



## **Universidad Austral de Chile**

Facultad de Ciencias  
Escuela de Ciencias

**PROFESOR PATROCINANTE:**  
**Dr. Eduardo Valenzuela**  
**Instituto de Microbiología**  
**Facultad de Ciencias**

### **CALIDAD BACTERIANA DEL AGUA DEL RÍO LLOLLEHUE DE LA X REGIÓN DE CHILE**

**Tesis de Grado presentada como parte  
de los requisitos para optar al Grado  
de Licenciado en ciencias Biológicas**

SANDRA BEATRIZ VON JOHNN NAVARRO

VALDIVIA – CHILE

2006

*Esta tesis la dedico a mis padres Harry y Maritza, por su apoyo incondicional y por creer en mí. A mis hermanos Verónica y Harry por su paciencia y apoyo. Y a mis amigos que fueron un pilar importante en mis años de estudio.*

## AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer al proyecto FONDECYT 1040913, al doctor Eduardo Valenzuela por darme la oportunidad de realizar esta tesis, por su entrega desinteresada de conocimientos y comprensión.

Agradezco a los profesores Angara Zambrano y Roberto Godoy, por ser parte de mi comisión, a la doctora Gladis Ruiz directora de la Escuela de Ciencias por su apoyo incondicional.

Agradezco a mis compañeros de laboratorio y amigos. Francisco, Natalia , Loreto y Catherine, por su amistad y apoyo. Al personal del instituto de microbiología de la Universidad Austral por su colaboración y un agradecimiento especial a don Nelson por su apoyo y por entregarme tantos concejos valiosos.

Agradezco a mi amigo Luis Felipe por su amistad y apoyo incondicional, su ayuda fue muy valiosa en el desarrollo de esta tesis.

Y por último y en forma especial agradezco a mi pololo Fernando por su apoyo y preocupación en el termino de mi tesis. Y por supuesto a toda mi familia.

## INDICE

### Índice de Contenidos

1. RESUMEN.....	8
2. INTRODUCCIÓN.....	9
3. MATERIAL Y METODOS .....	16
3.1. MATERIAL .....	16
3.1.1. Material biológico .....	16
3.1.2. Reactivos utilizados.....	16
3.1.3. Equipo de laboratorio .....	17
3.1.4. Otros .....	17
3.2. METODOS.....	17
3.2.1. Lugar de estudio .....	17
3.2.2. Recolección de muestras de agua.....	18
3.2.3. Determinación de la calidad bacteriológica de muestras de agua del río Llollehue	20
3.2.4. Determinación de poblaciones bacterianas relacionadas con los ciclos	24
biogeoquímicos del nitrógeno y fósforo.....	24
3.2.5. Caracterización morfológica y tintoriales de cepas bacterianas y pesquisa de	27
bacterias resistentes a antibióticos.....	27
3.2.6. Determinación de parámetros químicos .....	28
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	31
4.1. Calidad bacteriológica de muestras de agua del río Llollehue.....	31
4.1.1. Caracterización morfológica y tintoriales de cepas bacterianas.....	33
4.2. Coliformes Totales .....	35

4.3. Determinación de poblaciones bacterianas relacionadas con el ciclo biogeoquímicos del nitrógeno.....	38
4.4. Solubilización de fósforo inorgánico insoluble por cepas bacterianas.....	42
4.5. Cepas bacterianas resistentes a antibiótico.....	44
4.6. Parámetros Químicos y Físicos de Muestras de agua .....	47
4.7. Relación entre parámetros químicos y poblaciones bacterianas del ciclo del nitrógeno.....	51
5. CONCLUSIÓN .....	59
6. BIBLIOGRAFÍA.....	60
7. ANEXO .....	67

## Índice de Tablas

<b>Tabla 1.</b> Morfología, Gram y agrupación de capas organótrofas mesófilas viables del agua del río Llollehue de la Décima región.....	33
<b>Tabla 2.</b> Número de cepas solubilizadoras de $\text{CaHPO}_4$ y $\text{FePO}_4$ en muestras de agua del río Llollehue de la Décima región.....	42
<b>Tabla 3.</b> Cepas bacterianas resistentes a los antibióticos Penicilina y Estreptomicina en muestras de agua del río Llollehue de la Décima región.....	45
<b>Tabla 4.</b> pH y temperatura de muestras de agua del río Llollehue de la Décima región de acuerdo a la época del año.....	49
<b>Tabla 5.</b> Concentraciones de $\text{NH}_4$ , $\text{NO}_3$ , $\text{NO}_2$ y N-Orgánico en cuerpos de agua dulces y según normas chilenas.....	55

