviar y equino se llevó a cabo mediante la construcción de curvas estándar obtenidas a partir de diluciones seriadas de 10^2 a 10^8 copias μL^{-1} de fragmentos amplificados de cada uno de estos ADN's. El cálculo del número de copias de los amplicones se realizó según la siguiente ecuación $N = [D / (AL \times 660)] \times 6,022 \times 10^{23}$, descrita por Kapoor et al. (2013), considerando la concentración de ADN del amplicón y su longitud en pares de bases. De esta forma, se determinó un rango lineal de cuantificación entre 10^2 y 10^8 copias μL^{-1} , equivalente a 10^5 a 10^{11} copias por 100 mL de muestra (González-Saldía et al., 2019; Kapoor et al., 2013).

4.5 Cultivo y aislamiento de cepas resistentes a antibióticos

Posterior al análisis de las colimetrías provenientes del muestreo de primavera, se inoculó con un asa 10 µl de muestra provenientes de caldo EC en tubos de ensayo con 5 ml de Caldo Lauril y se incubaron a 35°C durante 48 horas para favorecer el crecimiento bacteriano. Luego se cultivaron 100 µl de muestra en placas con agar LB (CaCl₂; Peptona; extracto de levadura; glicerol; agar, agua destilada) suplementadas Penicilina/Estreptomicina (30 µg/mL) durante 24 horas, con el fin de obtener colonias aisladas resistentes al antibiótico.

Seguido de lo anterior, con un asa de 10 µl se tomó una colonia de cada placa con el fin de amplificar cada colonia en 5 ml de caldo Lauril durante 48 horas a 35°C. Posteriormente, se sembraron 100 µl de cada cepa de manera homogénea en agar LB suplementado con Penicilina/estreptomicina (30 µg/mL) y Agar MacConkey por duplicado.

La resistencia a antibióticos se realizó mediante la técnica de difusión en agar con 11 antibióticos (Valtek): CIP (Ciprofloxacino) 5 µg, CTX (Cefotaxima) 30 µg, CXM (Cefuroxima) 30 µg, SAM (Ampicilina/Sulbactam) 10 µg, AK (Amikacina) 30 µg, GE (Gentamicina) 10 µg, CF (Cefoxitina) 30 µg, CAZ (Ceftazidima) 30 µg, IPM (Imipenem) 10 µg, STX (Trimetoprima -Sulfametoxazol) 25 µg, CL (Colistina) 10 µg.

La interpretación de los halos de inhibición obtenidos en las pruebas de difusión en agar se realizó de acuerdo con los puntos de corte establecidos por el European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) y el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), lo que permitió determinar la resistencia, sensibilidad o resistencia intermedia de las cepas frente a cada antibiótico evaluado.

4.6 Determinación de nutrientes

Para la determinación de la concentración de nutrientes en las lagunas Grande y Chica de San Pedro de la Paz, se emplearon cuatro colorímetros portátiles de la marca Hanna Instruments, diseñados para medir parámetros clave en la calidad del agua.

La detección de amoníaco se realizó utilizando el HI700 Checker HC, diseñado específicamente para analizar este compuesto como parte del ciclo del nitrógeno. Este equipo, utilizado para análisis ambientales, permite obtener resultados mediante el método Nessler. Su intervalo de detección es de 0,00 a 3,00 ppm de $\text{NH}_3\text{-N}$, con una resolución de 0,01 ppm y una exactitud de $\pm 0,05$ ppm o $\pm 5\%$ de la lectura. La reacción entre el amoníaco y los reactivos genera un tinte amarillo en la muestra, detectado por una fotocelda de silicio con fuente de luz LED a 470 nm. Las mediciones se realizaron en terreno y los valores registrados se emplearon para análisis posteriores.

La determinación de fosfato se llevó a cabo utilizando el HI744 Checker HC, diseñado para aplicaciones en acuicultura y estudios de calidad del agua. Este equipo mide fosfato (PO_4^{3-}), un parámetro clave en el control de la calidad del agua debido a su influencia en el crecimiento de algas y los niveles de oxígeno disuelto. El método empleado se basa en la adaptación del método de ácido ascórbico descrito en la 20ª edición de los métodos estándar para el examen de aguas residuales. El intervalo de detección del equipo es de 0,00 a 0,90 ppm, con una resolución de 0,01 ppm y una exactitud de $\pm 0,02$ ppm o $\pm 5\%$ de la lectura. La reacción entre el fosfato y los reactivos produce un tinte azul, detectado por una fotocelda de silicio con fuente de luz LED a 525 nm.

Para la detección de nitrito, se utilizó el HI764 Checker HC, diseñado específicamente para la medición de este parámetro como parte del ciclo del nitrógeno. Este equipo, ideal para análisis ambientales, opera bajo el método EPA Diazotization 354,1. El intervalo de detección es de 0 a 200 ppb, con una resolución de 1 ppb y una exactitud de ± 10 ppb o $\pm 4\%$ de la lectura. La reacción química entre el nitrito y los reactivos genera un cambio de color en la muestra de color rosado pálido que es detectado por una fotocelda de silicio con fuente de luz LED a 525 nm.

Finalmente, para la detección de nitratos en muestras de agua salada, se empleó el HI781 Checker HC, diseñado para medir niveles bajos de este parámetro en acuarios marinos. Este equipo, ideal para aplicaciones en biología marina, tiene un intervalo de detección de 0,00 a 5,00 ppm como NO_3^- (o hasta 50,0 ppm mediante dilución), con una resolución de 0,01 ppm y una exactitud de $\pm 0,25$ ppm o

$\pm 2\%$ de la lectura. La reacción química entre el nitrato y el reactivo genera una coloración rosa/violeta en la muestra, detectada por una fotocelda de silicio con fuente de luz LED a 525 nm.

4.7 Análisis estadísticos

Se realizaron análisis estadísticos no paramétricos para las pruebas de hipótesis de comparación de promedio entre campañas y la zona norte y sur de la Laguna Grande, para los parámetros microbiológicos, fisicoquímicos, los perfiles de resistencia antimicrobiana y la detección de ADN mitocondrial de origen humano, aviar, canino, bovino, equino y porcino obtenidos durante el estudio.

Las correlaciones entre coliformes totales, coliformes fecales, temperatura, pH, concentraciones de nutrientes (nitrito, nitrato, amonio y fosfato) y la detección de ADN mitocondrial humano y canino fueron determinadas utilizando el coeficiente de correlación de Pearson asumiendo la normalidad de los datos (n=58). Para evaluar diferencias significativas entre estaciones del año y zonas de muestreo, se empleó la prueba de Friedman, seguida de la prueba post-hoc de Dunn-Bonferroni.

Respecto a los resultados del antibiograma, se calcularon los porcentajes de resistencia para cada antibiótico, así como el índice de resistencia antimicrobiana múltiple (MAR, por sus siglas en inglés), con el objetivo de evaluar el grado de multiresistencia en las cepas aisladas. Todos los análisis estadísticos fueron realizados utilizando el software DATAtab. Los resultados obtenidos fueron integrados gráficamente para facilitar su interpretación y visualización.

5. Resultados

5.1 Análisis estacional de coliformes

De acuerdo a los datos obtenidos durante el periodo de muestro del año 2024 de ambas lagunas. El análisis de coliformes totales y fecales presento variabilidad estacional. El valor promedio más alto de coliformes totales se observó en otoño ($101,380 \pm 74,445$ NMP/100 mL), seguido por verano ($64,083 \pm 66,079$ NMP/100 mL), primavera ($29,113 \pm 54,665$ NMP/100 mL) e invierno ($18,555 \pm 38,761$ NMP/100 mL), siendo esta última la estación con el valor más bajo.

Para los coliformes fecales, los valores promedios también presentaron su punto máximo en otoño ($97,246 \pm 79,562$ NMP/100 mL), seguido por verano ($34,287 \pm 42,918$ NMP/100 mL), primavera ($26,144 \pm 55,998$ NMP/100 mL) e invierno ($569 \pm 1,466$ NMP/100 mL). El análisis estadístico mediante la prueba de Friedman mostró diferencias significativas entre estaciones del año para ambas variables ($p < 0,001$), la prueba de Dunn mostro diferencias significativas entre otoño e invierno (valor $p = 0,009$), primavera e invierno ($p = 0,001$) y verano e invierno ($p = 0,009$) para los coliformes fecales.

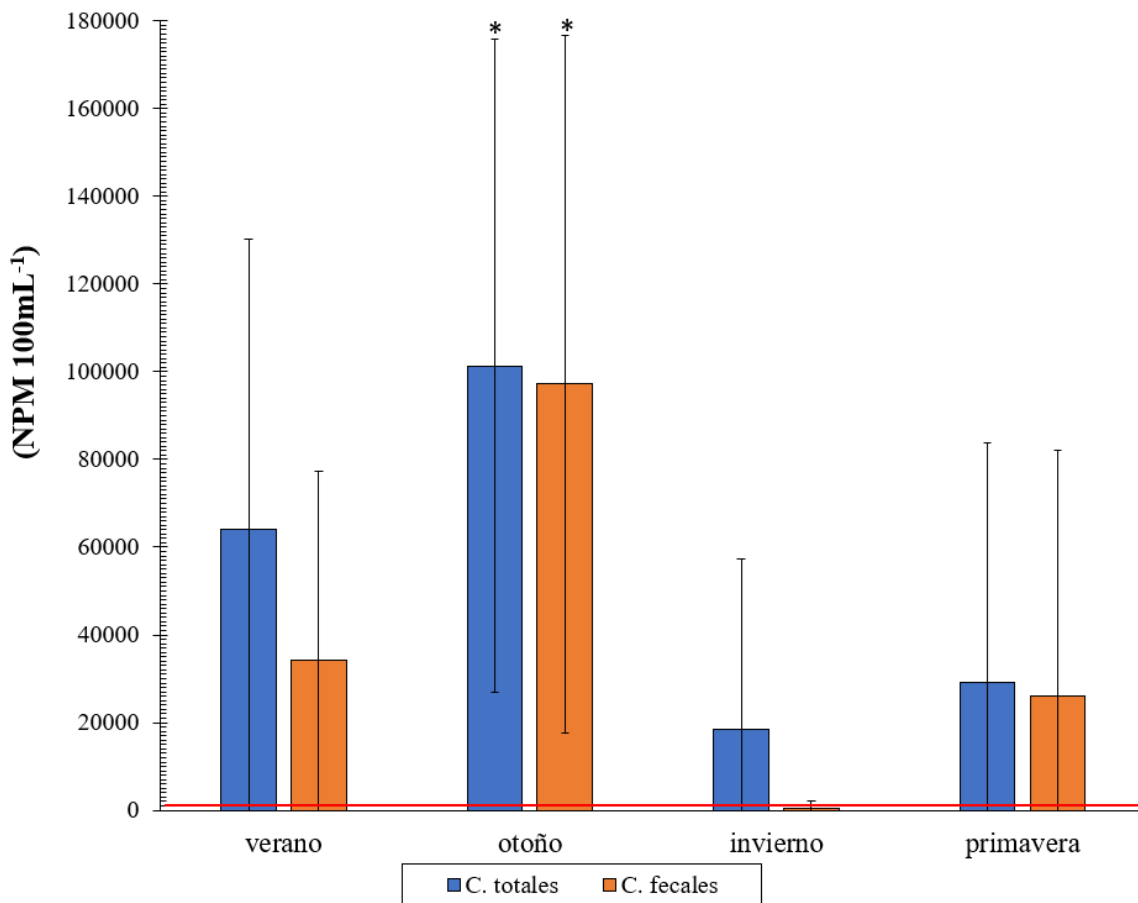


Figura 3: Promedio de coliformes totales y fecales por estación del año 2024 en ambas la Lagunas de San Pedro de la Paz, expresado en NMP/100 mL. Las barras de error representan la desviación estándar. La línea roja indica el límite máximo permitido de 1000 NMP/100 mL según la norma chilena NCh1333. El asterisco (*) indica diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las concentraciones de coliformes fecales y totales a lo largo de las estaciones del año.

5.2 Análisis estacional de marcadores moleculares

En cuanto a los marcadores moleculares, el ADN mitocondrial humano (HmtDNA) presentó su valor máximo durante otoño ($7,795 \pm 3,749$ N°copias/100 mL), y mínimo en invierno ($1,414 \pm 667$ N°copias/100 mL). El marcador de origen canino registró su mayor valor en otoño ($1,752 \pm 1,337$ N°copias/100 mL), y el menor en invierno (868 ± 455 N°copias/100 mL). En el caso del ADN equino, los valores oscilaron entre 962 ± 619 N°copias/100 mL en otoño y 217 ± 192 N°copias/100 mL en invierno. Para el ADN porcino, se obtuvo una concentración máxima en otoño ($1,752 \pm 1,449$ N°copias/100 mL) y mínima en invierno (180 ± 181 N°copias/100 mL). El marcador aviar presentó

su mayor concentración en otoño ($1,460 \pm 793$ N°copias/100 mL) y la más baja en primavera (458 ± 324 N°copias/100 mL). Finalmente, el ADN bovino mostró su valor más alto en verano (910 ± 710 copias/100 mL) y el menor en invierno (171 ± 165 c N°copias/100 mL). La prueba de Friedman evidenció diferencias estadísticamente significativas entre estaciones para todos los marcadores moleculares analizados ($p < 0,001$). La prueba de Dunn indicó diferencias significativas entre los siguientes pares de datos: humano-verano con aviar-verano ($p = 0,001$), humano-verano con bovino-verano ($p = 0,001$), humano-verano con equino-verano ($p < 0,001$), humano-verano con porcino-verano ($p < 0,001$), humano-invierno con bovino-invierno ($p < 0,001$), humano-invierno con equino-invierno ($p < 0,001$), humano-invierno con porcino-invierno ($p < 0,001$), humano-invierno con aviar-invierno ($p = 0,003$), humano-primavera con porcino-primavera ($p < 0,001$), humano-primavera con equino-primavera ($p < 0,001$), humano-primavera con bovino-primavera ($p < 0,001$), humano-primavera con aviar-primavera ($p < 0,001$), humano-otoño con bovino-otoño ($p < 0,001$), humano-otoño con equino-otoño ($p = 0,002$), humano-otoño con porcino-otoño ($p = 0,007$), humano-otoño con aviar-otoño ($p < 0,001$), equino-verano con canino-verano ($p = 0,004$), canino-verano con porcino-verano ($p < 0,001$), canino-invierno con porcino-invierno ($p < 0,001$), canino-otoño con porcino-otoño ($p = 0,001$)

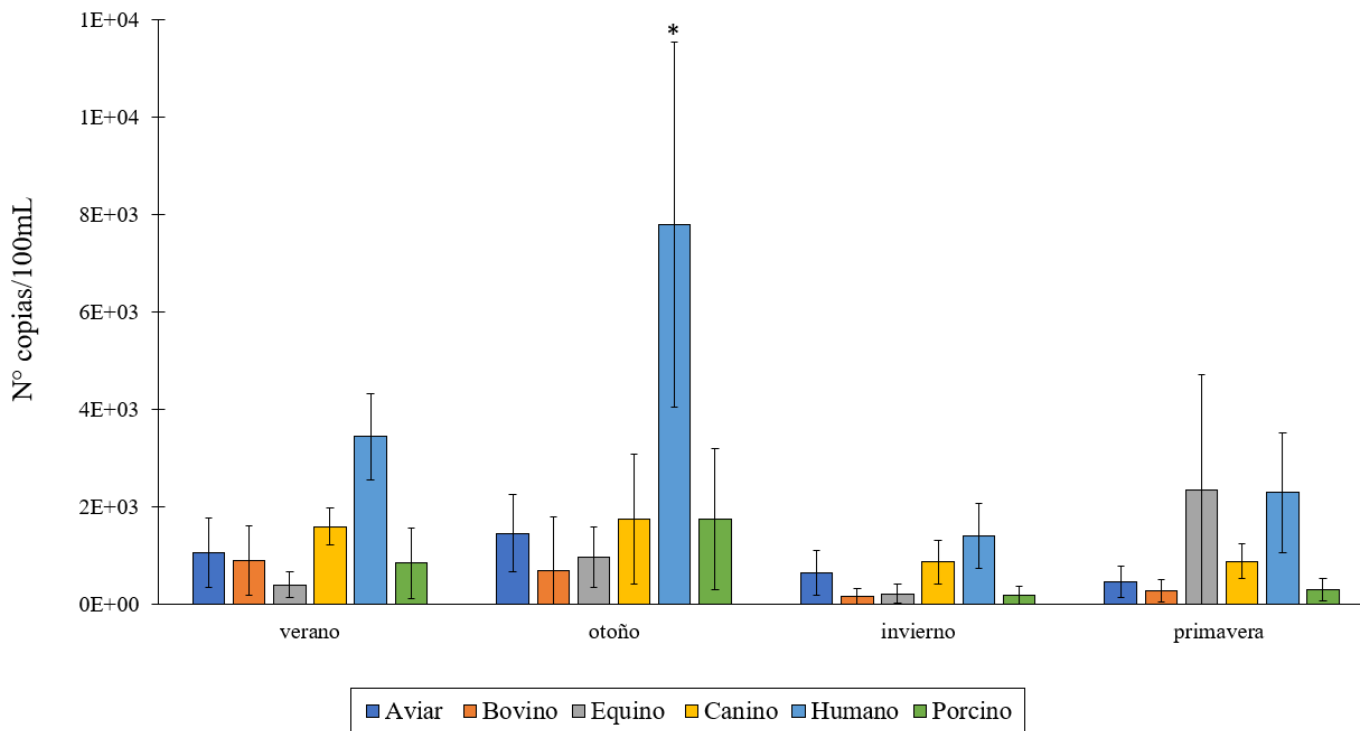


Figura 4: Concentración estacional promedio de los marcadores moleculares de origen humano y animal (N° copias/100 mL) en las lagunas de San Pedro de la Paz del año 2024. Las barras de error representan la desviación estándar. El asterisco (*) indica diferencias significativas ($p < 0,05$) entre estaciones y la presencia de los marcadores moleculares.

