



Facultad de Ciencias Ambientales
Universidad de Concepción

**“RELACIÓN ENTRE eDNA AMBIENTAL Y METANO DISUELTO EN LA LAGUNA URBANA
TRES PASCUALAS, CHILE CENTRAL: IMPLICANCIAS PARA LA GESTIÓN DE
ECOSISTEMAS EUTROFIZADOS.”**

Habilitación presentada para optar al título de

Ingeniero Ambiental

MATÍAS ANDREE HERRERA CORNEJO
CONCEPCION (Chile), 2026



Facultad de Ciencias Ambientales
Universidad de Concepción

**“RELACIÓN ENTRE eDNA AMBIENTAL Y METANO DISUELTUO EN LA LAGUNA URBANA
TRES PASCUALAS, CHILE CENTRAL: IMPLICANCIAS PARA LA GESTIÓN DE
ECOSISTEMAS EUTROFIZADOS.”**

Habilitación presentada para optar al título de

Ingeniero Ambiental

Alumno: MATÍAS ANDREE HERRERA CORNEJO

**Profesor guía y coguías: DRA. MARIELA YÉVENES; DR. FELIPE AGUILERA; DRA.
MARCELA SALGADO**

CONCEPCION (Chile), 2026.

3er lugar página de calificaciones
Solicitar en Secretaría de Pregrado.

**“RELACIÓN ENTRE eDNA AMBIENTAL Y METANO DISUELTO EN LA LAGUNA URBANA
TRES PASCUALAS, CHILE CENTRAL: IMPLICANCIAS PARA LA GESTIÓN DE
ECOSISTEMAS EUTROFIZADOS.”**

PROFESOR (ES) GUÍA:

PROFESOR COMISIÓN:

PROFESOR COMISIÓN:

CONCEPTO:

(Según Reglamento

de Docencia

Vigente)

Conceptos que se indica en el Título

Concepción, marzo, 2026.

“Relación entre eDNA y metano disuelto en la laguna urbana tres pascualas, Chile central: implicancias para la gestión de ecosistemas eutrofizados”

Profesor Guía: Dra. Mariela Yévenes Burgos



Profesor Guía: Dr. Felipe Aguilera Muñoz



Profesor Comisión: Dra. Marcela Salgado Vargas



Profesor Comisión: Dra. Patricia González Sánchez



CONCEPTO: APROBADO CON DISTINCIÓN MÁXIMA

Conceptos que se indica en el Título

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

Concepción, abril 2026

Tabla de contenido

1. Introducción	15
1.1.1. Problemática	15
1.2. Objetivo general	16
1.3. Objetivos específicos	17
2. Antecedentes	18
2.1. Relación entre la eutrofización y el metano	18
2.2. Relevancia de la producción y oxidación de metano	20
2.3. ADN ambiental	21
3. Metodología	26
4. Resultados y Discusión	49
5. Conclusiones	103
6. Referencias bibliográficas	110

Tabla de Ilustraciones

- Ilustración 1. Perfiles de profundidad de agentes metanotróficos (A), agentes metanogénicos (B) y concentraciones de metano disuelto (C), junto con la composición estable de isótopos de carbono e hidrógeno del metano en la columna de agua. Fuente: Cadieux et al. (2022).....24
- Ilustración 2. Área de Estudio. Figura elaborada mediante el uso del software ArcGIS versión 10.4.1.....26
- Ilustración 3. Metodología para el desarrollo de infografía. Fuente: Elaboración propia a partir de CEDEUS (2021).47
- Ilustración 4. Electroforesis en gel de agarosa (1%) de ADN Ambiental extraído desde Laguna Tres Pascualas. L: marcador de peso molecular (1 kb DNA Ladder). Carriles correspondientes a muestras Subsuperficiales y de Fondo indicadas para los cuatro puntos de muestreo. Condiciones de corrida: 70V, 300 mA, 90 min. La intensidad y continuidad de la señal permiten evaluar el rendimiento e integridad del ADN.56
- Ilustración 5. Gráfico de densidad kernel (KDE) que muestra la relación entre la longitud de las lecturas y la calidad media de lecturas obtenidas en la secuenciación Nanopore para la muestra LTP 1.1SS.67
- Ilustración 6. Gráfico de densidad kernel (KDE) que muestra la relación entre la longitud de las lecturas y la calidad media de lecturas obtenidas en la secuenciación Nanopore para la muestra LTP 2.2SS.69
- Ilustración 7. Gráfico de densidad kernel (KDE) que muestra la relación entre la longitud de las lecturas y la calidad media de lecturas obtenidas en la secuenciación Nanopore para la muestra LTP 1.2F.70

- Ilustración 8. Gráfico de densidad kernel (KDE) que muestra la relación entre la longitud de las lecturas y la calidad media de lectura obtenidas en la secuenciación Nanopore para la muestra LTP 2.3F.71
- Ilustración 9. Gráficos de barra de la composición taxonómica a nivel de filo en las muestras analizadas.74
- Ilustración 10. Gráficos de barra de la composición taxonómica a nivel de género en las muestras analizadas.75
- Ilustración 11. Composición taxonómica (Top 20) a nivel de Filos en LTP-1.1SS (Kraken2–MiniKraken2; tabla clean; conf=0)78
- Ilustración 12. Composición taxonómica (Top 20) a nivel de Género en LTP-1.1SS (Kraken2–MiniKraken2; tabla clean; conf=0)79
- Ilustración 13. Composición taxonómica (Top 20) a nivel de Especies en LTP-1.1SS (Kraken2–MiniKraken2; tabla clean; conf=0)80
- Ilustración 14. Composición taxonómica (Top 20) a nivel de Filos en LTP-1.2F (Kraken2–MiniKraken2; tabla clean; conf=0)82
- Ilustración 15. Composición taxonómica (Top 20) a nivel de Géneros en LTP-1.2F (Kraken2–MiniKraken2; tabla clean; conf=0)83
- Ilustración 16. Composición taxonómica (Top 20) a nivel de Especies en LTP-1.2F (Kraken2–MiniKraken2; tabla clean; conf=0)84
- Ilustración 17. Composición taxonómica (Top 20) a nivel de Filos en LTP-2.2SS (Kraken2–MiniKraken2; tabla clean; conf=0)85
- Ilustración 18. Composición taxonómica (Top 20) a nivel de Géneros en LTP-2.2SS (Kraken2–MiniKraken2; tabla clean; conf=0)86

- Ilustración 19. Composición taxonómica (Top 20) a nivel de Especies en LTP-2.2SS (Kraken2–MiniKraken2; tabla clean; conf=0)87
- Ilustración 20. Composición taxonómica (Top 20) a nivel de Filos en LTP-2.3F (Kraken2–MiniKraken2; tabla clean; conf=0)88
- Ilustración 21. Composición taxonómica (Top 20) a nivel de Género en LTP-2.3F (Kraken2–MiniKraken2; tabla clean; conf=0)89
- Ilustración 22. Composición taxonómica (Top 20) a nivel de Especies en LTP-2.3F (Kraken2–MiniKraken2; tabla clean; conf=0)90
- Ilustración 23. Comparación vertical SS vs F (Top 20) a nivel de Filos en Punto 1, Kraken2 (MiniKraken2), datos ‘clean’ (conf=0)94
- Ilustración 24: Comparación vertical SS vs F (Top 20) a nivel de Género en Punto 1, Kraken2 (MiniKraken2), datos ‘clean’ (conf=0)95
- Ilustración 25. Comparación vertical SS vs F (Top 20) a nivel de Especies en Punto 1, Kraken2 (MiniKraken2), datos ‘clean’ (conf=0)96
- Ilustración 26. Comparación vertical SS vs F (Top 20) a nivel de Filos en Punto 2, Kraken2 (MiniKraken2), datos ‘clean’ (conf=0)98
- Ilustración 27. Comparación vertical SS vs F (Top 20) a nivel de Género en Punto 2, Kraken2 (MiniKraken2), datos ‘clean’ (conf=0)99
- Ilustración 28. Comparación vertical SS vs F (Top 20) a nivel de Especies en Punto 2, Kraken2 (MiniKraken2), datos ‘clean’ (conf=0)100
- Ilustración 29. Afiche educativo desarrollado como herramienta de divulgación científica para la comunidad local de la Laguna Tres Pascualas.....101
- Ilustración 30. Modelo conceptual de la dinámica del metano (CH₄) en la Laguna Tres Pascualas.....105



I. Agradecimientos

No tengo dudas en que escribir los agradecimientos de mi trabajo de investigación de pregrado ha sido la tarea más compleja de todas, puesto que resumir en palabras el agradecimiento hacia quienes estuvieron y están en este largo camino es imposible.

En primer lugar quiero darme un fuerte agradecimiento por persistir, por creer en mí y por tomar decisiones que en su momento pensé que eran erróneas, como el atreverme a cambiar de carrera desde las ciencias sociales hacia la ingeniería y ciencias ambientales, por decidir entrar a la Universidad de Concepción antes que otras casas de estudio, por decidir estudiar antes que trabajar, entre muchas otras decisiones difíciles de tomar y proyectar. Así también, por no decaer en momentos donde lo más fácil en el día a día era estudiar, puesto que me permitía escapar y abstraerme de un montón de dificultades, que sin pensar, permitirían construir el ser humano, hijo, hermano, novio y amigo que hoy orgullosamente soy.

En segundo lugar, y sin dudas la persona más importante, agradecer a mi madre Ingrid por demostrarme que la fuerza, el amor y la valentía están más vivos que nunca, por apoyarme en las noches de estudio y en los días largos de trabajo, por instarme con dulzura a no decaer y a entregarse siempre por completo por lo que necesitase para lograr mis objetivos y sueños, gracias por esas noches de desvelo esperándome con algo calentito para comer y por tener la cama y pieza ordenada cuando pedía que no lo hiciera, gracias por ser una madre ejemplar.

En tercer lugar, gracias a mi familia poco tradicional, compuesta por tres mujeres (mis hermanas) valientes, inteligentes y dulces, por apoyarme y alegrarme cada día de los que vivimos juntos, incluso aquellos donde no entendían el por qué pasaba noches en desvelo. Gracias por entregarme la nobleza de instar a cumplir todo sin siquiera saber qué es lo que uno quería lograr, gracias por estar. Por otro lado, agradecer a mi padre, que si bien no formó parte del camino en

su totalidad, llegó en un momento clave para instarme a dar el último empujón anímico que necesitaba.

En cuarto lugar, agradezco a mi novia Diandra por entregarme la paz, la motivación y la alegría necesaria para atreverme a avanzar con todo lo que fuese necesario para poder culminar esta etapa de la mejor forma. Gracias por amarme y motivarme desde el día uno en que nos conocimos.

En quinto lugar, gracias a mis amigos/as, a mis compañeros del equipo de fútbol del Deportivo Lex, compañeros de carretes, de noches de estudio, de centralazos, de desayunos en el ombligo y de apuntes que me salvaron eternamente para estudiar si es que no iba a clases. Gracias por motivarme a ser mejor cada día, y a pelear intensamente por mis sueños.

En sexto lugar, agradecer a los docentes, auxiliares y secretarias de la Facultad de Ciencias Ambientales, en especial a la Secretaria Carolina Hurtado, por ayudarme no solo con aspectos académicos sino con diligencias que permitieron ayudar a mi familia en los peores momentos de mi vida. A mis compañeros del Laboratorio de Genómica Marina, Desarrollo y Evolución, especialmente a Yeruti y Sebastián, quienes me enseñaron en tiempo récord lo que es la doctrina de laboratorio y el amor por hacer algo que muchas veces es invisible y desconocido para nuestra sociedad.

Por último, agradezco haber tenido el placer de compartir con Camila, ex compañera de Sociología y con John, ex compañero de Ingeniería Ambiental, que hoy en día están descansando y de seguro observando felices este momento, los quiero y recuerdo eternamente.

Agradezco a cada una de las personas que me permitieron crecer en estos largos años de universidad, los cuales llevo en el corazón y en el recuerdo de haber disfrutado y vivido como nunca pensé hacerlo. Gracias.

II. Resumen

Las lagunas urbanas eutrofizadas son sistemas altamente vulnerables desde el punto de vista biogeoquímico y pueden actuar como fuentes relevantes de gases de efecto invernadero (GEI), debido al aporte continuo de materia orgánica de origen antropogénico. En este contexto, esta investigación evaluó la relación entre variables fisicoquímicas y la dinámica del CH₄ disuelto en la Laguna Tres Pascualas (Concepción, Chile), integrando además evidencia molecular basada en ADN ambiental (eDNA) para describir la estructura taxonómica de las comunidades microbianas en estratos subsuperficiales (SS) y de fondo (F), en dos puntos de muestreo.

Se aplicó un enfoque integrador que combinó perfiles fisicoquímicos, análisis estadísticos exploratorios y secuenciación metagenómica/eDNA con tecnología Oxford Nanopore (GridION), seguida de clasificación taxonómica con Kraken2 (MiniKraken) en entorno Ubuntu/WSL. Los resultados sugieren que la temperatura y el potencial óxido-reducción (ORP) estructuran de manera dominante la variabilidad del CH₄ disuelto, alcanzando un alto poder explicativo en el modelo multivariado (R^2 ajustado $\approx 0,93$), lo que posiciona preliminarmente a estas variables como controles fisicoquímicos clave en la dinámica del GEI. En términos interpretativos, este patrón es consistente con un sistema donde el componente térmico y el estado redox condicionan el balance entre producción, acumulación y atenuación del metano a escala de columna de agua.

De forma complementaria, el análisis de eDNA mostró diferenciación vertical y espacial en la composición microbiana, con cambios claros en los perfiles taxonómicos entre SS y F, y entre puntos de muestreo, reportados a nivel de filo, género y especie mediante perfiles comparativos (Top taxones) basados en lecturas clasificadas. En conjunto, los hallazgos sugieren que la Laguna Tres Pascualas opera como un sistema acoplado, donde el contexto fisicoquímico

(especialmente temperatura y redox) no solo se asocia estadísticamente al CH₄, sino que también coincide con variaciones detectables en la estructura microbiana del ecosistema.

Como consideración metodológica, la lectura de los resultados incorpora un tamaño muestral acotado y tasas de clasificación variables entre muestras, propias del enfoque de lecturas largas y del uso de una base de referencia reducida. Aun así, la convergencia entre el análisis estadístico y las clasificaciones taxonómicas permite inferir un diagnóstico integrado y aportar criterios claves para la gestión, orientados a limitar la acumulación de CH₄ mediante control de cargas orgánicas/nutrientes y mejora de condiciones de oxigenación/redox.

Palabras Claves: *Lago urbano Eutrófico – Metano Disuelto - Condiciones Redox - Temperatura - ADN Ambiental – Oxford Nanopore- ORP*

III. Abstract

Urban eutrophic lakes are highly vulnerable systems from a biogeochemical perspective and can act as relevant sources of greenhouse gases (GHGs) due to the continuous input of anthropogenic organic matter. In this context, this research assessed the relationship between physicochemical variables and dissolved CH₄ dynamics in Laguna Tres Pascualas (Concepción, Chile), additionally integrating molecular evidence based on environmental DNA (eDNA) to describe the taxonomic structure of microbial communities in subsurface (SS) and bottom (F) strata at two sampling points.

An integrative approach was applied, combining physicochemical profiling, exploratory statistical analyses, and metagenomic/eDNA sequencing using Oxford Nanopore technology (GridION), followed by taxonomic classification with Kraken2 (MiniKraken) in an Ubuntu/WSL environment. The results suggest that temperature and oxidation–reduction potential (ORP) dominantly structure the variability of dissolved CH₄, achieving high explanatory power in the multivariate model (adjusted R² ≈ 0.93), preliminarily positioning these variables as key physicochemical controls on GHG dynamics. Interpretively, this pattern is consistent with a system in which the thermal component and redox state condition the balance among methane production, accumulation, and attenuation at the water-column scale.

Complementarily, eDNA analysis showed vertical and spatial differentiation in microbial composition, with clear changes in taxonomic profiles between SS and F layers and between sampling points, reported at the phylum, genus, and species levels through comparative profiles (top taxa) based on classified reads. Taken together, the findings suggest that Laguna Tres Pascualas operates as a coupled system in which the physicochemical context (especially temperature and redox) is not only statistically associated with CH₄, but also coincides with detectable variations in the ecosystem's microbial structure.

As a methodological consideration, interpretation of the results incorporates a limited sample size and variable classification rates among samples, inherent to long-read approaches and the use of a reduced reference database. Even so, the convergence between the statistical analysis and taxonomic classifications supports an integrated diagnosis and provides key criteria for management, aimed at limiting CH₄ accumulation through control of organic/nutrient loads and improved oxygenation/redox conditions.

Keywords: *Urban eutrophic lakes – Dissolved methane – Redox conditions – Temperature – Environmental DNA – Oxford Nanopore – ORP..*

1. Introducción

1.1.1. Problemática

Los sistemas lacustres urbanos se caracterizan por su reducida extensión espacial (generalmente $< 10 \text{ km}^2$) y su escasa profundidad ($< 25 \text{ m}$), rasgos morfométricos que los distinguen de los grandes lagos y embalses tradicionalmente estudiados por la limnología (Rosentreter et al., 2021; Deemer et al., 2016). Estas características incrementan la relación entre el área drenada y la superficie del espejo de agua, condicionando su balance hídrico y aumentando su vulnerabilidad frente a presiones del entorno.

La proximidad de estos cuerpos de agua a fuentes puntuales y difusas de contaminación – como escorrentías agrícolas, efluentes industriales y descargas domiciliarias – favorecen un aporte sostenido de nutrientes y materia orgánica, alterando el equilibrio ecosistémico y la capacidad del sistema para procesar dichos insumos. Como resultado, los lagos urbanos suelen presentar altas concentraciones de nutrientes, materia orgánica en suspensión y contaminantes orgánicos e inorgánicos, lo que acelera los procesos de eutrofización y deteriora la calidad del agua, afectando tanto su valor recreativo como su funcionamiento biogeoquímico.

En este contexto de enriquecimiento orgánico, la componente microbiológica adquiere un rol central. La acumulación de materia orgánica en los sedimentos genera condiciones anóxicas que favorecen el desarrollo de comunidades microbianas metanogénicas responsables de la producción de metano (CH_4). Simultáneamente, en los estratos superiores oxigenados, comunidades metanotróficas pueden oxidar y consumir parte de este gas. Sin embargo, en sistemas eutrofizados este equilibrio suele verse alterado, permitiendo que el metano escape a la atmósfera en lugar de ser oxidado, transformando a los lagos urbanos en potenciales emisores de gases de efecto invernadero (GEI) y contribuyendo al forzamiento climático global.

A escala local, diversos estudios han documentado que las lagunas del Gran Concepción, y en particular la Laguna Tres Pascualas, presentan de forma crónica estados tróficos críticos (Campos et al., 2005; FONIS, 2015; Almanza et al., 2023). No obstante, persiste un vacío de conocimiento respecto de cómo interactúan las comunidades microbianas asociadas al ciclo del metano con las condiciones fisicoquímicas de la columna de agua, en sistemas de agua dulce continentales y urbanos, y de qué manera estas interacciones determinan el potencial del sistema como emisor de GEI.

Considerando la necesidad de generar antecedentes que orienten estrategias de recuperación, conservación y mitigación en ecosistemas urbanos eutrofizados, surge la siguiente pregunta de investigación.

Pregunta de investigación

¿Cuál es la relación entre la concentración de metano disuelto, la abundancia relativa de comunidades microbianas metanogénicas y metanotróficas, y los parámetros fisicoquímicos en los estratos subsuperficial y de fondo de la Laguna Tres Pascualas (Concepción, Chile), y qué implicancias tienen estas interacciones para el diseño de estrategias de gestión o mitigación en ecosistemas urbanos eutrofizados?

1.2. Objetivo general

Evaluar la interacción entre las concentraciones de metano disuelto, la estructura de las comunidades microbianas y los parámetros fisicoquímicos en la columna de agua de la Laguna Tres Pascualas, con el fin de comprender su dinámica ecosistémica y aportar lineamientos para la gestión ambiental.

1.3. Objetivos específicos

- a) Caracterizar el perfil fisicoquímico de la columna de agua en los estratos subsuperficial y de fondo, cuantificando la concentración de metano disuelto y variables ambientales relevantes.
- b) Determinar la composición y abundancia relativa de las comunidades metanogénicas y metanotróficas en ambos estratos mediante secuenciación metagenómica.
- c) Evaluar la relación entre las variables fisicoquímicas, la concentración de metano disuelto y estructura de las comunidades microbianas, con el fin de identificar patrones de interacción en el ecosistema.
- d) Diseñar material educativo que sintetice los principales hallazgos del estudio y contribuya a la transferencia de conocimiento para la formulación de lineamientos de gestión ambiental.

2. Antecedentes

2.1. Relación entre la eutrofización y el metano

La eutrofización de los sistemas acuáticos responde tanto a mecanismos de origen natural — como incremento gradual de nutrientes producto de la meteorización y los aportes atmosféricos — como a factores antrópicos que elevan abruptamente las concentraciones de fósforo (P) y nitrógeno (N). Estos aportes antropogénicos se asocian principalmente a actividades agrícolas intensivas, vertidos industriales y a una expansión urbana no planificada, expresada en la disposición de residuos domiciliarios y en descargas de aguas servidas sin regulación adecuada. Mientras que la eutrofización natural se desarrolla a escalas temporales de milenios (Wetzel, 2001), los aportes antropogénicos modernos han acelerado significativamente este proceso, provocando floraciones algales nocivas y pérdidas considerables de biodiversidad en escalas de tiempo decenales.

En la cuenca del Gran Concepción, Región del Biobío, se han documentado episodios recurrentes de floraciones de cianobacterias en diversos cuerpos de agua, entre ellos Laguna Redonda (Parra et al., 1986), Lago Rocuant (Campos et al., 1999), Laguna Chica de San Pedro (Campos et al., 2005), Laguna Tres Pascualas (FONIS, 2015) y Laguna Lo Galindo (Almanza et al., 2013). Estos antecedentes confirman un patrón regional de hipereutrofización crónica y estabilizada que compromete la funcionalidad ecológica, la calidad sanitaria y los servicios ecosistémicos de los sistemas lacustres urbanos.

Desde un punto de vista bioquímico, la eutrofización se origina cuando el ingreso de materia orgánica excede la capacidad del sistema para procesarla. Esta materia orgánica se fragmenta en la columna de agua y posteriormente se deposita en los sedimentos, donde se degrada mediante cuatro vías principales: (a) descomposición física y mecánica, asociada principalmente

al movimiento; (b) descomposición química abiótica, basada en reacciones de oxidación-reducción mediadas por fotólisis o procesos de superficie; (c) descomposición bioquímica aeróbica, en la que hongos y bacterias aerobias mineralizan compuestos orgánicos hasta CO_2 y H_2O ; (d) descomposición bioquímica anaeróbica, en la cual bacterias y arqueas anaerobias transforman la materia orgánica en compuestos reducidos, entre ellos ácidos orgánicos y metano (CH_4), principalmente en los sedimentos de los sistemas acuáticos.

En condiciones anóxicas características de sedimentos eutrofizados, la producción de CH_4 alcanza su máximo, ya que los procesos fermentativos y las rutas respiratorias anaeróbicas — incluyendo la desnitrificación y la reducción de manganeso, hierro y sulfatos — culminan en la metanogénesis. Este proceso es catalizado por la enzima metil-coenzima M reductasa (*mcrA*), característica de las arqueas metanogénicas (Bastviken et al., 2008). El metano producido migra hacia la columna de agua, donde es parcialmente consumido por microorganismos metanotróficos — principalmente bacterias aeróbicas del género *Methylomonas* y arqueas anaeróbicas del grupo ANME — mediante rutas oxidativas que convierten CH_4 en CO_2 . El metano disuelto que no es oxidado se libera a la atmósfera por difusión y ebullición, contribuyendo de forma significativa al forzamiento radiativo global (Sawakuchi et al., 2016), dado su potencial de calentamiento global entre 28 y 34 veces superior al del CO_2 en un horizonte de 100 años.

La cuantificación y comprensión de estas dinámicas de CH_4 en lagos urbanos resulta fundamental, no solo para modelar flujos de gases de efecto invernadero y evaluar su contribución al cambio climático, sino también para diseñar estrategias de remediación y gestión integrada de cuencas urbanas. En este contexto, Chile presenta una marcada escasez de estudios detallados en lagos de pequeña escala afectados por eutrofización, por lo que el estudio de la Laguna Tres Pascualas aporta antecedentes relevantes sobre flujos de metano y comunidades microbianas en un escenario de alta presión antropogénica.

2.2. Relevancia de la producción y oxidación de metano

El metano (CH_4) es un gas de efecto invernadero de alta relevancia debido a su elevado potencial de calentamiento global, a su capacidad de oxidación en la atmósfera y a la tendencia al alza de sus emisiones (Torres et al., 2002), aun considerando que su vida media atmosférica es relativamente corta (12-15 años) en comparación con el CO_2 (100-115 años). Este gas puede ser generado y emitido tanto por procesos naturales como antrópicos, principalmente mediante la degradación anaeróbica de la materia orgánica facilitada por microorganismos, siendo los sistemas acuáticos – como lagos, embalses, humedales, y suelos inundados – focos relevantes de emisión de gases de efecto invernadero (Bastviken et al., 2008; Conrad, 2009; DelSontro et al., 2018; Chowdury & Dick, 2013; Bodmer et al., 2010).

La participación de los microorganismos en el ciclo del metano es central, dado que estos regulan los procesos de producción y oxidación del gas a través de su interacción con la materia orgánica (Torres et al., 2002). Las arqueas metanogénicas producen CH_4 mediante rutas anaeróbicas en sedimentos saturados, donde las condiciones altamente reductoras resultan óptimas para la metanogénesis (Chowdury & Dick, 2015; Del Sontro et al., 2018). En contraste, la oxidación del metano en la columna de agua superficial se lleva a cabo mediante la acción de bacterias metanotróficas, capaces de operar tanto en presencia como ausencia de oxígeno (Conrad, 2009).

La eficiencia de estos procesos se explica en gran medida por la elevada productividad de metanógenos y metanotrofos en zonas donde se desarrollan gradientes pronunciados y contrapuestos entre CH_4 y oxígeno (O_2), una situación típica en los sistemas acuáticos. La oxidación del metano corresponde al proceso mediante el cual el CH_4 es transformado principalmente en dióxido de carbono (CO_2), utilizando el metano utilizar el metano como fuente

de energía y carbono para el crecimiento microbiano, lo que constituye un mecanismo clave para limitar su emisión a la atmósfera.

No obstante, en ecosistemas acuáticos altamente perturbados, como aquellos sometidos a eutrofización, este gradiente $\text{CH}_4\text{-O}_2$ puede verse alterado. En estos sistemas, la disponibilidad de oxígeno en la columna de agua es limitada y la producción de metano en los sedimentos se intensifica debido a la elevada carga de materia orgánica. Adicionalmente, se ha demostrado que la presencia de cianobacterias contribuye de manera significativa a la liberación de CH_4 incluso bajo condiciones oxigenadas, mediante mecanismos potencialmente asociados a la fotosíntesis (Bizic et al., 2020). Esto implica que el metano puede producirse no solo en ambientes anaeróbicos, sino también en condiciones oxigenadas, ampliando el conjunto de procesos que caracterizan a los sistemas eutróficos como emisores potenciales de metano.

Estos mecanismos sustentan la denominada “paradoja del metano” (Morana et al., 2020), que describe la presencia y producción de CH_4 en aguas oxigenadas, atribuida a procesos como la producción microbiana aeróbica (Bizic et al., 2020), la degradación de metilaminas y compuestos osmoprotectores (Wang et al., 2021) y el colapso de microhábitats anóxicos (Bastviken et al., 2008). En conjunto, estos antecedentes refuerzan la necesidad de analizar el potencial de emisión de metano de los sistemas acuáticos urbanos eutrofizados desde una perspectiva integrada.

2.3. ADN ambiental

La obtención de información sobre los microorganismos presentes en sistemas acuáticos resulta fundamental para caracterizar los agentes activos en la producción y oxidación de metano, así como para determinar en qué niveles de la columna de agua se desarrollan estos procesos. En ese contexto, herramientas moleculares como el análisis de ADN ambiental (eDNA) han adquirido

relevancia para el estudio de ecosistemas acuáticos (Padilla-García et al., 2021; Grifero, 2022), ya que permiten analizar el material genético presente en una muestra ambiental sin necesidad de cultivar o aislar los organismos que lo contienen.

El uso de eDNA permite estudiar la diversidad, abundancia relativa y función de los microorganismos presentes, los cuales reflejan los ciclos biogeoquímicos de nutrientes - carbono (C), fósforo (P) y nitrógeno (N) - así como variaciones en parámetros ambientales como pH y temperatura. Estas comunidades están estrechamente vinculadas a las características del entorno, tanto a escala de cuenca como a nivel local (Doherty et al., 2017; Urycki et al., 2020).

La detección y distribución del eDNA están moduladas por procesos de retención, resuspensión y degradación del ADN ambiental, así como por la dispersión y viabilidad de los propios microorganismos (Jerde et al., 2016; Shogren et al., 2017; Droppo et al., 2009; Newby et al., 2009). En consecuencia, la estructura y composición de los microbiomas a lo largo del perfil de la columna de agua están condicionadas tanto por factores abióticos - como la velocidad del flujo y la interacción con los sedimentos - como por procesos bióticos, incluyendo la depredación y el consumo de nutrientes, los cuales determinan las rutas metabólicas de producción y oxidación de metano en la columna de agua y en los sedimentos.