<b>Tabla 6.</b> Poblaciones bacterianas relacionadas con el ciclo del nitrógeno en muestras de agua del río Llollehue de la Décima región.....	57
<b>Tabla 7.</b> Determinación de poblaciones bacterianas organótrofas mesófilas viables y coliformes totales en muestras de agua del río Llollehue de la Décima región.....	67
<b>Tabla 8.</b> Determinación de poblaciones bacterianas relacionadas con el ciclo del Nitrógeno en muestras de agua del río Llollehue de la Décima región.....	68
<b>Tabla 9.</b> Determinación de parámetros químicos del muestreo de otoño en muestras de agua del río Llollehue de la Décima región.....	69
<b>Tabla 10.</b> Determinación de parámetros químicos del muestreo de invierno en muestras de agua del río Llollehue de la Décima región.....	69
<b>Tabla 11.</b> Determinación de parámetros químicos del muestreo de primavera en muestras de agua del río Llollehue de la Décima región.....	69
<b>Tabla 12.</b> Determinación de parámetros químicos del muestreo de verano en muestras de agua del río Llollehue de la Décima región.....	70

## Índice de Figuras

<b>Figura 1.</b> Estaciones de muestreo río Llollehue.....	19
<b>Figura 2.</b> Coliformes fecales.....	22
<b>Figura 3.</b> Batería bioquímica IMViC.....	23
<b>Figura 4.</b> Prueba de solubilización de fósforo.....	26
<b>Figura 5.</b> Poblaciones bacterianas organótrofas mesófilas viables en muestras de agua del río Llollehue de la Décima región.....	31

<b>Figura 6.</b> Bacterias coliformes totales. Número más probable (NMP) de bacterias/100 mL de agua en muestras de agua del río Llollehue de la Décima región.....	35
<b>Figura 7A.</b> Poblaciones bacterianas relacionadas con el ciclo de Nitrogeno en otoño en muestras de agua del río Llollehue del la Décima región.....	41
<b>Figura 7B.</b> Poblaciones bacterianas relacionadas con el ciclo de Nitrogeno en invierno en muestras de agua del río Llollehue del la Décima región.....	41
<b>Figura 7C.</b> Poblaciones bacterianas relacionadas con el ciclo de Nitrogeno en primavera en muestras de agua del río Llollehue del la Décima región.....	41
<b>Figura 7D.</b> Poblaciones bacterianas relacionadas con el ciclo de Nitrogeno en verano en muestras de agua del río Llollehue del la Décima región.....	41
<b>Figura 8.</b> Valores fósforo total, nitritos, nitratos y amonio determinados en muestras de agua del río Llollehue de la Décima región.....	47
<b>Figura 9.</b> Relación entre poblaciones bacterianas amonificantes/mL de agua y concentración de nitratos total (mg/L) en muestras de agua del río Llollehue.....	53
<b>Figura 10.</b> Relación entre poblaciones bacterianas desnitrificantes/mL de agua y concentración de nitratos total (mg/L) en muestras de agua del río Llollehue.....	53
<b>Figura 11.</b> Relación entre poblaciones bacterianas nitrificantes/mL de agua y concentración de amonio total (mg/L) en muestras de agua del río Llollehue.....	53
<b>Figura 12.</b> Relación entre poblaciones bacterianas proteolíticas/mL de agua y concentración de amonio total (mg/L) en muestras de agua del río Llollehue.....	53

## 1. RESUMEN

El incremento de las actividades agropecuarias, forestales e industriales que tiene la Décima región repercute en el aumento del uso de los recursos naturales y por ende en la calidad del agua de sus cuerpos de agua dulce. En el presente estudio se determinó, en cuatro épocas de muestreos del agua del río Llollehue, la presencia de bacterias: organótrofas mesófilas viables, coliformes totales y fecales, relacionadas con el ciclo del Nitrogeno, solubilizadoras de fósforo inorgánico insoluble y resistente a antibióticos. Además las concentraciones de fósforo, nitratos, nitritos y amonio del agua de este cuerpo de agua.