5.3 Análisis del índice Mar (Multi-Antibiotic Resistance Index)

El análisis del índice MAR (Multi-Antibiotic Resistance Index) en diferentes puntos de muestreo de la Laguna Grande durante la campaña de primavera de 2024 evidenció variabilidad según el medio de cultivo utilizado (LB y MacConkey). En el medio MacConkey, los valores más altos del índice MAR se observaron en las estaciones Est. 22, Est. 23 y Est. 24, con valores cercanos o iguales a 1,0. En estas mismas estaciones, los cultivos en medio LB alcanzaron valores en torno a 0,7. La estación Est. 26 y el punto Planta Elevadora también presentaron índices MAR elevados en ambos medios, con valores aproximados de 0,8 en MacConkey y de 0,6 a 0,7 en LB. La estación Est. 25 mostró un índice MAR de aproximadamente 0,6 en ambos medios. En el punto Desagüe, el índice MAR fue de 0,6 en MacConkey y de 0,3 en LB. En la estación Est. 21 y en el punto D. Kayak se registraron los

valores más bajos, con índices MAR en torno a 0,1. Finalmente, los puntos M. Viejo y P. Anfiteatro presentaron valores intermedios, con índices entre 0,4 y 0,6 en MacConkey, y entre 0,3 y 0,4 en LB.

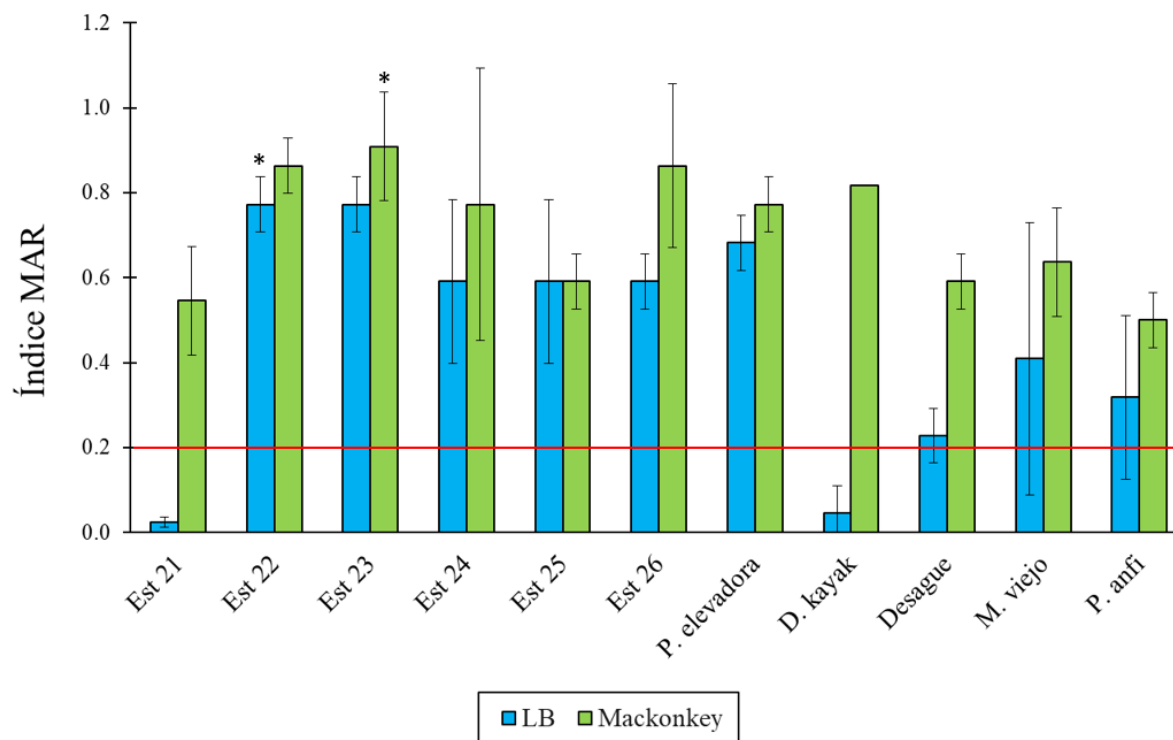


Figura 5: Índice de resistencia antimicrobiana múltiple (MAR) en distintos puntos de muestreo de la Laguna Grande de San Pedro de la Paz durante la primavera. Los valores de MAR se presentan para dos medios de cultivo: LB (azul) y MacConkey (verde). La línea roja representa el umbral de 0.2, que indica el límite por encima del cual se considera una alta presión de antibióticos en el ambiente. Los valores incluyen barras de error que representan la desviación estándar de las mediciones. El asterisco (*) indica diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los distintos puntos de muestreo en ambos medios.

5.4 Análisis estacional de parámetros físico-químicos

En relación a los nutrientes, El nitrato presentó su valor promedio más alto en otoño ($23,90 \pm 61,97 \mu\text{mol/L}$), seguido de invierno ($17,99 \pm 8,42 \mu\text{mol/L}$), primavera ($16,21 \pm 17,87 \mu\text{mol/L}$) y verano ($1,38 \pm 4,12 \mu\text{mol/L}$). Para el nitrito, la mayor concentración promedio se registró en invierno ($0,25 \pm 0,14 \mu\text{mol/L}$) y la menor en verano ($0,12 \pm 0,13 \mu\text{mol/L}$). El amonio alcanzó su valor máximo durante el invierno ($4,22 \pm 4,67 \mu\text{mol/L}$), seguido de verano ($2,26 \pm 7,84 \mu\text{mol/L}$), primavera ($1,52$

$\pm 1,49 \mu\text{mol/L}$) y otoño ($0,57 \pm 1,31 \mu\text{mol/L}$). Finalmente, el fosfato presentó su concentración más alta en invierno ($7,44 \pm 3,05 \mu\text{mol/L}$) y la más baja en verano ($3,88 \pm 2,77 \mu\text{mol/L}$).

La prueba de Friedman mostró diferencias significativas entre las estaciones del año para las concentraciones de nutrientes ($p < 0,001$). La prueba de Dunn indicó diferencias significativas entre las concentraciones de nitrato de verano respecto de otoño, invierno y primavera ($p < 0,001$), entre verano e invierno para el nitrito ($p = 0,049$), entre verano e invierno para el amonio ($p = 0,019$), y entre verano e invierno, así como entre verano y primavera, para el fosfato ($p < 0,001$ y $p = 0,004$, respectivamente).

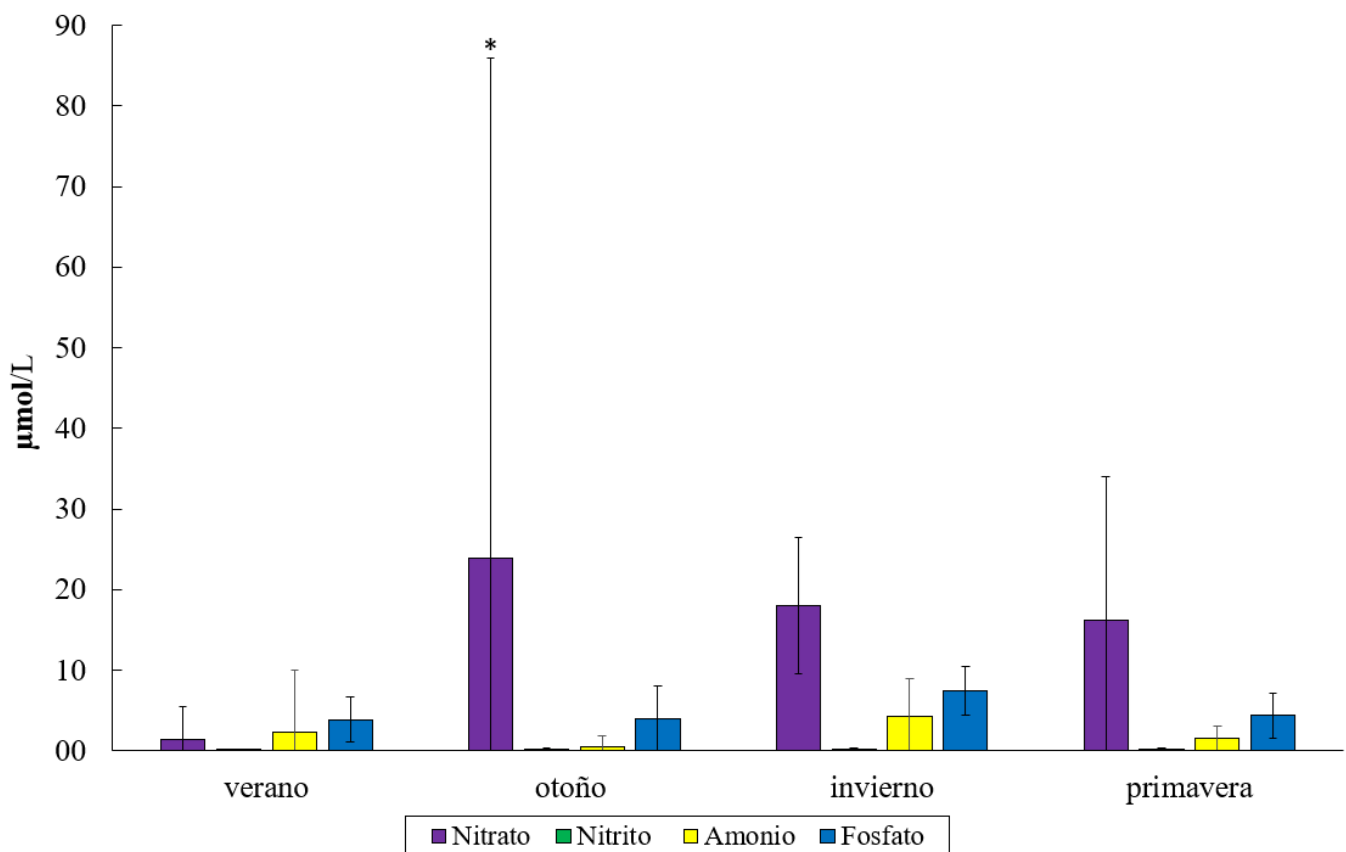


Figura 6: Concentraciones promedio de nitrato, nitrito, amonio, fosfato ($\mu\text{mol/L}$) en las Lagunas de San Pedro de la Paz durante las estaciones del año 2024. Las barras de error representan la desviación estándar. El asterisco (*) indica diferencias significativas ($p < 0,05$) entre estaciones

En relación con los parámetros físico-químicos, el pH tuvo su mayor valor en primavera ($8,50 \pm 0,18$) y el menor en otoño ($7,11 \pm 0,21$). La temperatura del agua alcanzó su valor máximo en verano ($23,98 \pm 0,45$ °C) y el mínimo en invierno ($13,29 \pm 2,59$).

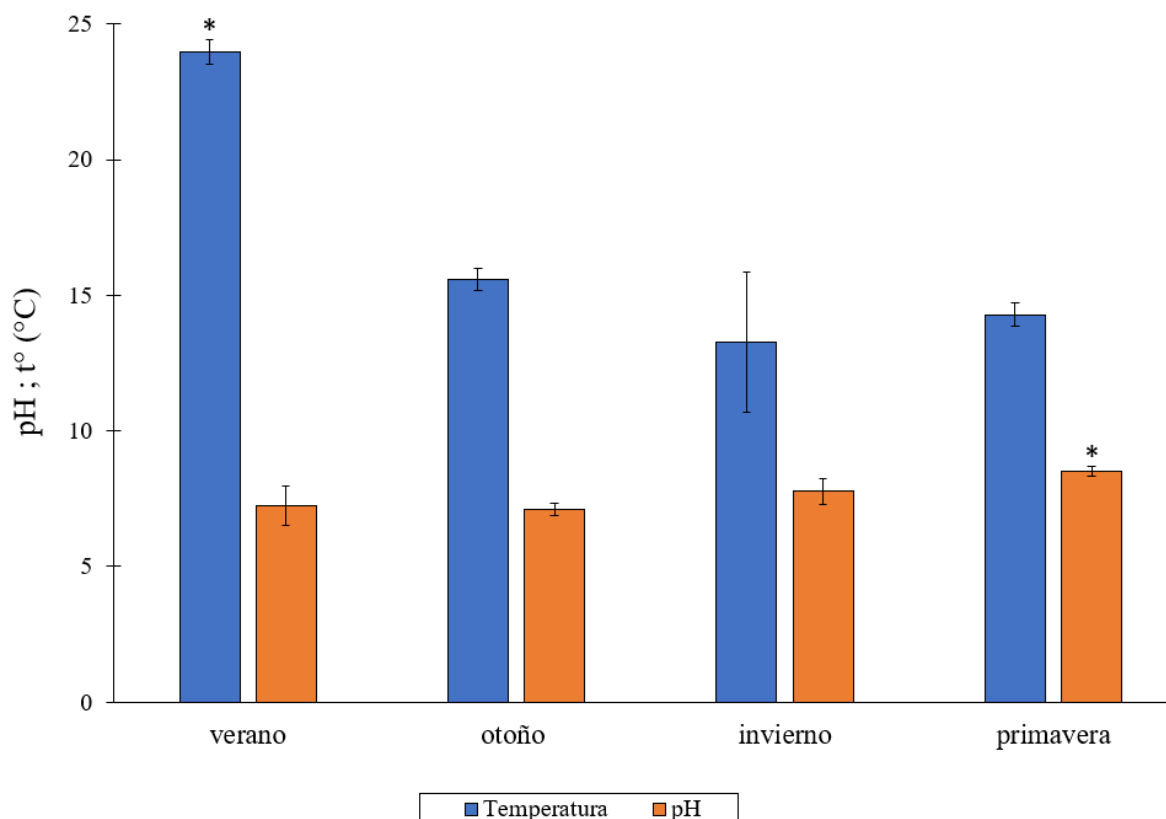


Figura 7: Variación estacional de pH y temperatura superficial de la Laguna Grande y Chica de San Pedro de la Paz, durante el año 2024. Las barras azules representan el valor promedio de pH, mientras que las naranjas corresponden a la temperatura promedio (°C) registrada en cada estación. Las barras de error indican la desviación estándar. El asterisco (*) indica diferencias significativas ($p < 0,05$) entre estaciones para temperatura y pH.

Tabla N°1: Resumen de parámetros obtenidos durante el periodo de muestreo del año 2024 la Laguna Grande y Chica de San Pedro de la Paz (promedios \pm desviación estándar)

VARIABLES	Verano	Otoño	Invierno	Primavera
Coliformes Totales (NMP 100mL-1)	64,083 \pm 66,079	101,380 \pm 74,445	18,555 \pm 38,761	29,113 \pm 54,665
Coliformes Fecales (NMP 100mL-1)	34,287 \pm 42,918	97,246 \pm 79,562	569 \pm 1,466	26,144 \pm 55,998
Nitrato (μ mol/L)	1,38 \pm 4,12	23,90 \pm 61,97	17,99 \pm 8,42	16,21 \pm 17,87
Fosfato (μ mol/L)	3,88 \pm 2,77	3,95 \pm 4,08	7,44 \pm 3,05	4,36 \pm 2,79
Nitrito (μ mol/L)	0,12 \pm 0,13	0,20 \pm 0,16	0,25 \pm 0,14	0,20 \pm 0,13
Amonio (μ mol/L)	2,26 \pm 7,84	0,57 \pm 1,31	4,22 \pm 4,67	1,52 \pm 1,49
ADN Aviar (N°copias/100 mL)	1,054 \pm 710	1,460 \pm 793	652 \pm 458	458 \pm 324
ADN Bovino (N°copias/100 mL)	910 \pm 710	691 \pm 1,105	171 \pm 165	284 \pm 236
ADN Equino (N°copias/100 mL)	406 \pm 274	962 \pm 619	217 \pm 192	295 \pm 229
ADN Canino (N°copias/100 mL)	1,599 \pm 383	1,752 \pm 1,337	868 \pm 455	887 \pm 353
ADN Humano (N°copias/100 mL)	3,441 \pm 890	7,795 \pm 3,749	1,414 \pm 667	2,294 \pm 1,226
ADN Porcino (N°copias/100 mL)	852 \pm 723	1,752 \pm 1,449	180 \pm 181	295 \pm 229
pH	7,25 \pm 0,71	7,11 \pm 0,21	7,77 \pm 0,47	8,50 \pm 0,18
Temperatura ($^{\circ}$ C)	23,98 \pm 0,45	15,58 \pm 0,41	13,29 \pm 2,59	14,27 \pm 0,43

5.5 Correlaciones entre Coliformes, marcadores moleculares y parámetros fisicoquímicos

Tabla 2: Matriz de correlación de Pearson entre coliformes totales, coliformes fecales, nutrientes (nitrato, fosfato, nitrito, amonio), temperatura, pH y biomarcadores de origen humano y animal (canino, equino, porcino, aviar y bovino). Se presentan los coeficientes de correlación (r) y los valores de significancia (p).