Los avances en análisis metagenómicos han transformado la comprensión de la ecología microbiana acuática, superando la visión histórica de las comunidades bacterianas de agua dulce como “cajas negras”. Estudios recientes han demostrado que estas comunidades, aunque organizadas en distintos grupos taxonómicos, responden de manera predecible a factores ambientales destacando el pH como una variable clave, con una influencia mayor que la temperatura o el carbono orgánico disuelto (Newton et al. 2011; Lauber et al., 2009).

Investigaciones como las de Urycki et al. (2020) han demostrado que las variaciones en la composición de bacterias y arqueas entre subcuencas fluviales se correlacionan con características hidrológicas y geológicas de las cuencas, subrayando el vínculo entre procesos biogeoquímicos y estructura comunitaria. Asimismo, Bonetti et al. (2021) evidenciaron respuestas rápidas de comunidades metanogénicas y metanotróficas ante pulsos de metano en humedales diseñados, mientras que Xu et al. (2020) señalaron que las floraciones algales nocivas no solo deterioran la calidad del agua, sino que también pueden constituir fuentes significativas de CH₄.

Desde un punto de vista bioquímico, la metanogénesis en sedimentos saturados de materia orgánica representa la principal ruta de producción de CH₄ bajo condiciones anaeróbicas (Torres et al., 2002; Chowdhury & Dick, 2015; Del Sontro et al., 2018): En contraste, en las capas oxigenadas de la columna de agua, las bacterias metanotróficas llevan a cabo la oxidación de CH₄ a CO₂, siendo este proceso más eficiente en zonas con gradientes marcados de metano y oxígeno (Conrad, 2009; Bastviken et al., 2008). Esta dualidad funcional explica en gran medida la dinámica de CH₄ observada en ecosistemas lénticos y lóticos y fundamenta la necesidad de integrar ambos extremos del ciclo microbiano en estudios metagenómicos.

A nivel global, los estudios que integran eDNA y dinámica del metano siguen siendo escasos. Un ejemplo relevante es el trabajo de Cadieux et al., (2022), quienes identificaron microorganismos metanogénicos y metanotróficos en relación con la profundidad de la columna de agua, considerando sedimentos anóxicos y capas de agua oxigenadas. En dicho estudio, la secuenciación del gen 16S rRNA permitió evidenciar la distribución vertical de estas comunidades en función del gradiente de metano y oxígeno, tal como se ilustra en la Ilustración 1, donde se observa la correspondencia entre la concentración de CH₄ disuelto y la abundancia relativa de agentes metanogénicos y metanotróficos (Cadieux et al., 2022).

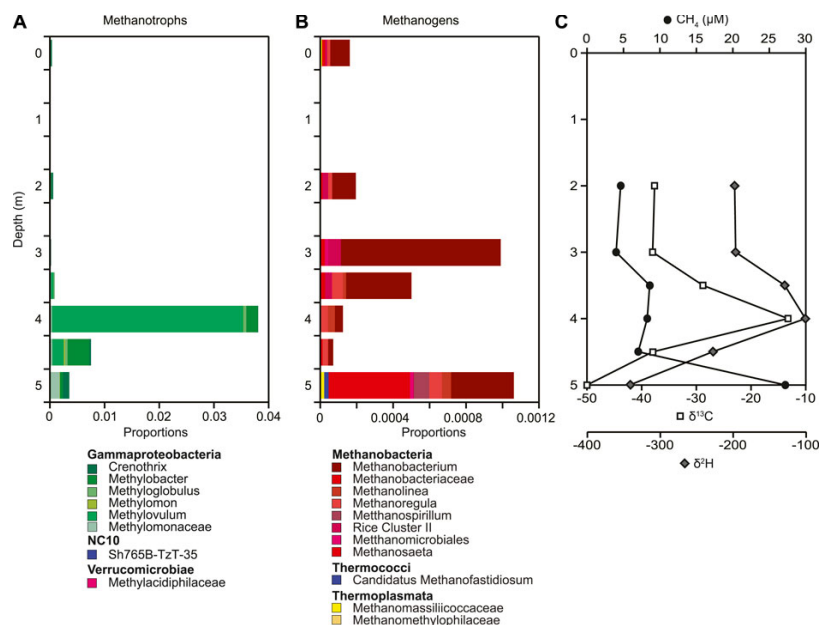


Ilustración 1. Perfiles de profundidad de agentes metanotróficos (A), agentes metanogénicos (B) y concentraciones de metano disuelto (C), junto con la composición estable de isótopos de carbono e hidrógeno del metano en la columna de agua. *Fuente: Cadieux et al. (2022).*

No obstante, estos estudios se concentran principalmente en el hemisferio norte, donde las condiciones climáticas y factores antropogénicos difieren sustancialmente de los sistemas urbanos chilenos. En este escenario, la aplicación de eDNA en ecosistemas acuáticos no debe limitarse a la identificación taxonómica, sino orientarse a la interpretación funcional de las comunidades microbianas y de su respuesta a procesos de eutrofización y variaciones fisicoquímicas, considerando además las dinámicas de retención y resuspensión del ADN ambiental que influyen en la representatividad de los resultados.

En Chile, los estudios sobre emisiones de metano se han concentrado principalmente en ambientes marinos (Flores-Leiva et al., 2013; Farías et al., 2020) y en suelos agrícolas (Alfaro et al., 2014; Alfaro et al., 2020), mientras que Yévenes et al. (2017, 2019) han abordado la interacción entre aguas continentales y emisiones de gases de efecto invernadero en fiordos australes, destacando la relación entre los flujos de CH₄, N₂O y CO₂ en sistemas de aguas mixtas.

En este contexto, para avanzar en la comprensión de estas dinámicas, la aplicación de ADN ambiental ha emergido como una herramienta clave, ya que permite detectar el material genético presente en una muestra sin necesidad de cultivo previo y evaluar la diversidad y función de la microbiota acuática. Sin embargo, es necesario considerar que se ha reportado que los patrones de retención y resuspensión del ADN influyen en la representatividad de los fragmentos genéticos recuperados (Jerde et al., 2016; Shogren et al, 2017), así como la movilidad de los organismos vivos (Droppo et al., 2009; Newby et al., 2009), entre otros factores a considerar al momento de analizar y concluir resultados de la presente investigación.

3. Metodología

Área de Estudio

La Laguna Tres Pascualas ($38^{\circ}48'50''\text{S}$ $73^{\circ}02'30''\text{O}$) es un cuerpo de agua superficial de origen fluvial, correspondiente a un remanente de un antiguo meandro del río Biobío (Martínez, 1968; Thiele et al., 1998). Se localiza en el sector Paicaví-Barrio Norte de la ciudad de Concepción, en la Región del Biobío, y forma parte del sistema de cuencas costeras e islas comprendidas entre los ríos Itata y Biobío (Ilustración 2). Presenta una superficie aproximada de 5,9 hectáreas y un volumen aproximado de 344.500 m^3 (Almanza et al., 2016).

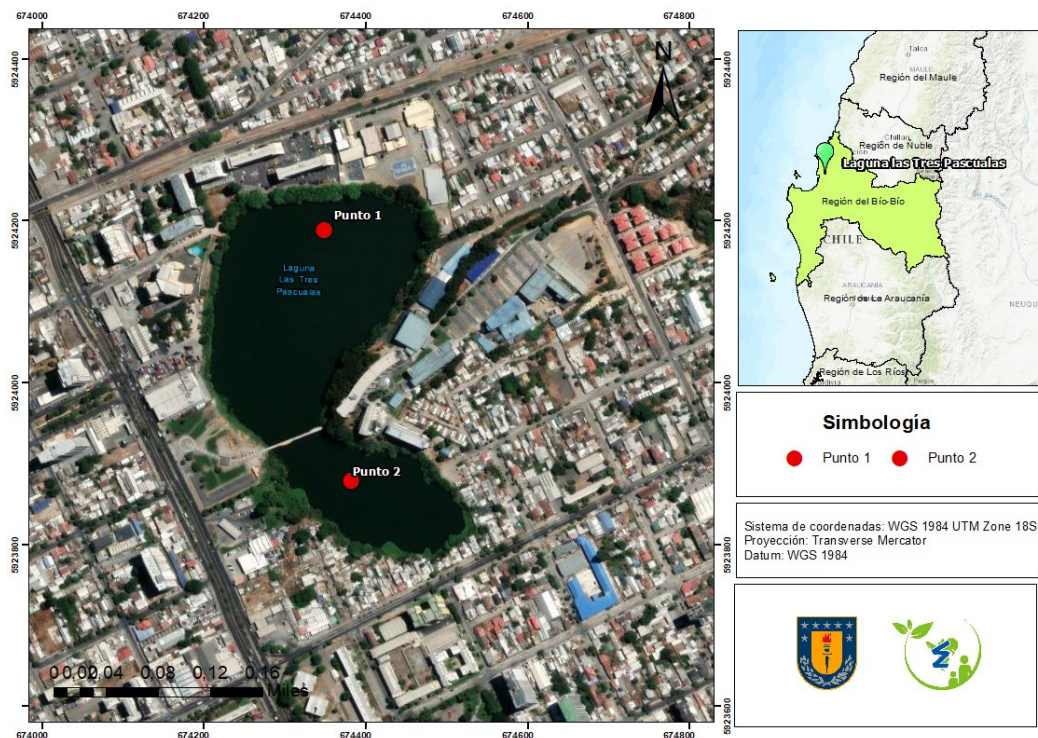


Ilustración 2. Área de Estudio. Figura elaborada mediante el uso del software ArcGIS versión 10.4.1.

Tabla 1. Coordenadas geográficas de los puntos de muestreo en la Laguna Tres Pascualas.

Nombre	Coordenadas	
LPT-1	36° 48' 43.4" S	73° 02' 43.1" W
LTP-2	36° 48' 53.7" S	73° 02' 42.1" W

El sistema se emplaza a 80 m.s.n.m. y alcanza una profundidad máxima de 8,2 m. Presenta una variación térmica menor a 2°C, por lo que no desarrolla estratificación térmica (Almanza et al., 2016). La línea de la ribera, con una extensión de 1.500 m, presenta en un 92,4% de bordes sin acceso público, debido principalmente a la presencia de conjuntos habitacionales formales e informales, así como a instituciones educativas de nivel secundario y universitario, quedando disponible solo un 7,6% para uso comunitario. Diversas investigaciones académicas han evidenciado el deterioro del estado trófico del sistema, reportando condiciones de eutrofización e hipereutrofización durante los periodos 2011, 2012 y 2013 (Almanza et al, 2016), estudios que además aportan información morfométrica detallada de la Laguna (ver Tabla 2).

Tabla 2. Parámetros morfométricos de la Laguna Tres Pascualas. Fuente: Elaboración propia a partir de información recopilada de Almanza et al. (2016)

Parámetros morfométricos	
Latitud	36° 48' 50" S
Longitud	73° 02' 30" O
Altura	80 m.s.n.m.
Profundidad máxima	8,2 m
Área superficial	5,9 ha
Estratificación térmica	No posee
Volumen	344.500 m ³

Diseño muestral

La obtención de las muestras se realizó una única campaña (Tabla 3), llevada a cabo en primavera de 2024, específicamente el 21 de octubre, en un horario comprendido entre las 11:30 y las 13:30 horas. El muestreo se efectuó utilizando una embarcación tipo *Zodiac* y contó con el apoyo de dos asistentes pertenecientes a los laboratorios de Agua y Ciencia Ciudadana (LACC) y del Centro de Ciencias Ambientales - EULA Chile, ambos adscritos a la Facultad de Ciencias Ambientales de la Universidad de Concepción.

Tabla 3. Definición de puntos de recolección para la campaña de muestreo.

Muestra	Nombre	Descripción	Fecha
Subsuperficial	LTP-1.1SS	Muestra 1.1 a nivel Subsuperficial	21/10/2024
Subsuperficial	LTP-1.2SS	Muestra 1.2. a nivel Subsuperficial	21/10/2024
Subsuperficial	LTP-1.3SS	Muestra 1.3. a nivel Subsuperficial	21/10/2024
Fondo	LTP-1.1F	Muestra 1.1. a nivel Fondo	21/10/2024
Fondo	LTP-1.2F	Muestra 1.2. a nivel Fondo	21/10/2024
Fondo	LTP-1.3F	Muestra 1.3. a nivel Fondo	21/10/2024
Subsuperficial	LTP-2.1SS	Muestra 2.1 a nivel Subsuperficial	21/10/2024

Muestra	Nombre	Descripción	Fecha
Subsuperficial	LTP-2.2SS	Muestra 2.2. a nivel Subsuperficial	21/10/2024
Subsuperficial	LTP-2.3SS	Muestra 2.3 a nivel Subsuperficial	21/10/2024
Fondo	LTP-2.1F	Muestra 2.1 a nivel Fondo	21/10/2024
Fondo	LTP-2.2F	Muestra 2.2 a nivel Fondo	21/10/2024
Fondo	LTP-2.3F	Muestra 2.3 a nivel Fondo	21/10/2024

Se determinaron 4 puntos de muestreo (Dos a nivel subsuperficial y dos a nivel de fondo, en dos puntos distintos), los cuales fueron recolectados por “triplicado”, dando un total de 12 muestras, en una fecha determinada (Una estación determinada del año) sin una comparación en otro punto del año calendario, por lo que, los resultados representan una caracterización puntual del sistema durante el periodo de muestreo y deben interpretarse como un diagnóstico “exploratorio” de la dinámica fisicoquímica y microbiana de la laguna.

Recolección de muestras

Concentración de metano y parámetros fisicoquímicos

Para la determinación de la concentración de metano de la Laguna Tres Pascualas se recolectaron muestras por triplicado en dos puntos de muestreo y a dos profundidades distintas: nivel subsuperficial (10-20 cm de profundidad) y nivel de fondo, este último obtenido mediante

botella Niskin sobre el agua intersticial. Las muestras se extrajeron en viales cromatográficos de vidrio de 20 mL y fueron fijadas inmediatamente con ácido clorhídrico (HCl), con el fin de detener la actividad biológica y evitar la sobreestimación o subestimación de las concentraciones de metano medidas *in situ*.

Tradicionalmente, la fijación de muestras para análisis de metano se realiza mediante cloruro de mercurio (HgCl_2) (Tilbrook y Karl, 1995). Sin embargo, debido a que el uso de HgCl_2 implica un manejo altamente restrictivo y un riesgo ecológico considerable por tratarse de un metal pesado, se optó por un protocolo alternativo. En este contexto, el Laboratorio de Agua y Ciencia Ciudadana (LACC) evaluó el cambio metodológico, obteniendo resultados que respaldan la sustitución del cloruro de mercurio por HCl sin comprometer la calidad analítica de las mediciones.

Posteriormente, los viales fueron sellados *in situ* mediante tapones herméticos y tapas de aluminio utilizando un crimper. Las muestras se transportaron en un cooler con hielo para mantener una temperatura aproximada de 4°C, y una vez en el laboratorio, fueron almacenadas en un compartimento a -20°C en el Laboratorio de Agua y Ciencia Ciudadana.

Para el análisis de la concentración de metano, se equilibraron las fases gaseosa y líquida mediante la adición de 5 mL de helio en cada vial. Posteriormente, la cuantificación del metano se realizó mediante cromatografía de gases, utilizando un cromatógrafo de gases Shimadzu modelo GC 2014, equipado con un detector de ionización de llama (FID).

De forma paralela, se realizaron mediciones *in situ* de diversos parámetros fisicoquímicos de la columna de agua. Los parámetros fisicoquímicos, así como la clorofila y turbidez, se midieron utilizando un multiparámetro Hannah modelo HI9829, botellas Durán de vidrio ámbar de 1 L y un disco Secchi, respectivamente.

Tabla 4. Parámetros fisicoquímicos evaluados en la columna de agua.

Parámetro	Unidad de medida
Nitrato	PPM
Clorofila	mg/m ³
Temperatura	°C
pH	-
Conductividad	μS/cm
ORP	mV
Turbidez	FNU
OD	PPM
Oxígeno	%
Solidos Totales Disueltos	PPM

ADN ambiental

Con respecto a la extracción de ADN, esta se orientó en la caracterización de la composición taxonómica de comunidades microbianas asociadas a la Laguna Tres Pascualas, a partir del eDNA extraído desde muestras de agua, seguido de la extracción del material de interés (ADN bacteriano) por medio de un protocolo de extracción estandarizado en el Laboratorio de Genómica Marina, Desarrollo y Evolución (LGMDE) de la Universidad de Concepción, para luego dar paso a la preparación de librería, a través de protocolo Ligation Sequencing Kit V14 (SQK-LSK114) de Oxford Nanopore Technologies (ONT), que permitiría secuenciar por medio de un dispositivo GridION, y por consecuencia, analizar bio informáticamente para dar con las taxas asociadas a nuestro ecosistema.

El enfoque utilizado se inscribe dentro de la metagenómica aplicada al estudio de comunidades, donde es clave poder distinguir entre flujos basados en amplicones y flujos shotgun/genómicos, debido a que cada uno exige supuestos, herramientas y criterios de calidad distintos (Wooley et al., 2010; Ciuffreda et al., 2021; Xia et al., 2023).

Dado que ONT corresponde a una tecnología de tercera generación, sus lecturas presentan ventajas relevantes (lecturas largas, tiempo “real”) pero también condiciones específicas (sensibilidad a calidad/pureza del ADN y un perfil de error distinto a tecnologías de segunda generación), lo cual impacta directamente en el rendimiento de secuenciación y la clasificación taxonómica asociada. Por lo anterior, la metodología se estableció de la siguiente forma:

1. Recolección y extracción del ADN bacteriano
2. Preparación de Librerías para la secuenciación mediante ONT
3. Análisis Bio informático de la secuenciación a través de herramientas como Kraken2/MiniKraken en entorno Ubuntu (WSL).

Para cada muestra se recolectó 1 Litro de agua desde la zona definida del punto de muestro, utilizando frascos DURAN de 1L. Con el objetivo de minimizar exposición a radiación UV, lo que provocaría una perturbación a la muestra, se cubrieron los frascos con papel aluminio y se depositó en un “Cooler” a la menor temperatura posible para ser trasladado al LGMDE y preservar las muestras a una temperatura de -80°C. El manejo de muestras líquidas, asociadas a ambientes abiertos como lagunas, presenta desafíos en torno a la exposición, temperatura, tiempos en la cual la muestra se puede ver afectada, lo que podría potencialmente dañar la integridad del ADN y aumentar el ruido o la contaminación de esta, por ello la cadena de transporte y el control de calidad se consideran puntos críticos para los procedimientos posteriores (Ciuffreda et al., 2021; Chen & XU, 2023).

Sacada la muestra del -80°C , se dispone la muestra para ser filtrada mediante un sistema de vacío utilizando un matraz Kitasato con embudo de porcelana y bomba de vacío, asegurando conexiones selladas con Parafilm para evitar fugas y minimizar riesgo de contaminación cruzada. Se utilizó papel filtro Whatman cualitativo grado 5 con porosidad de 2,5 μm . EL filtro fue previamente humedecido/preparado con agua destilada, y luego se procedió a filtrar el volumen total de muestra desde el frasco.

Una vez completado el filtrado, se retiró el filtro con pinzas previamente tratadas (Exposición UV), se transfirió a Placa Petri y se cortó en fragmentos con bisturí para aumentar el contacto durante la extracción.

Los fragmentos del filtro se transfirieron a un tubo Falcon de 15 mL y se añadió 5 mL del buffer de extracción (Ver Anexo X). La mezcla se incubó en baño de agua a $60-65^{\circ}\text{C}$, aplicando vórtex 1 minuto cada 10 minutos por 7 ciclos.

Luego:

- Se centrifugó a 4°C por 20 min a 3000 rcf
- Se transfirió el sobrenadante a un nuevo Falcon de 15 mL

Para precipitación del ADN:

- Se añadieron 4 mL de Isopropanol
- Se incubó a -20°C por un periodo aproximado de 20 horas

Al día siguiente:

- Se centrifugó a 4°C por 20 min a 3000 rcf
- Se descartó cuidadosamente el sobrenadante

- Se traspasó el contenido de interés (pellet y fracción con pigmentación cuando correspondió) hacia un Eppendorf de 1,5 mL

Posteriormente:

- Se centrifugó a 4°C por 15 minutos a 15.000 g y se descartó el sobrenadante

Una vez lavado el sobrenadante:

- Se añadió 200 uL de EtOH al 70%, resuspendiendo suavemente el pellet sin desintegrarlo
- Se centrifugó a 4°C por 15 minutos a 15.000 g
- Se repitió el lavado una segunda vez

Secado:

- Se aspiró el sobrenadante y se dejó secar el pellet bajo campana sobre papel (1-5 minutos, evitando grietas)

Luego, en la resuspensión:

- Se resuspende en 30 uL de agua libre de nucleasas y se deja disolver por 30 min a temperatura ambiente

Posteriormente, para el tratamiento con RNAsa:

- Se añadió 0,5 uL de RNAsa A y se incubó 30 minutos a 37°C en termociclador.

Finalmente, el almacenamiento consiste en:

- 4°C para uso inmediato
- -20°C para almacenamiento prolongado

Posteriormente al procedimiento de extracción se debe realizar un control de calidad del ADN extraído, el cual es un paso clave para la secuenciación a través ONT. Para aquello se estimó la concentración y pureza del ADN mediante Nanodrop ND-1000, registrando concentración y relación A260/A280 como indicador de pureza. Esta evaluación es crítica porque contaminantes y baja pureza afectan la eficiencia de preparación de librerías y la calidad de secuenciación (Rojas-Villalta et al., 2024; Oxford Nanopore Technologies, 2025). Luego, se evaluó integridad del ADN mediante electroforesis en gel de agarosa 1% con buffer TAE, tinción con bromuro de etidio, y marcador Quickload 1kb extended DNA ladder. La corrida se ejecutó a 70 V, 300 mA por 90 min, visualizando en equipo documentador bajo UV. La relevancia de este paso consiste en que ONT es sensible a fragmentación no deseada y arrastre de contaminantes a lo largo de las preparaciones previas, por ello, evaluar la pureza, concentración y distribución de tamaño es parte del control mínimo defendible que debemos realizar (Ciuffreda et al., 2021).

Posterior a la extracción y evaluación de pureza y concentración, se procede a preparar la librería para ONT a través del Ligation Sequencing Kit V14 (SQK-LSK114), el cual consiste en:

- Utilización de ADN genómico
- No requiere PCR previo
- Es compatible con celdas de flujo R10.4.1. para MinION/GridION (ONT)

El protocolo oficial recomienda trabajar con ADN genómico de alto peso molecular, ajustando masa/cantidad según longitud de fragmentos. De forma general, el kit considera como referencia:

- 1 µg de ADN para fragmentos largos (>10 kb),
- o 100–200 fmol según tamaño de fragmentos (Oxford Nanopore Technologies, 2025).

La cuantificación recomendada por protocolo para ADN (y librería) es mediante Qubit dsDNA HS, debido a su mejor robustez frente a contaminantes respecto a mediciones espectrofotométricas

(Oxford Nanopore Technologies, 2025). En el diseño metodológico, Nanodrop se utiliza como indicador de pureza y Qubit como cuantificación de referencia cuando se dispone.

El protocolo oficial organiza la preparación de librería en tres bloques principales:

- (i) reparación del ADN y preparación de extremos,
- (ii) ligación de adaptadores y purificación,
- (iii) acondicionamiento y carga de celda de flujo (Oxford Nanopore Technologies, 2025).

5.3.1 Reparación del ADN y preparación de extremos

La finalidad de esta etapa es reparar el ADN y preparar extremos adecuados para la ligación del adaptador. El protocolo oficial incorpora reactivos del módulo NEBNext (Companion Module v2) y define incubaciones controladas (Oxford Nanopore Technologies, 2025). De manera resumida, la lógica es:

1. Ajustar el ADN en agua libre de nucleasas al volumen objetivo.
2. Ejecutar mezcla de reparación y end-prep (incluye incubaciones a 20 °C y 65 °C según protocolo).
3. Purificar con microesferas AMPure XP, lavados con etanol 80%, secado sin agrietar y elución.
4. Cuantificar el eluido (Qubit) y, si corresponde, mantener a 4 °C hasta el día siguiente (Oxford Nanopore Technologies, 2025).

La relevancia metodológica de lo anterior reside en la recuperación de ADN y la pérdida por selección de tamaño dependen de la proporción de microesferas, y el protocolo advierte que una proporción inferior a la esperada puede generar pérdidas significativas (Oxford Nanopore Technologies, 2025).

Posteriormente, la ligación se realiza incorporando Ligation Adapter (LA) junto con Ligation Buffer (LNB) del kit y una ligasa recomendada (Salt-T4 DNA Ligase). El protocolo indica explícitamente que LNB del kit mejora la eficiencia de ligación del adaptador respecto a buffers alternativos (Oxford Nanopore Technologies, 2025).

Después de la ligación, se aplica purificación con AMPure XP y lavados que pueden orientarse a:

- Enriquecer fragmentos largos (>3 kb) usando Long Fragment Buffer (LFB), o
- Conservar fragmentos de todos los tamaños usando Short Fragment Buffer (SFB) (Oxford Nanopore Technologies, 2025).

Esta decisión es relevante para la interpretación: en eDNA/agua muchas veces existe fragmentación, y elegir LFB vs SFB afecta la composición de longitudes y potencialmente la diversidad representada.

La librería final se recupera en Elution Buffer (EB) y el protocolo recomienda cuantificar antes de cargar. Además, sugiere secuenciar lo antes posible tras la ligación, o conservar a 4 °C por períodos cortos y -80 °C para almacenamiento prolongado (Oxford Nanopore Technologies, 2025).

Previo a la carga, el protocolo recomienda:

- Llevar la celda de flujo a temperatura ambiente (~20 min) para mejor visibilidad y manipulación,
- Verificar el número de poros disponibles (para MinION/GridION se menciona un mínimo de referencia bajo garantía (mínimo 800 poros)),

- Evitar estrictamente introducir burbujas en la matriz (Oxford Nanopore Technologies, 2025).

El cebado se realiza con una mezcla basada en Flow Cell Flush (FCF) y Flow Cell Tether (FCT), y el protocolo recomienda agregar BSA (0,2 mg/ml final) para mejorar rendimiento de celdas R10.4.1 (Oxford Nanopore Technologies, 2025).

La librería se prepara para carga con Sequencing Buffer (SB), Library Beads (LIB) (mezcladas inmediatamente antes por sedimentación rápida) y el volumen de librería (12 µl de librería en el ejemplo del protocolo), generando una mezcla total que se carga gota a gota por el puerto SpotON (Oxford Nanopore Technologies, 2025). Tras cargar, se recomienda colocar el protector de celda para proteger y mantener condiciones durante la corrida (Oxford Nanopore Technologies, 2025).

Con respecto a la corrida de secuenciación, se ejecutó en plataforma GridION, controlada mediante MinKNOW, el cual gestiona adquisición de datos y basecalling en tiempo real. De acuerdo con el protocolo oficial, en MinKNOW se selecciona explícitamente el kit SQK-LSK114 en la configuración del experimento (Oxford Nanopore Technologies, 2025).

Parámetros utilizados fueron:

- Run limit: 48 h
- Pore scan frequency: 6 h
- Reserved pores: Off
- Basecalling: High-accuracy model v3.3 (450 bps)
- Modified basecalling: Off

- Min Q score: 9

El uso de high-accuracy se justifica por la necesidad de mejorar la confiabilidad por lectura, especialmente relevante cuando el objetivo es clasificación taxonómica y cuando se trabaja con bases de datos reducidas (Rojas-Villalta et al., 2024; Ciuffreda et al., 2021).

Posteriormente, los archivos FASTQ se obtuvieron desde los directorios de salida **fastq_pass** de la secuenciación realizada a través de GridION. Dado que se encontraban comprimidos, se trabajó con archivos *.fastq.gz*.

Para asegurar trazabilidad y facilitar el procesamiento, los FASTQ de cada muestra se consolidaron en un archivo final por condición/punto (ej.: *1.1SS.fastq.gz*, *1.2F.fastq.gz*, *2.2SS.fastq.gz*, *2.3F.fastq.gz*), manteniendo consistencia entre nomenclatura de muestreo y resultados bioinformáticos.

Es importante recalcar que, se aplicó filtrado mínimo orientado a:

- Reducir lecturas extremadamente cortas o de baja calidad,
- estandarizar el input al clasificador.

Se empleó una estrategia operacional basada en descompresión, filtrado y recompresión (por ejemplo, usando *filtlong* con umbrales tipo *min_mean_q=9* y *min_length=500*), y se verificó el resultado con estadísticas (por ejemplo *seqkit stats*). Este tipo de filtrado es consistente con flujos shotgun en ONT, donde la calidad puede impactar drásticamente la clasificación (Ciuffreda et al., 2021; Xia et al., 2023).

Ahora bien, es relevante mencionar que en una fase preliminar se evaluó utilizar DADA2 con el objetivo de obtener una taxonomía rica y detallada mediante la inferencia de ASVs, un enfoque ampliamente usado en estudios basados en amplicones (p.ej., 16S/ITS) para describir

composición microbiana con alta resolución. Sin embargo, al revisar la naturaleza real de los datos, se constató que el material secuenciado correspondía a ADN genómico con ONT (lecturas largas; sin PCR), lo cual no corresponde al supuesto central de DADA2/ASVs, diseñado para datos de amplicón y perfiles de error típicos de NGS (principalmente Illumina). En términos metodológicos, esto generaba un riesgo de:

- Describir un flujo bioinformático que no era compatible con el dato,
- Y, producir resultados difícilmente reproducibles o defendibles ante evaluación (Wooley et al., 2010; Xia et al., 2023).

En consecuencia, esta evaluación preliminar se trató como un aprendizaje dentro del proceso, y el análisis se reestructuró hacia un pipeline consistente con metagenómica shotgun/assembly-free para ONT, tal como se describe a continuación (Ciuffreda et al., 2021; Xia et al., 2023; Chaves et al., 2025).