En el presente estudio se determinó que el agua del río Llollehue, en lugares de muestreo distribuidos a lo largo del curso del río presentan un elevado número de bacterias organótrofas mesófilas viables (índices sobre 130 bacterias/mL), coliformes totales (índices sobre 350 de bacterias/100 mL de agua), amonificantes (250.000 bacterias/mL en invierno, primavera y verano), desnitrificantes (250.000 bacterias/mL en otoño) y proteolíticas (250.000 bacterias/mL en otoño, invierno y primavera), una alta concentración de fósforo (161.25 ug/L en otoño),  $\text{NH}_4^+$  (304.25 ug/L en otoño) y  $\text{NO}_3^-$  (178.54 ug/L en invierno). Estas altas poblaciones bacterianas indicarían una contaminación que se traduce en algunos sectores del río Llollehue en eutricación, que se podría deber a la contaminación del sector agropecuario, descargas constantes de las aguas domiciliarias sin tratamientos, desechos forestales e industriales y líquidos que percolan desde vertederos, lo que hace que el agua este río desde el punto de vista microbiológico no sean apta para el consumo humano y puede causar daños a la salud humana de la población aledaña al río.



## 2. INTRODUCCIÓN

Las distintas actividades productivas que realiza el ser humano en mayor o menor medida tienen repercusión en los ecosistemas naturales, denominadas actualmente “efectos ambientales” (Magadza, 2003). Al respecto, cabe hacer notar que en la última década del siglo pasado el crecimiento (urbano y económico) que ha tenido la X Región de Chile ha repercutido en el aumento del uso de los recursos naturales y por otra parte, en la calidad del agua de algunos cuerpos de agua dulce, las cuales constantemente son contaminadas con desechos domiciliarios y de las actividades agrícolas, forestales e industriales (Leiva, 1996).

En la X Región de Chile se encuentra el río Llollehue que nace a partir de varios esteros, los más importantes, en cuanto a su caudal son estero Amancay, estero Dollinco y estero Pichi. Su cause se extiende de E a O entre los paralelos 40° y 40.5° S aproximadamente (Instituto Geográfico Militar, 1985). Se desplaza por entre los campos de la Depresión Intermedia y es aquí donde recibe el nombre Llollehue, al pasar por el fundo del mismo nombre, el viaje de sus aguas prosigue hacia el Oeste pasando por la localidad de Rapaco y la ciudad de La Unión, para desembocar a unos pocos kilómetros de ésta ciudad en el río Bueno. En su paso por la ciudad de La Unión recibe dos afluentes, no de gran tamaño, pero sí importantes desde el punto de vista de la contaminación, estos son el estero Sagyue y el río Radimadi. (Sernatur La Unión, 2004). Como se señaló el río Llollehue cruza la ciudad de La Unión, en cuyas riberas se encuentra el Parque Municipal que en época de verano se utiliza como balneario, al mismo tiempo el río Llollehue desemboca en el río Bueno que se utiliza para navegación, regadío y como balneario, finalmente este río desemboca en el mar.

En el contexto de la contaminación y en forma específica a las aguas del río Llollehue van a parar, entre otros, los desechos líquidos que se percolan desde vertederos, aguas domésticas de comunidades o asentamientos humanos que aún no cuentan con alcantarillado, residuos de fertilizantes provenientes de la actividad agrícola-forestal, excretas de la actividad ganadera y los residuos de los mataderos (Gonzalez\*, 2004). En algunas zonas del río Llollehue, orillas del río aledañas a los puentes 21 de Mayo, Amancay y zonas al sur de la ciudad de La Unión, se observa un crecimiento exuberante de los vegetales, talvez por la eutroficación de sus aguas (Garcia-Tello, 1995). Además las aguas del río Llollehue son ocupadas para regadío y en lugares como pequeñas parcelas de pequeños agricultores a lo largo del cause del río para el consumo animal y humano (Gonzalez\*, 2004). El paso del río Llollehue por la ciudad está relacionado con la actividad industrial, destacan las empresas: Molino Carossi, la Cooperativa lechera COLUN, las fábricas de géneros Linos La unión y la planta productora de azúcar IANSA Rapaco ubicada a 7 kilómetros de la ciudad. A la fecha la empresa COLUN posee su propia planta de tratamiento de aguas y se prevee que la ciudad de la Unión tendría a corto plazo su planta de tratamiento de aguas residuales domésticas, pues hasta hoy este tipo de agua es eliminado al río sin ningún tipo de tratamiento. Estudios previos realizados por el servicio Agrícola Ganadero, señalan que la calidad química y microbiológica de las aguas del río Llollehue superan las normas establecidas (Servicio Agrícola Ganadero, 2004), determinándose que químicamente se encuentran algunos elementos como fósforo en una concentración de 120 ug/L, nitritos 15.0 ug/L y nitratos 1.760 ug/L (Quiroz, 2004).