		C. totales (NPM 100mL ⁻¹)	C.fecales (NPM 100mL ⁻¹)	Nitrato(μmol/L)	Fosfato (μmol/L)	Nitrito (μmol/L)	Amonio (μmol/L)	Aviar (N°copias/100 mL)	Bovino (N°copias/100 mL)	Equino (N°copias/100 mL)	Canino (N°copias/100 mL)	Humano (N°copias/100 mL)	Porcino (N°copias/100 mL)	pH	Temperatura
C. totales (NPM 100mL ⁻¹)	Correlación	1	0.89	0.15	-0.35	-0.05	0.05	0.36	0.18	0.17	0.39	0.56	0.52	-0.27	0.15
	p		< 0.001	0.272	0.007	0.703	0.728	0.006	0.186	0.212	0.002	< 0.001	< 0.001	0.044	0.272
C.fecales (NPM 100mL ⁻¹)	Correlación	0.89	1	0.18	-0.33	-0.06	-0.03	0.47	0.2	0.23	0.4	0.65	0.58	-0.24	0.05
	p	< 0.001		0.186	0.012	0.666	0.823	< 0.001	0.123	0.087	0.002	< 0.001	< 0.001	0.071	0.714
Nitrato(μmol/L)	Correlación	0.15	0.18	1	0.22	0.4	0.14	0.13	-0.02	0.14	0.05	0.19	-0.01	-0.09	-0.21
	p	0.272	0.186		0.099	0.002	0.295	0.333	0.858	0.279	0.689	0.147	0.936	0.503	0.107
Fosfato (μmol/L)	Correlación	-0.35	-0.33	0.22	1	0.3	0.14	-0.27	-0.09	-0.25	-0.13	-0.19	-0.24	0.16	-0.17
	p	0.007	0.012	0.099		0.022	0.291	0.039	0.485	0.061	0.333	0.154	0.071	0.227	0.201
Nitrito (μmol/L)	Correlación	-0.05	-0.06	0.4	0.3	1	0.31	-0.1	-0.12	0.07	-0.05	-0.09	-0.18	0.05	-0.21
	p	0.703	0.666	0.002	0.022		0.02	0.449	0.378	0.58	0.722	0.516	0.167	0.706	0.11
Amonio (μmol/L)	Correlación	0.05	-0.03	0.14	0.14	0.31	1	0.07	0	-0.04	-0.14	-0.16	-0.09	0.28	-0.15
	p	0.728	0.823	0.295	0.291	0.02		0.585	0.978	0.745	0.287	0.232	0.525	0.031	0.258
Aviar (N°copias/100 mL)	Correlación	0.36	0.47	0.13	-0.27	-0.1	0.07	1	0.26	-0.02	0.03	0.46	0.3	-0.33	0.14
	p	0.006	< 0.001	0.333	0.039	0.449	0.585		0.046	0.881	0.837	< 0.001	0.024	0.012	0.312
Bovino (N°copias/100 mL)	Correlación	0.18	0.2	-0.02	-0.09	-0.12	0	0.26	1	-0.13	0.4	0.03	0.3	-0.18	0.32
	p	0.186	0.123	0.858	0.485	0.378	0.978	0.046		0.327	0.002	0.807	0.022	0.165	0.013
Equino (N°copias/100 mL)	Correlación	0.17	0.23	0.14	-0.25	0.07	-0.04	-0.02	-0.13	1	-0.11	0.11	0.05	0.3	-0.18
	p	0.212	0.087	0.279	0.061	0.58	0.745	0.881	0.327		0.391	0.42	0.726	0.02	0.18
Canino (N°copias/100 mL)	Correlación	0.39	0.4	0.05	-0.13	-0.05	-0.14	0.03	0.4	-0.11	1	0.28	0.31	-0.36	0.29
	p	0.002	0.002	0.689	0.333	0.722	0.287	0.837	0.002	0.391		0.032	0.017	0.005	0.026
Humano (N°copias/100 mL)	Correlación	0.56	0.65	0.19	-0.19	-0.09	-0.16	0.46	0.03	0.11	0.28	1	0.62	-0.45	0.12
	p	< 0.001	< 0.001	0.147	0.154	0.516	0.232	< 0.001	0.807	0.42	0.032		< 0.001	< 0.001	0.368
Cerdo (N°copias/100 mL)	Correlación	0.52	0.58	-0.01	-0.24	-0.18	-0.09	0.3	0.3	0.05	0.31	0.62	1	-0.41	0.16
	p	< 0.001	< 0.001	0.936	0.071	0.167	0.525	0.024	0.022	0.726	0.017	< 0.001		0.001	0.216
pH	Correlación	-0.27	-0.24	-0.09	0.16	0.05	0.28	-0.33	-0.18	0.3	-0.36	-0.45	-0.41	1	-0.46
	p	0.044	0.071	0.503	0.227	0.706	0.031	0.012	0.165	0.02	0.005	< 0.001	0.001		< 0.001
Temperatura	Correlación	0.15	0.05	-0.21	-0.17	-0.21	-0.15	0.14	0.32	-0.18	-0.15	0.12	0.16	-0.46	1
	p	0.272	0.714	0.107	0.201	0.11	0.258	0.312	0.013	0.18	0.026	0.368	0.216	< 0.001	

5.6 Análisis de regresión lineal para coliformes fecales y marcadores moleculares

El análisis de regresión lineal entre la concentración de coliformes fecales y los distintos marcadores moleculares mostró relaciones estadísticamente significativas en todos los casos ($p < 0,001$). El marcador humano presentó el mayor coeficiente de determinación ($R^2 = 0,4164$), seguido por el marcador porcino ($R^2 = 0,3404$) (Figuras 11 y 10). Los marcadores aviar ($R^2 = 0,2201$), canino ($R^2 = 0,1543$) y equino ($R^2 = 0,1356$) también mostraron asociaciones significativas con los coliformes fecales (Figuras 7, 9 y 8, respectivamente).

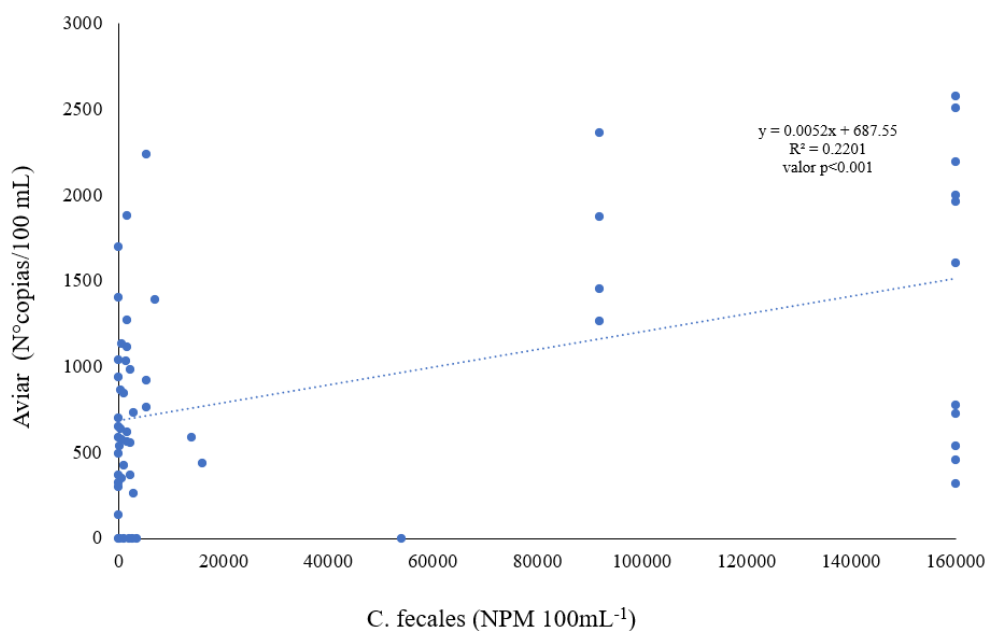


Figura 8: Regresión lineal entre coliformes fecales y el marcador molecular Aviar (N°copias/100 mL). Se observa una asociación estadísticamente significativa (valor $p < 0,001$; $R^2 = 0,2201$)

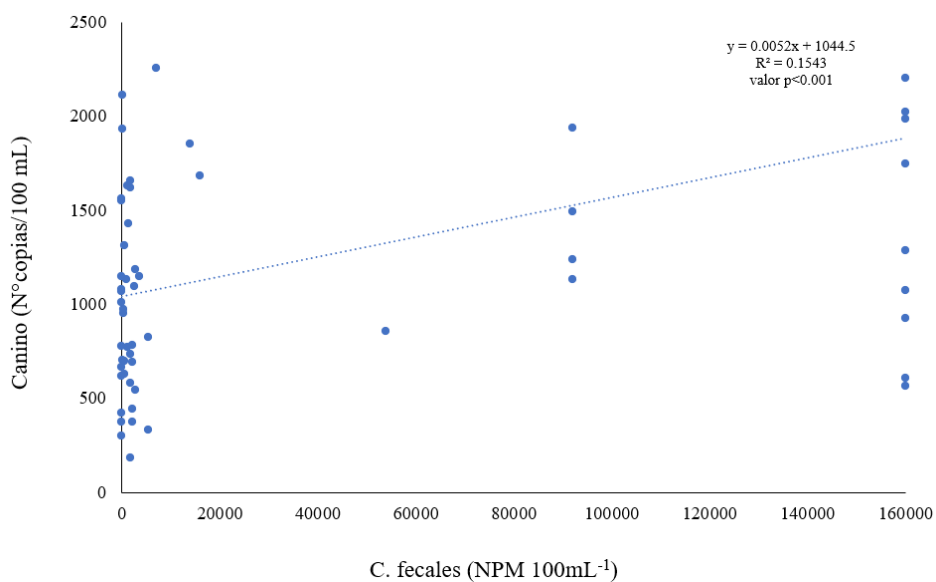


Figura 9: Regresión lineal entre coliformes fecales y el marcador molecular Canino (N°copias/100 mL). Se observa una asociación estadísticamente significativa (valor $p < 0,001$; $R^2 = 0,1543$)

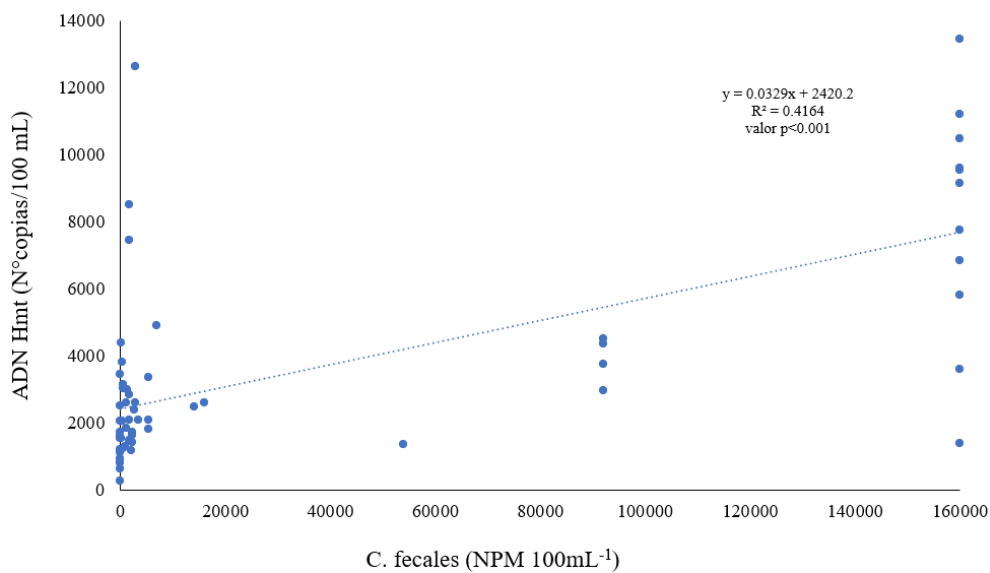


Figura 10: Regresión lineal entre coliformes fecales y el marcador molecular Hmt (N°copias/100 mL). Se observa una asociación estadísticamente significativa (valor $p < 0,001$; $R^2 = 0,4164$)

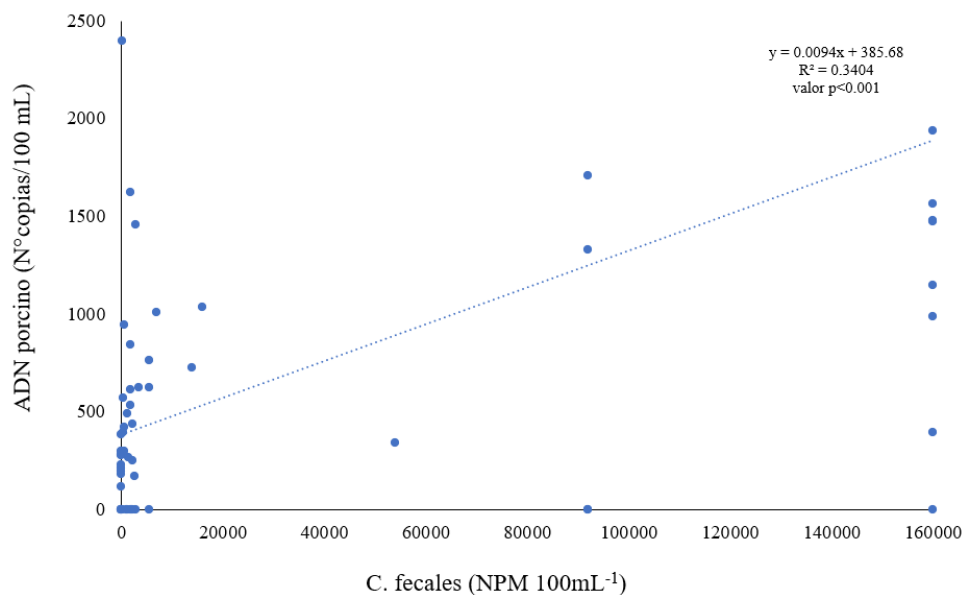


Figura 11: Regresión lineal entre coliformes fecales y el marcador molecular aviar (N°copias/100 mL). Se observa una asociación estadísticamente significativa (valor $p < 0,001$; $R^2 = 0,3404$)

5.7 Comparación espacio temporal coliformes totales y fecales, marcadores moleculares y nutrientes

Debido a la variabilidad estacional observada en los valores de coliformes totales y fecales (Fig. 3), nutrientes (Fig. 4) y marcadores moleculares (Fig. 5), se evaluó una posible influencia de la conexión que existe entre la Laguna Grande y la Laguna Chica de San Pedro de la Paz a través del desagüe que las conecta físicamente, sobre la distribución espacio-temporal de los parámetros determinados. Sin embargo, debido a la cantidad de datos los resultados no fueron estadísticamente relevantes. Por lo tanto, los valores registrados de la zona norte de la Laguna Chica fueron comparables con los resultados obtenidos en la zona norte de la Laguna Grande.

Se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre la zona norte y la zona sur de la Laguna Grande en las variables evaluadas, incluyendo coliformes, marcadores moleculares y nutrientes (Fig. 14). La prueba de Friedman aplicada a los coliformes totales y fecales evidenció diferencias significativas ($p < 0,001$). La prueba de Dunn presentó diferencias significativas entre los

coliformes totales de la zona norte y sur ($p=0,006$), Coliformes totales de la zona norte y coliformes fecales zona sur ($p<0,001$), Coliformes fecales de la zona norte y zona sur ($p=0,003$), y entre Coliformes totales zona sur y coliformes fecales zona sur ($p=0,024$).

De igual forma, se compararon las concentraciones de los coliformes totales y fecales de la zona norte de la Laguna Grande y Laguna Chica de. La prueba de Friedman evidencio diferencias significativas ($p=0,029$). La comparación por pares indicó diferencias significativas entre los Coliformes totales de la zona norte de laguna Grande y fecales de la zona norte de Laguna Chica ($p=0,004$) y entre coliformes fecales de la zona norte de Laguna Grande y Coliformes fecales de la zona norte de Laguna Chica ($p=0,039$). La prueba de Dunn confirmo la diferencia significativa entre los coliformes totales de la zona norte de Laguna Grande y fecales de la zona norte de Laguna Chica ($p=0,006$).