Desde lo anterior, se releva que la metagenómica shotgun/assembly-free permite caracterizar comunidades mediante clasificación directa de lecturas sin depender de ensamblaje, lo cual es especialmente útil cuando el objetivo primario es perfil taxonómico y cuando se requiere rapidez y trazabilidad del pipeline (Wooley et al., 2010; Xia et al., 2023). En ONT, la clasificación depende críticamente de:

- Calidad y longitud de lecturas,
- Estrategia de filtrado,
- Y base de datos disponible (Ciuffreda et al., 2021; Xia et al., 2023).

Por lo tanto, se implementó Kraken2 como clasificador taxonómico basado en k-mers, complementado con reportes estructurados para extracción por niveles (P/G/S) y posterior

visualización. Este enfoque es ampliamente reportado en estrategias contemporáneas para análisis metagenómico en datos ONT y/o integrados (Xia et al., 2023; Chaves et al., 2025). El análisis se ejecutó en Ubuntu bajo WSL, gestionando dependencias mediante **conda** y un entorno dedicado.

Inicialmente se evaluó construir/descargar una base estándar completa. Sin embargo, por limitaciones prácticas (tamaño de descarga y estabilidad de transferencia), se optó por una base estándar reducida (~8GB) tipo minikraken/standard, la cual permite ejecutar el flujo completo en recursos locales manteniendo trazabilidad (Xia et al., 2023). Esta decisión se justifica metodológicamente como un compromiso explícito entre:

- Cobertura taxonómica (mayor en DB completa),
- Y factibilidad computacional (mayor en DB reducida).

Se ejecutó clasificación por muestra generando:

- archivo de salida de asignación por lectura (*.kraken.out*)
- y reporte resumido (*.kreport.txt*)

Se evaluó el impacto de distintos valores de `--confidence` (por ejemplo 0.10; 0.05; 0.02; 0), observando que umbrales más estrictos reducen drásticamente lecturas clasificadas. Dado el objetivo del trabajo (maximizar detección taxonómica inicial para posterior análisis comparativo por punto y profundidad), se adoptó una estrategia consistente:

- reportar explícitamente la fracción **unclassified**,
- y trabajar el análisis e interpretación principalmente sobre las fracciones clasificadas y sobre los taxa de mayor soporte relativo (Ciuffreda et al., 2021; Xia et al., 2023; Chen & Xu, 2023).

A partir de cada *kreport*, se extrajeron tablas por rank:

- *P (phylum)*
- *G (genus)*
- *S (species)*

Ordenando por abundancia (lecturas por clado) para facilitar comparación y generación de “Top N”.

Luego, se definieron dos productos:

- Raw/crudo: contiene todas las asignaciones tal cual salen del clasificador.
- Clean: se genera para visualización/interpretación microbiológica, removiendo taxa eucariotas/humano y/o grupos dominantes no objetivo cuando éstos “tapan” la lectura microbiana del sistema. Esto se justifica como una estrategia de presentación y análisis, no como censura de datos: el raw queda disponible como respaldo y trazabilidad.

Esta separación es defendible porque evita que la narrativa microbiológica sea dominada por señales no informativas para el objetivo ecológico, especialmente en matrices donde puede aparecer “ruido” o arrastre (Chen & Xu, 2023; Ciuffreda et al., 2021).

Con las tablas clean (Top N por nivel), se generaron gráficos por muestra y por nivel taxonómico (P/G/S), además de composiciones comparativas por punto (SS vs F) mediante barras apiladas, reportando:

- proporción sobre lecturas clasificadas,
- proporción unclassified,
- y distribución de taxa principales.

Por último, para asegurar transparencia se reporta explícitamente:

- configuración de corrida (kit, basecalling, minQ),
- parámetros de filtrado (mínimo Q y longitud),
- parámetros de clasificación (DB, confidence, hilos),
- proporción de lecturas clasificadas vs unclassified,
- y criterio de enfoque interpretativo (priorizar taxa con mayor soporte).

En metagenómica ambiental, especialmente con ONT y DB reducida, el componente *unclassified* debe entenderse como una salida informativa del proceso (limitación de DB, calidad, representación taxonómica), no como un “fallo” per se (Ciuffreda et al., 2021; Xia et al., 2023; Chaves et al., 2025).

Análisis estadístico

El análisis estadístico se desarrolló sobre un conjunto de $N = 12$ observaciones correspondientes a muestras agrupadas por punto y estrato (subsUPERficial, SS; fondo, F). La variable respuesta principal fue la concentración de metano disuelto (CH_4), reportada y analizada en unidades equivalentes (ppm y nmol L^{-1}). Como variables explicativas se consideraron parámetros fisicoquímicos asociados al sistema acuático, incluyendo temperatura ($^{\circ}\text{C}$), pH, conductividad ($\mu\text{S cm}^{-1}$), potencial óxido–reducción (ORP, mV), turbidez (FNU), oxígeno disuelto (ppm), oxígeno (% saturación) y sólidos disueltos totales (TDS, ppm), además de nitrato. La variable clorofila no fue incorporada en los análisis inferenciales por ausencia de datos ($N = 0$).

En primera instancia se realizó un análisis descriptivo para caracterizar la distribución y magnitud de las concentraciones de CH_4 y de los parámetros fisicoquímicos. Se reportaron estadísticos resumen (mínimo, máximo, media y desviación estándar) **por punto y estrato**, y adicionalmente

un resumen global de rangos y dispersión considerando el conjunto de muestras. Este paso permitió identificar patrones iniciales, amplitud de variación por estrato y consistencia interna entre observaciones, además de establecer un marco cuantitativo previo a los análisis inferenciales.

Para definir la pertinencia de métodos paramétricos y no paramétricos, se evaluó el cumplimiento del supuesto de normalidad para cada variable mediante la prueba de Shapiro–Wilk, recomendada para tamaños muestrales reducidos. Se utilizó como criterio operativo $\alpha = 0,05$.

Los resultados de Shapiro–Wilk permitieron distinguir variables con distribución compatible con normalidad ($p \geq 0,05$) —por ejemplo, metano (ppm y nmol L^{-1}) y nitrato— de variables con desviaciones significativas ($p < 0,05$), entre ellas temperatura, pH, conductividad, ORP, oxígeno disuelto, oxígeno (% saturación) y TDS. Variables cercanas al umbral ($p \sim 0,05$) fueron tratadas con cautela, priorizando enfoques robustos cuando correspondió.

Para explorar asociaciones bi variadas entre metano disuelto y las variables fisicoquímicas se aplicaron pruebas de correlación diferenciando el método según el resultado de normalidad:

- Pearson (r) se utilizó cuando las variables involucradas fueron compatibles con normalidad y la relación se interpretó bajo un marco lineal.
- Spearman (ρ) se empleó para variables sin normalidad (o cuando se buscó una asociación monotónica robusta sin exigir una distribución normal).

En cada caso se reportaron: Coeficiente de correlación, p-value y tamaño muestral ($n=12$, usando observaciones completas). Este análisis se utilizó como etapa exploratorio para priorizar potenciales predictores para el modelamiento multivariado posterior. Cuando correspondió, se consideró el control del riesgo de falsos descubrimientos mediante ajuste por FDR, reconociendo que múltiples comparaciones pueden inflar en errores en los análisis exploratorios.

Por otro lado, a partir de las asociaciones exploratorias y de la relevancia fisicoquímica de los predictores, se ajustó un modelo de regresión múltiple con el objetivo de explicar la variabilidad de metano disuelto mediante un conjunto reducido de variables ambientales. La variable respuesta fue el logaritmo de la concentración de metano disuelto ($\log CH_4$), con el fin de estabilizar varianza y aproximar linealidad en la relación respuesta-predictores.

El modelo se especificó de forma general como:

$$\log(CH_4) = \beta_0 + \beta_1 (\text{temperatura}) + \beta_2 (ORP) + \beta_3 (STD)$$

La estimación se realizó mediante mínimos cuadrados ordinarios, empleando únicamente observaciones completas ($N = 12$). Se reportaron coeficientes (β), errores estándar, estadísticos t, p-values y medidas de ajuste global (R^2 y R^2 ajustado). La selección de predictores (Temperatura, ORP y STD) se justificó por su comportamiento en el análisis correlacional y por su interpretación biogeoquímica en relación con condiciones redox y dinámica microbiana del sistema.

Por último, para evaluar la validez estadística del ajuste, se aplicaron pruebas sobre los supuestos principales del modelo:

1. Normalidad de residuos: Se evaluó mediante Shapiro-Wilk aplicado a los residuos del modelo ($W = 0,899$); $p = 0,153$; $N = 12$), concluyendo que no se rechaza la normalidad de los residuos a $\alpha = 0,05$.
2. Heterocedasticidad: se aplicó la prueba de Breusch-Pagan, reportando estadístico LM y F con p-values asociados (p cercanos a 0,05 pero superiores al umbral), interpretando ausencia de evidencia estadística suficiente para heterocedasticidad marcada, aunque recomendando cautela dado el tamaño muestral.

3. Multicolinealidad: se estimaron Factores de Inflación de Varianza (VIF) para los predictores. Se observaron valores elevados (Temperatura, ORP y TDS), lo que indica colinealidad sustantiva entre variables explicativas. En consecuencia, la interpretación de coeficientes individuales se realizó con cautela, priorizando la lectura integrada del modelo y el rol relativo de los predictores, más que inferencias aisladas sobre cada parámetro.

Se adoptó $\alpha = 0,05$ como umbral de significancia estadística. Sin embargo, considerando el tamaño muestral y el carácter exploratorio del análisis, la interpretación se basó en un enfoque combinado: magnitud del efecto (coeficientes/correlaciones), consistencia del patrón y ajuste global, complementando la significancia formal con criterios de plausibilidad fisicoquímica y coherencia interna entre resultados.

Metodología para la vinculación el medio

Con el objetivo de sintetizar de forma visual y accesible los principales hallazgos de la investigación, se realizó una infografía o panel informativo orientado a facilitar la transferencia del conocimiento generado. Esta herramienta busca incentivar la participación de actores comunitarios, gubernamentales y académicos en futuros procesos de toma de decisiones vinculados al ecosistema estudiado. Para su desarrollo, se contempló la aplicación de los principios y lineamientos éticos para el trabajo participativo con comunidades, promovidos por el Centro de Desarrollo Urbano Sustentable (CEDEUS, 2021).



Ilustración 3. Metodología para el desarrollo de infografía. Fuente: Elaboración propia a partir de CEDEUS (2021).

En la presente investigación, y de acuerdo con los lineamientos previamente expuestos, se consideraron distintas etapas para la vinculación con el medio. En una fase preliminar, se realizó un análisis bibliográfico orientado a la identificación de actores clave y a la recopilación de antecedentes sobre las principales problemáticas asociadas al bienestar del ecosistema durante la última década. Este análisis permitió contextualizar el estado del sistema y reconocer a los actores relevantes para una eventual participación en procesos de gestión y toma de decisiones. Posteriormente, se desarrollarán un plan de investigación enfocado en la generación de recomendaciones para el avance del trabajo de co-construcción desde el ámbito investigativo. Este proceso incluyó la definición del entregable preliminar de la presente investigación, consistente en una infografía, así como la identificación de los pasos a seguir para la proyección del material generado hacia instancias posteriores de vinculación.

Finalmente, en la etapa de ejecución logística, se elaboró un documento tipo destinado a involucrar a los diversos actores identificados, con el objetivo de facilitar su vinculación con la

infografía desarrollada y con las recomendaciones relativas a las etapas siguientes del proceso. No se consideraron las etapa de "Sistematización y análisis" ni de "Cierre y evaluación", dado que los alcances de la presente investigación se limitaron a la elaboración de la infografía y a la definición de los pasos derivados del material a vincular.

4. Resultados y Discusión

Se caracterizaron las condiciones fisicoquímicas del sistema y las concentraciones de metano disuelto a partir de 12 observaciones, correspondientes a dos puntos de muestreo (LTP-1 y LTP-2) y dos estratos (subsuperficial, SS; y fondo, F), con tres submuestras por estrato (Tablas 6–7). En conjunto, los resultados muestran contrastes consistentes entre estratos y diferencias claras entre puntos, lo que permite establecer el contexto ambiental necesario para la interpretación posterior del comportamiento del CH₄ y su análisis estadístico.

En el Punto 1 (LTP-1), las concentraciones de CH₄ fueron mayores en el estrato subsuperficial respecto del fondo (Tabla 6). En SS, el CH₄ varió entre 508,04 y 557,19 nmol/L, con una media de $539,74 \pm 27,50$ nmol/L, mientras que en F se observó un rango menor (404,94–423,92 nmol/L) y una media de $411,52 \pm 10,74$ nmol/L (Tabla 8). En términos prácticos, en este punto el estrato SS presentó aproximadamente ~128 nmol/L más CH₄ que el estrato F, lo que evidencia una diferenciación vertical del gas en la columna de agua para este sector.

En el Punto 2 (LTP-2), el patrón SS > F se mantuvo, pero con una magnitud más marcada (Tablas 6 y 8). En SS, el CH₄ se ubicó entre 731,02 y 856,48 nmol/L, con una media de $773,08 \pm 72,23$ nmol/L; en F, las concentraciones fueron menores (460,39–504,79 nmol/L) y la media alcanzó $482,40 \pm 22,20$ nmol/L (Tabla 8). La diferencia promedio entre estratos en el Punto 2 fue de aproximadamente ~291 nmol/L, lo que sugiere un contraste vertical más pronunciado que en el Punto 1. Adicionalmente, al comparar puntos, el Punto 2 presentó niveles de CH₄ superiores al Punto 1 en ambos estratos, especialmente en SS.

Respecto a los **nutrientes (nitrato)**, el Punto 1 presentó valores más altos que el Punto 2 (Tabla 6). En LTP-1, el nitrato mostró medias de **$6,58 \pm 0,12$ mg/L (SS)** y **$5,30 \pm 0,18$ mg/L (F)**, mientras que en LTP-2 disminuyó a **$3,92 \pm 0,43$ mg/L (SS)** y **$3,09 \pm 0,05$ mg/L (F)** (Tabla 9). Este gradiente

entre puntos entrega un contexto relevante para interpretar diferencias espaciales del sistema, aunque por sí solo no implica causalidad sobre el CH₄.

En términos de temperatura, los registros fueron estrechos (Tabla 6), con medias por estrato y punto entre 17,9 y 18,9 °C (Tabla 9). En cambio, el pH mostró diferencias marcadas según estrato y punto: en LTP-1 se observó pH más ácido en SS (6,2) y más alto en F (7,8), mientras que en LTP-2 el pH fue alto en SS (8,1) y más bajo en F (6,2) (Tablas 6 y 9). Estas diferencias describen un escenario químico contrastante entre sectores y profundidades que debe considerarse en la lectura integrada del sistema.

Tabla 5. Concentraciones de metano total disuelto (TC, nmol/L) y parámetros fisicoquímicos por punto de muestreo¹.

Código de Muestra	Metano TC (nmol/L)	Nitrato (mg/L)	Clorofila (mg/m ³)	Temperatura (°C)	pH
LTP-1.1SS	554,001	6,710	N/A	18,43	6,20
LTP-1.2SS	557,186	6,465	N/A	18,43	6,20
LTP-1.3SS	508,040	6,559	N/A	18,43	6,20
LTP-1.1F	423,919	5,468	N/A	17,90	7,82
LTP-1.2F	405,717	5,110	N/A	17,90	7,82
LTP-1.3F	404,937	5,336	N/A	17,90	7,82
LTP-2.1SS	731,018	3,924	N/A	18,90	8,12
LTP-2.2SS	856,484	4,357	N/A	18,90	8,12

¹Todas las muestras fueron recolectadas durante la estación primavera del año 2024, según lo indicado previamente en la sección de metodología.

Código de Muestra	Metano TC (nmol/L)	Nitrato (mg/L)	Clorofila (mg/m ³)	Temperatura (°C)	pH
LTP-2.3SS	731,733	3,491	N/A	18,00	6,16
LTP-2.1F	460,389	3,096	N/A	18,00	6,16
LTP-2.2F	504,789	3,040	N/A	18,00	6,16
LTP-2.3F	482,037	3,134	N/A	18,00	6,16

Los parámetros complementarios (Tabla 7) evidenciaron rasgos ambientales distintivos, particularmente en el fondo del Punto 2, donde la conductividad y los sólidos disueltos totales (TDS) fueron notoriamente menores (139 $\mu\text{S/cm}$ y 69 mg/L, respectivamente), en comparación con los demás estratos/puntos que se concentraron en rangos cercanos a $\sim 264\text{--}270$ $\mu\text{S/cm}$ y $\sim 132\text{--}135$ mg/L (Tabla 7; ver síntesis en Tabla 9). Además, el potencial redox (ORP) mostró un descenso sistemático desde SS a F, con el mínimo en LTP-2F (205 mV), mientras que el oxígeno (%) y el oxígeno disuelto (OD) tendieron a ser mayores hacia el fondo del Punto 2 (27,23% y 3,09 ppm) en comparación con los otros estratos (Tabla 7). La turbidez fue mayor en estratos de fondo, alcanzando su máximo en LTP-2F (7,47 FNU) (Tabla 7).

En relación con clorofila, no se dispone de registros para las muestras consideradas en esta etapa, por lo que se reporta como N/A en las Tablas 6 y 9.

Tabla 6. Concentraciones de metano total disuelto (TC, nmol/L) y parámetros fisicoquímicos por punto de muestreo.

Código de Muestra	Conductividad (µS/cm)	ORP (mV)	Turbidez (FNU)	OD (PPM)	Oxígeno (%)	TDS (mg/L)
LTP-1.1SS	263,667	299,433	5,630	2,450	21,60	132,00
LTP-1.2SS	263,667	299,433	5,630	2,450	21,60	132,00
LTP-1.3SS	263,667	299,433	5,630	2,450	21,60	132,00
LTP-1.1F	270,000	260,633	6,500	2,570	22,70	135,00
LTP-1.2F	270,000	260,633	6,500	2,570	22,70	135,00
LTP-1.3F	270,000	260,633	6,500	2,570	22,70	135,00
LTP-2.1SS	265,000	267,630	6,730	2,790	24,53	132,00
LTP-2.2SS	265,000	267,630	6,730	2,790	24,53	132,00
LTP-2.3SS	265,000	267,630	6,730	2,790	24,53	132,00
LTP-2.1F	139,000	205,000	7,470	3,090	27,23	69,00
LTP-2.2F	139,000	205,000	7,470	3,090	27,23	69,00
LTP-2.3F	139,000	205,000	7,470	3,090	27,23	69,00

Tabla 7. Estadística descriptiva de las concentraciones de metano disuelto (nmol/L) por punto y estrato de muestreo.

Parámetro	Punto	Mín	Max	Media	DS
Metano (nmol/L)	LTP-1SS	508,04	557,19	539,74	27,50
Metano (nmol/L)	LTP-1F	404.94	423.92	411.52	10.74
Metano (nmol/L)	LTP-2SS	731.02	856.48	773.08	72.23
Metano (nmol/L)	LTP-2F	460.39	504.79	482.40	22.20

Tabla 8. Estadística descriptiva de los parámetros fisicoquímicos por punto y estrato de muestreo.

Parámetro	Punto	Min	Max	Media	DS
Nitrato (mg/L)	LTP-1SS	6.47	6.71	6.58	0.12
Nitrato (mg/L)	LTP-1F	5.11	5.47	5.30	0.18
Nitrato (mg/L)	LTP-2SS	3.49	4.36	3.92	0.43
Nitrato (mg/L)	LTP-2F	3.04	3.13	3.09	0.05
Clorofila (mg/m ³)	LTP-1SS	N/A	N/A	N/A	N/A
Clorofila (mg/m ³)	LTP-1F	N/A	N/A	N/A	N/A
Clorofila (mg/m ³)	LTP-2SS	N/A	N/A	N/A	N/A
Clorofila (mg/m ³)	LTP-2F	N/A	N/A	N/A	N/A
Temperatura (°C)	LTP-1SS	18.4	18.4	18.4	0
Temperatura (°C)	LTP-1F	17.9	17.9	17.9	0
Temperatura (°C)	LTP-2SS	18.9	18.9	18.9	0
Temperatura (°C)	LTP-2F	18.0	18.0	18.0	0
pH	LTP-1SS	6.2	6.2	6.2	0
pH	LTP-1F	7.8	7.8	7.8	0
pH	LTP-2SS	8.1	8.1	8.1	0
pH	LTP-2F	6.2	6.2	6.2	0
Conductividad (μS/cm)	LTP-1SS	264	264	264	0
Conductividad (μS/cm)	LTP-1F	270	270	270	0
Conductividad (μS/cm)	LTP-2SS	265	265	265	0
Conductividad (μS/cm)	LTP-2F	139	139	139	0
ORP (mV)	LTP-1SS	299.4	299.4	299.4	0
ORP (mV)	LTP-1F	260.6	260.6	260.6	0
ORP (mV)	LTP-2SS	267.6	267.6	267.6	0
ORP (mV)	LTP-2F	205.0	205.0	205.0	0

Parámetro	Punto	Min	Max	Media	DS
Turbidez (FNU)	LTP-1SS	5.63	5.63	5.63	0
Turbidez (FNU)	LTP-1F	6.50	6.50	6.50	0
Turbidez (FNU)	LTP-2SS	6.73	6.73	6.73	0
Turbidez (FNU)	LTP-2F	7.47	7.47	7.47	0
TDS (PPM)	LTP-1SS	132	132	132	0
TDS (PPM)	LTP-1F	135	135	135	0
TDS (PPM)	LTP-2SS	132	132	132	0
TDS (PPM)	LTP-2F	69	69	69	0

De manera global, el CH₄ osciló entre 404,94 y 856,48 nmol/L, mientras que el resto de variables se mantuvo dentro de rangos acotados por estrato y punto; por ello, los análisis posteriores se interpretan principalmente a escala de estrato/punto.

Con respecto a las mediciones de concentración y pureza del ADN recuperado, esta se evaluó mediante espectrofotometría Nanodrop ND-1000 (relación A260/280) y mediante electroforesis en gel de agarosa, como aproximaciones complementarias para estimar el rendimiento y la integridad del ADN previo a la preparación de librerías. Los valores de concentración obtenidos (Tabla 11) abarcaron un rango amplio (140,4–790,5 ng/μL), evidenciando una extracción globalmente efectiva en términos de cantidad. Sin embargo, la pureza mostró variación relevante, con relaciones A260/280 entre 0,73 y 1,89, lo que sugiere que parte de las muestras presentó degradadores de la pureza como fenoles o mala adecuación de la técnica de re suspensión o pipeteos según el protocolo.

Tabla 9. Mediciones de la concentración y absorbancia del ADN extraído de las muestras analizadas.

Código de Muestra	Concentración (ng/μL)	Absorbancia (A260/280)
LTP-1.1SS	452.3	1.39
LTP-1.2SS	283.5	1.44
LTP-1.3SS	150.4	1.44
LTP-1.1F	443.8	1.39
LTP-1.2F	628.4	1.61
LTP-1.3F	279.9	1.67
LTP-2.1SS	287.1	1.38
LTP-2.2SS	697.5	1.74
LTP-2.3SS	371.2	1.89
LTP-2.1F	790.5	0.73
LTP-2.2F	178.6	1.43
LTP-2.3F	140.4	1.68

En términos interpretativos, una relación A260/280 cercana a 1,8 suele asociarse a ADN relativamente más puro, mientras que valores <1,8 son consistentes con presencia de contaminantes que pueden afectar la eficiencia de enzimas en etapas posteriores (por ejemplo, end-repair/ligación). En contraste, valores >2,0 suelen sugerir aporte de ARN u otras interferencias espectrales. Dado que en este estudio la cuantificación se realizó con Nanodrop + gel, y no con fluorimetría (por ejemplo, Qubit), estos resultados se consideran una evaluación útil para priorizar material pero con limitaciones para estimar “masa real” de ADN.

A continuación, se presentan los resultados de la electroforesis en gel de agarosa correspondiente a las muestras de ADN ambiental extraídas.

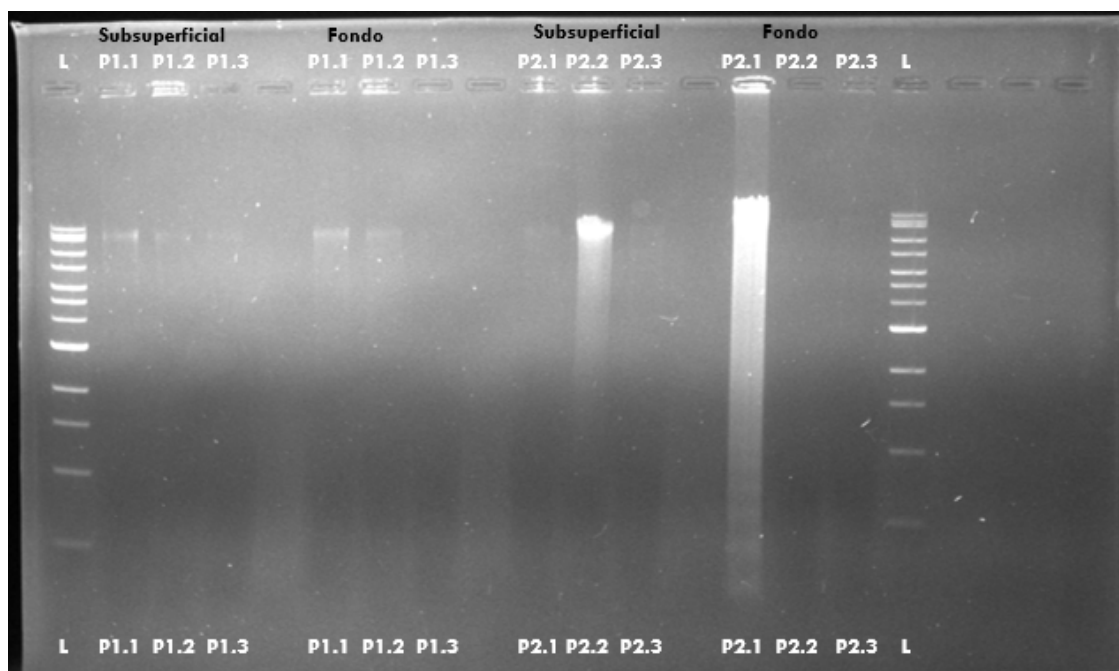


Ilustración 4. Electroforesis en gel de agarosa (1%) de ADN Ambiental extraído desde Laguna Tres Pascualas. L: marcador de peso molecular (1 kb DNA Ladder). Carriles correspondientes a muestras Subsuperficiales y de Fondo indicadas para los cuatro puntos de muestreo. Condiciones de corrida: 70V, 300 mA, 90 min. La intensidad y continuidad de la señal permiten evaluar el rendimiento e integridad del ADN.

La electroforesis (Ilustración 4) permitió evaluar cualitativamente la integridad del ADN ambiental. En este tipo de muestras se espera observar ADN de alto peso molecular retenido en la zona superior del gel y/o un patrón de smear cuando existe fragmentación (por extracción, manipulación o degradación ambiental). En conjunto, el gel se utilizó como criterio de apoyo para distinguir entre extractos con señal compatible con ADN genómico utilizable versus extractos con degradación marcada o señales débiles, complementando la lectura de A260/280.

La selección de extractos para secuenciación se definió en función de (i) cantidad, (ii) pureza (A260/280) y (iii) evidencia cualitativa de integridad en gel, buscando maximizar la probabilidad

de éxito en la preparación de librerías. De acuerdo con el protocolo Ligation Sequencing Kit V14 (SQK-LSK114), por lo que se priorizaron extractos capaces de aportar masa suficiente dentro de volúmenes de pipeteo razonables. Adicionalmente, se establece el criterio de representatividad al incluir muestras de subsuperficie (SS) y fondo (F) por punto de muestreo, para mantener consistencia con el diseño comparativo del estudio. Ver Tabla 12.

Tabla 10. Muestras seleccionadas para secuenciación mediante la tecnología Oxford Nanopore, en función de los criterios de concentración y pureza del ADN establecidos en el protocolo.

Muestras elegidas para secuenciación
LTP-1.1SS
LTP-1.2F
LTP-2.2SS / 1.2SS
LTP-2.1F / 1.3

La Tabla 13 resume los ajustes de regresión lineal simple realizados entre la concentración de metano disuelto (variable dependiente) y parámetros fisicoquímicos (variables independientes) para cada punto y estrato. Este análisis se planteó con un objetivo exploratorio, orientado a identificar direcciones de asociación (pendiente β) y patrones consistentes entre variables dentro de cada condición de muestreo.

No obstante, es imprescindible explicitar que estos ajustes se basan en un n reducido por grupo (réplicas dentro de cada punto/estrato), lo que puede inflar artificialmente métricas como R^2 y producir valores de p poco estables. Por esta razón, la interpretación de la Tabla 13 se centra en: (i) signo y magnitud de la pendiente, (ii) coherencia del patrón entre estratos/puntos, y (iii) consistencia con los análisis globales posteriores (correlaciones y modelo múltiple). Los

resultados de significancia estadística se reportan por transparencia, pero no se consideran evidencia concluyente por sí solos bajo el tamaño muestral disponible.

En términos descriptivos, las regresiones simples muestran asociaciones negativas entre metano y variables vinculadas a condiciones más oxigenadas en algunas condiciones (p. ej., oxígeno disuelto), mientras que otras variables (p. ej., pH, conductividad, temperatura, turbidez) presentan pendientes cuya dirección varía por estrato y punto. En consecuencia, la Tabla 13 se interpreta como un primer barrido de relaciones potenciales, cuya validez se contrasta y refuerza (o se descarta) con los análisis globales y la evaluación de supuestos (Tablas 14–19).