()\*: Quiroz, E. (2004) comunicación personal. Profesor Universidad Austral de Chile.

()\*: González, L. (2004) conversación personal. Médico Veterinario Jefe servicio de salud de La Unión

Estudios realizados al río Trancura que desemboca en el lago Villarica, y desde el punto de vista microbiológico presentan un título de coliformes fecales de 180 – 3330 ufc/100mL de agua (Brow & Zimmermann, 2000).

Por otra parte, las bacterias tienen gran importancia en los procesos de eutrofización, ciclos Biogeoquímicos y en el tratamiento de las aguas contaminadas. En los cuerpos de aguas se encuentran bacterias propias de este hábitat y también bacterias terrestres, pues entre las bacterias de las aguas continentales y las del suelo existen ciertas conexiones si se trata de aguas corrientes, por estar relacionadas con la contaminación proveniente del suelo (Rheinheimer, 1987. Garay, 2003).

Las poblaciones bacterianas organótrofas y algunas quimiolitótrofas que habitan los ríos son las responsables de degradar, transformar o mineralizar los constituyentes orgánicos de los vegetales y animales muertos que se depositan en los cursos de agua, restituyendo componentes como N, P, C a los ciclos biogeoquímicos respectivos, también son las responsables de transformar o mineralizar los constituyentes orgánicos de los residuos contaminantes cuando estos sobrepasan un volumen crítico (García-Tello, 1985; Droop & Jannasch, 1977). De hecho, la contaminación que recibe un río puede afectar la composición de sus aguas (Tada et al, 2001), y puede quedar tan enriquecida en nutrientes que tenga lugar una alta producción primaria (Schlegel, 1997. Horner-Devire et al, 2003).

Las bacterias tienen gran importancia en los ciclos de la materia. Así, en el ciclo del Nitrógeno las Cianobacterias son las encargadas de fijar el  $N_2$  (g) a través de su metabolismo,

transformándolo en aminoácidos (Schlegel, 1997). El ciclo del nitrógeno involucra también los procesos de nitrificación, desnitrificación, amonización, proteólisis y fijación de nitrógeno ( $N_2$  (g)) en forma libre o simbiótica. La nitrificación es una transformación microbiológica donde el amonio es oxidado a nitrato ( $NH_4^+ - NO_3$ ) este proceso lo llevan a cabo bacterias como Nitrosomonas y Nitrobacter. La amonificación corresponde a la reducción del  $NO_3$  a  $NH_4^+$ , puede ser desasimilatoria o asimilatoria y es llevada a cabo por bacterias anaerobias facultativas. La desnitrificación la llevan a cabo bacterias anaerobias facultativas, que utilizan como aceptor de  $H_2$  el  $NO_3$  reduciéndolo a  $N_{2(g)}$  que retorna a la atmósfera, durante este proceso se producen reacciones que generan productos intermediarios como el óxido nítrico (NO) y óxido nitroso ( $N_2O$ ) que tienen importancia ecológica, pues el  $N_2O$  destruye el ozono ( $O_3$ ) y contribuye con el efecto invernadero (Droop & Jannasch, 1977. Firth & Edwards, 2000). Por último, la proteólisis corresponde a un proceso de mineralización del nitrógeno que forma parte de los aminoácidos, péptido y proteínas este proceso culmina con la producción de  $NH_3$  (Madigan et al, 1998).

Los residuos contaminantes que ingresan a los cuerpos de agua continentales aportan una gran cantidad de Fósforo y Nitrógeno que inducen a un excesivo crecimiento de los vegetales que viven en estos hábitat (Heard & Winterton, 2000. Kleeberg et al, 2000), siendo estos elementos de gran importancia en el estado trófico del agua (Kleeberg et al, 2001. Johnson & Chase, 2004), este proceso trae como consecuencia una disminución de la concentración del oxígeno en el agua, debido a que los vegetales utilizan casi por completo el oxígeno, esto a su vez provoca una eutroficación de las aguas. La eutroficación se define como el proceso por el cual una masa de agua pasa de una condición oligotrófica a eutrófica (Harper, 1992), es un proceso de desequilibrio o alteración significativa de los ecosistemas naturales, provocado por la

introducción de elementos en concentraciones anormales, lo que configura un caso particular de polución (Ryding & Rast, 1992).