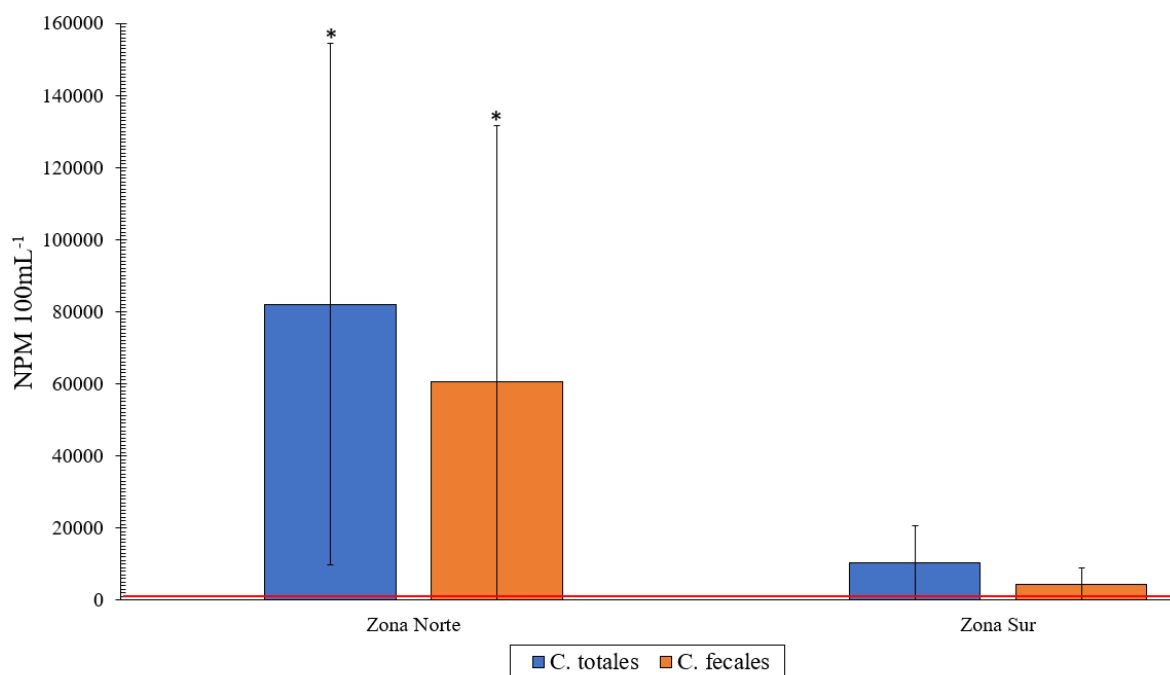


Figura 12: Concentración promedio de coliformes totales y fecales de la Laguna Grande de San Pedro de la Paz, diferenciando la zona norte y sur. Los valores se expresan en NMP/100 mL. Las barras de error representan la desviación estándar. La línea roja indica el límite máximo permitido de 1000 NMP/100 mL según la norma chilena NCh1333. El asterisco (*) indica diferencias significativas ($p<0,05$) entre zonas.

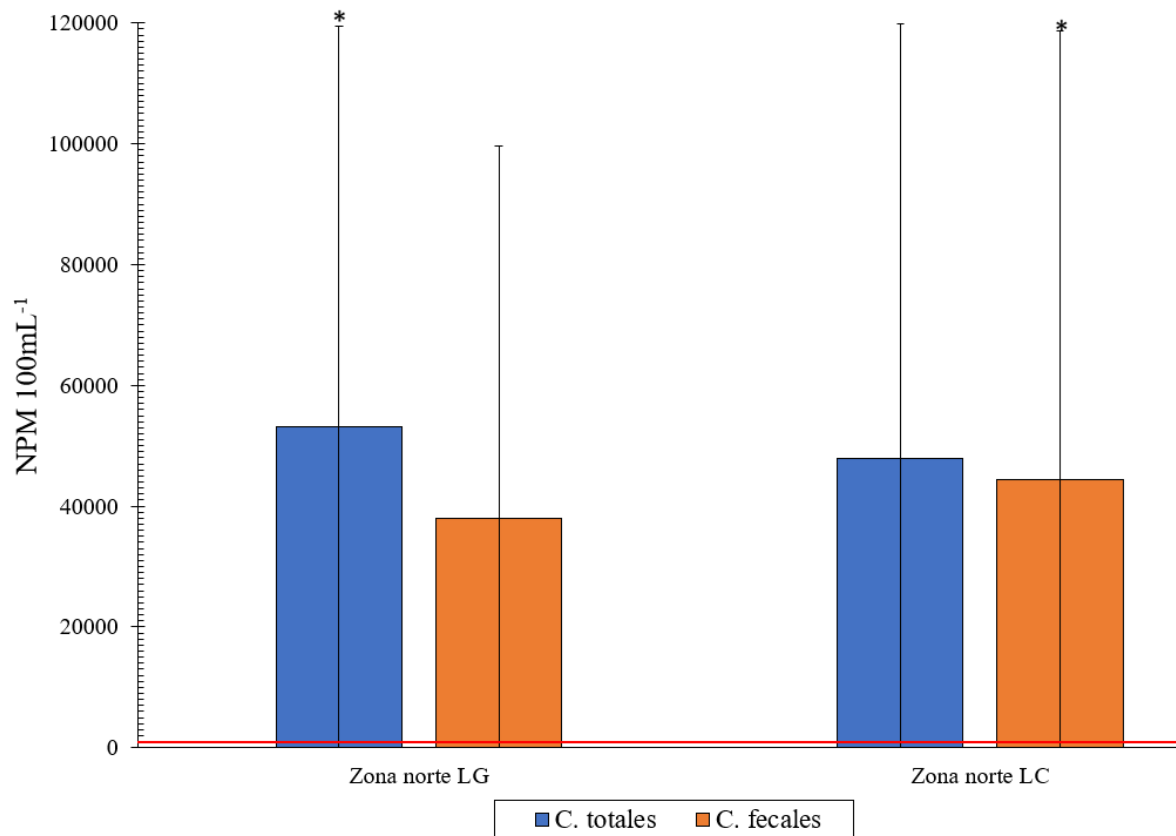


Figura 13: Comparación de los valores promedio de coliformes totales y fecales por zona de muestreo en ambas lagunas (Laguna grande= LG; Laguna Chica= LC). Los valores se expresan en NMP/100 mL Las barras de error representan la desviación estándar. La línea roja indica el límite máximo permitido de 1000 NMP/100 mL según la norma chilena NCh1333. Los asteriscos (*) indica diferencias significativas ($p < 0,05$) entre zonas.

Para evaluar la distribución espacial de los marcadores moleculares en la Laguna Grande de San Pedro de la Paz, se compararon las concentraciones de ADN mitocondrial de origen humano, bovino, porcino, equino, canino y aviar entre la zona norte y la zona sur (Fig. 18). La prueba de Friedman evidenció diferencias significativas entre los grupos analizados ($p < 0,001$). La prueba de Dunn detectó diferencias significativas entre humano (zona norte) y humano (zona sur) ($p < 0,001$), humano (zona norte) y cerdo (zona sur) ($p < 0,001$), humano (zona norte) y perro (zona norte) ($p = 0,034$), bovino (zona norte) y humano (zona norte) ($p < 0,001$), así como caballo (zona norte) y humano (zona

norte) ($p < 0,001$), entre otros pares evaluados. Adicionalmente, se realizó una comparación entre la zona norte de la Laguna Grande y la zona norte de la Laguna Chica (Fig. 19). La prueba de Friedman también indicó diferencias significativas entre las concentraciones de los marcadores moleculares ($p < 0,001$). Según la prueba de Dunn, se identificaron diferencias significativas entre humano (zona norte Laguna Grande) y humano (zona norte Laguna Chica) ($p < 0,001$), así como entre humano (zona norte Laguna Grande) y cerdo (zona norte Laguna Chica) ($p < 0,001$), caballo (zona norte Laguna Chica) ($p < 0,001$) y bovino (zona norte Laguna Chica) ($p < 0,001$).

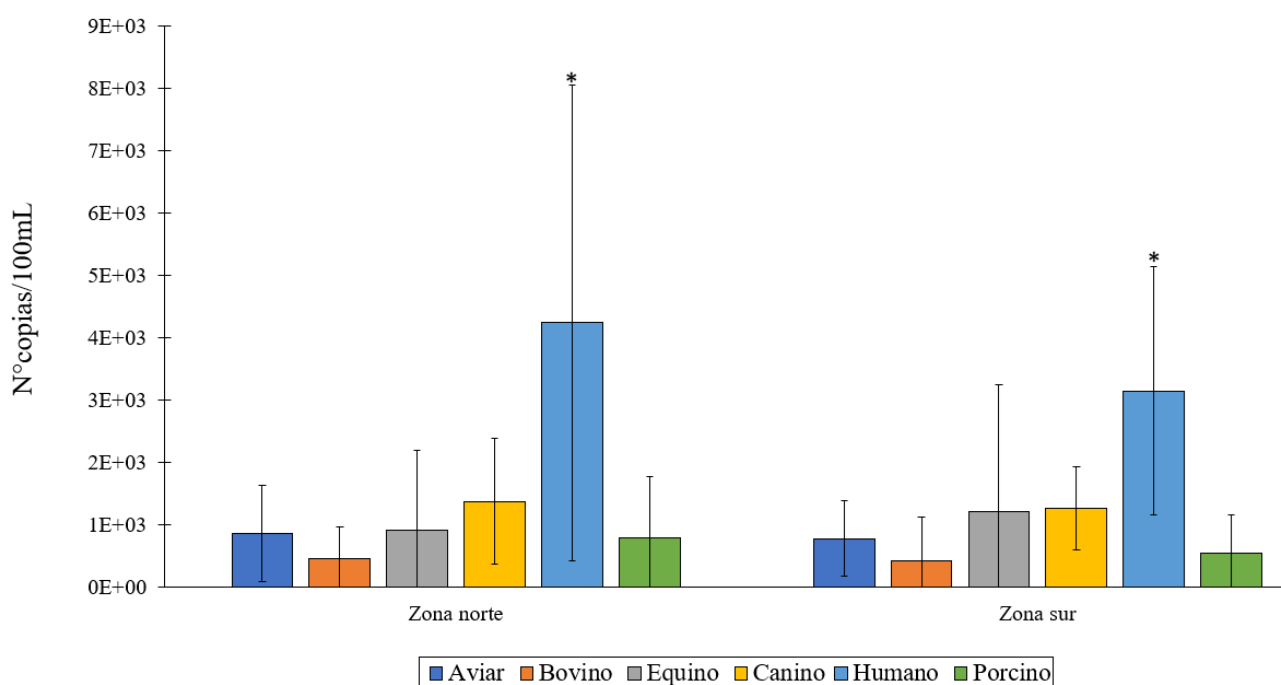


Figura 14: Concentraciones promedio de ADN de origen fecal en N°copias/100 mL en la zona norte y zona sur de la Laguna Grande de San Pedro de la Paz. Se incluyen seis marcadores moleculares correspondientes a distintas especies: Aviar (azul), Bovino (naranja), Equino (gris), Canino (amarillo), Humano (celeste) y Porcino (verde). Las barras de error representan la desviación estándar de los datos. Los asteriscos (*) indica diferencias significativas ($p < 0,05$) entre zonas.

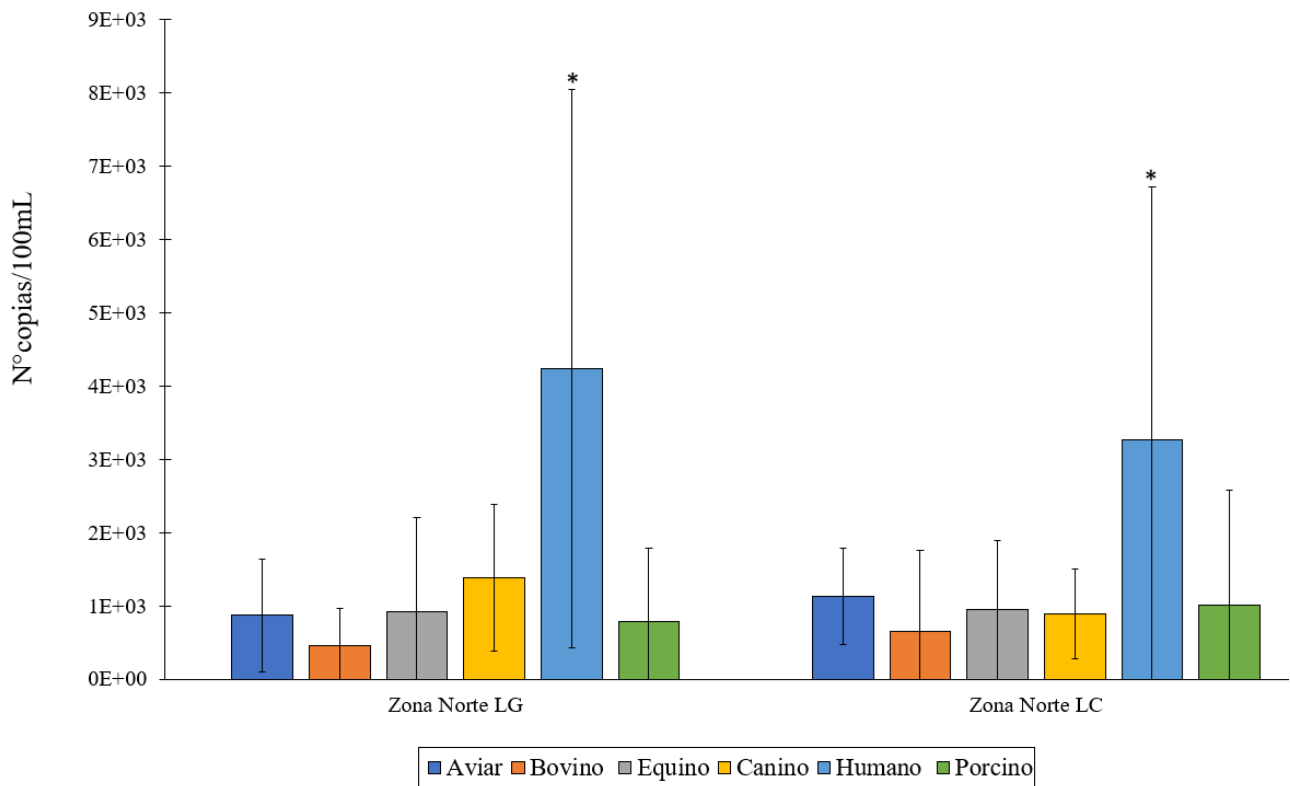


Figura 15: Concentraciones promedio de ADN de origen fecal en copias/100 mL en la zona norte de la Laguna Grande y zona norte de la Laguna Chica de San Pedro de la Paz. Se incluyen seis marcadores moleculares correspondientes a distintas especies: Aviar (azul), Bovino (naranja), Equino (gris), Canino (amarillo), Humano (celeste) y Porcino (verde). Las barras de error representan la desviación estándar de los datos. Los asteriscos (*) indica diferencias significativas ($p < 0,05$) entre zonas.

Se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre la zona norte y sur de la Laguna Grande (Fig. 16) en las concentraciones de nutrientes analizados. La prueba de Friedman indico diferencias significativas globales entre grupos ($p < 0,001$). La prueba de Dunn detecto diferencias significativas entre el nitrato de la zona norte y el nitrito ($p < 0,001$), nitrato y amonio ($p = 0,001$), nitrato proveniente de la zona norte y nitrito de la zona sur ($p < 0,001$) y nitrito (zona norte) con amonio (zona sur) ($p < 0,001$). También se encontraron diferencias significativas entre el fosfato (zona norte) y nitrito (zona sur) ($p < 0,001$), fosfato (zona norte) y amonio (zona norte) ($p < 0,001$), fosfato (zona norte) y nitrito (zona sur) ($p < 0,001$), fosfato (zona norte) y amonio zona sur ($p < 0,001$). A su vez, presentaron diferencias el nitrito (zona norte) con nitrato (zona sur) ($p < 0,001$) y fosfato (zona sur), nitrato (zona sur) presento diferencias con nitrito (zona sur)

($p < 0,001$) y amonio (zona sur) ($p < 0,001$). Finalmente, fosfato (zona sur) presento diferencias con nitrito (zona sur) ($p < 0,001$) y amonio (zona sur) ($p < 0,001$).