Tabla 11. Resultados de los análisis de regresión lineal entre la concentración de metano disuelto (variable dependiente) y los parámetros fisicoquímicos (variables independientes), por punto y nivel de muestreo.

Punto	Variable	Intercepción	Pendiente (β)	R ²	P-Value
LTP-1F	Oxígeno disuelto (ppm)	0,553	-0,064	0,994	< 0,01
	pH	0,946	-0,179	0,999	< 0,001
	Conductividad (μ S/cm)	2,433	-1,069	0,998	< 0,001
	Temperatura ($^{\circ}$ C)	1,276	0,039	0,995	< 0,01
	Turbidez (FNU)	0,875	-0,005	0,962	< 0,01
LTP-1SS	Oxígeno disuelto (ppm)	0,560	-0,078	0,995	< 0,01
	pH	0,940	-0,202	0,998	< 0,001
	Conductividad (μ S/cm)	2,430	-0,945	0,997	< 0,001
	Temperatura ($^{\circ}$ C)	1,280	0,032	0,992	< 0,01

Punto	Variable	Intercepción	Pendiente (β)	R ²	P-Value
	Turbidez (FNU)	0,880	-0,006	0,958	< 0,01
LTP-2F	Oxígeno disuelto (ppm)	0,615	-0,109	0,993	< 0,01
	pH	0,855	-0,189	0,997	< 0,001
	Conductividad (μ S/cm)	2,146	-1,032	0,996	< 0,001
	Temperatura ($^{\circ}$ C)	1,279	0,041	0,991	< 0,01
	Turbidez (FNU)	0,928	-0,004	0,965	< 0,01
LTP-2SS	Oxígeno disuelto (ppm)	0,580	-0,062	0,994	< 0,01
	pH	0,960	-0,176	0,997	< 0,001
	Conductividad (μ S/cm)	2,425	-0,987	0,995	< 0,001
	Temperatura ($^{\circ}$ C)	1,299	0,029	0,990	< 0,01
	Turbidez (FNU)	0,888	-0,007	0,962	< 0,01

Con el fin de justificar la elección entre métodos paramétricos y no paramétricos en los análisis globales, se aplicó la prueba de Shapiro–Wilk a las variables consideradas (Tabla 14), reportando estadístico W, p-value y N.

Los resultados indican que algunas variables no evidencian desviaciones fuertes de normalidad a un umbral convencional ($p \geq 0,05$), mientras que otras muestran desviaciones significativas ($p < 0,05$), lo cual orienta la selección de métricas de asociación (Pearson vs Spearman). Dado que el tamaño muestral es $N = 12$, esta evaluación se interpreta con cautela: Shapiro–Wilk puede ser

sensible a la distribución y a valores extremos, por lo que su uso se entiende como un criterio operativo para guiar el análisis, más que como una garantía absoluta de cumplimiento de supuestos.

Respecto de **clorofila**, la Tabla 14 reporta ausencia de evaluación debido a falta de datos, que si bien fueron recolectados (Misma toma de agua que las demás muestras), no se realizó a tiempo la extracción y cuantificación.

Tabla 12. Resultados de la prueba de normalidad de Shapiro Wilk aplicada a las variables analizadas (datos crudos, análisis global).

Variable	Estadístico W	P-Value	N
Metano (ppm)	0,865	0,056	12
Metano (nmol L ⁻¹)	0,866	0,058	12
Nitrato (ppm)	0,895	0,136	12
Clorofila (mg m ⁻³)	–	–	0
Temperatura (°C)	0,810	0,012	12
pH	0,708	0,001	12
Conductividad (µS cm ⁻¹)	0,587	0,0001	12
ORP (mV)	0,829	0,02	12
Turbidez (FNU)	0,862	0,052	12
Oxígeno disuelto (ppm)	0,834	0,024	12
Oxígeno (% de saturación)	0,846	0,033	12
Sólidos disueltos totales (TDS, ppm)	0,586	0.0001	12

La **Tabla 15** presenta los coeficientes de correlación global entre metano disuelto y variables fisicoquímicas, junto con p-values y tamaño muestral. En coherencia con la evaluación de normalidad (Tabla 14), se aplicó **Pearson** cuando el supuesto de normalidad fue considerado

aceptable y **Spearman** cuando la variable mostró desviaciones de normalidad o cuando se buscó capturar asociaciones monotónicas sin asumir linealidad estricta.

En el análisis global, la **temperatura** muestra la asociación más fuerte y consistente con la concentración de metano (coeficientes altos y p-values muy bajos según Tabla 15), sugiriendo que, en el rango observado, mayores temperaturas se asocian con mayores concentraciones de metano. El **ORP** presenta una asociación de magnitud moderada y estadísticamente marginal/significativa según el valor reportado en la tabla, lo que sugiere que condiciones redox más reductoras podrían relacionarse con mayores concentraciones de metano, aunque esta relación debe interpretarse de forma prudente.

En contraste, variables como nitrato, conductividad, pH, oxígeno (en sus diferentes expresiones) y turbidez muestran asociaciones débiles o no significativas en el análisis global (Tabla 15). Esto no implica ausencia de relación ecológica, sino que dentro del tamaño muestral y rango observado dichas variables no emergen como predictores robustos de la variabilidad del metano.

Tabla 13. Resultados del análisis de correlación de Pearson y Spearman entre la concentración de metano disuelto y las variables fisicoquímicas (análisis global)

Variable	Coef r	P-Value	Metodo	n
Metano (nmol L ⁻¹)	1,000	0,000	Pearson	12
Metano (nmol L ⁻¹)	0,995	0,000	Pearson	12
Clorofila (mg m ⁻³)			Pearson	12
Clorofila (mg m ⁻³)			Pearson	12
Conductividad (μS cm ⁻¹)	0,261	0,413	Pearson	12
Conductividad (μS cm ⁻¹)	-0,195	0,543	Pearson	12
Nitrato (ppm)	-0,187	0,560	Pearson	12
Nitrato (ppm)	0,011	0,974	Pearson	12

Variable	Coef r	P-Value	Metodo	n
ORP (mV)	0,262	0,410	Pearson	12
ORP (mV)	0,586	0,045	Pearson	12
Oxígeno (% de saturación)	0,084	0,796	Spearman	12
Oxígeno (% de saturación)	0,000	1,000	Spearman	12
pH	0,395	0,204	Spearman	12
pH	0,309	0,329	Spearman	12
Sólidos disueltos totales (TDS, ppm)	0,254	0,426	Spearman	12
Sólidos disueltos totales (TDS, ppm)	-0,309	0,329	Spearman	12
Temperatura (°C)	0,950	0,000002	Spearman	12
Temperatura (°C)	0,977	0,0000001	Spearman	12
Turbidez (FNU)	-0,041	0,900	Spearman	12

A partir de los patrones observados en el análisis correlacional y de su relevancia ecológica para procesos redox y dinámica del gas, se ajustó un modelo de regresión lineal múltiple para explicar la variación de metano en función de predictores seleccionados (Tabla 16). El modelo se ajustó utilizando únicamente observaciones completas (N = 12), excluyendo casos con datos faltantes. El modelo presenta un alto poder explicativo global (R^2 y R^2 ajustado reportados en Tabla 16), lo que indica que el conjunto de predictores considerados captura una fracción importante de la variabilidad del metano en las condiciones medidas. En cuanto a los coeficientes individuales, la temperatura muestra un efecto positivo y estadísticamente significativo, consistente con su rol como variable integradora del funcionamiento biogeoquímico y de la actividad microbiana

asociada a la producción/transformación de metano. Por su parte, el ORP y los TDS presentan coeficientes de menor estabilidad estadística (según p-values), lo que sugiere que su contribución marginal al explicar la variación del metano es más incierta bajo el tamaño muestral disponible.

Dado el carácter observacional del estudio y el tamaño muestral limitado, este modelo se interpreta como una aproximación explicativa (no causal) que resume patrones coherentes entre variables fisicoquímicas y metano disuelto en el sistema.

Tabla 14. Resultados del modelo de regresión lineal múltiple para las concentraciones de metano disuelto en función de variables fisicoquímicas seleccionadas.

Predicción	Coefficiente	Error estándar	t	p-value	R ²	R ² ajustado
Constante	-102,854	13,095	-7,855	0,00005	0,95	0,93
Temperatura (°C)	6,402	0,802	7,985	0,00004	0,95	0,93
ORP (mV)	-0,024	0,012	-1,995	0,0811	0,95	0,93
Sólidos disueltos totales (TDS, ppm)	0,011	0,012	0,957	0,3666	0,95	0,93

La prueba de Shapiro–Wilk aplicada a los residuos del modelo (Tabla 17) muestra un p-value por sobre el umbral convencional ($\alpha = 0,05$), por lo que no se rechaza la hipótesis de normalidad de residuos. En términos prácticos, esto sugiere que el supuesto de normalidad es razonable para este ajuste, aunque se mantiene la cautela por N reducido.

Tabla 15. Prueba de normalidad de Shapiro-Wilk aplicada a los residuos del modelo de regresión lineal múltiple.

Prueba	Estadístico	p-value	N
--------	-------------	---------	---

Test Shapiro-Wilk

W = 0,899

0,153

12

La prueba de Breusch–Pagan (Tabla 18) evalúa la hipótesis nula de homocedasticidad (varianza constante). Dado que los p-values reportados se encuentran por sobre 0,05, no se rechaza la hipótesis nula, es decir, no hay evidencia estadística suficiente de heterocedasticidad en los residuos. Sin embargo, al situarse cerca del umbral, se recomienda interpretar este resultado como evidencia débil o marginal y complementarlo con inspección gráfica (residuos vs ajustados) para robustecer la evaluación.

Tabla 16. Prueba de Bresuch-Pagan para la evaluación de heterocedasticidad de los residuos del modelo de regresión lineal múltiple.

Estadístico LM	p-value LM	Estadístico F	p-value F
0,65	0,084	3,31	0,078

Los valores de VIF reportados (Tabla 19) son muy elevados, lo cual indica colinealidad fuerte entre predictores. Esta condición puede inflar errores estándar y volver inestables los coeficientes individuales, aun cuando el modelo tenga buen ajuste global. Por lo tanto, aunque el modelo puede describir bien la variación del metano en conjunto, la interpretación debe priorizar: (i) el patrón global del modelo y (ii) la consistencia entre análisis, antes que conclusiones finas sobre el efecto aislado de cada predictor.

En términos metodológicos, este resultado justifica que, en una versión final, se evalúe reducir el set de predictores, usar variables transformadas/centradas, o seleccionar predictores por criterios más pertinentes, que permita ir en pos de fortalecer la interpretación y reproducibilidad del modelo.

Tabla 17. Factores de inflación de varianza (VIF) de las variables predictoras del modelo de regresión múltiple.

Variable	VIF
Temperatura	101,41
ORP	297,82
TDS	89,33

En conjunto, los análisis estadísticos globales indican que la variabilidad del metano disuelto en la Laguna Tres Pascualas se asocia principalmente a variables integradoras del estado fisicoquímico del sistema, destacando temperatura como el predictor más consistente en el conjunto de análisis. Variables vinculadas al estado redox (ORP) muestran asociaciones moderadas que deben interpretarse con cautela, mientras que otros parámetros presentan efectos débiles en el rango observado. Considerando el tamaño muestral y las limitaciones de colinealidad identificadas, estos resultados se entienden como evidencia exploratoria y coherente para orientar la integración posterior con la información bioinformática de composición microbiana (sección siguiente), evitando inferencias causales directas y priorizando patrones reproducibles entre aproximaciones analíticas.

Resultados secuenciación

Previo al análisis taxonómico, se evaluó el rendimiento y la calidad de las lecturas obtenidas mediante secuenciación Oxford Nanopore, con el objetivo de establecer si el conjunto de datos era consistente con un análisis metagenómico de ADN ambiental y, al mismo tiempo, identificar limitaciones inherentes a la muestra (p. ej., fragmentación) o al proceso (p. ej., preparación de librerías y filtrado). Para ello, se emplearon herramientas específicas para datos ONT orientadas a control de calidad y preprocesamiento de lecturas (NanoPack: NanoPlot y NanoFilt) (De Coster et al., 2018), y se reportaron métricas estándar por muestra (Tablas 20–23; Ilustraciones 5–8).

Tabla 18. Resumen de métricas de calidad y rendimiento de la secuenciación Nanopore para la muestra LTP 1.1SS.

Resumen General	Valor
Longitud media de lectura	697,8
Calidad media de la lectura	11,3
Número de lecturas	6.972
Longitud de lectura N50	880
Bases totales	4.865.295
Q>10	5531 (79,3%)
Q>15	418 (6,0%)
Q>20	14 (0,2%)
Q>25	7 (0,1%)
Q>30	0 (0%)

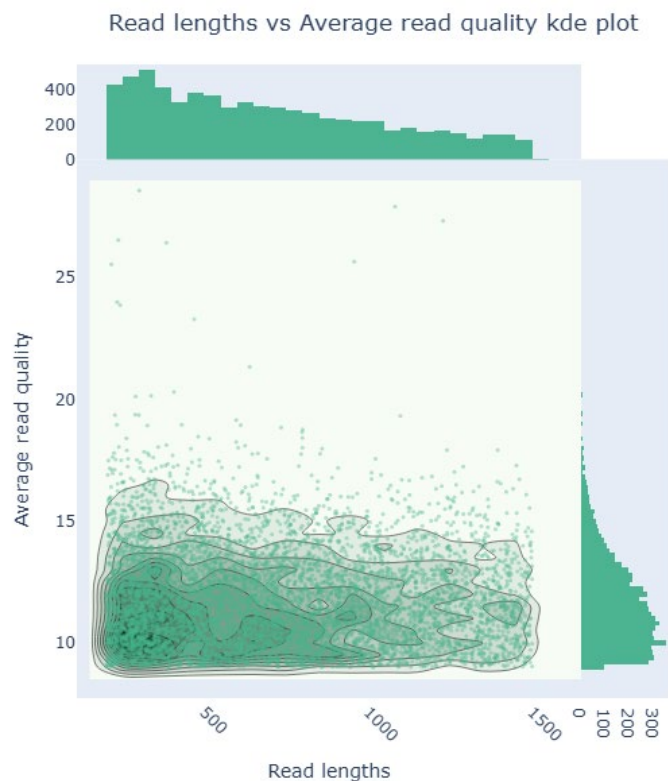


Ilustración 5. Gráfico de densidad kernel (KDE) que muestra la relación entre la longitud de las lecturas y la calidad media de lectura obtenidas en la secuenciación Nanopore para la muestra LTP 1.1SS.

En la muestra LTP-1.1SS, se obtuvieron 6.972 lecturas con una longitud media de 697,8 pb, N50 = 880 pb y calidad media Q = 11,3, totalizando 4.865.295 bases. Del total, 79,3% de las lecturas superó $Q > 10$, mientras que 6,0% superó $Q > 15$ y $\leq 0,2\%$ superó $Q > 20$ (Tabla 20). Este patrón indica que la señal retenida se concentra mayoritariamente en calidad intermedia, consistente con un esquema de filtrado mínimo por calidad (umbral de Q) definido durante el preprocesamiento.

Tabla 19. Resumen de métricas de calidad y rendimiento de la secuenciación Nanopore para la muestra LTP 2.2SS.

Resumen General	Valor
Longitud media de lectura	568,2
Calidad media de la lectura	11,3
Número de lecturas	12.530
Longitud de lectura N50	696
Bases totales	7.119.481
Q>10	9.707 (77,5%)
Q>15	850 (6,8%)
Q>20	42 (0,3%)
Q>25	19 (0,2%)
Q>30	0 (0%)

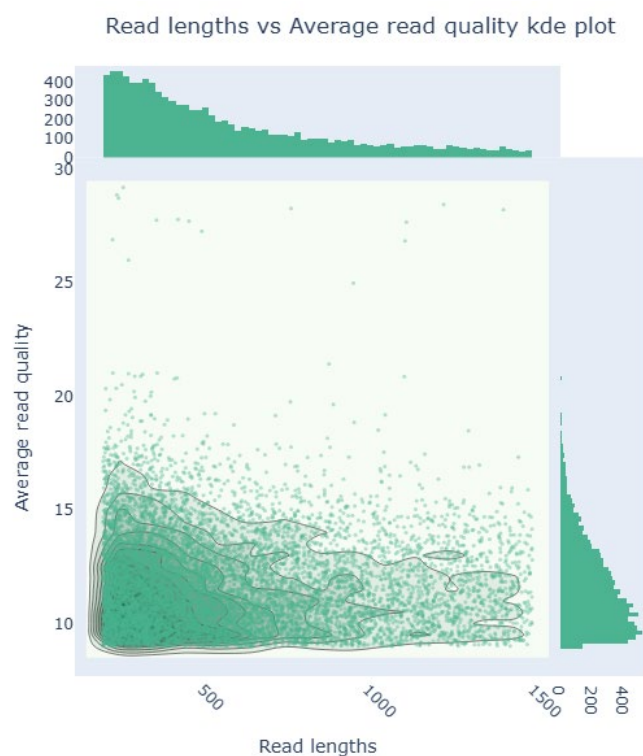


Ilustración 6. Gráfico de densidad kernel (KDE) que muestra la relación entre la longitud de las lecturas y la calidad media de lectura obtenidas en la secuenciación Nanopore para la muestra LTP 2.2SS.

En LTP-2.2SS, se registró el mayor número de lecturas (12.530) con longitud media 568,2 pb, N50 = 696 pb, Q media = 11,3 y 7.119.481 bases (Tabla 21). La fracción Q>10 alcanzó 77,5%, mientras que Q>15 representó 6,8% y Q>20 fue 0,3%. En LTP-1.2F, se obtuvieron 9.797 lecturas, longitud media 506,2 pb, N50 = 581 pb, Q media = 11,5 y 4.959.263 bases, con 80,0% de lecturas Q>10 y 8,7% Q>15 (Tabla 22).

Tabla 20. Resumen de métricas de calidad y rendimiento de la secuenciación Nanopore para la muestra LTP 1.2F.

Resumen General	Valor
Longitud media de lectura	506,2
Calidad media de la lectura	11,5
Número de lecturas	9.797
Longitud de lectura N50	581
Bases totales	4.959.263
Q>10	7.841 (80%)
Q>15	856 (8,7%)
Q>20	33 (0,3%)
Q>25	12 (0,1%)
Q>30	0 (0%)

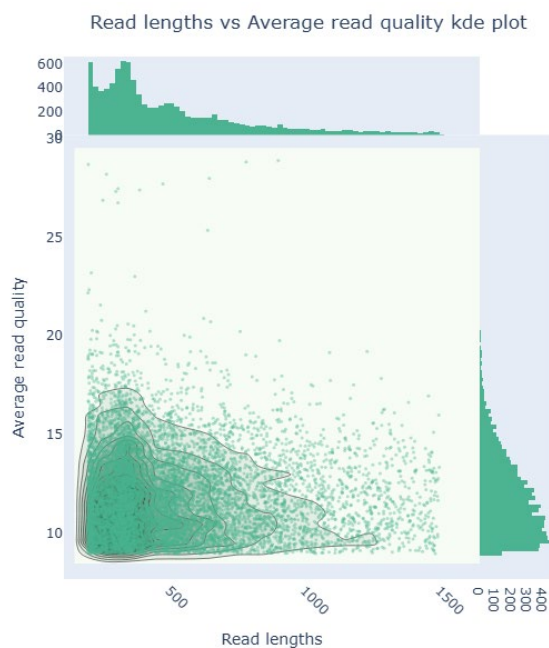


Ilustración 7. Gráfico de densidad kernel (KDE) que muestra la relación entre la longitud de las lecturas y la calidad media de lectura obtenidas en la secuenciación Nanopore para la muestra LTP 1.2F.

Finalmente, LTP-2.3F presentó 11.397 lecturas, longitud media 507,8 pb, N50 = 591 pb, Q media = 11,5 y 5.787.496 bases, con 80,9% Q>10 y 8,9% Q>15 (Tabla 23).

Tabla 21. Resumen de métricas de calidad y rendimiento de la secuenciación Nanopore para la muestra LTP 2.3F.

Resumen General	Valor
Longitud media de lectura	507,8
Calidad media de la lectura	11,5
Número de lecturas	11.397
Longitud de lectura N50	591
Bases totales	5.787.496
Q>10	9.219 (80,9%)

Resumen General	Valor
Q>15	1.017 (8,9%)
Q>20	35 (0,3%)
Q>25	9 (0,1%)
Q>30	1 (0%)

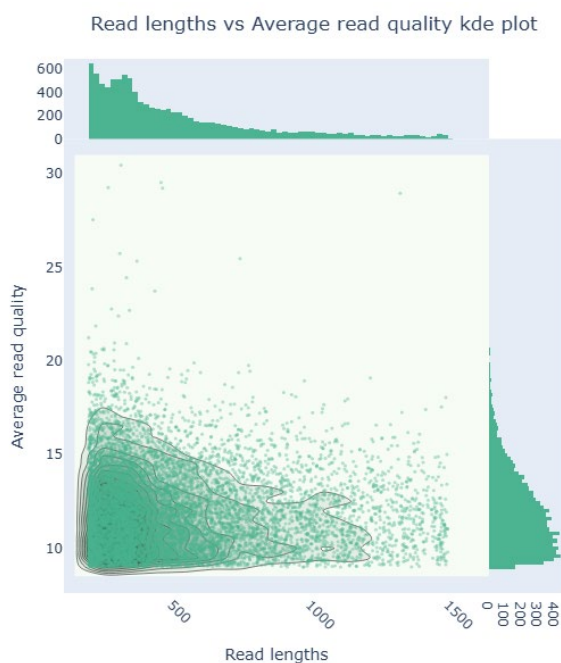


Ilustración 8. Gráfico de densidad kernel (KDE) que muestra la relación entre la longitud de las lecturas y la calidad media de lectura obtenidas en la secuenciación Nanopore para la muestra LTP 2.3F.

En conjunto, las cuatro corridas muestran un comportamiento consistente: calidad promedio concentrada en torno a $Q \approx 11-12$ y predominio de lecturas sobre Q_{10} , con una proporción reducida de lecturas de alta calidad ($\geq Q_{20}$). Esto es relevante porque, en enfoques basados en asignación taxonómica directa de lecturas (p. ej., clasificación por k-mers), la combinación de

longitud y calidad condiciona la sensibilidad de clasificación y la fracción de lecturas no asignadas (Wood et al., 2019; Xia et al., 2023).

Las Ilustraciones 5–8 (gráficos KDE longitud vs calidad) evidencian que la densidad principal se ubica en longitudes sub-kilobase (centro en ~500–700 pb) con calidad promedio alrededor de $Q \approx 10–15$. Dado que la secuenciación por ligación para ADN genómico en ONT está diseñada para aprovechar fragmentos largos cuando el ADN presenta alta integridad (Oxford Nanopore Technologies, 2025), la concentración mayoritaria de lecturas cortas no debe interpretarse como “esperada” para la plataforma, sino que, se sugiere analizarlas como un indicio de que el ADN ambiental extraído se encontraba mayoritariamente fragmentado o fue sometido a condiciones que favorecieron fragmentación durante etapas previas (extracción/manipulación/preparación de librería). Esta interpretación es coherente con la naturaleza del ADN ambiental en sistemas acuáticos eutróficos, donde la degradación y la fragmentación pueden ser elevadas por procesos físicos, químicos y biológicos, afectando el tamaño efectivo del material disponible para secuenciación (Xia et al., 2023; Rojas-Villalta et al., 2024).

En este contexto, el control de calidad no se utiliza para “validar” que el resultado sea ideal para lecturas largas, sino para delimitar la calidad real de la extracción y justificar decisiones posteriores: (i) enfatizar análisis basados en lectura individual (clasificación) por sobre estrategias que requieren fragmentos largos (ensamblaje), y (ii) reportar explícitamente el impacto esperado de esta fragmentación sobre la tasa de clasificación y la resolución taxonómica que podríamos esperar.

Resultados del tratamiento bioinformático (DADA2 / SILVA / Phyloseq)

El análisis taxonómico se abordó en dos etapas: (1) un procesamiento exploratorio inicial basado en inferencia tipo ASV, y (2) un reanálisis final mediante clasificación taxonómica directa, seleccionado por su mayor compatibilidad con lecturas ONT y por ofrecer resultados reproducibles y comparables entre profundidades y puntos de muestreo.

Inicialmente se evaluó el uso de DADA2 como estrategia exploratoria de depuración/inferencia de variantes (Callahan et al., 2016) junto con asignación taxonómica utilizando SILVA (Quast et al., 2013) y visualización mediante phyloseq (McMurdie & Holmes, 2013). Sin embargo, DADA2 fue desarrollado y validado principalmente para datos de amplicones de lectura corta (Illumina), donde el modelo de error y la inferencia de variantes se apoyan en distribuciones de calidad y longitudes relativamente homogéneas. En datos ONT, especialmente cuando predominan lecturas cortas y calidad intermedia como en este estudio (Tablas 20–23), la inferencia de ASV puede volverse inestable o producir asignaciones limitadas, afectando la capacidad de interpretación ecológica a niveles bajos (Xia et al., 2023).

Consistente con lo anterior, los resultados obtenidos bajo este enfoque mostraron resolución taxonómica restringida (Ver Ilustraciones 9 y 10), con patrones dominados por pocos taxones y poca robustez para interpretar diferencias entre estratos. Dado que el objetivo del trabajo requiere comparar composición microbiana entre subsuperficie (SS) y fondo (F) en dos puntos de muestreo, se optó por un enfoque alternativo, explícitamente diseñado para clasificación directa de lecturas y con uso extendido en metagenómica: Kraken2.

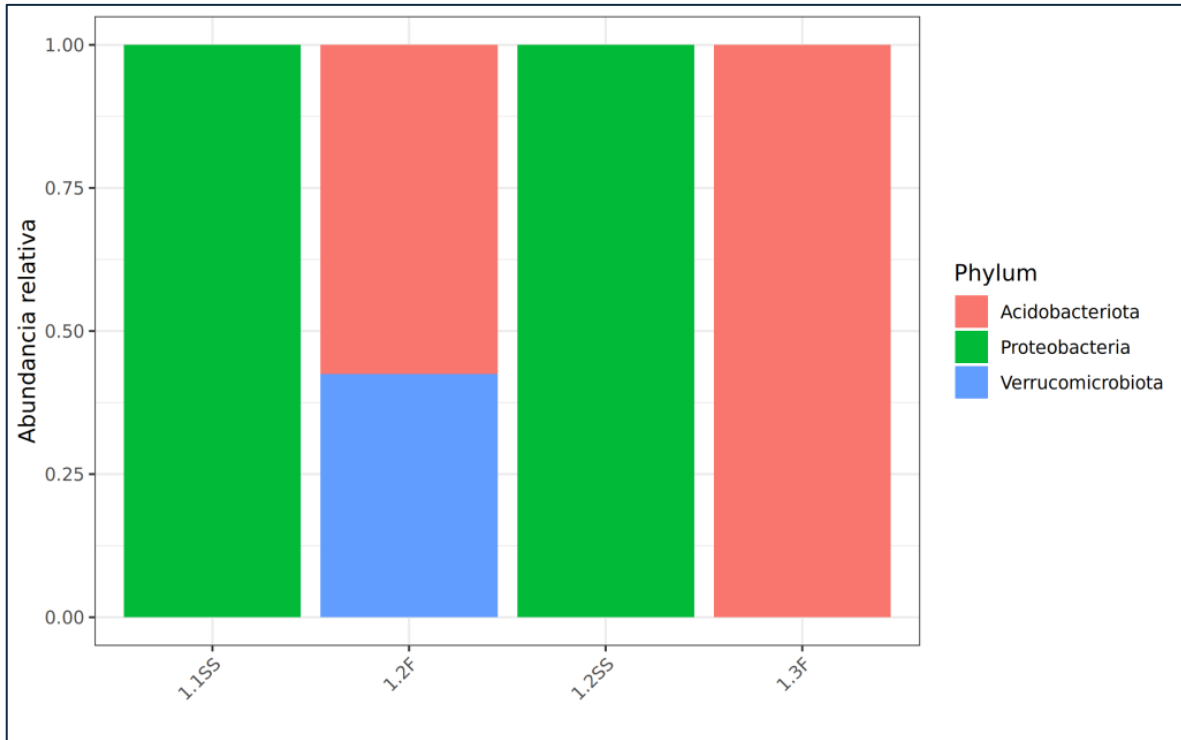


Ilustración 9. Gráficos de barra de la composición taxonómica a nivel de filo en las muestras analizadas.