El oxígeno es un factor de particular interés, especialmente en los ríos que reciben mucha materia orgánica procedente de aguas residuales y de la contaminación industrial. Aunque las aguas de un río se mezclan debido al flujo del agua y a las turbulencias, si el aporte de materia es muy elevado se puede producir un déficit de oxígeno (Madigan et al, 1998). Esta falta de oxígeno también influye en el ciclo de Nitrógeno, en especial en los procesos de desnitrificación y nitrificación. En una masa de agua, la disminución de la concentración de oxígeno no es conveniente, pues los animales necesitan oxígeno y en condiciones anóxicas, aunque sea temporal, no pueden sobrevivir, al igual que las bacterias nitrificantes (Barbieri & Simona, 2001). Además, cuando el agua se vuelve anóxica, empiezan a imponerse las poblaciones bacterianas anaeróbicas que realizan una desnitrificación y otras que producen compuestos odoríferos (aminas, H<sub>2</sub>S, mercaptanos y ácidos grasos) (Geshe. et al, 2003. Sugiera et al, 2004), algunos de estos compuestos también son tóxicos para los organismos superiores (Madigan et al, 1998. Schlegel, 1997).

La contaminación de los cuerpos de agua con excremento de origen humano y animal contribuye al agua con las bacterias propias del tracto digestivo, alguna de las cuales pueden ser patógenas para el ser humano. Este grupo de bacterias es denominado coliforme, incluye a las Enterobacterias de los géneros *Klebsiella*, y *Escherichia*, utilizándose la especie *Escherichia coli* como indicador de contaminación fecal (Madigan et al, 1998. Canosa & Pinilla, 1999. Villanova et al, 2002. Bordalo et al, 2002). Es por esto, que uno de los exámenes más importantes para

determinar la calidad bacteriológica del agua, es el examen bacteriológico de agua (APHA. American Public Health Association, 1980), donde se investiga la presencia de un número de gérmenes saprofitos o bacterias procedentes del intestino humano como indicadores de contaminación fecal (Rheinheimer, 1987).

En ambientes acuáticos como el río Yarra ubicado en el sur este de Australia, cuyas aguas se encuentran contaminadas por desechos domiciliarios o líquidos percolados desde vertederos, se ha determinado un incremento de las bacterias sensibles a los antibióticos de uso común (Boon & Cattarach, 1999. Madigan et al, 1998), esto podría deberse a una selección de los mutantes bacterianos y estaría dada por los nutrientes que contienen las aguas contaminadas (San Martín et al, 2002), pues las bacterias resistentes a antibióticos podrían utilizar alguno de estos nutrientes e imponerse al resto de las poblaciones bacterianas que forman parte del cuerpo de agua (Brow & Zimmermann, 2000). En el presente estudio se presume que la contaminación de las aguas del río Llollehue por parte de los líquidos percolados del basural comunal influirían en las poblaciones bacterianas, seleccionando los mutantes naturales resistentes antibióticos. Una forma de comprobar la presencia de cepas bacterianas resistentes a distintos antibióticos es por medio de un antibiograma (Castagneto, 1980. Valenzuela, 2003.). En estudios semejantes realizados en el sur este de Australia (Boon and Cattarach, 1999) determinaron un incremento de las bacterias resistentes a los antibióticos ampicilina, cloranfenicol, kanamicina y estreptomicina en el río Yarra, según este estudio el incremento de la resistencia a antibióticos aparece en áreas donde el consumo de antibióticos por humanos es extenso.

En base a lo expuesto se plantea la siguiente hipótesis de trabajo:

Las aguas del río Llollehue son un reservorio de bacterias entéricas y relacionadas con el proceso de eutricación.

Para dar respuesta a la hipótesis planteada, los siguientes objetivos específicos

- Determinar cuantitativamente las poblaciones bacterianas relacionadas con el ciclo del nitrógeno (amonificantes, desnitrificantes, nitrificantes, proteolíticas) en muestras de agua del río Llollehue.
- Determinar cualitativa-cuantitativamente la calidad bacteriológica de muestras de aguas del río Llollehue.
- Pesquisar la presencia de cepas bacterianas resistentes a tres antibióticos en muestras de aguas del río Llollehue.
- Determinar cualitativamente poblaciones bacterianas solubilizadoras de fósforo en muestras de aguas del río Llollehue.
- Determinar la concentración química del fósforo y nitrógeno total presente en las muestras de aguas, durante las estaciones del año.