En cuanto a la comparación entre la zona norte de la Laguna Grande y la zona norte de la Laguna Chica (Fig. 17), la prueba de Friedman demostró que existen diferencias significativas ($p < 0,001$). Se detecto mediante la prueba de Dunn diferencias significativas entre el nitrato (zona norte LG) y el nitrito (zona norte LG) ($p < 0,001$), nitrato y amonio (zona norte LG) ($p = 0,001$), nitrato (zona norte LG) y nitrito (zona norte LC) ($p < 0,001$). También se encontraron diferencias entre el fosfato (zona norte LG) y el nitrito (zona norte LG) ($p < 0,001$), fosfato y amonio (zona norte LG) ($p = 0,001$), y fosfato (zona norte LG) con nitrito (zona norte LC) ($p = 0,002$). Además, el nitrito (zona norte LG) presentó diferencias con nitrato (zona norte LC) ($p < 0,001$), fosfato (zona norte LC) ($p = 0,002$) y amonio (zona norte LC) ($p = 0,001$). A su vez, el amonio (zona norte LG) presento diferencias con el nitrato (zona norte LC) ($p = 0,005$) y fosfato (zona norte LC) ($p = 0,007$). Finalmente, el nitrato (zona norte LC) presentó diferencias con nitrito (zona norte LC) ($p = 0,009$), y el fosfato (zona norte LC) con nitrito (zona norte LC) ($p = 0,012$).

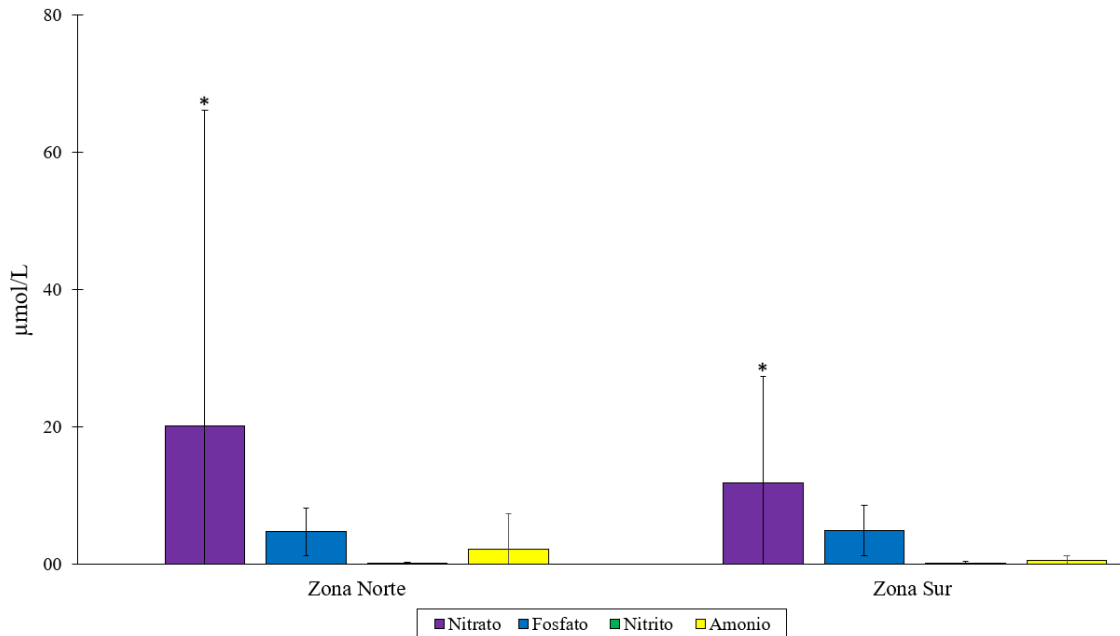


Figura 16: Concentraciones promedio de nitrato, fosfato, nitrito y amonio ($\mu\text{mol/L}$) en la zona norte y sur de la Laguna Grande. Las barras de error representan la desviación estándar de los datos. El asterisco (*) indica diferencias significativas ($p < 0,05$) entre zonas.

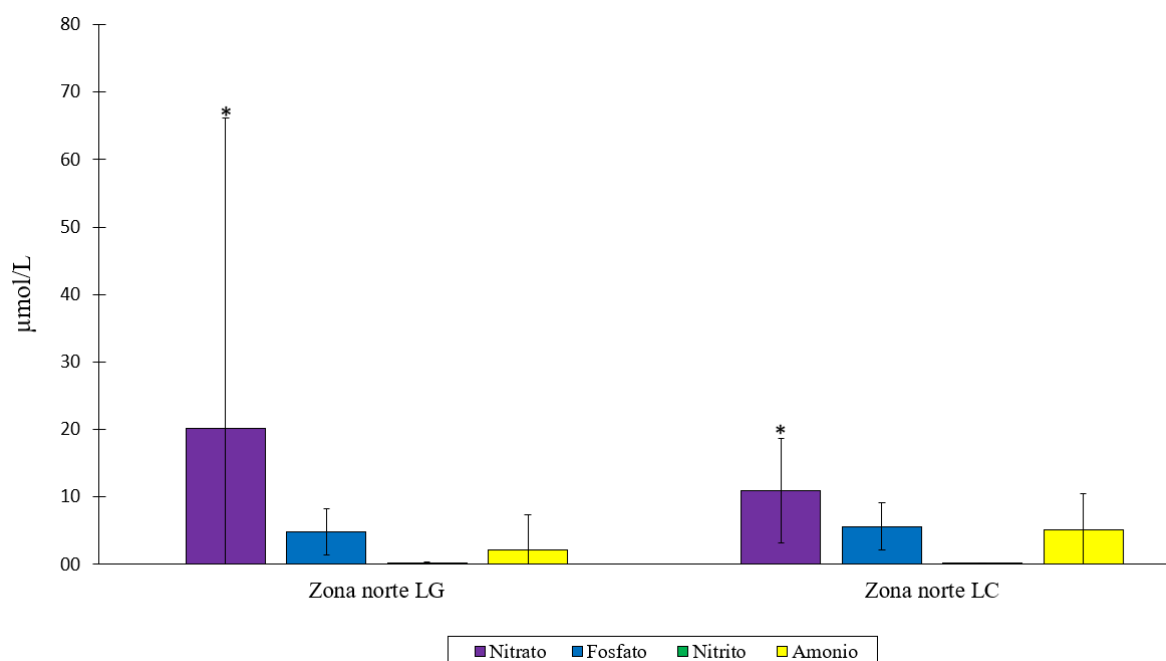


Figura 17: Comparación de los valores promedio de los nutrientes ($\mu\text{mol/L}$) por zona de muestreo en ambas lagunas (Laguna grande= LG; Laguna Chica= LC). Las barras de error representan la desviación estándar de los datos. El asterisco (*) indica diferencias significativas ($p < 0,05$) entre zonas.

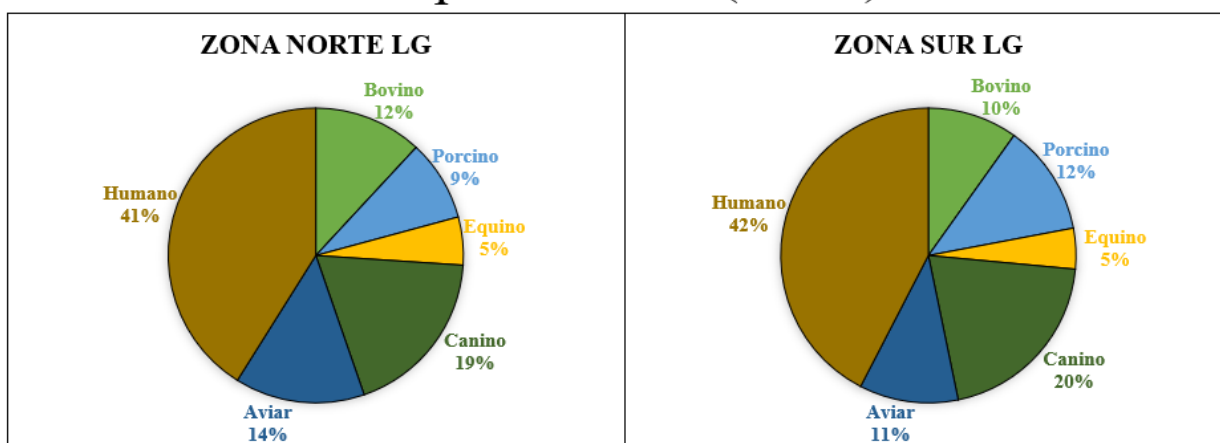
5.8 Distribución porcentual estacional de los marcadores moleculares

El análisis estacional de la presencia de ADN mitocondrial de origen fecal en la Laguna Grande de San Pedro de la Paz se representa en los gráficos de torta (Fig. 20; Fig. 21), los cuales muestran la distribución porcentual de los marcadores moleculares en las zonas norte y sur durante las campañas de muestreo realizadas en el año 2024. En la zona norte, durante el verano, el mayor porcentaje corresponde al marcador humano (41%), seguido por el canino (19%), aviar (14%), bovino (12%), porcino (9%) y equino (5%). En otoño, el marcador humano alcanza un 60%, seguido por porcino (12%), canino (12%), aviar (8%), equino (6%) y bovino (2%). En invierno, el marcador humano representa un 50%, mientras que el canino corresponde a un 21%, aviar a un 9%, equino a un 8%, bovino a un 7% y porcino a un 5%. En primavera, el marcador humano alcanza un 39%, seguido por el canino (29%), aviar (17%), equino (6%), bovino (5%) y porcino (4%).

En la zona sur, durante el verano, el marcador humano representa un 42%, seguido por el canino (20%), porcino (12%), aviar (11%), bovino (10%) y equino (5%). En otoño, el marcador humano

corresponde al 48%, seguido por el canino (14%), aviar (14%), equino (10%), porcino (7%) y bovino (7%). En invierno, el marcador humano representa un 46%, seguido por el canino (28%), aviar (10%), porcino (9%), equino (5%) y bovino (2%). En primavera, el marcador humano representa un 51%, seguido por el canino (18%), equino (13%), aviar (9%), porcino (7%) y bovino (2%).

Campaña verano (2024)



Campaña otoño (2024)

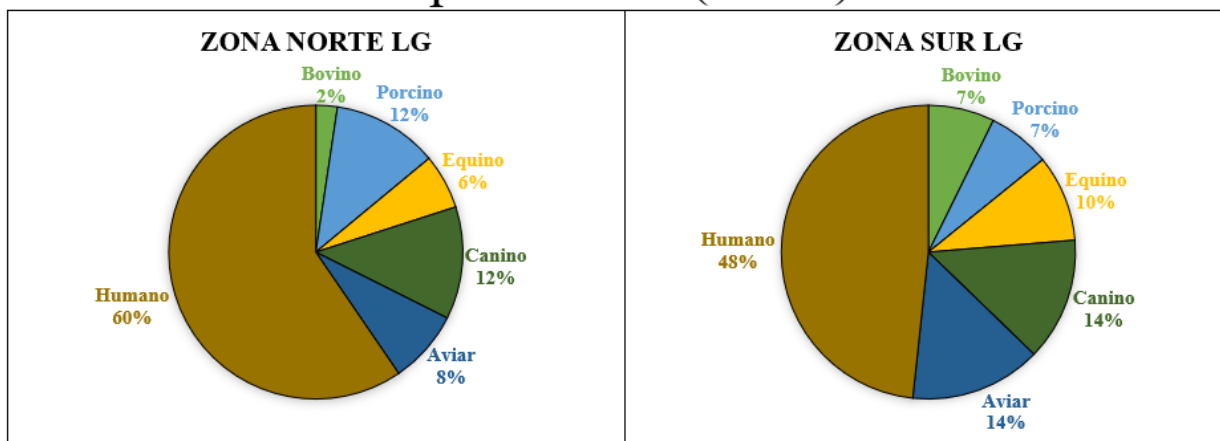
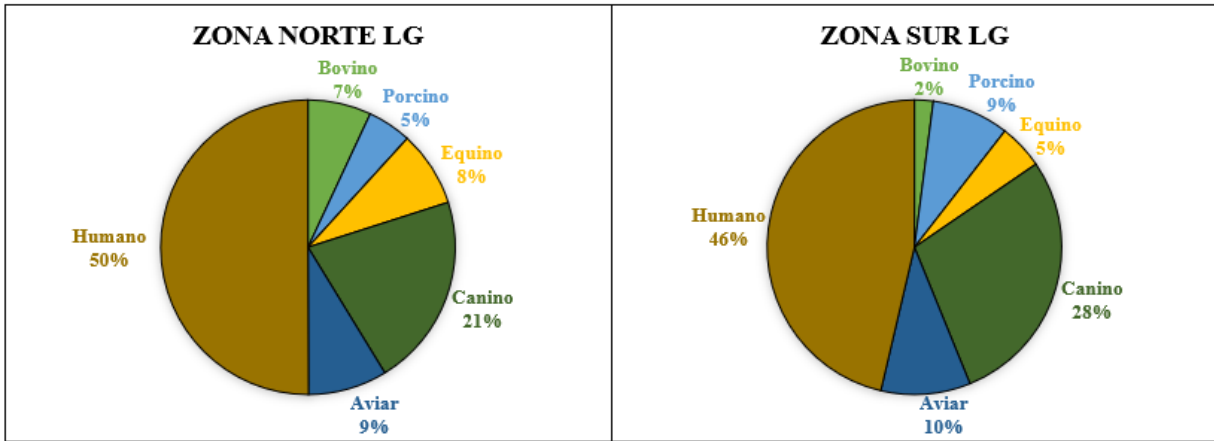


Figura 18: Distribución porcentual por zona (Norte y Sur) del ADN de origen humano y animal en la Laguna Grande de San Pedro de la Paz durante las campañas de verano y otoño de 2024. Gráficos elaborados utilizando los promedios de la detección de los marcadores moleculares específicos para cada especie.

Campaña invierno (2024)



Campaña primavera (2024)

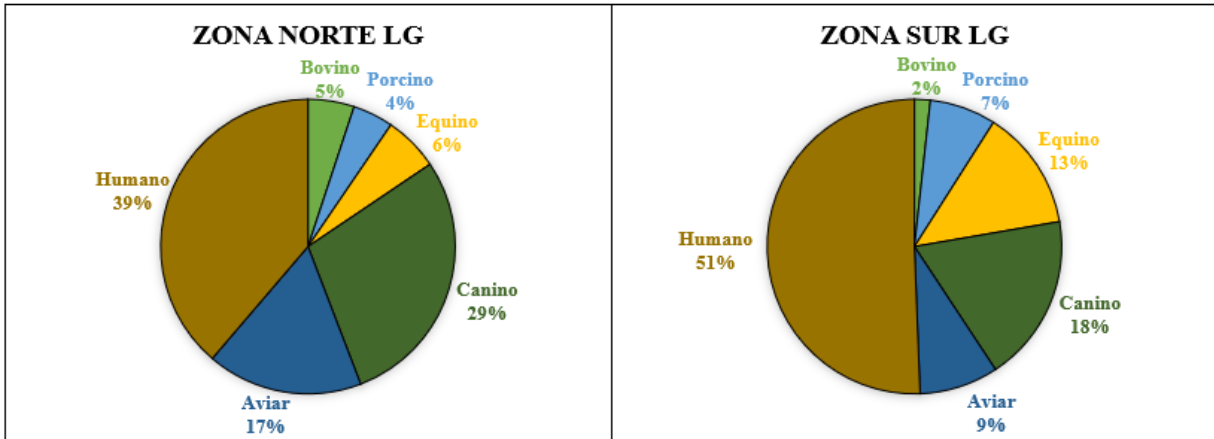


Figura 19: Distribución porcentual por zona (Norte y Sur) del ADN de origen humano y animal en la Laguna Grande de San Pedro de la Paz durante las campañas de invierno y primavera de 2024. Gráficos elaborados utilizando los promedios de la detección de los marcadores moleculares específicos para cada especie.

La comparación entre la zona norte de la Laguna Grande y la zona norte de la Laguna Chica de San Pedro de la Paz se realizó considerando la totalidad de los datos disponibles para cada laguna (Fig. 21). No se efectuó una comparación por estación debido a la cantidad limitada de datos obtenidos desde la Laguna Chica. La prueba de Friedman indicó diferencias significativas entre las variables analizadas ($p < 0.001$). En cuanto a la distribución porcentual de los marcadores moleculares, en la Laguna Grande se observó un 55% de ADN mitocondrial de origen humano, seguido por canino (16%), porcino (9%), aviar (9%), equino (7%) y bovino (4%). En la Laguna Chica, el marcador humano alcanzó un 44%, seguido por el aviar (15%), porcino (14%), canino (12%), equino (6%) y bovino (9%).