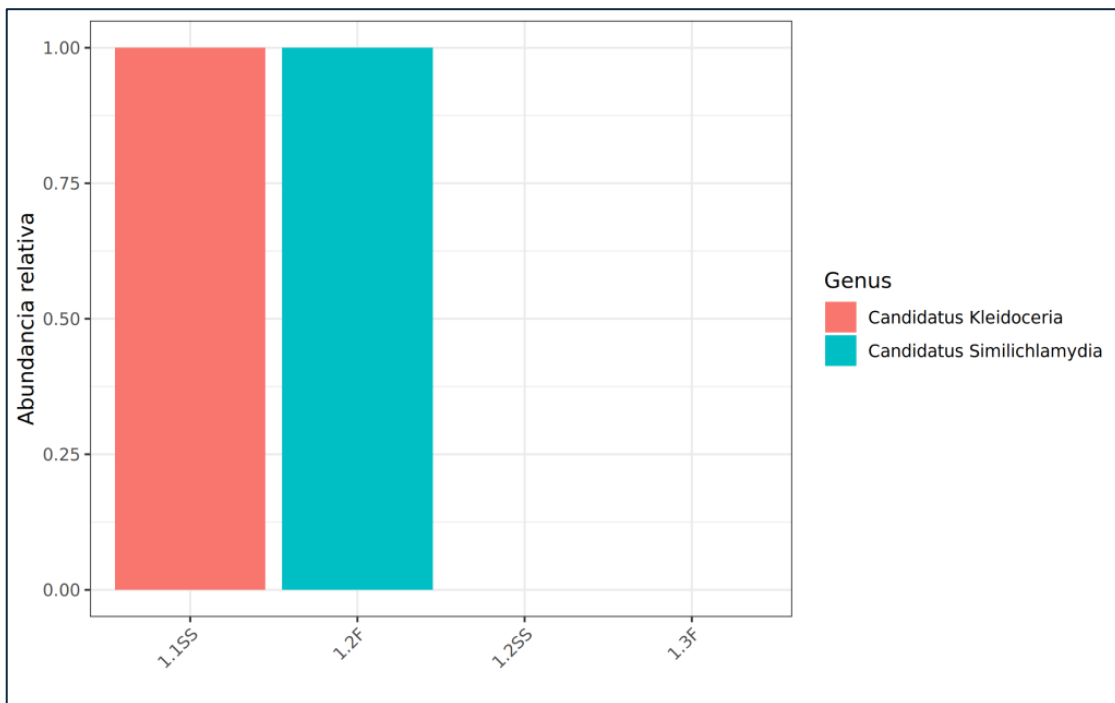


Ilustración 10. Gráficos de barra de la composición taxonómica a nivel de género en las muestras analizadas.

Desde lo anterior, el análisis final se realizó mediante Kraken2, utilizando una base MiniKraken2 (tamaño reducido) para clasificación por *k*-mers, priorizando reproducibilidad y tiempos de cómputo (Wood et al., 2019). La clasificación se ejecutó para las cuatro muestras secuenciadas (LTP-1.1SS, LTP-1.2F, LTP-2.2SS y LTP-2.3F) y se reportó explícitamente la fracción de lecturas clasificadas y no clasificadas, dado que esta métrica constituye un resultado crítico del desempeño del pipeline en ADN ambiental fragmentado y con cobertura incompleta en bases de referencia.

En la ejecución final (confianza mínima = 0), la fracción clasificada mostró variabilidad entre muestras, con predominio de lecturas no clasificadas: LTP-1.1SS = 28,10% clasificado, LTP-1.2F = 9,44%, LTP-2.2SS = 12,92% y LTP-2.3F = 21,49%. Esta heterogeneidad es consistente con un escenario donde (i) la integridad/longitud efectiva de lecturas difiere entre estratos, y (ii) la base MiniKraken2, por definición, reduce cobertura taxonómica respecto a bases completas, incrementando la proporción de lecturas no asignadas (Wood et al., 2019; Xia et al., 2023). Por lo mismo, en las visualizaciones se incorporó de manera explícita la categoría unclassified como componente informativo y no como “ruido”, ya que representa una limitación cuantificable del sistema.

Con el objetivo de caracterizar la composición taxonómica de las comunidades microbianas detectadas mediante secuenciación Oxford Nanopore, se construyeron perfiles de abundancia a partir de la clasificación taxonómica basada en *k*-mers usando Kraken2 y una base MiniKraken2. Los resultados se resumen mediante gráficos radiales por muestra, que representan los taxa más abundantes a tres niveles jerárquicos: Filo (Top 20), Género (Top 20) y Especie (Top 15). En todos los casos, se utilizaron reportes “clean” (tabla depurada para consistencia de nombres y agregación por taxón) y un umbral $\text{conf}=0$, ya mencionado, lo que implica que se consideraron

todas las asignaciones generadas por el clasificador sin aplicar un filtro adicional de confianza. En consecuencia, los patrones son adecuados para describir tendencias dominantes de composición, aunque la interpretación fina —especialmente a nivel de especie— debe realizarse con cautela debido a la posibilidad de asignaciones poco precisas en taxones de baja representatividad o especificidad en bases de datos de referencia.

Cada gráfico distribuye los taxa seleccionados alrededor de un círculo. La longitud radial de cada barra representa la magnitud de la señal para ese taxón, expresada como reads asignadas a clado (lecturas acumuladas al taxón, considerando su jerarquía). En paralelo, la escala de color (verde → amarillo → rojo) codifica la intensidad: tonos verdes corresponden a menor número de lecturas y tonos rojos a mayor número de lecturas. Este formato permite identificar rápidamente: (i) el/los taxa dominantes por muestra (barras más largas y rojas), (ii) la distribución del “resto” de taxa relevantes (barras medias), y (iii) si existe una comunidad más “concentrada” (pocos taxa dominantes) o más “repartida” (varios taxa con magnitudes similares), entre otros.

A nivel de Filo, las cuatro muestras analizadas (Punto 1 subsuperficie: 1.1SS; Punto 1 fondo: 1.2F; Punto 2 subsuperficie: 2.2SS; Punto 2 fondo: 2.3F) muestran un patrón consistente: la comunidad está estructurada por pocos filos dominantes y un conjunto de filos secundarios. En términos generales, se observa una señal fuerte y recurrente de *Actinomycetota* y *Pseudomonadota*, acompañadas por filos como *Bacteroidota* y otros grupos minoritarios que varían entre estratos. Este resultado es coherente con sistemas acuáticos eutróficos donde coexisten linajes asociados a degradación de materia orgánica, reciclaje de nutrientes y respuestas rápidas a pulsos ambientales, y donde los gradientes verticales (oxígeno, potencial redox, materia orgánica disponible) tienden a reorganizar la abundancia relativa de los principales linajes.

A nivel de Género, emergen como componentes frecuentes (según la muestra) *Candidatus Planktophila*, *Limnohabitans*, *Polynucleobacter* y *Flavobacterium*, junto con géneros típicamente asociados a *Actinobacteria* ambientales como *Streptomyces* y otros actinomicetos relacionados. La repetición de estos géneros en SS y F sugiere la presencia de un “núcleo” comunitario del sistema, mientras que las diferencias entre estratos se reflejan en cambios en la dominancia y en la aparición de taxones más específicos en fondo o subsuperficie.

A nivel de Especie, la asignación es frágil puesto que: (i) la resolución de especie en metagenómica de lecturas largas depende fuertemente de la base de referencia y de la unicidad del contenido k-mer; y (ii) los conteos en Top 15 suelen ser bajos y, por lo tanto, pequeñas diferencias absolutas pueden verse amplificadas visualmente. Por ello, este nivel se utiliza aquí principalmente como evidencia complementaria, manteniendo como soporte principal las tendencias observadas en filo y género.

1.1SS | Top 20 Phylum (clean, conf=0)

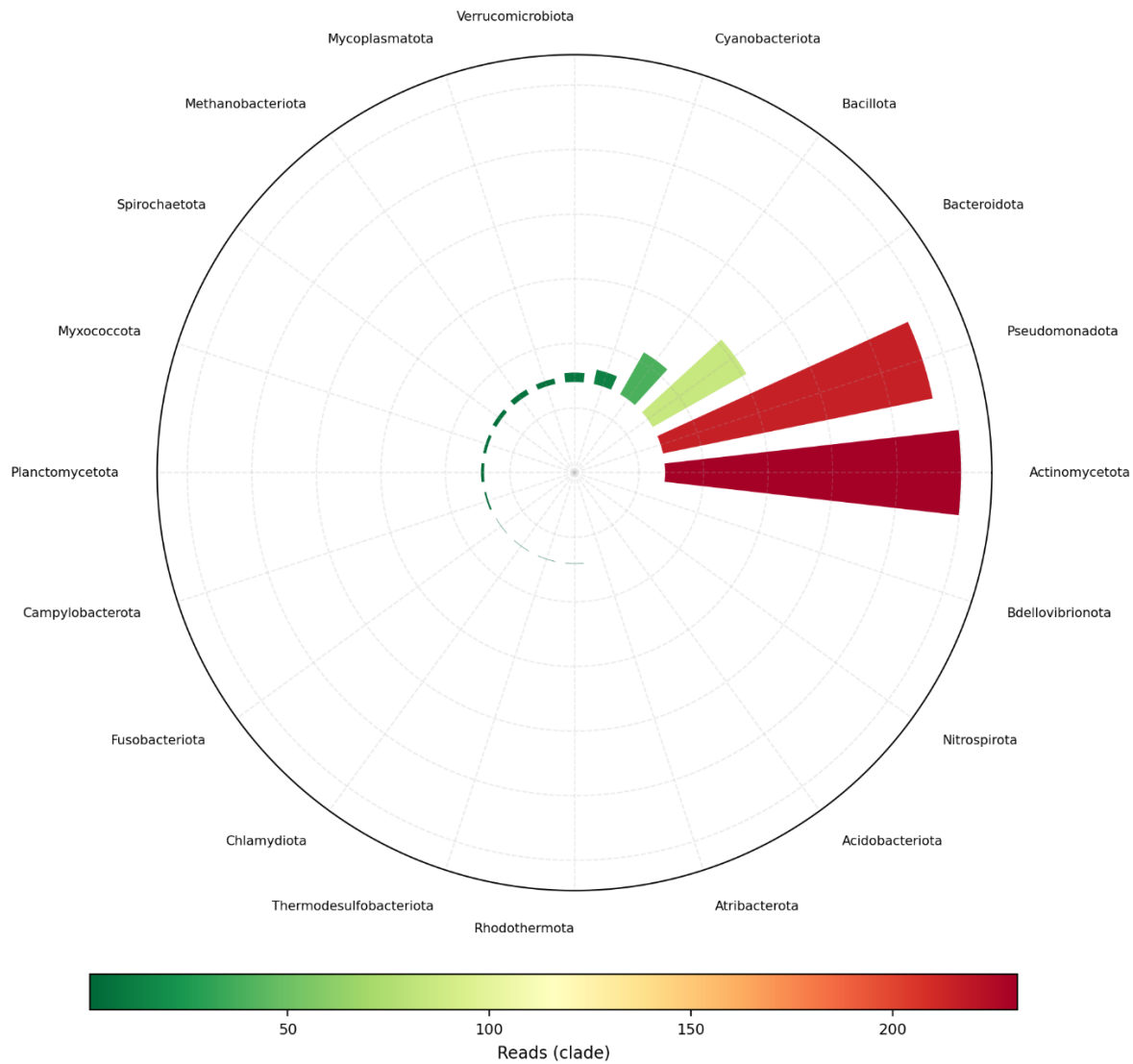


Ilustración 11. Composición taxonómica (Top 20) a nivel de Filos en LTP-1.1SS (Kraken2–MiniKraken2; tabla clean; conf=0)

En 1.1SS, el gráfico a nivel de Filo evidencia dominancia marcada de *Actinomycetota* y una contribución relevante de *Pseudomonadota*, con filos secundarios de menor magnitud. Esta estructura sugiere una comunidad con un componente fuerte de actinobacterias, consistente con

ambientes donde existe aporte y/o transformación activa de materia orgánica particulada y disuelta.

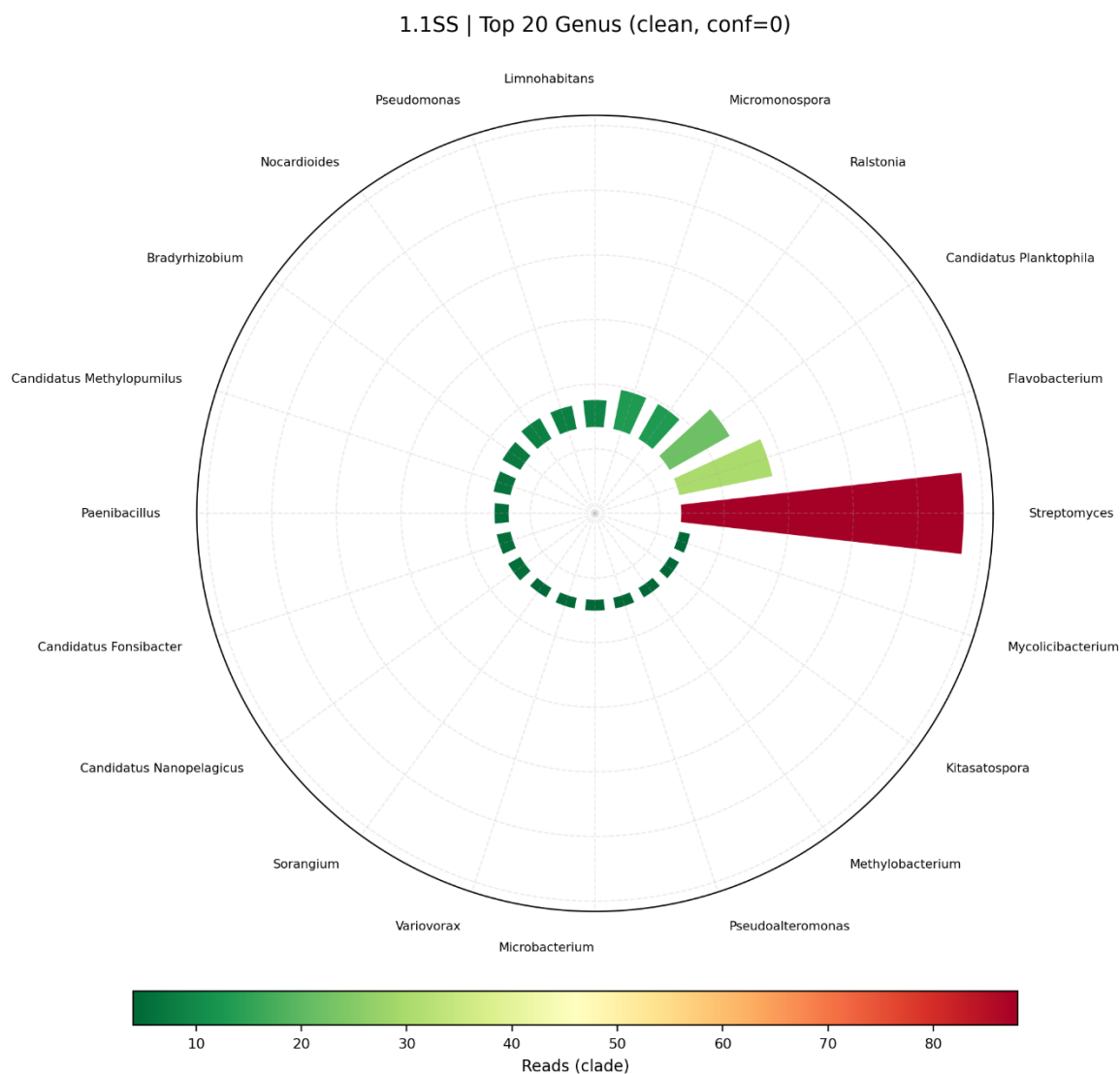


Ilustración 12. Composición taxonómica (Top 20) a nivel de Género en LTP-1.1SS (Kraken2–MiniKraken2; tabla clean; conf=0)

En el nivel de Género, destaca *Streptomyces* como uno de los taxones con mayor señal dentro del Top 20, acompañado por *Flavobacterium* y géneros característicos de ambientes de agua dulce como *Candidatus Planktophila* y *Limnohabitans*. La “co existencia” de estos géneros

sugiere, al menos descriptivamente, un ensamblaje donde convergen: (i) componentes típicos de columna de agua (linajes planctónicos), y (ii) organismos asociados a degradación de sustratos orgánicos o a interacción con partículas, que pueden aumentar su presencia relativa bajo condiciones de alta carga orgánica o microhábitats en el perfil mismo.

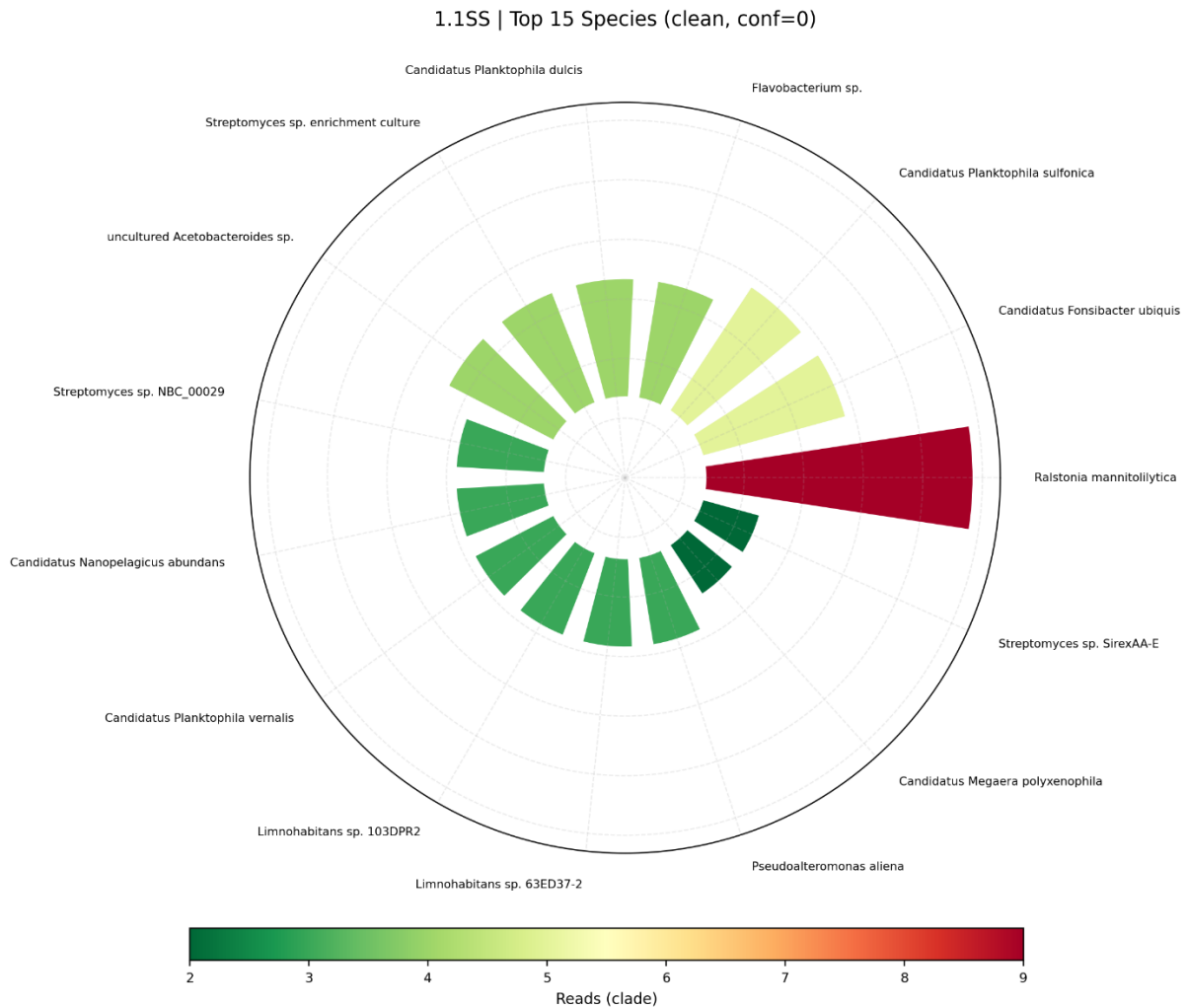


Ilustración 13. Composición taxonómica (Top 20) a nivel de Especies en LTP-1.1SS (Kraken2–MiniKraken2; tabla clean; conf=0)

En el nivel de Especie (Top 15), aparece una señal destacada para especies/candidatus asociadas a linajes planctónicos (por ejemplo, entradas etiquetadas como *Candidatus Planktophila* y *Limnohabitans*), junto con otras asignaciones. Dado el bajo rango de lecturas en este panel y las limitaciones de resolución, este resultado se interpreta como una indicación de que los géneros dominantes observados en 1.1SS también se reflejan parcialmente a nivel específico, sin que ello implique confirmación taxonómica definitiva de especie (recordar considerar estos hallazgos de especies como exploratorios).

1.2F | Top 20 Phylum (clean, conf=0)

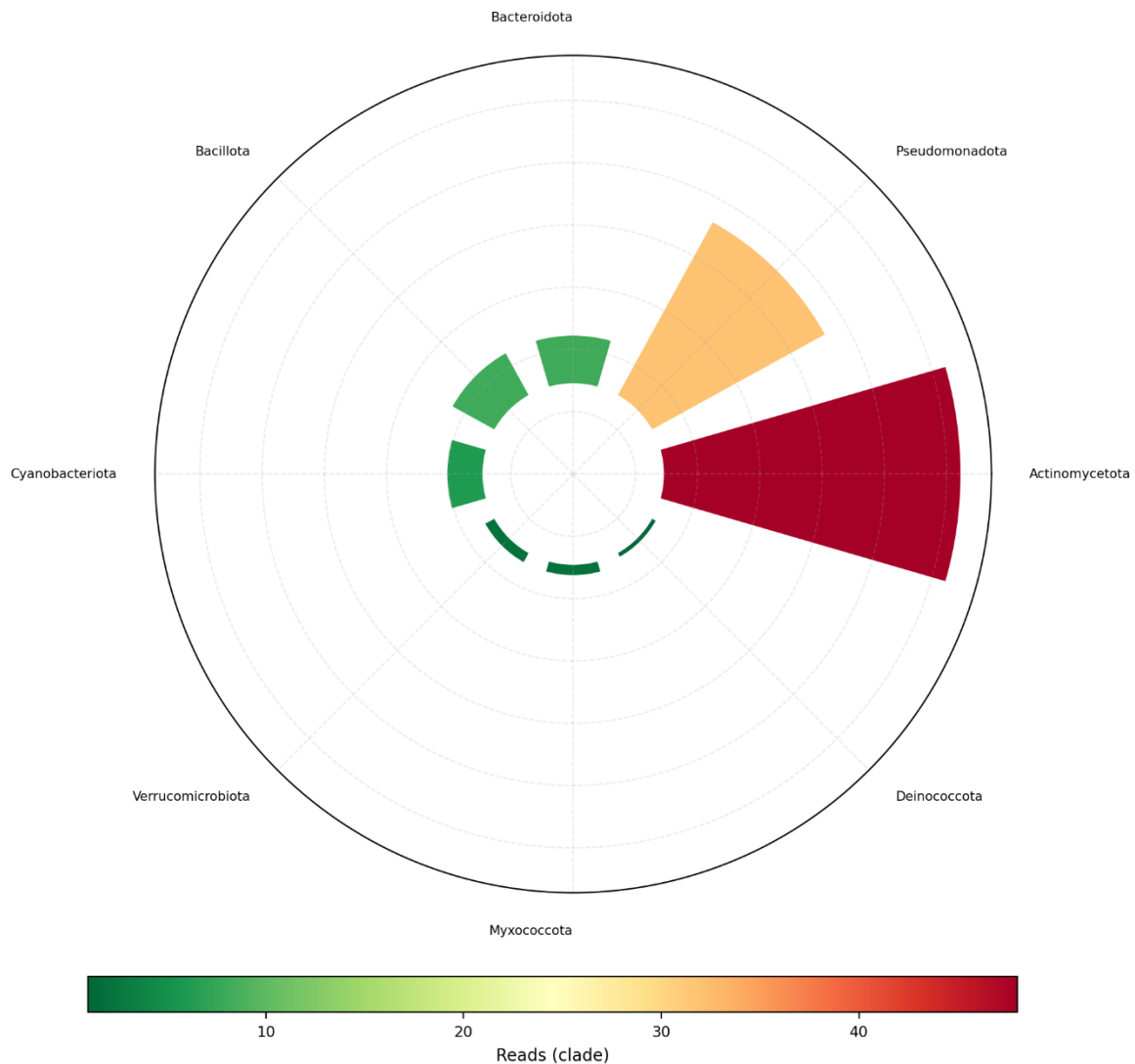


Ilustración 14. Composición taxonómica (Top 20) a nivel de Filos en LTP-1.2F (Kraken2–MiniKraken2; tabla clean; conf=0)

En 1.2F, el nivel de Filo mantiene la dominancia de Actinomycetota y Pseudomonadota, pero con una estructura donde algunos filos secundarios adquieren mayor peso relativo respecto de 1.1SS. Este cambio es compatible con un gradiente vertical, donde el fondo suele concentrar materia orgánica sedimentable, microzonas con menor oxigenación y una dinámica de intercambio de gases y/o nutrientes.

1.2F | Top 20 Genus (clean, conf=0)

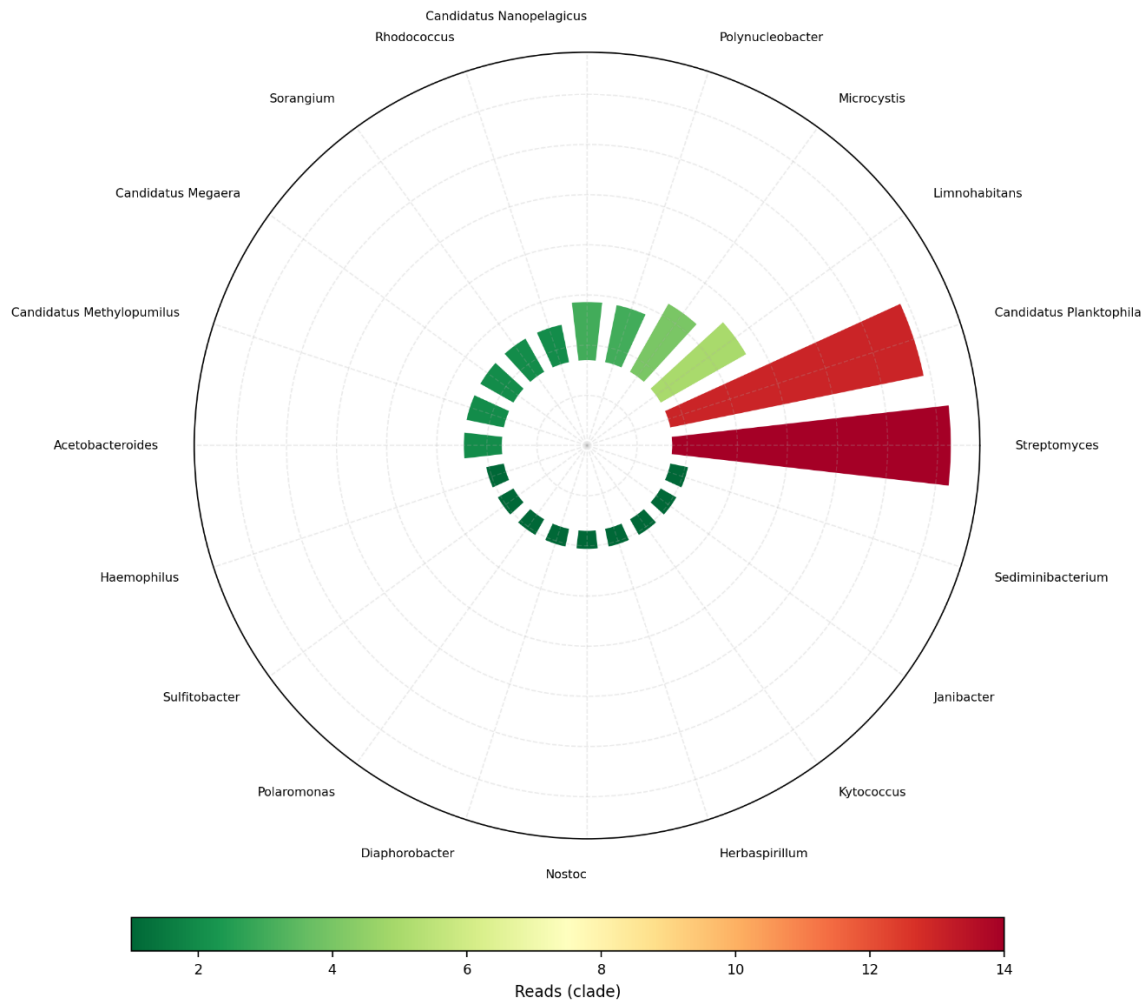


Ilustración 15. Composición taxonómica (Top 20) a nivel de Géneros en LTP-1.2F (Kraken2–MiniKraken2; tabla clean; conf=0)

A nivel de Género, vuelve a observarse un patrón con *Streptomyces* y *Candidatus Planktophila* entre los taxones más intensos, junto con la presencia de géneros asociados a sistemas acuáticos (p. ej., *Limnohabitans*, *Polynucleobacter*) y otros taxones de menor magnitud.