### 3. MATERIAL Y METODOS

#### 3.1. MATERIAL

##### 3.1.1. Material biológico

Se utilizaron 400 cepas bacterianas aisladas desde muestras de agua recolectadas en el río Llollehue de la X Región de Chile.

##### 3.1.2. Reactivos utilizados

Los reactivos utilizados en la etapa experimental se presentan en orden alfabético y se señala en paréntesis las abreviaturas usadas en el texto: ácido ascórbico al 7%, ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ), agar-agar, agar citrato Simmons, agar eosina azul de metileno (AEAM), agar Müller-Hinton, agar noble, agar peptona al 1.2 y 2% (AP), alcohol al 70%, alcohol-acetona, antibióticos (penicilina y estreptomicina), azul de bromotimol, caldo asparragina, caldo EC, caldo lactosado, caldo nitrato, carbonato de calcio ( $\text{CaCO}_3$ ), cloruro de sodio (NaCl), extracto de carne, fosfato de Calcio ( $\text{CaHPO}_4$ ), fosfato de fierro ( $\text{FePO}_4$ ), fucsina de Gram, gelatina, glucosa, lactosa, lugol, nitrato de amonio ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ), peptona, reactivo d-fenilamina sulfúrica, reactivo de Barrit, reactivo de Kovac, reactivo de Nessler, reactivo oxidante (constituido por 5g de persulfato de potasio, 3g de ácido bórico, 100 mL de NaOH 0.375 molar), reactivo Rojo metilo, rojo alizarín, safranina al 0.25% , solución color 8.5%, solución de citrato al 25%, solución de fenol 25%, solución de hipoclorito alcalino al 10%, solución  $\text{NO}_2^-$  al 1.2%, solución mixta al 25% (constituida por ácido sulfúrico 200mL, solución heptomolibdato de amonio 45mL y solución



tartrato de potasio y antimonio 5mL ), solución oxidante 10 % solución salina estándar, sulfato de amonio ( $\text{NH}_4\text{SO}_4$ ), violeta de genciana.

### **3.1.3. Equipo de laboratorio**

Autoclave Orsa, balanza analítica Precisa 2200 C, balanza Sartorius 2462, cámara de cultivo Kotterman GMB Type S430, cámara de cultivo Trilab, cámara fría Eurofrigo, espectrofotómetro UV mini 1240 Shimadzu, microscopio óptico Carl Zeiss G/427942, baño María Memmert, microondas LG, refrigerador Trotter.

### **3.1.4. Otros**

Aceite de inmersión, agua destilada estéril, algodón, asa de siembra, botellas de vidrio de 500 mL, campanas Durham, cinta de papel, cocinilla a gas, embudo, filtros, gradillas, lápiz marcador, mechero, microondas, muestra de agua del río Llollehue (total 20 muestras) olla a presión, pipetas volumétricas de 1, 5 y 10 mL, pipetas Pasteur, placas Petri, portaobjetos, probetas de 50, 500 y 2000 mL, tubos de ensayos, vasos precipitados de 100, 250 y 500 mL.