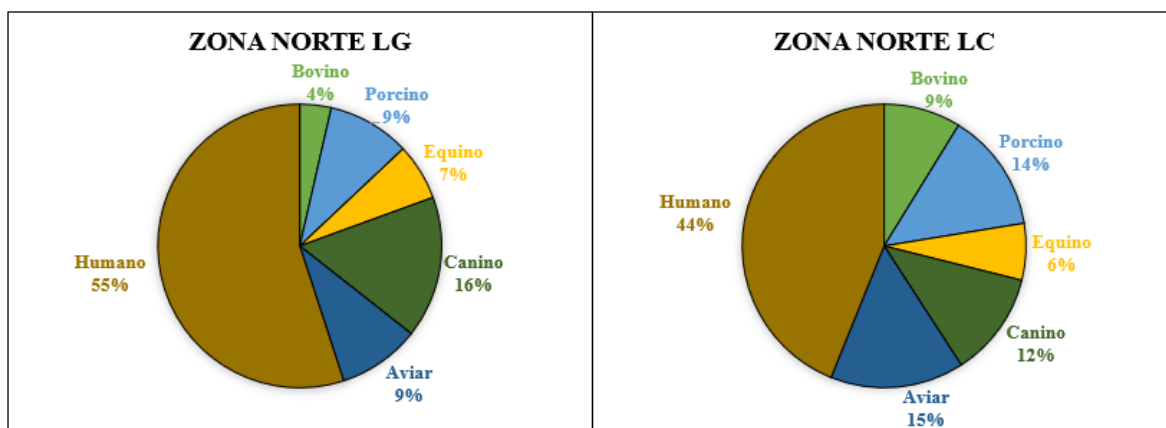


Figura 20: Distribución porcentual del ADN de origen humano y animal en la zona norte de la Laguna Grande (LG) y la zona norte de la Laguna Chica (LC). Los valores corresponden a los promedios obtenidos a partir de la detección de los marcadores genéticos específicos para cada especie.

5.9 Distribución espacial de coliformes fecales y marcadores moleculares

Para complementar el análisis estacional y porcentual de la contaminación fecal en la Laguna Grande y la Laguna Chica de San Pedro de la Paz, se generaron mapas de distribución espacial para coliformes fecales y para cada una de las especies identificadas mediante detección de ADN mitocondrial. La figura 22 muestra la concentración estacional de coliformes fecales (NMP/100 mL) en ambas lagunas durante las campañas de otoño, invierno, primavera y verano del año 2024. Los valores se encuentran representados mediante una escala de colores que permite visualizar las áreas con mayor o menor concentración. Las figuras 22, 23, 24 y 25 presentan la distribución espacial de los seis marcadores moleculares (humano, canino, porcino, aviar, bovino y equino) en cada estación, representando la concentración de ADN (N°copias/100 mL) y su localización geográfica dentro de ambas lagunas.

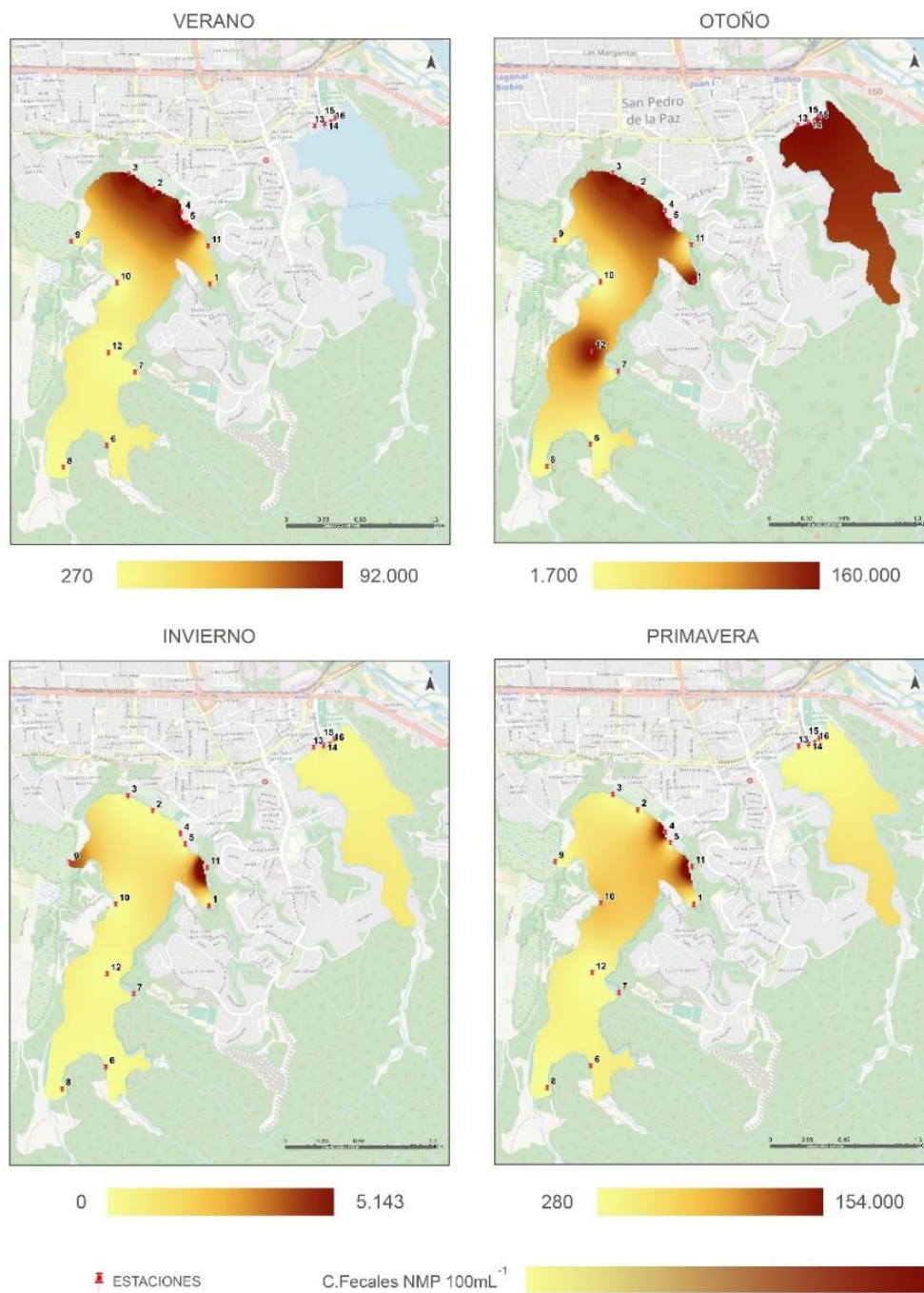


Figura 21: Distribución estacional de coliformes fecales (NMP/100mL⁻¹) en la Laguna Grande y Laguna Chica de San Pedro de la Paz. Los mapas muestran la interpolación espacial de la concentración de coliformes fecales (NMP/100 mL) en las cuatro estaciones del año. La escala de colores indica los niveles de contaminación, desde valores bajos en amarillo hasta valores altos en marrón oscuro. Los puntos rojos representan las estaciones de muestreo.

CAMPAÑA VERANO

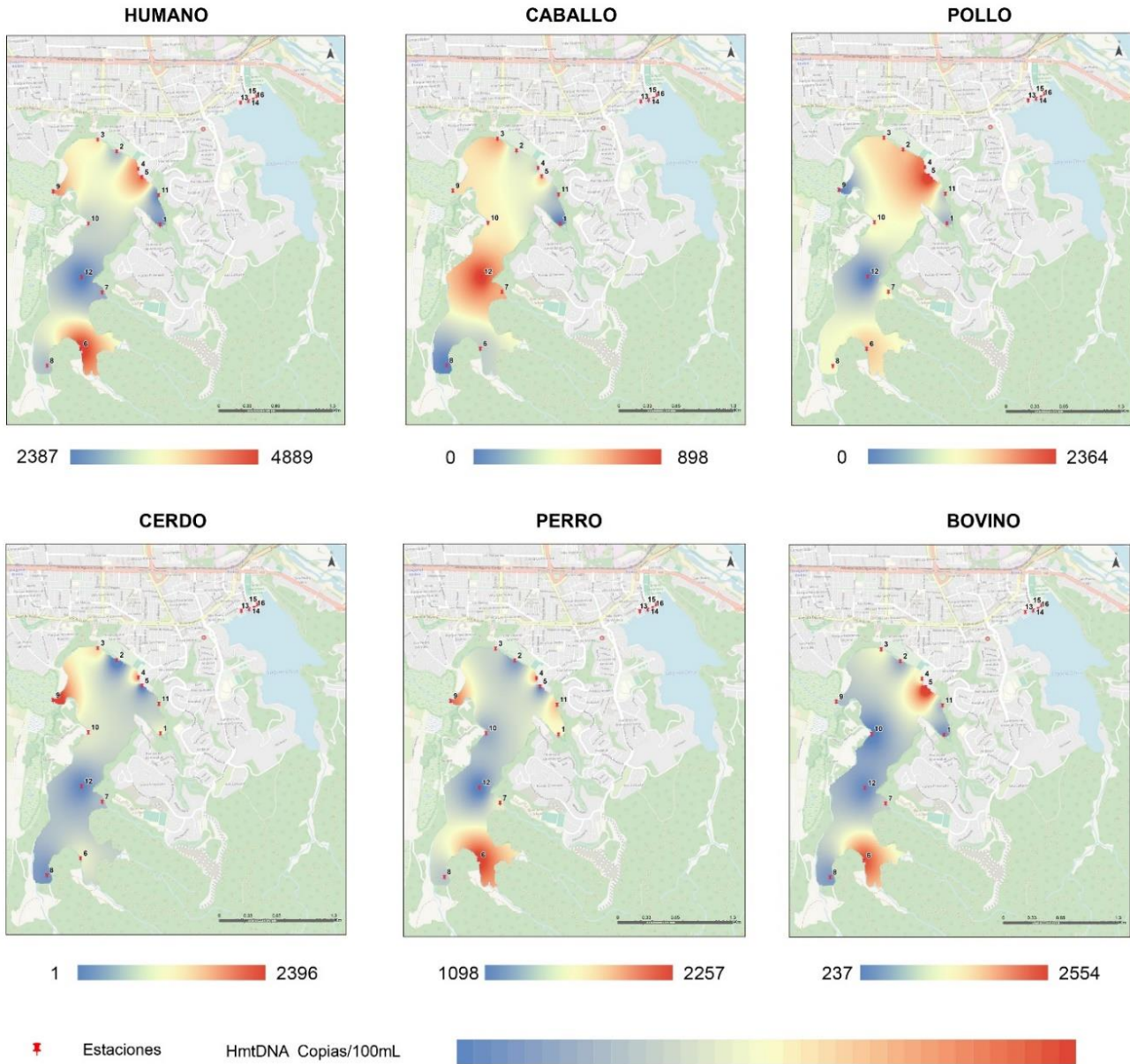


Figura 22: Distribución espacial de los seis marcadores moleculares (humano, equino, aviar, porcino, canino y bovino) en la Laguna Grande y Laguna Chica de San Pedro de la Paz durante la campaña de verano. Los mapas muestran la interpolación de la concentración de ADN mitocondrial (N°copias/100 mL), donde la escala de colores indica las variaciones en los niveles de detección. Los puntos rojos representan las estaciones de muestreo.

CAMPAÑA OTOÑO

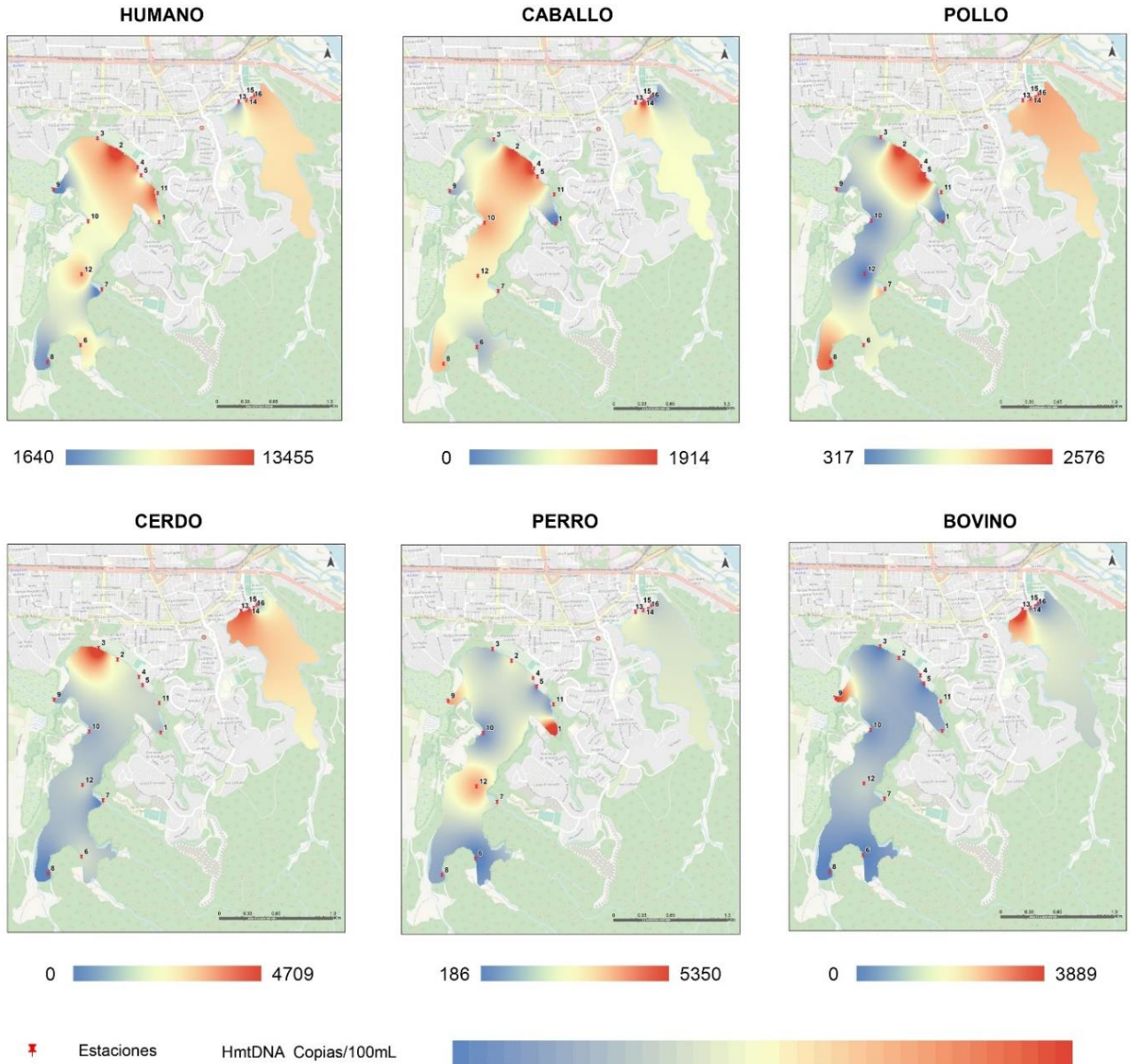


Figura 23: Distribución espacial de los seis marcadores moleculares (humano, equino, aviar, porcino, canino y bovino) en la Laguna Grande y Laguna Chica de San Pedro de la Paz durante la campaña de otoño. Los mapas presentan la interpolación de la concentración de ADN mitocondrial (N° copias/100 mL), donde la escala de colores indica los niveles de detección. Los puntos rojos representan las estaciones de muestreo.