1.2F | Top 15 Species (clean, conf=0)

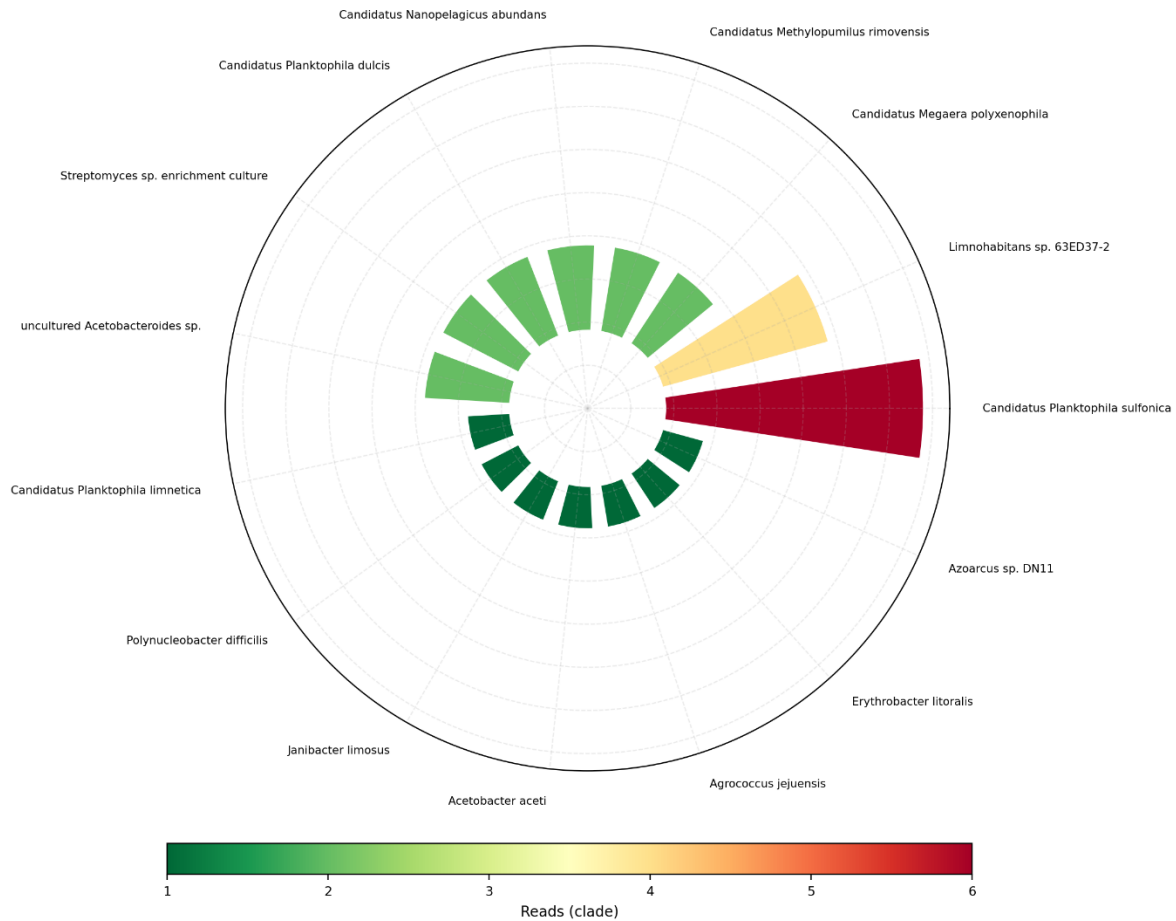


Ilustración 16. Composición taxonómica (Top 20) a nivel de Especies en LTP-1.2F (Kraken2–MiniKraken2; tabla clean; conf=0)

En el panel de Especie para 1.2F, se observa nuevamente la representación de especies/candidatus vinculadas a los géneros dominantes (poe ejemplo, entradas de *Candidatus Planktophila* y *Limnohabitans*). Como criterio de redacción defendible, este resultado debe comunicarse como concordancia parcial entre niveles jerárquicos (género → especie), manteniendo la interpretación ecológica fuerte en filo/género.

2.2SS | Top 20 Phylum (clean, conf=0)

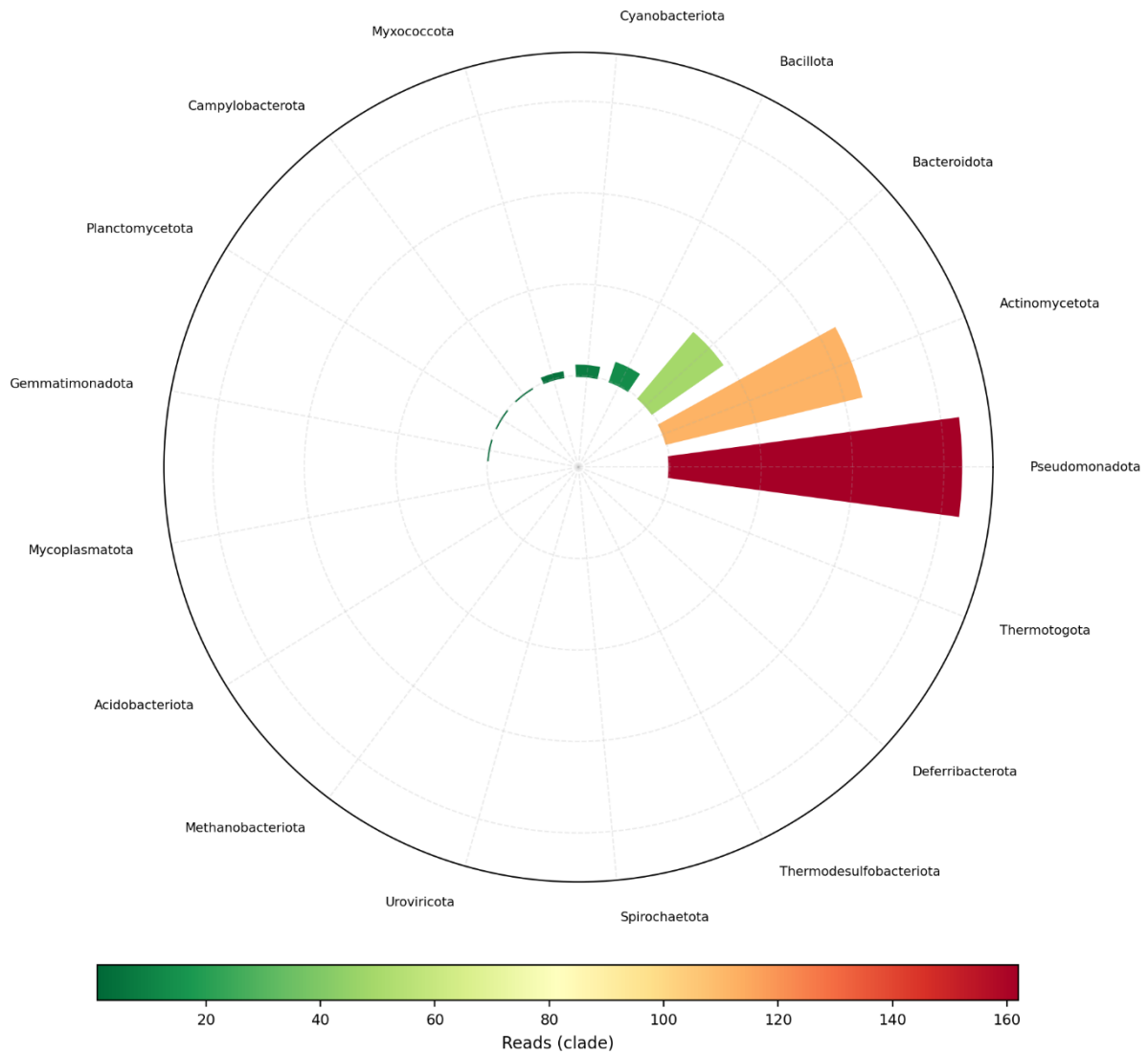


Ilustración 17. Composición taxonómica (Top 20) a nivel de Filos en LTP-2.2SS (Kraken2–MiniKraken2; tabla clean; conf=0)

En 2.2SS, el gráfico de Filo muestra un dominio marcado de Pseudomonadota, acompañado por Actinomycetota y filos secundarios. En términos descriptivos, esto sugiere que en este punto la subsuperficie presenta una señal más cargada hacia linajes típicamente abundantes en agua dulce y asociados a respuestas rápidas a disponibilidad de recursos, lo que podría relacionarse

con diferencias locales del punto de muestreo (condiciones fisicoquímicas, aportes, microhábitats).

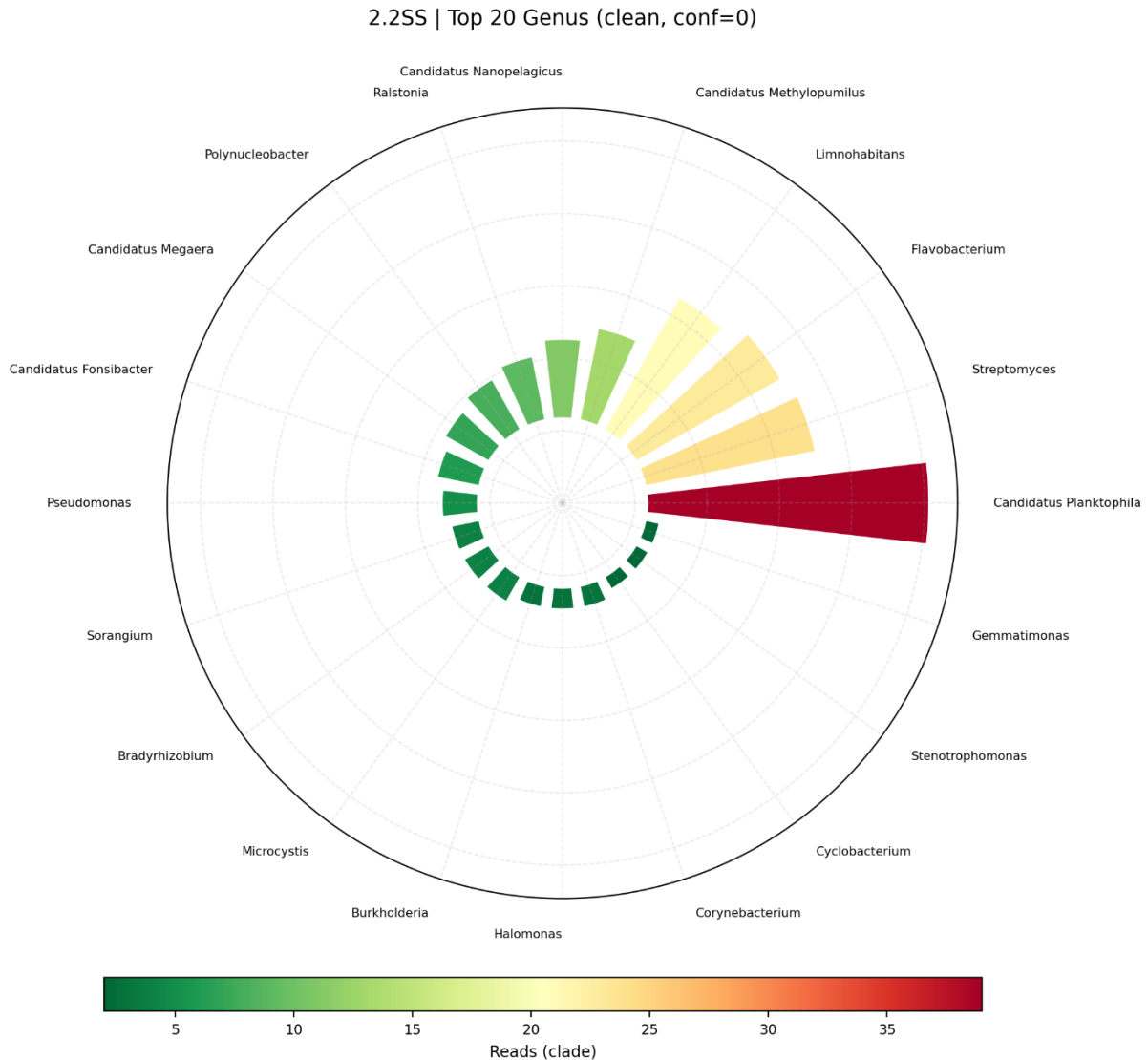


Ilustración 18. Composición taxonómica (Top 20) a nivel de Géneros en LTP-2.2SS (Kraken2–MiniKraken2; tabla clean; conf=0)

El panel de Género refuerza esta lectura al mostrar alta intensidad de *Candidatus Planktophila* junto con *Limnohabitans*, *Flavobacterium* y *Streptomyces*, además de otros géneros de menor magnitud. Este patrón es relevante porque combina (i) un componente planctónico recurrente y

(ii) taxones que suelen aumentar con disponibilidad de materia orgánica y/o partículas. La estructura general sugiere una comunidad dominada por pocos géneros principales, con un “cinturón” de géneros secundarios.

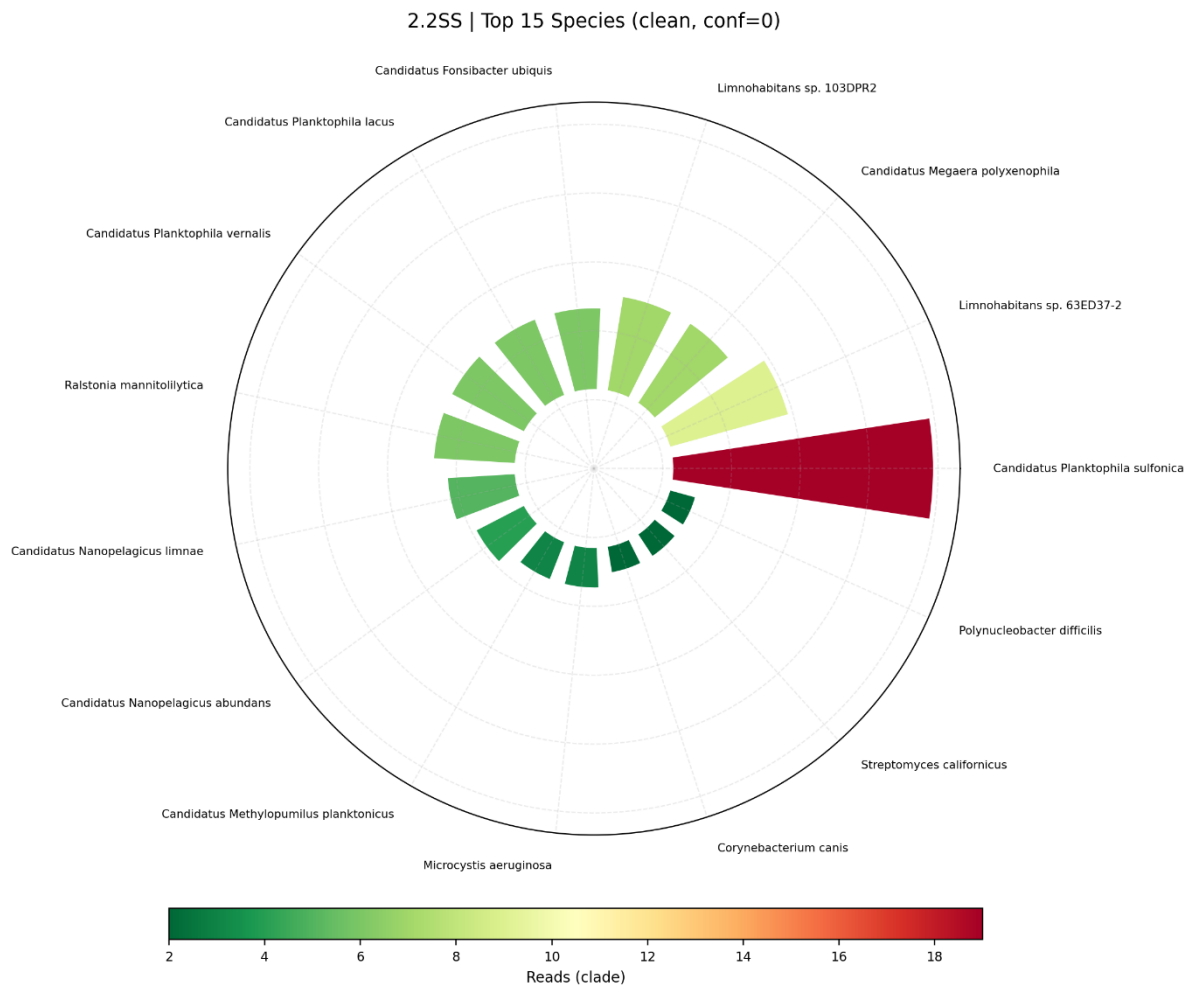


Ilustración 19. Composición taxonómica (Top 20) a nivel de Especies en LTP-2.2SS (Kraken2–MiniKraken2; tabla clean; conf=0)

En Especie (2.2SS), el Top 15 vuelve a estar dominado por especies/candidatus vinculadas a los géneros previamente mencionados (por ejemplo, entradas de *Candidatus Planktophilia* y *Limnohabitans*). Dado que aquí los conteos son relativamente mayores que en otros paneles de especie, este gráfico resulta útil para ilustrar que la dominancia no es sólo un artefacto de

agregación a nivel de género, sino que también se expresa (al menos en parte) en asignaciones más finas, con las precauciones metodológicas ya indicadas.

2.3F | Top 20 Phylum (clean, conf=0)

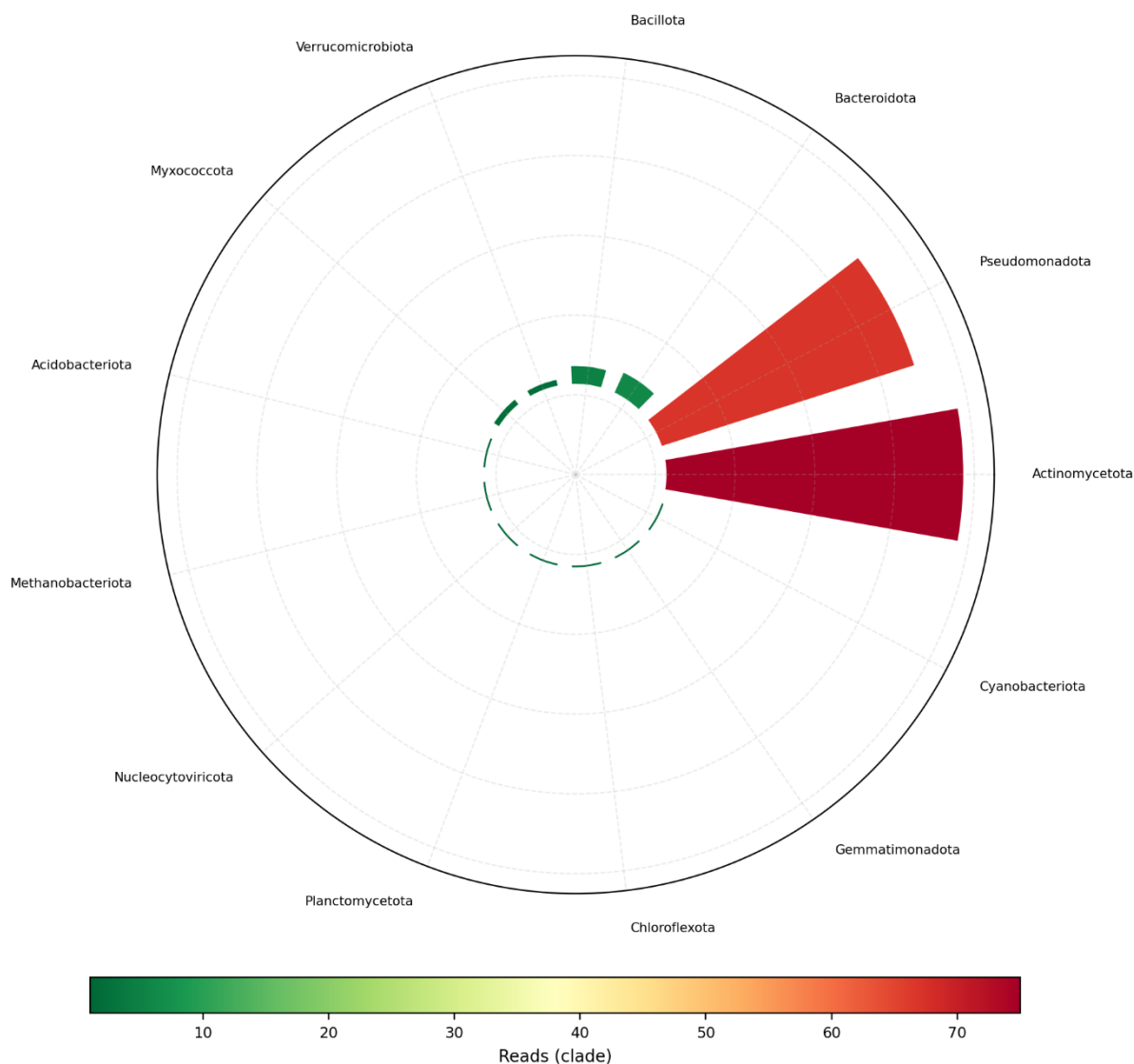


Ilustración 20. Composición taxonómica (Top 20) a nivel de Filos en LTP-2.3F (Kraken2–MiniKraken2; tabla clean; conf=0)

En 2.3F, el nivel de Filo vuelve a mostrar dominancia compartida entre *Actinomycetota* y *Pseudomonadota*, con un conjunto de filios secundarios. Este patrón, comparable al observado

en 1.2F, es coherente con la idea de que el fondo funciona como un compartimento con condiciones distintas a la subsuperficie, donde el balance entre grupos puede reorganizarse por disponibilidad de sustratos, micro-redox y resuspensión.

2.3F | Top 20 Genus (clean, conf=0)

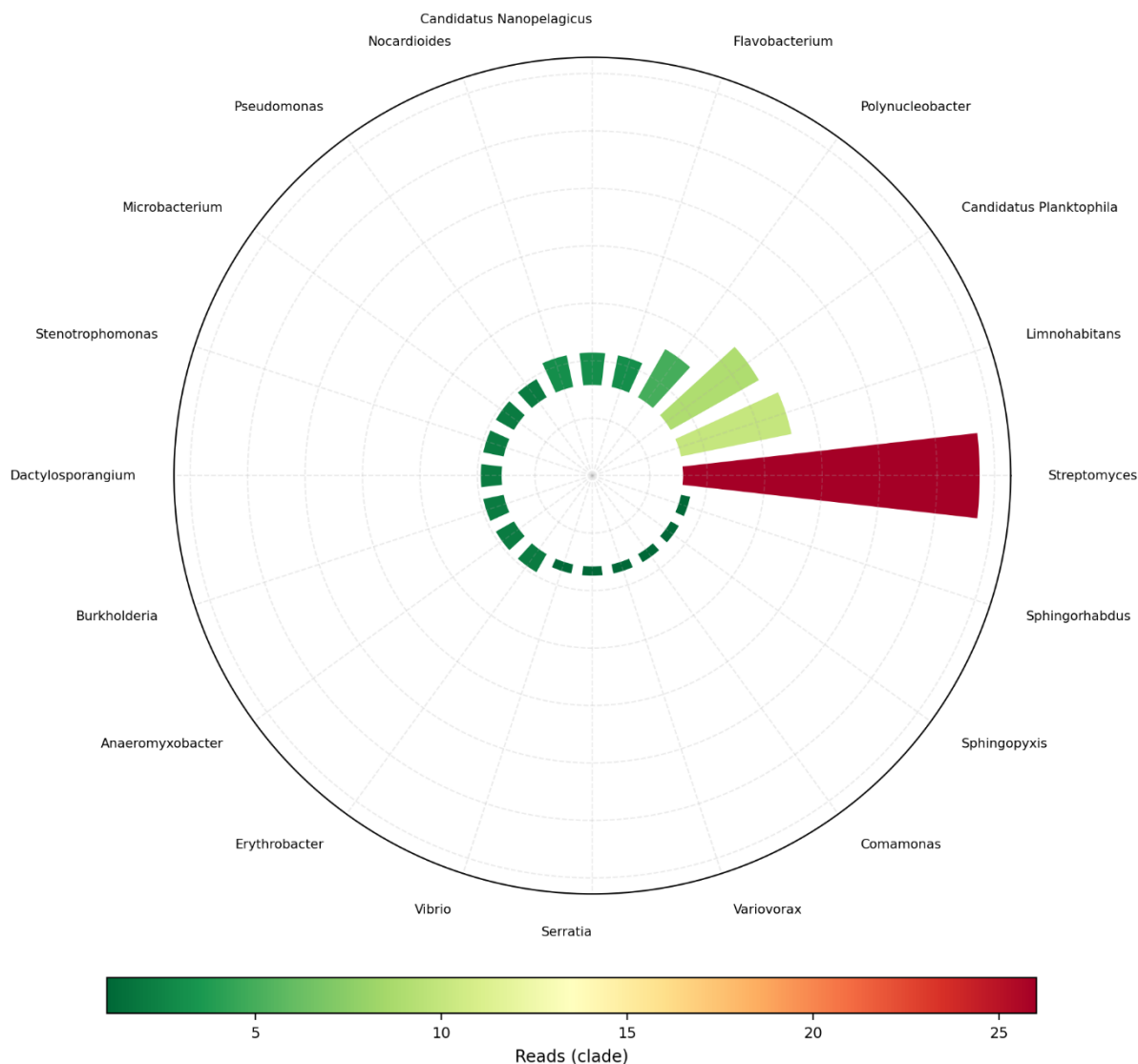


Ilustración 21. Composición taxonómica (Top 20) a nivel de Género en LTP-2.3F (Kraken2–MiniKraken2; tabla clean; conf=0)

En el nivel de Género, destaca nuevamente *Streptomyces* como taxón de alta intensidad, acompañado por géneros característicos de agua dulce como *Limnohabitans*, *Polynucleobacter* y *Candidatus Planktophila*, además de otros grupos minoritarios. En términos descriptivos, el fondo del punto 2 parece sostener un perfil donde *actinobacterias* ambientales tienen un peso importante, sin perder completamente el componente planctónico (lo que podría reflejar mezcla vertical, resuspensión o aporte desde la columna de agua).

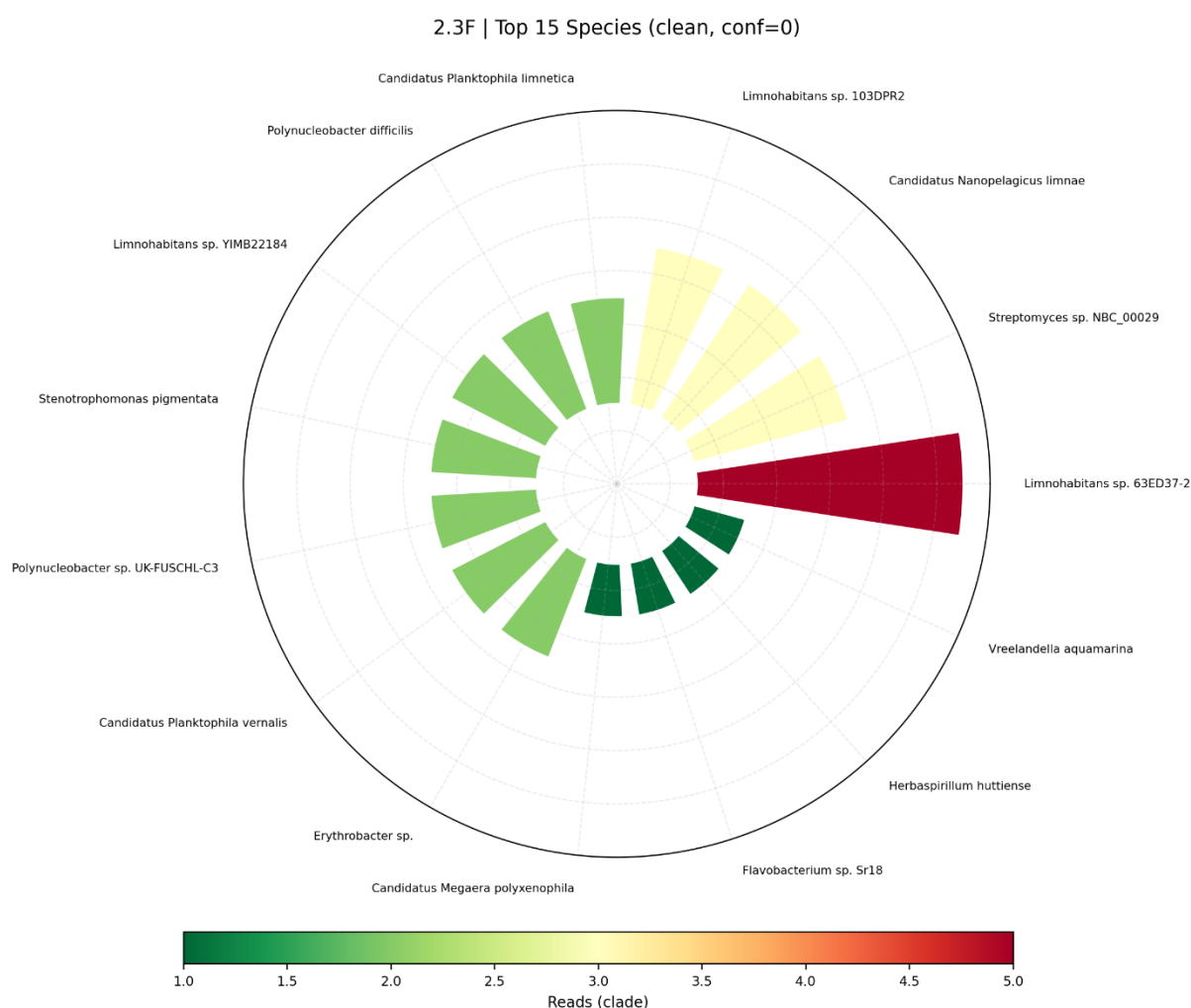


Ilustración 22. Composición taxonómica (Top 20) a nivel de Especies en LTP-2.3F (Kraken2–MiniKraken2; tabla clean; conf=0)

En el nivel de Especie (2.3F), se observa una dominancia fuerte de una entrada asociada a Limnohabitans (p. ej., *Limnohabitans sp.*) y presencia de especies/candidatus asociadas a linajes planctónicos. Este resultado puede redactarse como un indicador de que, para esta muestra, la señal a nivel de especie está particularmente concentrada en un linaje dominante, lo que es consistente con lo observado a nivel de género; sin embargo, por las limitaciones inherentes, debe presentarse como evidencia complementaria.