## **3.2. METODOS**

### **3.2.1. Lugar de estudio**

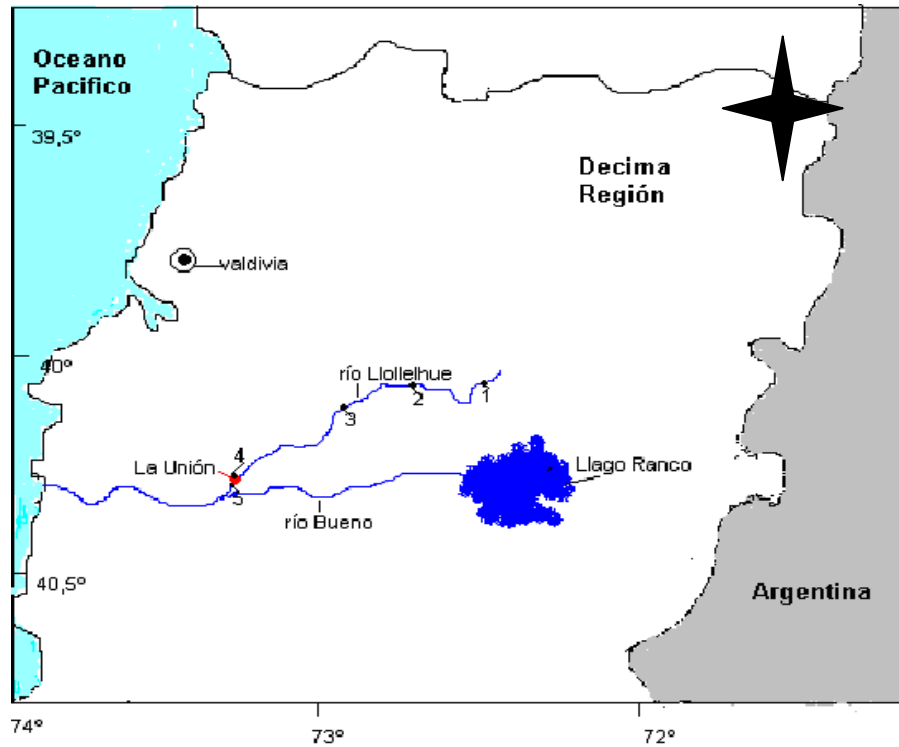
Las muestras de agua utilizadas en el presente estudio fueron recolectadas desde el río Llollehue que se ubica en la X Región de Chile. Es un río de origen pluvial, se extiende a través

de la Depresión Intermedia, entre los Paralelos 40° y 40.5° de latitud S y los meridianos 73.5° y 72.9° de longitud O. El río Llollelhue tiene una superficie de 710 Km<sup>2</sup> y una longitud de 95 Km, posee poca profundidad, lo que no lo hace navegable. Durante el invierno su caudal aumenta a raíz de las lluvias que llegan a los 1871.0 mm<sup>3</sup>, pudiendo dar origen a inundaciones de los terrenos aledaños. En verano disminuye de forma significativa, pero mantienen una constante afluencia de aguas ya que los terrenos aledaños se encuentran saturados de agua.. (Instituto Geográfico Militar, 2004). Las aguas del río presentan una temperatura promedio, en invierno de 7.2 ° C y en verano de 16.24 ° C. El pH de su agua varía entre 6.87 y 7.42 (Quiroz, 2004). En su curso el río Llollelhue atraviesa la ciudad de La Unión y es aquí donde se reúne su afluente con el del río Radimádi, esta unión es la que da origen al nombre de la ciudad. Las riveras del río son lugar de asentamiento de industrias de importancia nacional como: Colún, Iansa, Molino Carossii y Linos La Unión.

### **3.2.2. Recolección de muestras de agua**

Para la recolección de las muestras de agua se realizaron 4 muestreos en el río Llollelhue. Cada muestreo coincidió con el comienzo de las estaciones climáticas del año 2004 (primer muestro Marzo, segundo muestreo Junio, tercer muestreo Septiembre y cuarto muestreo Diciembre). Se seleccionaron de norte a sur cinco estaciones de muestreo a lo largo del curso del río (Fig. 1), la primera estación corresponde al estero Amancay ubicado (40° 87' 35'' S y 72.5° 19' 15'' W), la segunda estación se ubica al sur del puente Dollinco (40.1° 10' 23'' S y 72.8° 3' 31'' W), la tercera se ubica frente a las instalaciones de la empresa IANSA Rapaco (40.2° 57' 62'' S y 73.0° 25' 67'' W), la cuarta estación corresponde al paso del río bajo el puente Arturo Pratt en la ciudad de La unión (40.3° 02' 64'' S y 73.0° 85' 37'' W) y la quinta estación esta ubicada en

la vega del fundo El Laurel ( $40.3^{\circ} 17' 09''$  S y  $73.1^{\circ} 05' 45''$  W). En cada estación, en una botella estéril se recolectó una muestra de agua de 500 mL, las muestras de agua se recolectaron en la riera Oeste del río a 1 metro de la orilla y a 20 cm de profundidad.



**Figura 1.** Estaciones de muestreo en el río Llolelhue: 1) primera estación estero Amancay, 2) segunda estación al sur del puente Dollinco, 3) tercera estación frente a las instalaciones de la empresa IANSA Rapaco, 4) cuarta estación bajo el puente Arturo Pratt en la ciudad de La Unión y 5) quinta estación esta ubicada en la vega del fundo El Laurel.