CAMPAÑA INVIERNO

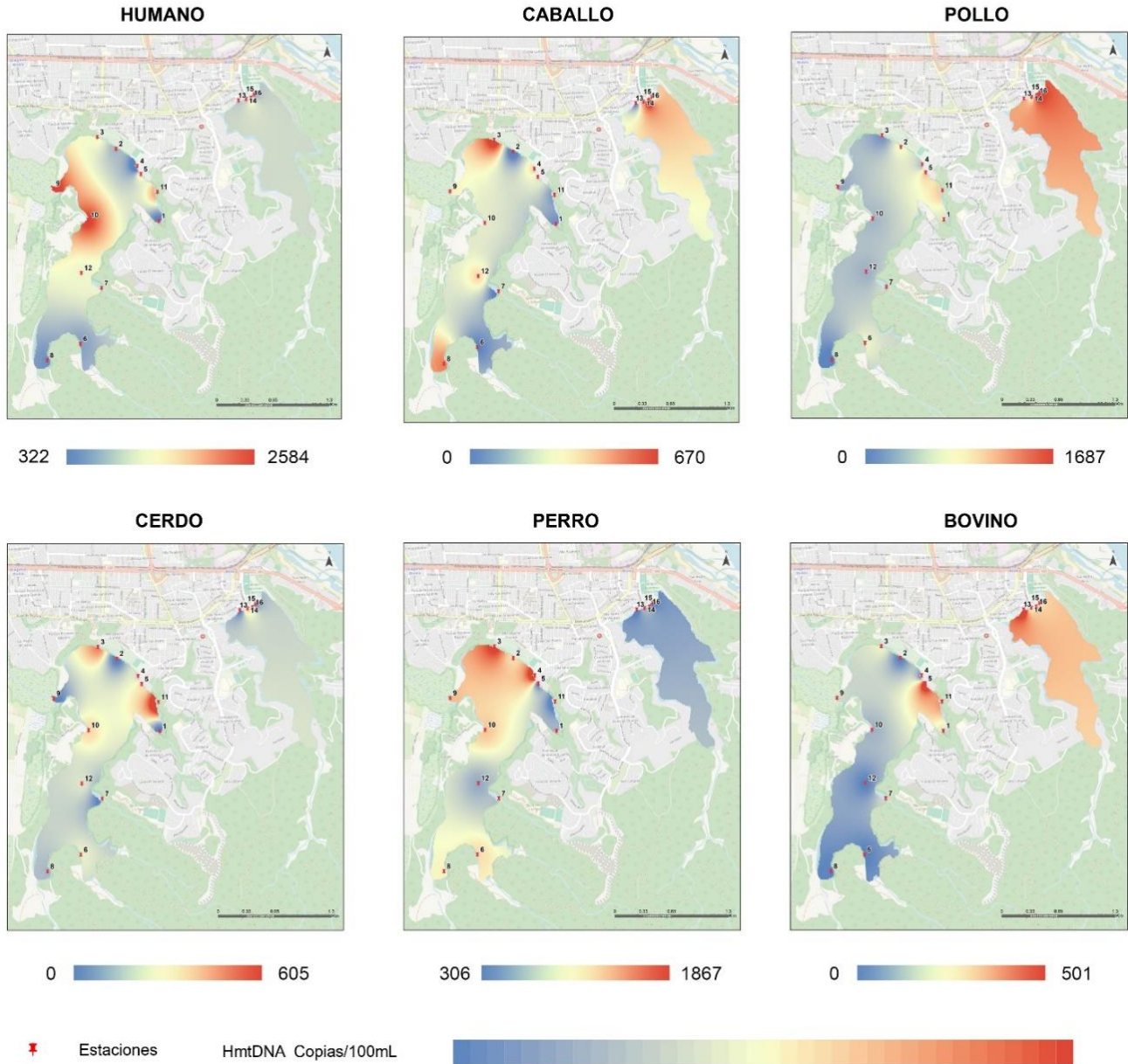


Figura 24: Distribución espacial de los seis marcadores moleculares (humano, equino, aviar, porcino, canino y bovino) en la Laguna Grande y Laguna Chica de San Pedro de la Paz durante la campaña de invierno. Los mapas presentan la interpolación de la concentración de ADN mitocondrial (N° copias/100 mL), donde la escala de colores indica los niveles de detección. Los puntos rojos representan las estaciones de muestreo

CAMPAÑA PRIMAVERA

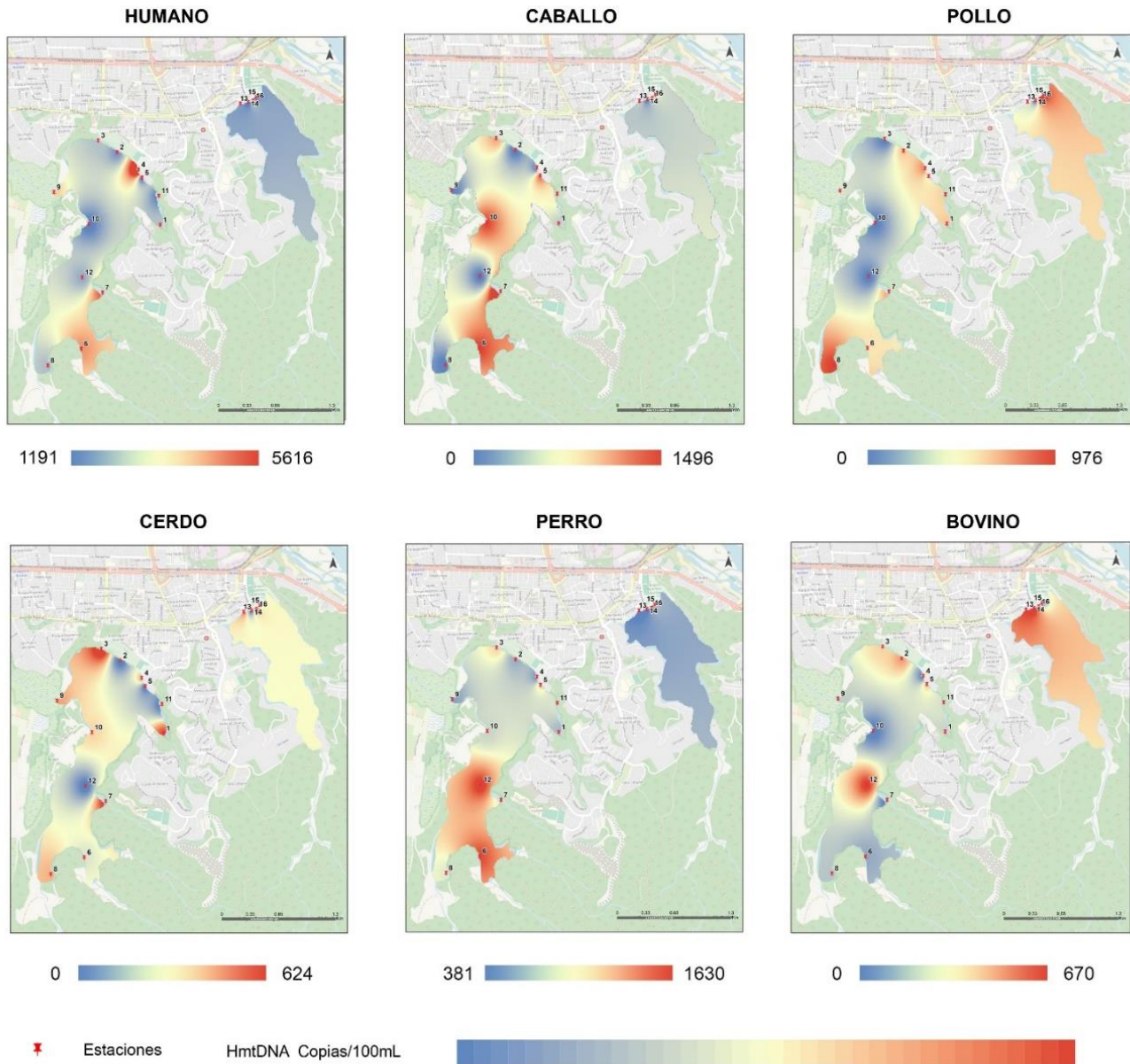


Figura 25: Distribución espacial de los seis marcadores moleculares (humano, equino, aviar, porcino, canino y bovino) en la Laguna Grande y Laguna Chica de San Pedro de la Paz durante la campaña de primavera. Los mapas presentan la interpolación de la concentración de ADN mitocondrial (N° copias/100 mL), donde la escala de colores indica los niveles de detección. Los puntos rojos representan las estaciones de muestreo

6. Discusión

Diversos estudios han descrito la variabilidad estacional de los coliformes fecales y totales en cuerpos de agua urbanos, esta variabilidad se pudo demostrar con los niveles de los coliformes totales y fecales en la Laguna Grande y Chica de San Pedro de la Paz durante el 2024. Ndione et al., 2022 en su investigación analizó la dinámica de la contaminación de dos sitios en la Bahía de Ayré, Francia, donde demostraron que las precipitaciones fueron un factor clave en la contaminación fecal de las zonas de estudio durante el otoño y el invierno (Ndione et al., 2022). De manera similar, un estudio realizado en el río Brunei (Yusof et al., 2023), demostró que las concentraciones más altas de coliformes fueron detectadas previas a las temporadas de lluvias y producto de las precipitaciones las concentraciones presentes en el área de estudio se encontraban asociadas a la escorrentía urbana (Yusof et al., 2023). Cabe destacar que, en el caso de las lagunas de San Pedro de la Paz, la mayoría de las muestras analizadas superaron el límite de 1.000 NMP/100 mL establecido por la norma chilena NCh1333, especialmente en otoño (Fig. 3). Este resultado sugiere una presión microbiológica elevada sobre estos ecosistemas acuáticos, con posibles implicancias para la salud pública. En el caso del sistema de lagunas, las mayores concentraciones de coliformes fecales se observan en otoño (Fig. 3), posterior a las primeras lluvias después del verano. Se debe destacar que la semana antes del muestreo de otoño (02/05/2024), las precipitaciones registradas por la estación de meteorología carriel sur muestran un valor de 77,2 mm entre los días 21 y 31 de abril (DGA, 2024). Estas precipitaciones produjeron la escorrentía de material fecal hacia las lagunas, especialmente humano, caballo, pollo y perro (Fig. 18; Fig. 23). Así también, las mayores concentraciones de los coliformes fecales fueron registradas en la zona norte de la Laguna Grande (Fig 23).

La variabilidad estacional observada en las concentraciones de ADN mitocondrial humano (HmtDNA) y otros marcadores moleculares en las Lagunas Grande y Chica de San Pedro de la Paz durante el año 2024 refleja aportes diferenciados de contaminación fecal según la fuente y la estación del año (Fig. 22; Fig. 23; Fig. 24; Fig. 25). El HmtDNA alcanzó su máxima concentración en otoño (Tabla 1) y la mínima en invierno (Tabla 1), indicando un incremento en la contaminación de origen humano durante el otoño (Fig 18). Este patrón coincide con estudios previos que han identificado una mayor presencia de HmtDNA en cuerpos de agua durante (He et al., 2015).

Las correlaciones de Pearson observadas entre los coliformes fecales y el Hmt muestran el mayor índice de las correlaciones significativas observadas entre los coliformes fecales y los marcadores moleculares analizados (Tabla 2; Fig. 4). Este resultado demuestra que las lagunas reciben material fecal de distintas especies, no obstante, el aporte humano es el más significativo, seguido por el ADN de canino (Fig. 18; Fig. 19). El marcador de origen canino mostró su mayor valor en otoño (Tabla 2; Fig.18) sugiriendo que las actividades al aire libre y la presencia de mascotas en áreas cercanas a las lagunas podrían contribuir a la contaminación fecal en esta estación. Estudios han demostrado que la escorrentía superficial durante las primeras lluvias después de períodos secos puede movilizar heces de mascotas hacia cuerpos de agua, incrementando la contaminación fecal (Ahmed et al., 2021).

La dinámica estacional de los marcadores equino, porcino y aviar evidencia una influencia climática por sobre sus concentraciones a lo largo del año (Fig. 4). Las concentraciones de otoño (Fig. 4), sugiere que la escorrentía actuaría como un vector en el transporte de material fecal hacia las lagunas. Este fenómeno ha sido descrito por literatura, donde se ha documentado que las lluvias intensas, redistribuyen residuos acumulados en suelos agrícolas, zonas urbanas y vertederos (Ahmed et al., 2021). Lo que podría estar relacionado con prácticas agrícolas y ganaderas en las proximidades de la Laguna Grande, sin embargo, no hay una explicación clara respecto a la presencia de estos marcadores en la Laguna Chica, debido a que no hay zonas agrícolas que cercanas a esa laguna, lo que implicaría que la presencia de los marcadores podría estar asociada al lixiviado de la basura urbana que de alguna manera desembocaría en la zona norte de ambas lagunas, o, podría deberse al consumo de productos de origen animal que, lo anterior es sostenible considerando las correlaciones significativas que presentaron las concentraciones de los coliformes fecales con cada uno de los marcadores (Tabla 2) en conjunto con el aporte porcentual de ADN Hmt a través de las estaciones (Fig. 18, Fig. 19), Caldwell et al. (2011) validaron el uso de HmtDNA como indicador específico de contaminación fecal humana, reportando su sensibilidad en ambientes de agua dulce. A su vez, González-Saldía et al. (2019) confirmaron su aplicación en ambientes costeros del sur de Chile, observando una correlación significativa entre coliformes fecales reforzando la utilidad del marcador en zonas sometidas a presión urbana.

El análisis del Índice de Resistencia Antimicrobiana Múltiple (MAR) en la Laguna Grande durante la primavera de 2024 reveló variaciones significativas entre las estaciones de muestreo y los medios de cultivo utilizados (LB y MacConkey). Estaciones como la Est. 22, Est. 23 y Est. 24 presentaron valores de MAR cercanos o iguales a 1.0 en MacConkey y alrededor de 0.7 en LB, indicando una alta

presión de antibióticos en estas áreas (Fig. 5). Estos resultados son consistentes con estudios previos que sugieren que un índice MAR superior a 0.2 señala una fuente de contaminación de alto riesgo, donde los antibióticos son frecuentemente utilizados (Mekonnen et al., 2024).

La presencia de bacterias con altos índices MAR en cuerpos de agua dulce ha sido documentada en diversas investigaciones. Por ejemplo, un estudio en Etiopía encontró que las cepas de *Escherichia coli* O157:H7 aisladas de aguas residuales y agua potable presentaban índices MAR entre 0.3 y 0.8, reflejando una resistencia significativa a múltiples antibióticos (Mekonnen et al., 2024). Asimismo, investigaciones en Sudáfrica han demostrado que las plantas de tratamiento de agua potable pueden influir en la prevalencia de bacterias indicadoras y en sus índices MAR, variando según la temporada y las etapas de tratamiento (Mekonnen et al., 2024).

La variabilidad estacional en los índices MAR también ha sido observada en otros estudios. Por ejemplo, en un análisis de plantas de tratamiento de agua en Sudáfrica, se encontró que la reducción de bacterias indicadoras y sus índices MAR variaban según la temporada, sugiriendo que el uso de antibióticos es dependiente del sitio y la estación (Biyela & Bezuidenhout., 2024). Estos hallazgos subrayan la importancia de monitorear continuamente la resistencia antimicrobiana en cuerpos de agua, especialmente en áreas sujetas a diferentes presiones antropogénicas y estacionales (Biyela & Bezuidenhout., 2024).

La variabilidad estacional observada en las concentraciones de nutrientes refleja la influencia de factores hidrológicos y biogeoquímicos en estos ecosistemas acuáticos. El nitrato presentó su concentración promedio más alta en otoño y la más baja en verano (Tabla 1). Este patrón sugiere que las lluvias otoñales pueden movilizar nitratos desde las cuencas hacia las lagunas, mientras que, en verano, la menor escorrentía y el aumento en la asimilación por parte de productores primarios reducen las concentraciones de nitrato. Estudios previos han documentado aumentos en las concentraciones de nitrato durante períodos de lluvias intensas debido al arrastre de nutrientes desde suelos agrícolas y urbanos hacia cuerpos de agua (Beers., 2022; Chen et al., 2022).

El aumento de nitrito en el invierno (Tabla 1) podría estar relacionado con la reducción de la actividad fotosintética y la consecuente disminución en la asimilación de nitritos por parte de las algas, junto con procesos de nitrificación más activos en temperaturas más bajas. Investigaciones han indicado que las concentraciones de nitrito pueden aumentar en invierno debido a la menor actividad biológica y a la acumulación de materia orgánica en descomposición (Chen et al., 2022). Las concentraciones

de amonio en invierno (Tabla 1, Fig 6) podría estar asociado a la descomposición de materia orgánica acumulada y a la menor actividad de nitrificación en condiciones de menor temperatura. Estudios han demostrado que el amonio tiende a acumularse en capas más profundas durante el invierno debido a la estratificación térmica y la reducción en la mezcla vertical (Zhang et al., 2023). Respecto al fósforo, a liberación de fosfato desde los sedimentos bajo condiciones anóxicas en invierno, junto con la menor asimilación por parte de productores primarios, podría explicar este incremento (Zhang et al., 2023). Investigaciones han señalado que la estratificación invernal y las condiciones de bajo oxígeno pueden facilitar la liberación de fósforo desde los sedimentos hacia la columna de agua, en conjunto con la escorrentía producto de las precipitaciones del año 2024 (Wetzel., 2001; Sun et al., 2022). En los ecosistemas de agua dulce el fósforo juega un rol fundamental en las floraciones de cianobacterias, puesto que es el nutriente limitante para este tipo de microorganismos, los que son capaces de obtener el nitrógeno desde el aire (Wetzel., 2001).

La evidencia espacial y estadística reunida en este estudio indica una zonación clara de la contaminación fecal en la Laguna Grande, en donde se ve una concentración significativamente mayor de coliformes fecales y marcadores moleculares en la zona norte respecto de la zona sur de la Laguna grande (Fig. 21; Fig. 22; Fig. 23; Fig. 24; Fig. 25). Esta asimetría puede explicarse, en parte, por la urbanización que rodea al cuerpo de agua, en este caso la zona norte se encuentra más expuesta a la influencia directa del ser humano producto de la infraestructura urbana y posibles descargas domésticas, generando una mayor presión antrópica en la laguna.

La comparación entre la zona norte de la Laguna Grande y la zona norte de la Laguna Chica revela diferencias significativas en los niveles de coliformes y marcadores moleculares, con un mayor aporte de origen humano en la Laguna Grande (55%) en comparación con la Laguna Chica (44%) (Fig. 20). Estas diferencias podrían explicarse por la limitada conectividad hidrológica entre ambas lagunas y por el distinto grado de urbanización que las rodea, afectando la intensidad y tipo de aportes contaminantes. Un estudio de caracterización y tendencias tróficas de lagos costeros en Chile indicó que la Laguna Grande de San Pedro es más eutrófica en comparación con otros cuerpos de agua, lo que se relaciona con el nivel de intervención en sus cuencas de drenaje (Parra., 2003). En este contexto, las evidencias obtenidas refuerzan la idea de que la presión antrópica constituye un factor determinante en la calidad sanitaria de estos ecosistemas.