A continuación, las ilustraciones presentadas integran, para cada punto de muestreo, una comparación directa entre el estrato subsuperficial (SS) y el estrato de fondo (F), utilizando perfiles taxonómicos estimados a partir de lecturas de secuenciación Oxford Nanopore procesadas en un flujo de clasificación taxonómica. En particular, las figuras resumen la composición microbiana en tres niveles jerárquicos (Filo, Género y Especie) y se enfocan únicamente en los taxones más representativos (Top 20) por estrato y nivel. Con ello, el objetivo de estas ilustraciones es evaluar cambios verticales en la estructura taxonómica dentro de cada punto (SS vs F), y contrastar posteriormente si esos cambios son consistentes entre puntos (Punto 1 vs Punto 2).

En cada ilustración, el eje Y representa los dos estratos comparados dentro de un mismo punto: SS (subsuperficie) y F (fondo). El eje X muestra la proporción relativa asociada a los taxones representados, calculada sobre la base de lecturas que lograron asignación taxonómica (“lecturas clasificadas”). Adicionalmente, el encabezado de cada figura incluye el resumen de clasificación por muestra, expresado como lecturas clasificadas / lecturas totales y su porcentaje. Este indicador es clave, porque entrega una medida directa del rendimiento de la clasificación para cada estrato y permite contextualizar la solidez interpretativa a cada nivel taxonómico.

Un punto metodológico importante es que estas figuras fueron generadas sin la categoría “Otros”. En consecuencia, la barra apilada no necesariamente suma 1, ya que el tramo faltante

corresponde a taxones clasificados pero fuera del Top 20 (baja abundancia relativa o alta diversidad de colas). Esto no es un problema, pero sí cambia la lectura: aquí la longitud total de la barra representa cuánta fracción de la comunidad clasificada está capturada por los taxones dominantes (Top 20); y la fragmentación de colores dentro de la barra permite visualizar la concentración o dispersión (dominancia de pocos taxones vs distribución más repartida).

Por último, a medida que se avanza desde Filo → Género → Especie, es esperable observar una disminución en la proporción de lecturas que alcanzan asignación precisa, especialmente en muestras ambientales complejas y con bases de datos reducidas. Por ello, las interpretaciones a nivel de especie deben plantearse con mayor prudencia, privilegiando patrones consistentes y evitando conclusiones causales cuando el soporte empírico (número de lecturas clasificadas y cobertura) es bajo.

En el Punto 1 de muestreo, el resumen de clasificación indica una diferencia marcada entre estratos: la muestra 1.1SS presenta un mayor porcentaje de lecturas clasificadas que 1.2F, lo cual sugiere que la fracción de ADN que logra mapear de forma consistente contra la base de referencia es más alta en subsuperficie que en fondo para este punto. Este comportamiento puede explicarse por múltiples factores (mezcla de ADN ambiental, fragmentación, proporción de ADN no representado en bases de datos, o presencia de secuencias con baja complejidad), por lo que en esta etapa se interpreta principalmente como diferencia de rendimiento taxonómico y no como evidencia ecológica directa.

En la barra apilada a nivel de género, se aprecia que los taxones del Top 20 capturan solo una parte del total clasificado (dado que “Otros” fue removido). Aun así, es posible evaluar qué tan dominantes son los taxones principales dentro de lo representado: un patrón de pocos segmentos amplios implica mayor dominancia relativa; mientras que una barra con muchos segmentos de tamaño similar sugiere un reparto más homogéneo dentro del conjunto dominante. En el Punto

1, el estrato SS tiende a mostrar una señal dominada por un subconjunto reducido del Top 20, mientras que el estrato F exhibe una composición algo más repartida dentro de lo visualizado. Esta diferencia es coherente con la idea de que, incluso dentro de un mismo punto, la estructura taxonómica puede variar verticalmente, ya sea por gradientes ambientales, por cambios en la disponibilidad de sustratos, o por la interacción con microhábitats asociados a material particulado y sedimentario.

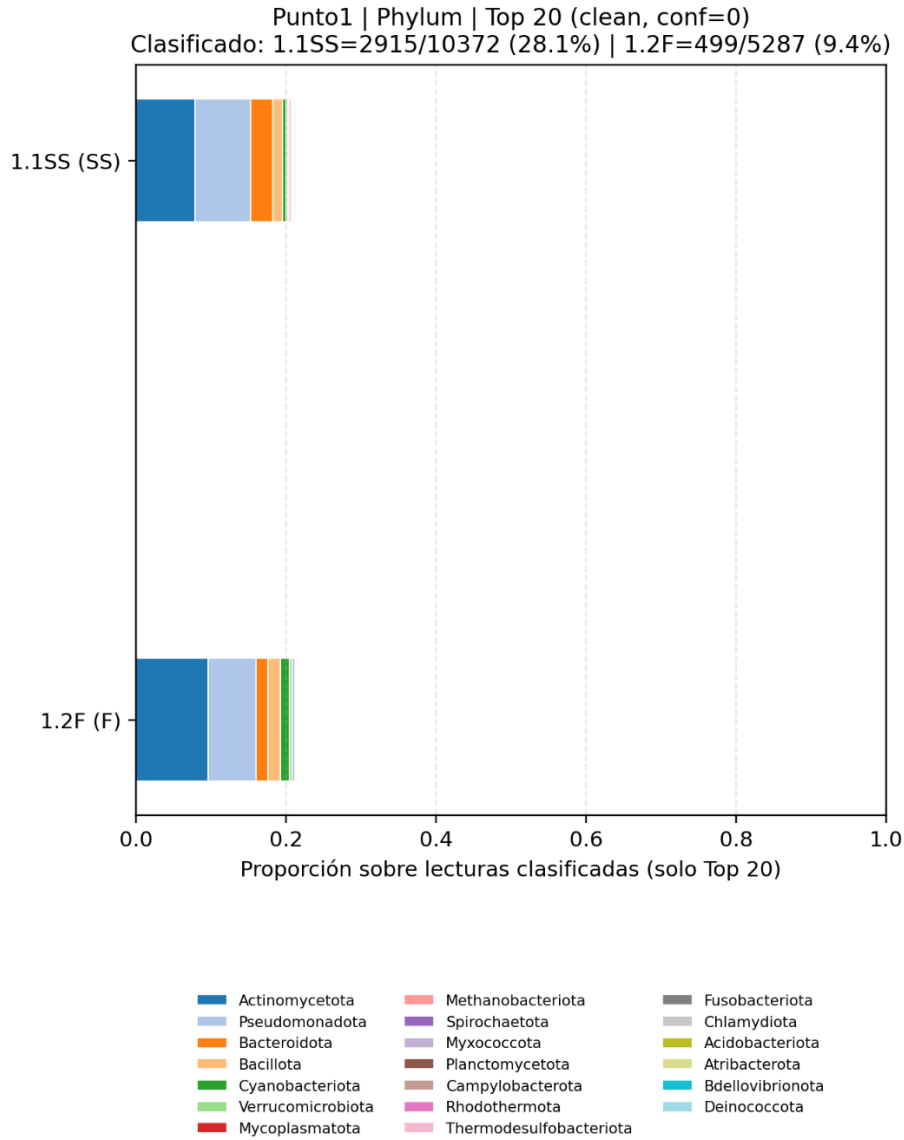


Ilustración 23. Comparación vertical SS vs F (Top 20) a nivel de Filos en Punto 1, Kraken2 (MiniKraken2), datos 'clean' (conf=0)

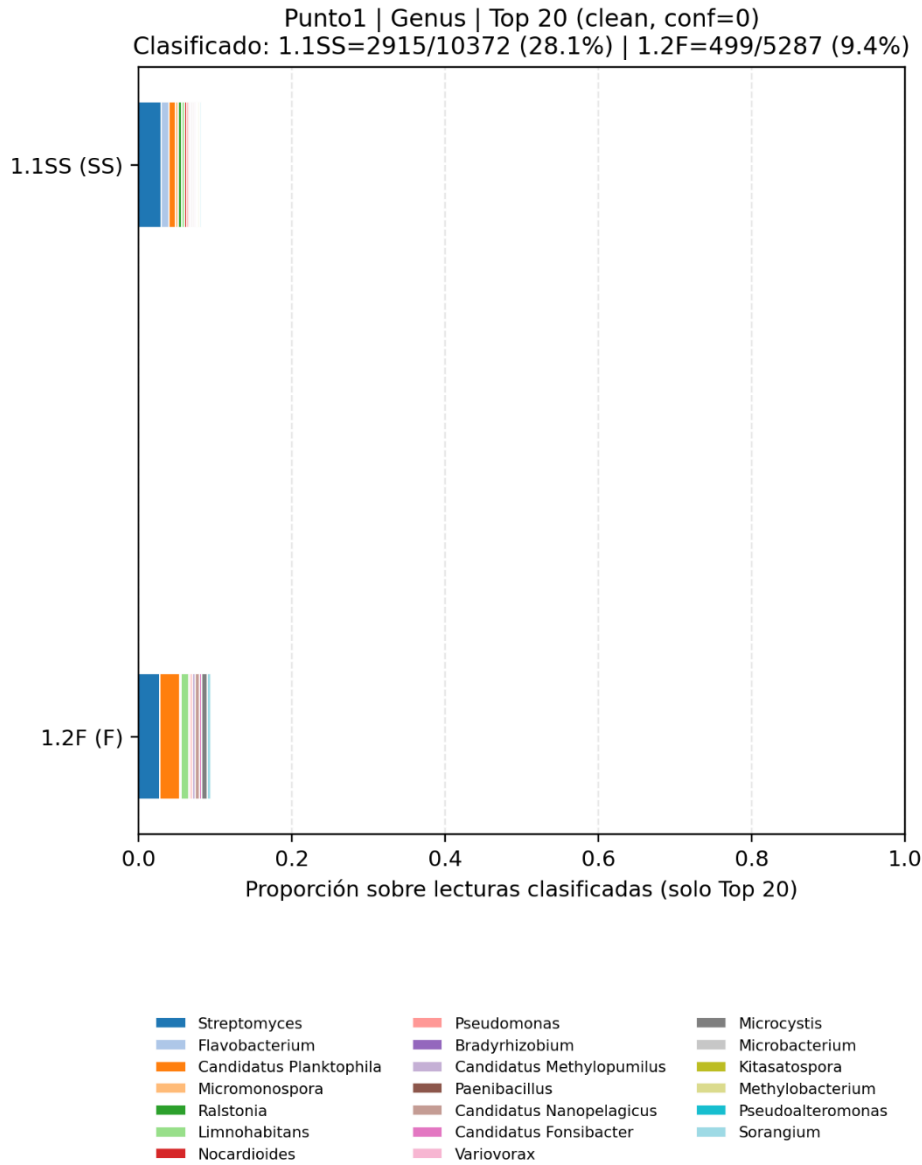


Ilustración 24: Comparación vertical SS vs F (Top 20) a nivel de Género en Punto 1, Kraken2 (MiniKraken2), datos 'clean' (conf=0)

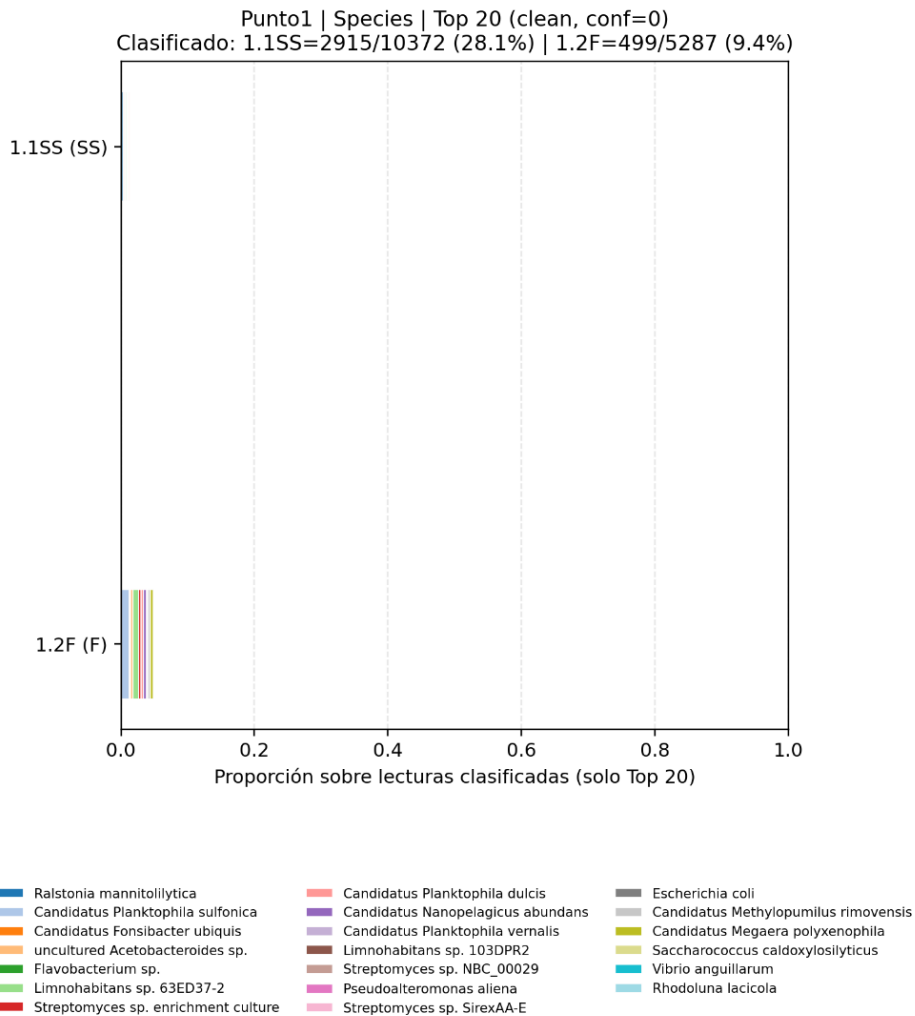


Ilustración 25. Comparación vertical SS vs F (Top 20) a nivel de Especies en Punto 1, Kraken2 (MiniKraken2), datos 'clean' (conf=0)

En el Punto 2, el resumen de clasificación indica un comportamiento distinto al Punto 1: el porcentaje de lecturas clasificadas difiere entre 2.2SS y 2.3F, mostrando que el rendimiento de asignación no es constante entre estratos ni entre puntos. Esta observación es importante porque sugiere que la comparación SS vs F debe interpretarse considerando no solo la composición relativa, sino también la capacidad efectiva del pipeline para clasificar las lecturas en cada estrato.

En la visualización por géneros, el estrato SS suele exhibir una composición del Top 20 relativamente diversa (varios segmentos visibles) mientras que el estrato F puede mostrar una señal más concentrada en pocos géneros dominantes, o alternatively una barra más corta si gran parte de la composición queda fuera del Top 20 (alta cola de rareza). Cualquiera de estos dos escenarios es interpretativamente relevante: una dominancia fuerte sugiere concentración funcional/taxonómica; y una barra corta sugiere que la comunidad clasificada está distribuida en muchos taxones de baja abundancia relativa (y por ello el Top 20 no captura gran parte del total).

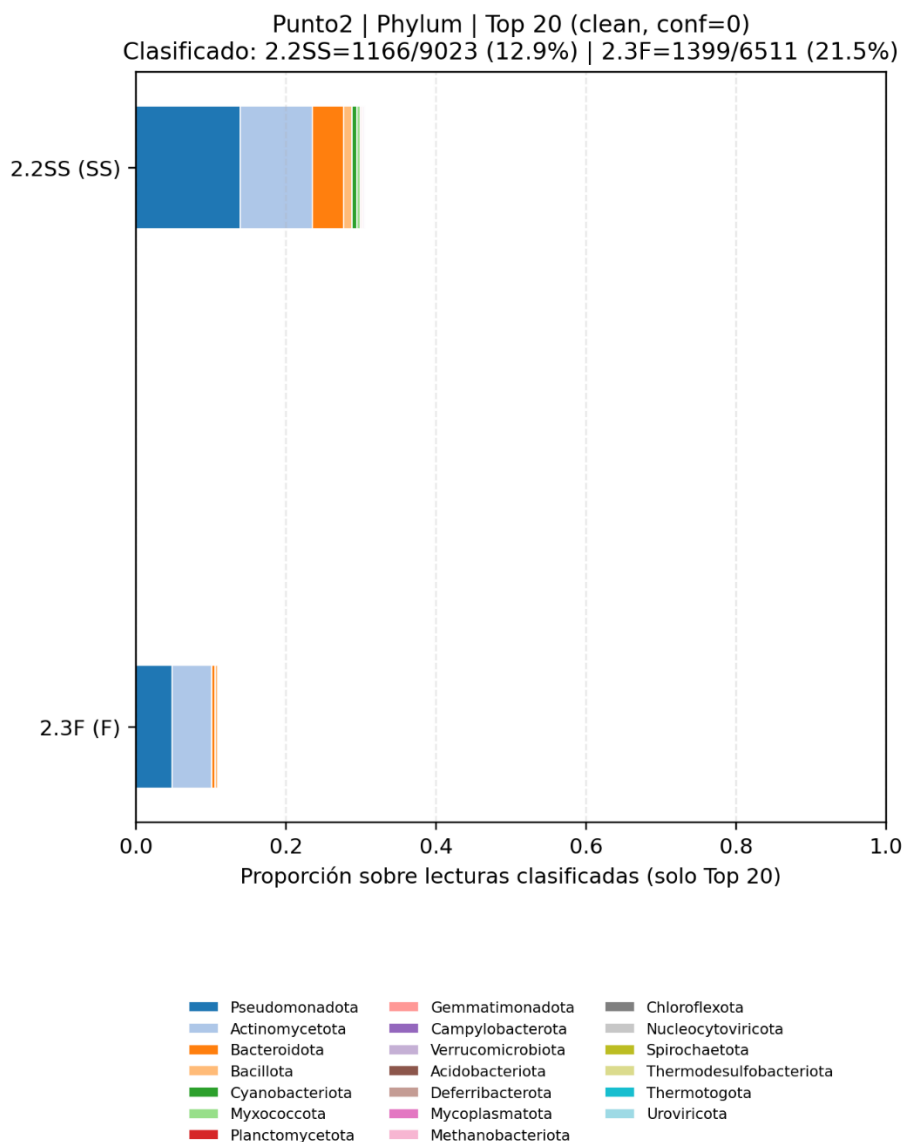


Ilustración 26. Comparación vertical SS vs F (Top 20) a nivel de Filos en Punto 2, Kraken2 (MiniKraken2), datos 'clean' (conf=0)

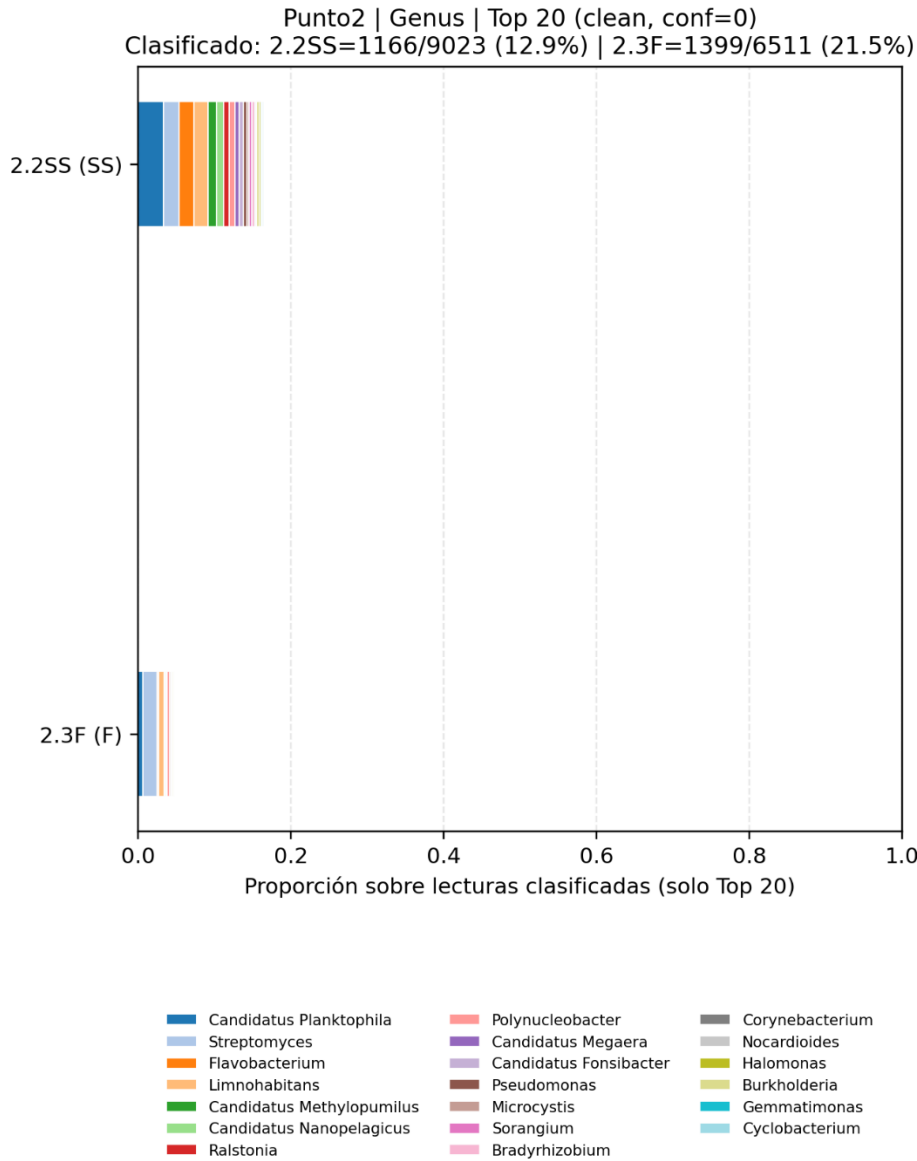


Ilustración 27. Comparación vertical SS vs F (Top 20) a nivel de Género en Punto 2, Kraken2 (MiniKraken2), datos 'clean' (conf=0)

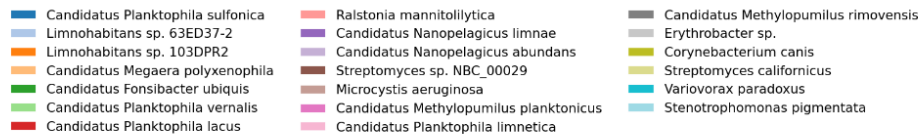
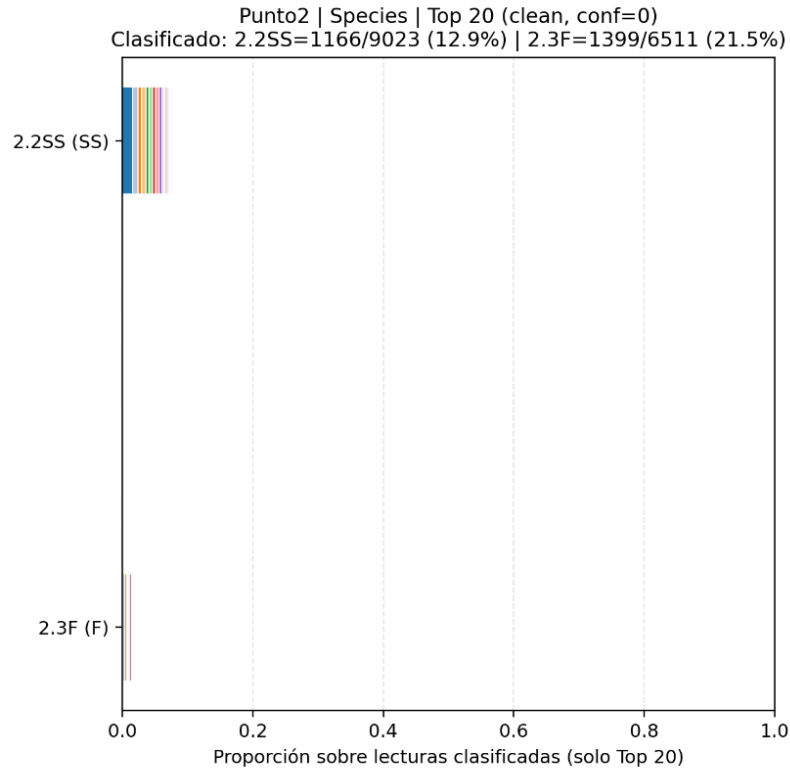


Ilustración 28. Comparación vertical SS vs F (Top 20) a nivel de Especies en Punto 2, Kraken2 (MiniKraken2), datos 'clean' (conf=0)

Diseño y elaboración de material educativo para la comunidad local

En el marco del objetivo de transferencia de conocimiento hacia la comunidad local, se diseñó un material educativo tipo afiche/infografía (Ilustración 29) orientado a comunicar, en lenguaje accesible, los principales hallazgos del estudio sobre metano disuelto (CH_4) y su relación con variables fisicoquímicas relevantes para la dinámica del ecosistema. El diseño incorporó elementos visuales del sistema (Laguna Tres Pascualas) y mensajes preventivos asociados a prácticas de cuidado ambiental, buscando fortalecer el vínculo entre evidencia científica y acción ciudadana.



Ilustración 29. Afiche educativo desarrollado como herramienta de divulgación científica para la comunidad local de la Laguna Tres Pascualas.

La construcción del material se sustentó en una recopilación bibliográfica en línea y una revisión periodística/administrativa disponible públicamente, con el propósito de contextualizar el estado del sistema, identificar problemáticas recurrentes y reconocer actores institucionales y comunitarios potencialmente vinculados a procesos de gestión (p. ej., comunidad local, instituciones académicas, municipio y organizaciones con presencia territorial). Este enfoque permitió delimitar un diagnóstico comunicacional inicial y estructurar un primer instrumento de divulgación alineado con los resultados de la investigación.

Cabe señalar que, por limitaciones logísticas del periodo de ejecución, no fue posible implementar instancias presenciales de participación (entrevistas, talleres o reuniones con actores clave y vecinos/as). En consecuencia, el producto desarrollado debe entenderse como un entregable preliminar basado en evidencia secundaria, útil para orientar y focalizar futuras etapas de vinculación. En términos operativos, el afiche funciona como una base para próximos acercamientos comunitarios, donde se recomienda incorporar validación participativa, retroalimentación local y co construcción de mensajes, con el fin de aumentar pertinencia territorial, legitimidad y capacidad de incidencia del material.

5. Conclusiones

La Laguna Tres Pascualas representa un ecosistema acuático urbano particularmente sensible a presiones crónicas asociadas al ingreso de nutrientes y materia orgánica, lo que condiciona su estado trófico y favorece escenarios biogeoquímicos donde pueden intensificarse rutas microbianas asociadas a la producción, acumulación y eventual emisión de metano. Desde ese contexto, esta investigación se propuso comprender la dinámica del metano disuelto (CH_4) integrando mediciones fisicoquímicas, análisis estadístico y evidencia molecular basada en ADN ambiental (eDNA), con el propósito de pasar desde una caracterización descriptiva hacia una interpretación funcional defendible del sistema, y aportar una base útil para orientar acciones de gestión y mitigación en un ambiente eutrofizado sometido a perturbación antrópica (Segers, 1998; Bastviken et al., 2004; Grossart et al., 2002; Conrad, 2009).

En términos generales, los resultados sugieren que la Laguna no se comporta como un “emisor pasivo” de metano, sino como un sistema dinámico cuyo CH_4 disuelto responde a controles dominantes de naturaleza fisicoquímica y a una distribución microbiana del ecosistema que es coherente con gradientes esperables en ambientes eutrofizados. La evidencia estadística mostró que una proporción relevante de la variabilidad del metano puede explicarse por un conjunto acotado de variables, donde la temperatura se posiciona como el factor con señal más consistente y robusta, tanto en el análisis correlacional como en el modelo de regresión múltiple, lo que es coherente con lo descrito para sistemas eutrofizados, donde el aumento térmico intensifica procesos microbianos, altera el equilibrio de oxidantes y favorece condiciones que pueden promover la acumulación o liberación de CH_4 (Wang et al., 2024; Bastviken et al., 2004; Grossart et al., 2002). Del mismo modo, la señal asociada al potencial óxido-reducción (ORP) se interpreta como compatible con el marco biogeoquímico del ciclo del metano: a medida que

el sistema tiende a condiciones más reductoras, se abren ventanas ambientales que favorecen rutas anaerobias vinculadas a metanogénesis, aun cuando la fuerza estadística del efecto pueda variar dependiendo del enfoque y del tamaño muestral. Por eso, la interpretación debe ser cautelosa en el sentido de que el patrón identificado es coherente con literatura, pero no corresponde presentarla como causalidad cerrada, sino como una relación ecológicamente plausible dentro de un análisis exploratorio controlado y metodológicamente transparente (Thauer et al., 1998; Conrad, 2009; Segers, 1998).

Por otro lado, un aspecto a considerar es que el análisis estadístico se trabajó con la evaluación de supuestos (normalidad de variables, selección de correlaciones paramétricas/no paramétricas, y chequeos de residuos y heterocedasticidad en el modelo múltiple), lo cual permite sostener con mayor solidez la interpretación general del patrón. Sin embargo, los resultados también obligan a ser rigurosos en cómo se comunican: el alto ajuste global del modelo (R^2 y R^2 ajustado elevados) no debe confundirse con evidencia causal, y la presencia de colinealidad elevada (VIF altos) exige interpretar el modelo desde una lectura integrada del sistema, más que desde el “peso” aislado de cada coeficiente de las variables. En otras palabras, el aporte más sólido no es afirmar que cada predictor opera de forma independiente y estable, sino sostener que el CH_4 está fuertemente condicionado por controles fisicoquímicos dominantes — particularmente temperatura y señal redox— y que otras variables cumplen roles secundarios o contextuales que requieren mayor resolución temporal y espacial para delimitar su contribución real, ver Ilustración 30 (Bastviken et al., 2004; Conrad, 2009; Segers, 1998; Wang et al., 2024).

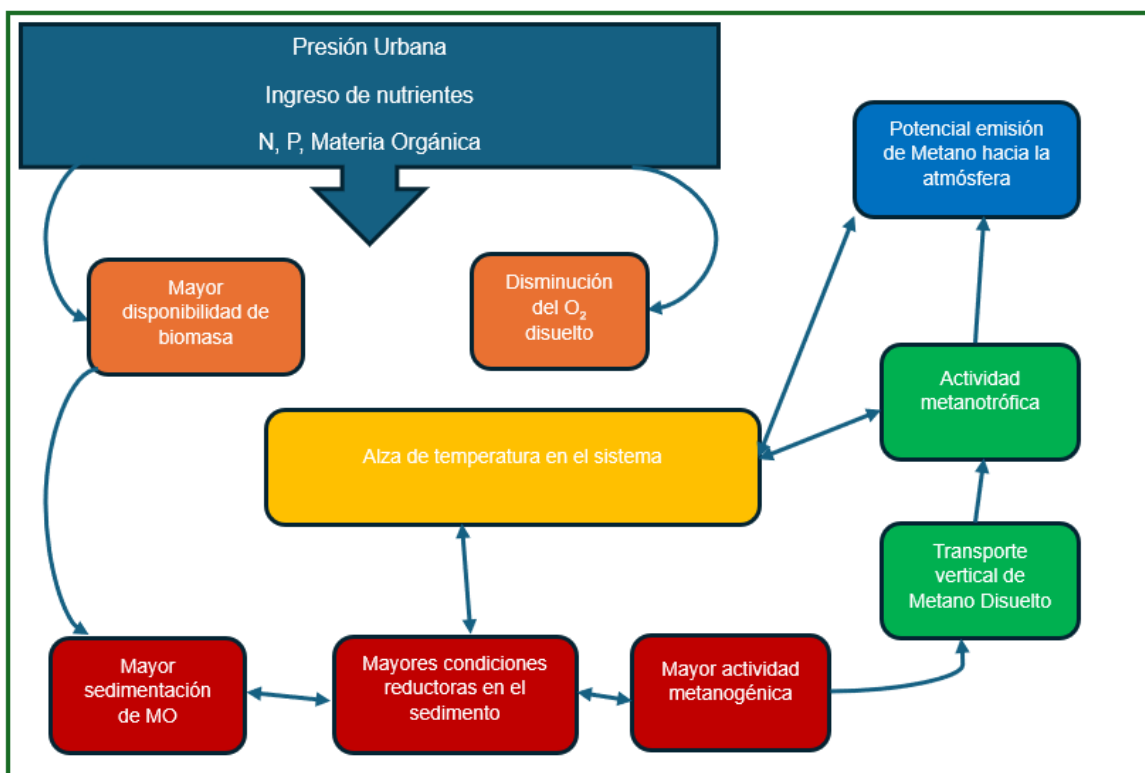


Ilustración 30. Modelo conceptual de la dinámica del metano (CH₄) en la Laguna Tres Pascualas.

La integración del ADN Ambiental permitió complementar los análisis fisicoquímicos desde una dimensión biológica. La información derivada, interpretada con cautela y sin sobreextender su alcance, aporta evidencia estructural sobre la composición taxonómica y su diferenciación vertical entre estratos. Esta diferenciación es consistente con la lógica ecológica de sistemas eutrofizados, donde la subsuperficie suele presentar microambientes relativamente más oxigenados o menos reductores, mientras que el fondo y el sedimento concentran materia orgánica y favorecen condiciones reductoras; por lo tanto, no resulta esperable que la estructura microbiana sea homogénea o aleatoria a lo largo de la columna de agua, aun considerando que la Laguna no posee estratificación térmica por literatura y a través de la información recopilada en nuestros muestreos. Al mismo tiempo, esta evidencia debe ser tratada como aproximación de composición y no como prueba directa de actividad metabólica: la identificación taxonómica

describe qué taxas fueron detectados y clasificados en base a la base de datos utilizada, pero no permite por sí sola afirmar tasas, rutas funcionales activas ni relaciones causales directas con el CH₄ sin marcadores funcionales específicos o mediciones adicionales. Aun con ese resguardo, el aporte del eDNA es valioso porque permite sostener que las condiciones fisicoquímicas que modulan el metano ocurren dentro de un marco de comunidades microbianas que responden a gradientes ambientales y que, por ende, pueden estar acopladas al funcionamiento biogeoquímico del sistema (Conrad, 2009; Segers, 1998).

En términos metodológicos, un aprendizaje clave fue el ajuste del conducto bioinformático. Inicialmente se intentó un flujo de trabajo orientado a ASV mediante DADA2, que es un enfoque ampliamente validado para amplicones y datos de segunda generación (Illumina), pero que no necesariamente se ajusta de manera óptima a lecturas largas de Oxford Nanopore, debido a perfiles de error, distribución de longitudes y supuestos de inferencia distintos. Reconocer este contratiempo como parte del proceso investigativo es fundamental para asegurar transparencia y reproducibilidad: se trató de una etapa exploratoria, que permitió evaluar limitaciones reales del dato y del enfoque, para luego transitar hacia una estrategia más coherente con la naturaleza de los datos ONT y con el objetivo central de clasificación taxonómica. En ese sentido, el paso hacia un conducto basado en Kraken2 con base MiniKraken se adoptó como una alternativa metodológicamente más consistente para la clasificación de lecturas, y su uso se alinea con discusiones actuales sobre herramientas y estrategias en análisis metagenómico integrado y secuenciación de tercera generación (Xia, 2023; Rojas-Villalta et al., 2024). Este punto es particularmente importante puesto que no se trata de “cambiar de herramienta”, sino de tomar el camino más adecuado según la naturaleza de los datos y el objetivo de estos, que está dado por el contexto de cada investigación en particular.

Ahora bien, existieron limitantes que deben ser consideradas para estudios y análisis posteriores. En primer lugar, el diseño muestral corresponde a un levantamiento acotado en tiempo y con tamaño muestral reducido, lo que restringe la capacidad de generalización, disminuye la potencia estadística y obliga a interpretar correlaciones y regresiones como aproximaciones exploratorias, evitando lecturas causales o extrapolaciones fuera del rango observado. En esa misma línea, algunas variables presentaron ausencia de datos (por ejemplo, clorofila), lo que limita evaluar de manera directa el rol de la productividad y la dinámica algal en la generación/consumo de CH₄, y exige declarar explícitamente que ciertas interpretaciones quedan como hipótesis plausibles sustentadas en literatura, pero no comprobadas empíricamente en este set de datos. Asimismo, aunque se aplicaron pruebas de supuestos y verificación de residuos, el modelo multivariado mostró señales de colinealidad (VIF elevados), lo que implica que los coeficientes individuales deben leerse con cautela y que el valor del modelo está principalmente en su capacidad descriptiva global para capturar un patrón integrado del sistema, más que en atribuir “peso” independiente a cada predictor. En segundo lugar, en el componente molecular, la evidencia de eDNA describe composición taxonómica inferida desde bases de datos y criterios de clasificación, pero no permite concluir actividad metabólica ni rutas funcionales activas sin marcadores funcionales específicos (p. ej., genes asociados a metanogénesis/metanotrofia) o mediciones complementarias; adicionalmente, el porcentaje de lecturas clasificadas varió entre muestras y, por ende, cualquier comparación debe contextualizarse por diferencias en rendimiento, longitud/calidad de lecturas y límites de la base utilizada. En tercer lugar, y como parte del proceso real de investigación, existió un contratiempo metodológico relevante al intentar inicialmente un enfoque orientado a ASV (DADA2), que es robusto para amplicones y ciertos tipos de datos, pero que mostró incompatibilidades conceptuales y técnicas con lecturas largas de Oxford Nanopore; este punto no invalida el trabajo, pero sí debe registrarse como una etapa exploratoria que llevó a redefinir el conducto hacia una estrategia más consistente con la

naturaleza del dato, basada en clasificación taxonómica con Kraken2/MiniKraken, priorizando coherencia metodológica y reproducibilidad. Finalmente, en el objetivo de vinculación con el medio, no fue posible realizar entrevistas, reuniones presenciales ni procesos participativos con actores clave o comunidad local, por lo que el material elaborado se sustentó en revisión bibliográfica y fuentes públicas disponibles en línea; esta restricción limita el componente de co-construcción y validación social de los contenidos, pero deja instalada una base documental y un insumo comunicacional inicial que permite orientar futuras aproximaciones participativas de manera más focalizada y con respaldo técnico. En conjunto, estas limitaciones delimitan el alcance inferencial del estudio, pero también señalan con claridad las rutas de profundización necesarias para robustecer la comprensión del sistema en investigaciones posteriores.

En síntesis, esta investigación aporta una lectura integrada y metodológicamente defendible de la dinámica del metano disuelto en la Laguna Tres Pascualas, sugiriendo que el CH₄ se encuentra estrechamente acoplado a controles fisicoquímicos dominantes —principalmente temperatura y señal redox— y que su interpretación se enriquece cuando se incorpora evidencia biológica sobre la estructura microbiana a través de eDNA, siempre manteniendo una frontera clara entre composición taxonómica e inferencia funcional. A nivel metodológico, el trabajo se fortalece al transparentar el proceso real de construcción del conducto bioinformático, incluyendo el contratiempo inicial y la decisión posterior de adoptar una estrategia más coherente con datos ONT mediante Kraken2, lo que aporta trazabilidad, reproducibilidad y coherencia técnica (Xia, 2023; Rojas-Villalta et al., 2024). Desde el punto de vista aplicado, el presente estudio entrega una base concreta para orientar monitoreo y gestión en un ecosistema urbano eutrofizado, sugiriendo que la mitigación del metano debe pensarse desde el control de nutrientes y materia orgánica y desde la estabilización de condiciones de oxigenación y redox, más que como una intervención aislada sobre el gas. Con todo, los resultados deben leerse como una aproximación

robusta pero acotada por limitaciones de tamaño muestral, variables faltantes y restricciones operativas, lo que abre posibilidades lógicas para generar trabajos futuros mucho más robustos y completos, a través de: ampliar muestreo temporal/estacional, incorporar marcadores funcionales y fortalecer el componente participativo con actores locales, de manera que el conocimiento generado aquí se transforme en decisiones ambientales más precisas y socialmente vinculadas. (Segers, 1998; Bastviken et al., 2004; Conrad, 2009; Grossart et al., 2002; Wang et al., 2024).

6. Referencias bibliográficas

- Aizaki, M. (1981). Application of modified Carlson's trophic state index to Japanese lakes and its relationships to other parameters related to trophic state (in Japanese with English summary). Res. Rep. Nat. Inst. Environ. Stud., 23, 13-31
- Almanza, V., Parra, O., Beltran, J., Becerra, J. & Urrutia, R. (2013). Ocurrencia y monitoreo de floraciones de algas verde azules (Cyanobacteria) en ecosistemas de aguas continentales de Chile. Reunión Latinoamericana sobre Algas Nocivas. Florianopolis, Brasil.
- Almanza-Marroquín, Viviana, Figueroa, Ricardo, Parra, Oscar, Fernández, Ximena, Baeza, Carolina, Yañez, Jesús, & Urrutia, Roberto. (2016). Bases limnológicas para la gestión de los lagos urbanos de Concepción, Chile. Latin american journal of aquatic research, 44(2), 313-326. <https://dx.doi.org/10.3856/vol44-issue2-fulltext-12>
- Bastviken, D., Cole, J. J., Pace, M. L., & Tranvik, L. J. (2004). Methane emissions from lakes: Dependence of lake characteristics, two regional assessments, and a global estimate. *Global Biogeochemical Cycles*, 18, GB4009. <https://doi.org/10.1029/2004GB002238>
- Bastviken, D., Cole, J. J., Pace, M. L., & Van De Bogert, M. C.. (2008). Fates of methane from different lake habitats: Connecting whole-lake budgets and CH₄emissions. *Journal of Geophysical Research: Space Physics*, 113(G2), n/a–n/a. <https://doi.org/10.1029/2007jg000608>
- Britannica, T. Editors of Encyclopaedia (2023, May 5). methane. Encyclopedia Britannica. <https://www.britannica.com/science/methane>
- Bodmer et al., 2020., Spatial and temporal variability of methane emissions from cascading reservoirs in the Upper Mekong River.

- Callahan, B. J., McMurdie, P. J., Rosen, M. J., Han, A. W., Johnson, A. J. A., & Holmes, S. P. (2016). DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature Methods*, 13(7), 581–583. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3869>
- Campos, V., S. Lisperguer, J. Weckesser, A. Vera & D. Muñoz. 2005. Cyanobacteria and potential risks of toxicity in continental waters of Chile. *Bol. Micol.*, 20: 73-81.
- Conrad, R. (2009), The global methane cycle: recent advances in understanding the microbial processes involved. *Environmental Microbiology Reports*, 1: 285-292. <https://doi.org/10.1111/j.1758-2229.2009.00038.x>
- Carlson, R. E. (1977). A trophic state index for lakes. *Limnol. Oceanogr.* 22: 361369.
- Conley, D. J., Paerl, H. W., Howarth, R. W., Boesch, D. F., Seitzinger, S. P., Havens, K. E., ... & Likens, G. E. (2009). Controlling eutrophication: nitrogen and phosphorus. *Science*, 323(5917), 1014-1015.
- Cadieux et al., 2022. Exploring methane cycling in an arctic lake in Kangerlussuaq Greenland using stable isotopes and 16S rRNA gene sequencing
- Cerbin et al., (2022). Methane-derived carbon as a driver for cyanobacterial growth. *Frontiers in microbiology*, doi: 10.3389/fmicb.2022.837198.
- Chaves, M., Hashish, A., Goraichuk, I. V., Casserta, L. C., Mears, M. C., Gadu, E., Bakre, A., Morris, E. R. A., Shelkamy, M. M. S., Nadendla, S., Perez, D. R., & El-Gazzar, M. (2025). Nanopore sequencing in veterinary medicine: From concepts to clinical applications. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 15, 1701570. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2025.1701570>
- Chen, J., & Xu, F. (2023). Application of nanopore sequencing in the diagnosis and treatment of pulmonary infections. *Molecular Diagnosis & Therapy*, 27(6), 685–701. <https://doi.org/10.1007/s40291-023-00669-8>

- Ciuffreda, L., Rodríguez-Pérez, H., & Flores, C. (2021). Nanopore sequencing and its application to the study of microbial communities. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 19, 1497–1511. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2021.02.020>
- Clausen, P. T. L. C., Hallgren, M. B., Overballe-Petersen, S., Marcelino, V. R., Hasman, H., & Aarestrup, F. M. (2025). Assembly-free typing of Nanopore and Illumina data through proximity scoring with KMA. *NAR Genomics and Bioinformatics*, 7(3), Article lqaf116. <https://doi.org/10.1093/nargab/lqaf116>
- COTOVICZ JUNIOR, L. C. Aplicações de modelos (ASSETS e TRIX) para avaliação do estado trófico e cenário futuro da eutrofização do Complexo Estuarino-Lagunar Mundaú-Manguaba, (AL). Dissertation (Master in Environmental Geochemistry) - Niterói: UFF. 2012.
- Conrad, R. (2009). The global methane cycle: Recent advances in understanding the microbial processes involved. *Environmental Microbiology Reports*, 1(5), 285–292. <https://doi.org/10.1111/j.1758-2229.2009.00038.x>
- Cuartero, J., Querejeta, J. I., Prieto, I., Frey, B., & Alguacil, M. M. (2024). [Warming and rainfall reduction alter soil microbial diversity and co-occurrence networks and enhance pathogenic fungi in drylands]. *Science of the Total Environment*. Advance online publication. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2024.175006>
- David W. Deamer and Daniel Branton. *Accounts of Chemical Research* 2002 35 (10), 817-825. DOI: 10.1021/ar000138m
- De Coster, W., D'Hert, S., Schultz, D. T., Cruts, M., & Van Broeckhoven, C. (2018). NanoPack: Visualizing and processing long-read sequencing data. *Bioinformatics*, 34(15), 2666–2669. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty149>

- Deemer, B. R., Harrison, J. A., Li, S., Beaulieu, J. J., DelSontro, T., Barros, N., Bezerra-Neto, J. F., Powers, S. M., dos Santos, M. A., & Vonk, J. A. (2016). Greenhouse Gas Emissions from Reservoir Water Surfaces: A New Global Synthesis. *BioScience*, 66(11), 949–964. <https://doi.org/10.1093/biosci/biw117>
- Doherty, R. M., Orbe, C., Zeng, G., Plummer, D. A., Prather, M. J., Wild, O., Lin, M., Shindell, D. T., & Mackenzie, I. A.. (2017). Multi-model impacts of climate change on pollution transport from global emission source regions. *Atmospheric Chemistry and Physics*, 17(23), 14219–14237. <https://doi.org/10.5194/acp-17-14219-2017>
- Evans, N. T., Olds, B. P., Renshaw, M. A., Turner, C. R., Li, Y., Jerde, C. L., Mahon, A. R., Pfrender, M. E., Lamberti, G. A., & Lodge, D. M.. (2016). Quantification of mesocosm fish and amphibian species diversity via environmental DNA metabarcoding. *Molecular Ecology Resources*, 16(1), 29–41. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12433>
- FONIS. (2015). Identificación, monitoreo y evaluación del riesgo de la población del gran concepción ante la presencia de cianobacterias y cianotoxinas. Informe final proyecto FONIS CONICYT SA 13I20211.
- Giuditta Bonetti, Stacey M. Trevathan-Tackett, Paul E. Carnell, Sarah Treby, Peter I. Macreadie, Local vegetation and hydroperiod influence spatial and temporal patterns of carbon and microbe response to wetland rehabilitation, *Applied Soil Ecology*, Volume 163, 2021, 103917, ISSN 0929-1393, <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2021.103917>.
- Kielak, A. M., Cipriano, M. A. P., & Kuramae, E. E. (2016). Acidobacteria strains from subdivision 1 act as plant growth-promoting bacteria. *Archives of Microbiology*, 198(10), 987–993. <https://doi.org/10.1007/s00203-016-1260-2>
- Lauber, C. L., Hamady, M., Knight, R., & Fierer, N. (2009). Pyrosequencing-based assessment of soil pH as a predictor of soil bacterial community

structure at the continental scale. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(15), 5111–5120. <https://doi.org/10.1128/AEM.00335-09>

- Lee, W., Kim, M.-H., Park, J., Kim, Y. J., Kim, E., Heo, E. J., Kim, S. H., Kim, G., Shin, H., Kim, S. H., & Kim, H.-Y. (2023). Seasonal changes in the microbial communities on lettuce (*Lactuca sativa* L.) in Chungcheong-do, South Korea. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 33(2), 219–227. <https://doi.org/10.4014/jmb.2210.10001>
- McMurdie, P. J., & Holmes, S. (2013). phyloseq: An R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. *PLOS ONE*, 8(4), e61217. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061217>
- McNaughton, A. L., Roberts, H. E., Bonsall, D., de Cesare, M., Mokaya, J., Lumley, S. F., Golubchik, T., Piazza, P., Martin, J. B., de Lara, C., Brown, A., Ansari, M. A., Bowden, R., Barnes, E., & Matthews, P. C. (2019). Illumina and Nanopore methods for whole genome sequencing of hepatitis B virus (HBV). *Scientific Reports*, 9(1), 7081. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-43524-9>
- Mohammadi, S. S., Pol, A., van Alen, T. A., Jetten, M. S. M., & Op den Camp, H. J. M. (2017). Ecophysiology of metabolically versatile acidophilic methanotrophs of the Verrucomicrobia. *Frontiers in Microbiology*, 8, 1902. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01902>
- Moreno-Mesonero, L., Soler, L., Jimenez-Belenguer, A., Castillo, M. Á., Zornoza, A., García-Ferrús, M., García-Hernández, J., & Moreno, Y. (2025). Characterization of microbial communities and antibiotic resistance in the water–soil–vegetable interface of a small-scale organic field. *Scientia Horticulturae*, 345, 114147. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2025.114147>

- Newton, R. J., Jones, S. E., Eiler, A., McMahon, K. D., & Bertilsson, S. (2011). A guide to the natural history of freshwater lake bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 75(1), 14–49. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00028-10>
- Novoa, M., M.E. Luque, D. Lombardo & A. Martínez. 2006. Estudio ficológico de lagos urbanos artificiales del sur de la provincia de Córdoba. *Bol. Soc. Argent. Bot.*, 41(3-4): 203-231.
- OCDE, 1982. Eutrophisation des eaux. Méthodes de surveillance, d'évaluation et de lutte. Paris. 164 pp.
- Ohta, A., Nishi, K., Hirota, K., & Matsuo, Y. (2023). Using nanopore sequencing to identify fungi from clinical samples with high phylogenetic resolution. *Scientific Reports*, 13(1), 9785. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-37016-0>
- Padilla-García, C. Y., Camacho-Sánchez, F. Y., & Reyes-López, M. Á.. (2021). Metabarcoding de DNA ambiental: un enfoque para el seguimiento de la biodiversidad. *Cienciauat*, 136–149. <https://doi.org/10.29059/cienciauat.v16i1.1509>
- Parra, O., D. Avilés, J. Becerra, V. Dellarossa & R. Montoya. 1986. Primer registro de floración de algas verde-azules en Chile: Informe preliminar. *Gayana Bot.*, 43(1-4): 15-17.
- Pieja, A. J., Rostkowski, K. H., & Criddle, C. S. (2011). Distribution and selection of poly-3-hydroxybutyrate production capacity in methanotrophic Proteobacteria. *Microbial Ecology*, 62(3), 564–573. <https://doi.org/10.1007/s00248-011-9873-0>
- Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P., Peplies, J., & Glöckner, F. O. (2013). The SILVA ribosomal RNA gene database project: Improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Research*, 41(Database issue), D590–D596. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1219>

- Ramos-Tapia, I., Salinas, P., Núñez, R., Cortez, D., Soto, J., & Paneque, M. (2023). Compositional changes in sediment microbiota are associated with seasonal variation of the water column in high-altitude hyperarid Andean lake systems. *Microbiology Spectrum*, 11(3), e05200-22. <https://doi.org/10.1128/spectrum.05200-22>
- Rosentreter, J. A., Borges, A. V., Deemer, B. R., et al. (2021). Half of global methane emissions come from highly variable aquatic ecosystem sources. *Nature Geoscience*, 14, 225–230. <https://doi.org/10.1038/s41561-021-00715-2>
- Rojas-Villalta, D., Benavides-Villegas, D., Angulo-Hidalgo, B., Muñoz-Solórzano, L., & Consumi-Tubito, C. (2024). Caracterización de las tecnologías de secuenciación genética de segunda y tercera generación. *Revista Tecnología en Marcha*, 37(2), 70–81. <https://doi.org/10.18845/tm.v37i2.6494>
- Sales, N. G., McKenzie, M. B., Drake, J., Harper, L. R., Browett, S. S., Coscia, I., Wangenstein, O. S., Baillie, C., Bryce, E., Dawson, D. A., Ochu, E., Hänfling, B., Lawson Handley, L., Mariani, S., Lambin, X., Sutherland, C., & Mcdevitt, A. D.. (2020). Fishing for mammals: Landscape-level monitoring of terrestrial and semi-aquatic communities using eDNA from riverine systems. *Journal of Applied Ecology*, 57(4), 707–716. <https://doi.org/10.1111/1365-2664.13592>
- Sawakuchi, H. O., Bastviken, D., Sawakuchi, A. O., Ward, N. D., Borges, C. D., Tsai, S. M., Richey, J. E., Ballester, M. V. R., & Krusche, A. V.. (2016). Oxidative mitigation of aquatic methane emissions in large Amazonian rivers. *Global Change Biology*, 22(3), 1075–1085. <https://doi.org/10.1111/gcb.13169>
- Sanders, I. A., Heppell, C. M., Cotton, J. A., Wharton, G., Hildrew, A. G., Flowers, E. J., & Trimmer, M.. (2007). Emission of methane from chalk streams has potential implications

for agricultural practices. *Freshwater Biology*, 52(6), 1176–1186.

<https://doi.org/10.1111/j.1365-2427.2007.01745.x>

- Santos, Everson de Oliveira e Medeiros, Paulo Ricardo Petter. A Ação Antrópica e o Processo de Eutrofização no Rio Paraíba do Meio. *Sociedade & Natureza*. 2023, v. 35 e66441.. <https://doi.org/10.14393/SN-v35-2023-66441>.
- Segers, R. (1998). Methane production and methane consumption: A review of processes underlying wetland methane fluxes. *Biogeochemistry*, 41(1), 23–51. <https://doi.org/10.1023/A:1005929032764>
- Soler, L., Moreno-Mesonero, L., Jimenez-Belenguer, A., Castillo, M. Á., Zornoza, A., García-Ferrús, M., García-Hernández, J., & Moreno, Y. (2025). Characterization of microbial communities and antibiotic resistance in the water–soil–vegetable interface of a small-scale organic field. *Scientia Horticulturae*, 345, 114147. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2025.114147>
- Sun, G., McNulty, S.G., Moore Myers, J.A. & Cohen, E.C. (2008). Impacts of climate change, population growth, land use change, and groundwater availability on water supply and demand across the conterminous U.S. *Watershed Update*. 6(2): 1-30.
- Taniya Roy Chowdhury, Richard P. Dick. Ecology of aerobic methanotrophs in controlling methane fluxes from wetlands, *Applied Soil Ecology*, Volume 65, 2013, Pages 8-22, ISSN 0929-1393, <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2012.12.014>.
- Thauer, R. K. (1998). Biochemistry of methanogenesis: A tribute to Marjory Stephenson. *Microbiology*, 144(9), 2377–2406. <https://doi.org/10.1099/00221287-144-9-2377>
- Thauer, R. K., Kaster, A. K., Seedorf, H., Buckel, W., & Hedderich, R. (2008). Methanogenic archaea: Ecologically relevant differences in energy conservation. *Nature Reviews Microbiology*, 6(8), 579–591. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1931>

- Torres, R., Gutierrez, F., Contreras, F. 2002. Calentamiento atmosférico: La importancia de la metanogénesis y los humedales. *ContactoS* N°43: 19-31.
- Op den Camp, H. J. M., Mohammadi, S. S., Pol, A., & Dunfield, P. F. (2018). Verrucomicrobial methanotrophs. En M. G. Kalyuzhnaya & X.-H. Xing (Eds.), *Methane biocatalysis: Paving the way to sustainability* (pp. 43–55). Springer.
https://doi.org/10.1007/978-3-319-74866-5_3
- Urycki, D. R., Good, S. P., Crump, B. C., Chadwick, J., & Jones, G. D.. (2020). River Microbiome Composition Reflects Macroscale Climatic and Geomorphic Differences in Headwater Streams. *Frontiers in Water*, 2. <https://doi.org/10.3389/frwa.2020.574728>
- Valdovinos, C. (2006). Humedales dulceacuícolas y biodiversidad. en: Atlas social y ambiental del área metropolitana de Concepción. Región del Biobío, Chile. Universidad de Concepción (Eds). Concepción, Chile. 104-124 pp.
- Verma, S.R., Chaudhari, P.R., Singh, R.K. & Wate, S.R. (2011). Studies on the ecology and trophic status of an urban lake at Nagpur city, India. *Rasayan J. Chem.* 4(3): 652-659.
- Wang, X., Ganzert, L., Bartholomäus, A., Amen, R., Yang, S., Merino Guzmán, C., Matus, F., Albornoz, M. F., Aburto, F., Oses-Pedraza, R., Friedl, T., & Wagner, D. (2024). The effects of climate and soil depth on living and dead bacterial communities along a longitudinal gradient in Chile. *Science of the Total Environment*, 945, 173846.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2024.173846>
- Wetzel, R.G. 2001. *Limnology: lake and river ecosystems*. Academic Press, San Diego, 1006 pp.
- Wooley, J. C., Godzik, A., & Friedberg, I. (2010). A primer on metagenomics. *PLOS Computational Biology*, 6(2), e1000667. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1000667>

- Wood, D. E., Lu, J., & Langmead, B. (2019). Improved metagenomic analysis with Kraken 2. *Genome Biology*, 20, 257. <https://doi.org/10.1186/s13059-019-1891-0>
- Xia, Y., Li, X., Wu, Z., Nie, C., Cheng, Z., Sun, Y., Liu, L., & Zhang, T. (2023). Strategies and tools in illumina and nanopore-integrated metagenomic analysis of microbiome data. *iMeta*, 2(1), e72. <https://doi.org/10.1002/imt2.72>
- Xi-Jun Xu, Wan-Qiong Wang, Chuan Chen, Peng Xie, Wen-Zong Liu, Xu Zhou, Xue-Ting Wang, Ye Yuan, Ai-Jie Wang, Duu-Jong Lee, Yi-Xing Yuan, Nan-Qi Ren, Bioelectrochemical system for the enhancement of methane production by anaerobic digestion of alkaline pretreated sludge, *Bioresource Technology*, Volume 304, 2020, 123000, ISSN 0960-8524, <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123000>.
- XU, Y., G. WANG, W. YANG & R. LI. 2010. Dynamics of the water bloom-forming *Microcystis* and its relationship with physicochemical factors in Lake Xuanwu (China). *Environmental Science and Pollution Research* 17: 1581-1590.
- Yuan, D., Li, S., Xu, Y. J., Ma, S., Zhang, K., Le, J., Wang, Y., Ma, B., Jiang, P., Zhang, L., & Xu, J. (2024). Response of dissolved carbon dioxide and methane concentration to warming in shallow lakes. *Water Research*, 251, 121116. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2024.121116>
- Oxford Nanopore Technologies. (2025). *Secuenciación de ADN por ligación V14 (SQK-LSK114)* (GDE_9161_v114_revAC_24Sep2025). Oxford Nanopore Technologies. (Manual/protocolo técnico; versión en español).