7. Conclusiones

En todas las campañas realizadas con la excepción de la campaña de invierno, mostraron concentraciones de coliformes fecales por sobre la norma chilena NCh 13333.

Se observó una marcada variabilidad estacional en las concentraciones de coliformes totales y fecales, alcanzando sus valores más altos durante el otoño. Esta tendencia coincide con el aumento de precipitaciones, lo que favorece la escorrentía y el arrastre de contaminantes hacia los cuerpos de agua.

El análisis de marcadores moleculares de ADN mitocondrial permitió identificar y cuantificar las principales fuentes de contaminación fecal. El marcador humano fue el más abundante, especialmente en otoño, lo que sugiere una importante presión antrópica sobre estos ecosistemas. También se detectaron niveles relevantes de contaminación de origen canino, porcino, equino y aviar, lo cual refleja la influencia combinada de factores urbanos, actividades recreativas, y posiblemente lixiviados de residuos domiciliarios y la presencia de estos marcadores en material fecal humano producto de la dieta.

Se observó una zonación clara en la distribución de contaminantes, siendo la zona norte de la Laguna Grande la más afectada. Esta zona presentó mayores concentraciones de coliformes, nitrato, amonio y marcadores moleculares, lo que podría estar asociado a una mayor densidad poblacional, presencia de descargas no reguladas y menor capacidad de renovación del agua.

Las concentraciones de nutrientes (nitrato, fosfato, amonio y nitrito) mostraron variaciones estacionales durante el periodo de estudio. En especial, el fosfato mostró concentraciones por sobre $3,3 \mu\text{M}$ en promedio para todas las campañas realizadas, lo que clasifica a estas lagunas en un estado hipertrófico con respecto a este nutriente.

El análisis del índice MAR reveló la presencia de bacterias multirresistentes en varios puntos de la Laguna Grande, con valores que superan el umbral de 0.22, considerado indicativo de una alta presión de antibióticos en el ambiente. Esto sugiere un riesgo sanitario adicional asociado al uso recreativo del lago.

El análisis evidencia una zonación clara de la contaminación fecal en la Laguna Grande, concentrándose en la zona norte. Esta situación se asocia al crecimiento urbano, uso intensivo del borde lacustre y descargas no reguladas. El plan regulador actual no contempla medidas de protección ambiental efectivas. Continuar urbanizando la ribera norte podría agravar la degradación ecológica y sanitaria del ecosistema.

8. Bibliografía

- Ahmad, N. B., Jaafaru, M. S., Isa, Z., Abdulhamid, Y., Kakudi, R. A., Ugya, A. Y., & Meguellati, K. (2024). High pollution loads engineer oxygen dynamics, ecological niches, and pathogenicity shifts in freshwater environments. *Journal of Hazardous Materials Advances*, 100425.
- Ahmed, W., Payyappat, S., Cassidy, M., & Besley, C. (2021). Mobilization of *Escherichia coli* and fecal source markers from cowpats after simulated rainfall events: Differences between dairy and beef cattle. *Science of The Total Environment*, 756, 143851. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.143851>
- Almanza, V., Figueroa, R., Parra, O., Fernández, X., Baeza, C., Yáñez, J. & Urrutia, R. (2016). Bases limnológicas para la gestión de los lagos urbanos de Concepción, Chile. *Latin American Journal of Aquatic Research*, 44(2), 313–326.
- Beltrán Araya, N. I. (2024). Emisión de metano disuelto en el lago urbano (Laguna Chica), San Pedro de la Paz, región del Biobío, Chile Central.
- Beers, D. T. (2022). Post-implementation re-assessment of agricultural best management practices on watersheds of Conesus Lake: Effects on stream water chemistry and aquatic macroinvertebrate communities (Master's thesis, SUNY Brockport, Department of Environmental Science and Ecology).
- Birch, S., & McCaskie, J. (1999). Shallow urban lakes: a challenge for lake management. *Hydrobiologia*, 395, 365–377.
- Biyela, P. T., & Bezuidenhout, C. C. (2024). Water treatment stage impacts on the occurrence of bacteriological indicators and antibiotic resistance in drinking water production facilities. *Engineering, Technology & Applied Science Research*, 14(4), 7069.
- Carpenter, S. R. (2005). Eutrophication of aquatic ecosystems: bistability and soil phosphorus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(29), 10002–10005.
- Caldwell, J. M., Raley, M. E., & Levine, J. F. (2011). Mitochondrial DNA as a tool for identifying fecal contamination sources in water quality monitoring. *Water Research*, 45(16), 5229–5239.
- Chen, X., Wang, Y., Xu, Y., & Zhang, H. (2022). Temporal variation of nitrogen and phosphorus in urban rivers and its influencing factors: A case study of the Jialing River, China. *Water*, 14(19), 3124.
- Cisternas, M., Torres, L., Urrutia, R., Araneda, A. & Parra, O. (2000). Comparación ambiental, mediante registros sedimentarios, entre las condiciones prehispánicas y actuales de un sistema lacustre. *Revista Chilena de Historia Natural*, 73(1).

Costa, D., Sutter, C., Shepherd, A., Jarvie, H., Wilson, H., Elliott, J., ... & Macrae, M. (2022). Impact of climate change on catchment nutrient dynamics: insights from around the world. *Environmental Reviews*, 31(1), 4–25.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). (2024). *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing* (33rd ed.). CLSI supplement M100. Clinical and Laboratory Standards Institute.

Da Le, N., Hoang, T. T. H., Nguyen, T. M. H., Rochelle-Newall, E., Phung, T. X. B., Pham, T. M. H., ... & Le, T. P. Q. (2024). Microbial contamination in surface water in urban lakes of Hanoi city, Vietnam. *Urban Water Journal*, 21(5), 602–614.

DECRETO144/2009, Establece normas de calidad primaria para la protección de las aguas marinas y estuarinas aptas para actividades de recreación con contacto directo

Díaz-Gavidia, C., Barría, C., Weller, D. L., Salgado-Caxito, M., Estrada, E. M., Araya, A., ... & Adell, A. D. (2022). Humans and hoofed livestock are the main sources of fecal contamination of rivers used for crop irrigation: A microbial source tracking approach. *Frontiers in Microbiology*, 13, 768527.

Dirección General de Aeronáutica Civil. (2024). *Registro de agua caída diaria: Estación Meteorológica Carriel Sur*. Ministerio de Defensa Nacional, Gobierno de Chile. Recuperado de: <https://climatologia.meteochile.gob.cl/application/requerimiento/producto/RE1006>

European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). (2024). *Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters, version 13.0*. Retrieved from <https://www.eucast.org>

Fanzo, J., Bellows, A. L., Spiker, M. L., Thorne-Lyman, A. L., & Bloem, M. W. (2021). The importance of food systems and the environment for nutrition. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 113(1), 7–16.

Fenchel, T., King, G. M., & Blackburn, T. H. (2012). *Bacterial biogeochemistry: the ecophysiology of mineral cycling*. Academic Press.

GI, B. M. (2023). *Escherichia coli* y colifagos somáticos: bioindicadores de contaminación fecal en el Lago Guamuez.

Glibert, P. M. (2017). Eutrophication, harmful algae and biodiversity—Challenging paradigms in a world of complex nutrient changes. *Marine Pollution Bulletin*, 124(2), 591–606.

González-Saldía, R. R., Pino-Maureira, N. L., Muñoz, C., Soto, L., Durán, E., Barra, M. J., ... & Saavedra, A. (2019). Fecal pollution source tracking and thalassogenic diseases: The temporal-spatial concordance between maximum concentrations of human mitochondrial DNA in seawater and Hepatitis A outbreaks among a coastal population. *Science of the Total Environment*, 686, 158-170.

González-Saldía, R., Rueda-Seguel, I., Stuardo, M., Lagos, F., & Krautz, M. C. (2023). Océano, clima y salud: Trazabilidad de la contaminación fecal humana en el ecosistema marino y aguas continentales en un escenario de cambio climático. En *Agua, ecosistemas y salud pública* (p. 179). Centro de Recursos Hídricos para la Agricultura y la Minería (CRHIAM), Universidad de Concepción. https://eula.udec.cl/giba/wp-content/uploads/2023/08/CRHIAM_Libro-Agua-Ecosistemas_-Alta-res.pdf

Guzmán, M. (2021). Los cambios en la expansión urbana y su relación con el estado trófico de Laguna Grande y Laguna Chica de San Pedro de la Paz en los últimos 30 años (Doctoral dissertation, Tesis Pregrado, Universidad de Concepción. Repositorio Bibliotecas Universidad de Concepción).

Haji Mohd Yusof, N. S., & Padmanabhan, E. (2023). Impact of Seasonal Variation and Population Growth on Coliform Bacteria Concentrations in the Brunei River: A Temporal Analysis with Future Projection. *Water*, 15(7), 1275.

He, X., Chen, H., Shi, W., Cui, Y., & Zhang, X.-X. (2015). Persistence of mitochondrial DNA markers as fecal indicators in water environments. *Science of The Total Environment*, 533, 383–390. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.06.119>

Ishii, S., & Sadowsky, M. J. (2008). *Escherichia coli* in the environment: implications for water quality and human health. *Microbes and Environments*, 23(2), 101–108.

Instituto de Salud Pública (ISP), (2010). PRT-712.03-005. NMP para la determinación de coliformes y coliformes fecales en aguas. Sección Microbiología de Alimentos (6pp.)

Jang, J., Hur, H. G., Sadowsky, M. J., Byappanahalli, M. N., Yan, T., & Ishii, S. (2017). Environmental *Escherichia coli*: ecology and public health implications—a review. *Journal of Applied Microbiology*, 123(3), 570–581.

Jeppesen, E., Moss, B., Bennion, H., Carvalho, L., DeMeester, L., Feuchtmayr, H., ... & Verhoeven, J. T. (2010). Interaction of climate change and eutrophication. *Climate Change Impacts on Freshwater Ecosystems*, 119–151.

Kakade, A., Salama, E. S., Han, H., Zheng, Y., Kulshrestha, S., Jalalah, M., ... & Li, X. (2021). World eutrophic pollution of lake and river: Biotreatment potential and future perspectives. *Environmental Technology & Innovation*, 23, 101604.

Kapoor, V., Smith, C., Santo Domingo, J.W., Lu, T., Wendell, D., 2013. Correlative assessment of fecal indicators using human mitochondrial DNA as a direct marker. *Environ. Sci. Technol.* 47 (18), 10485–10493. <https://doi.org/10.1021/es4020458>.

- Karkman, A., Johnson, T. A., Lyra, C., Stedtfeld, R. D., Tamminen, M., Tiedje, J. M., & Virta, M. (2016). High-throughput quantification of antibiotic resistance genes from an urban wastewater treatment plant. *FEMS Microbiology Ecology*, 92(3), fiw014.
- Korajkic, A., Wanjugi, P., Brooks, L., Cao, Y., & Harwood, V. J. (2019). Persistence and decay of fecal microbiota in aquatic habitats. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 83(4), 10-1128.
- Lagos Cabrera, F. G. (2022). Distribución estacional de la contaminación fecal humana en bahía Concepción y su potencial impacto en la salud humana de la población costera.
- Maier, R. M. (2015). Biogeochemical cycling. In *Environmental Microbiology* (pp. 339–373). Academic Press.
- Martellini, A., Payment, P., & Villemur, R. (2005). Use of eukaryotic mitochondrial DNA to differentiate human, bovine, porcine, and ovine sources in fecally contaminated surface water. *Water Research*, 39(4), 541–548.
- Mekonnen, D., Garedew, L., & Medhin, G. (2024). *Vibrio cholerae* O1 and *Escherichia coli* O157:H7 from drinking water and wastewater in Addis Ababa, Ethiopia: Isolation and antimicrobial susceptibility. *BMC Microbiology*, 24, 302.
- Millennium Ecosystem Assessment. (2005). *Ecosystem and human well-being: synthesis*. Island Press, Washington, DC.
- Mundahl, N. D., & Howard, J. (2025). Total Phosphorus Loadings and Corrective Actions Needed to Restore Water Quality in a Eutrophic Urban Lake in Minnesota, USA: A Case Study. *Limnological Review*, 25(3), 28
- Nevers, M. B., Byappanahalli, M. N., Shively, D., Buszka, P. M., Jackson, P. R., & Phanikumar, M. S. (2018). Identifying and eliminating sources of recreational water quality degradation along an urban coast. *Journal of Environmental Quality*, 47(5), 1042–1050.
- Norma Chilena NCh N°1333.Of78. Modificada 1987, Requisitos de Calidad de Agua para diferentes usos. Chile
- Ndione, R. A., Dumas, F., Plus, M., & Fiandrino, A. (2022). Temporal variations in fecal indicator bacteria in bathing water and sediment in a coastal ecosystem: Aytré Bay, Charente-Maritime, France. *Marine Pollution Bulletin*, 175, 113374.
- Osińska, A., Korzeniewska, E., Harnisz, M., Felis, E., Bajkacz, S., Jachimowicz, P., ... & Konopka, I. (2020). Small-scale wastewater treatment plants as a source of the dissemination of antibiotic resistance genes in the aquatic environment. *Journal of Hazardous Materials*, 381, 121221.

- Papajová, I., Šmigová, J., Gregová, G., Šoltys, J., Venglovský, J., Papaj, J., ... & Regecová, I. (2022). Effect of wastewater treatment on bacterial community, antibiotic-resistant bacteria and endoparasites. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 19(5), 2750.
- Parra, O. (2013). Memoria y Balance Campos Deportivos Llacolén, 18-19.
- Parra, O., Valdovinos, C., Basualto, S., & Urrutia, R. (2005). Diversidad fitoplanctónica de los lagos Nahuelbutanos (Chile central), 147–161.
- Parra, O., Valdovinos, C., Urrutia, R., Cisternas, M., Habit, E., & Mardones, M. (2003). Caracterización y tendencias tróficas de cinco lagos costeros de Chile Central. *limnetica*, 22(1-2), 51-83.
- Pérez-Martín, M. Á. (2023). Understanding nutrient loads from catchment and eutrophication in a salt lagoon: the Mar Menor Case. *Water*, 15(20), 3569.
- Pörtner, H. (2002). Climate variations and the physiological basis of temperature dependent biogeography: systemic to molecular hierarchy of thermal tolerance in animals. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 132(4), 739–761.
- Paerl, H. W., & Otten, T. G. (2013). Harmful cyanobacterial blooms: causes, consequences, and controls. *Microbial Ecology*, 65, 995–1010.
- Pradhan, S. K., Sinha, U., Satapathy, D. M., Swain, A. P., & Mishra, R. P. (2018). Assessment of household water treatment and storage practices. *International Journal of Community Medicine and Public Health*, 5(3), 1060–1063.
- Sanhueza Erices, F. A. (2021). Propuesta de anteproyecto de norma secundaria de calidad ambiental para la protección de las aguas superficiales del sistema Laguna Chica, Laguna Grande y Humedal los Batros.
- Sun, C., Wang, S., Wang, H., Hu, X., Yang, F., Tang, M., ... & Zhong, J. (2022). Internal nitrogen and phosphorus loading in a seasonally stratified reservoir: Implications for eutrophication management of deep-water ecosystems. *Journal of Environmental Management*, 319, 115681.
- Suresh, K., Tang, T., Van Vliet, M. T., Bierkens, M. F., Stokal, M., Sorger-Domenigg, F., & Wada, Y. (2023). Recent advancement in water quality indicators for eutrophication in global freshwater lakes. *Environmental Research Letters*, 18(6), 063004.
- Tian, J., Ge, F., Zhang, D., Deng, S., & Liu, X. (2021). Roles of phosphate solubilizing microorganisms from managing soil phosphorus deficiency to mediating biogeochemical P cycle. *Biology*, 10(2), 158.

Torres Poblete, D. A. (2023). Variabilidad espaciotemporal de parámetros biofísicos de calidad del agua integrando datos in-situ y teledetección: caso Laguna Grande San Pedro de la Paz.

Van Puijenbroek, P. J. T. M., Beusen, A. H. W., & Bouwman, A. F. (2019). Global nitrogen and phosphorus in urban wastewater based on the Shared Socio-economic Pathways. *Journal of Environmental Management*, 231, 446–456.

Wetzel, R. G. (2001). *Limnology: lake and river ecosystems*. gulf professional publishing.

World Health Organization. (2018). WHO report on surveillance of antibiotic consumption: 2016-2018 early implementation.

Wu, Z., Li, J., Sun, Y., Peñuelas, J., Huang, J., Sardans, J., ... & Liu, Y. (2022). Imbalance of global nutrient cycles exacerbated by the greater retention of phosphorus over nitrogen in lakes. *Nature Geoscience*, 15(6), 464–468.

Zhang, Y., Chen, M., Li, W., & Liu, L. (2023). Sediment phosphorus release under anoxic conditions in shallow lakes: Implications for internal loading. *Environmental Research*, 226, 115751. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2023.115751>