### **3.2.3. Determinación de la calidad bacteriológica de muestras de agua del río Llollehue**

Mediante ensayos bacteriológicos de rutina se determinaron cuantitativamente las poblaciones bacterianas organótrofas mesófilas viables y las coliformes totales, y en forma cualitativa las coliformes fecales, específicamente *Escherichia coli*, bacteria indicadora de contaminación fecal.

#### **3.2.3.1. Recuento de poblaciones bacterianas organótrofas mesófilas viables**

Para el recuento de las poblaciones bacterianas organótrofas mesófilas viables se utilizó la técnica de recuento en placa, mediante siembra en superficie. Para realizar las diluciones seriadas, cada muestra de agua se trató en forma individual. A partir de la muestra de agua respectiva con una pipeta estéril se extrajo 1 mL de la muestra y se depositó en un tubo de ensayo que contenía 9 mL de agua destilada estéril (obteniéndose una dilución  $10^{-1}$ ), a partir de este tubo previamente homogenizado se extrajo con una nueva pipeta estéril 1 mL de muestra y se depositó en un nuevo tubo que contenía 9 mL de agua destilada estéril (obteniéndose una dilución  $10^{-2}$ ), esta metodología se aplicó hasta obtener una dilución  $10^{-7}$ . Cada una de las diluciones obtenidas se sembró individualmente y por triplicado en placas que contenían AP al 2%. Sembradas las placas se incubaron a  $23 \pm 2^\circ \text{C}$  por 24 horas. El recuento de las poblaciones bacterianas se realizó en las placas que presentaban entre 30 a 300 colonias. La población bacteriana se expresó como el número de unidades formadoras de colonia por volumen de agua (UFC/mL de agua).

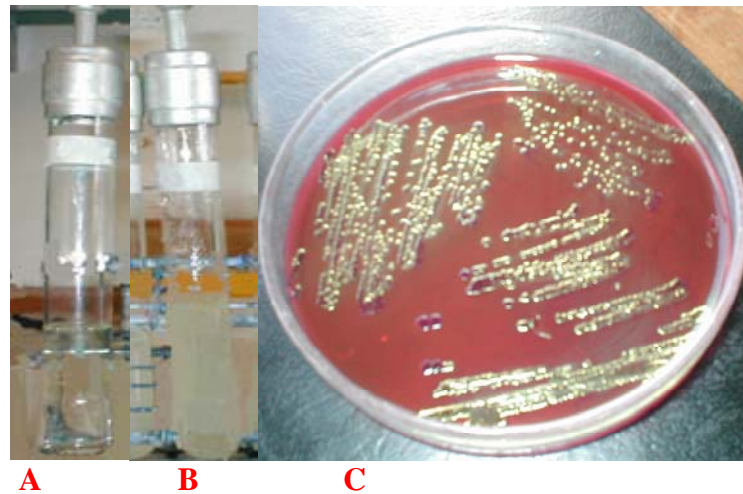
### 3.2.3.2. Determinación de coliformes totales

Para determinar cuantitativamente en las muestras de agua la presencia de bacterias pertenecientes al grupo coliformes totales, representados por los géneros *Escherichia*, *Enterobacter*, *Klebsiella* y *Citrobacter*, se utilizó la técnica modificada de diluciones de tubos múltiples (NMP).

Cada muestra de agua se sembró individualmente en tres series de 5 tubos de ensayo que contenían caldo lactosado estéril más azul de bromotimol como indicador de pH y en el interior de cada tubo además se deposita una campana Durham, para detectar la producción de gases. La primera serie de 5 tubos, cada uno contiene 10 mL de caldo lactosado concentrado, se inocula en forma independiente con 10 mL de la muestra de agua. La segunda serie de 5 tubos, cada uno de ellos contiene 10 mL de caldo lactosado diluido, se inocula en forma independiente con 1 mL de la muestra de agua y la tercera serie de 5 tubos, cada uno de ellos contiene 10 mL de caldo lactosado diluido, se siembra en forma independiente con 0.1 mL de la muestra de agua. Una vez sembrados los tubos se incuban a 37° C por 24 horas. Se toman como positivos los tubos que presentan un cambio de color de azul a amarillo y que a la vez presenten gas en la campana Durham. Terminado el periodo de incubación se registran los tubos positivos de cada serie para conformar una cifra de tres dígitos, el cual se confronta con la tabla del número más probable y se determina así el número de coliformes totales que se encuentra por cada 100 mL de agua analizada.

### 3.2.3.3. Determinación de coliformes fecales

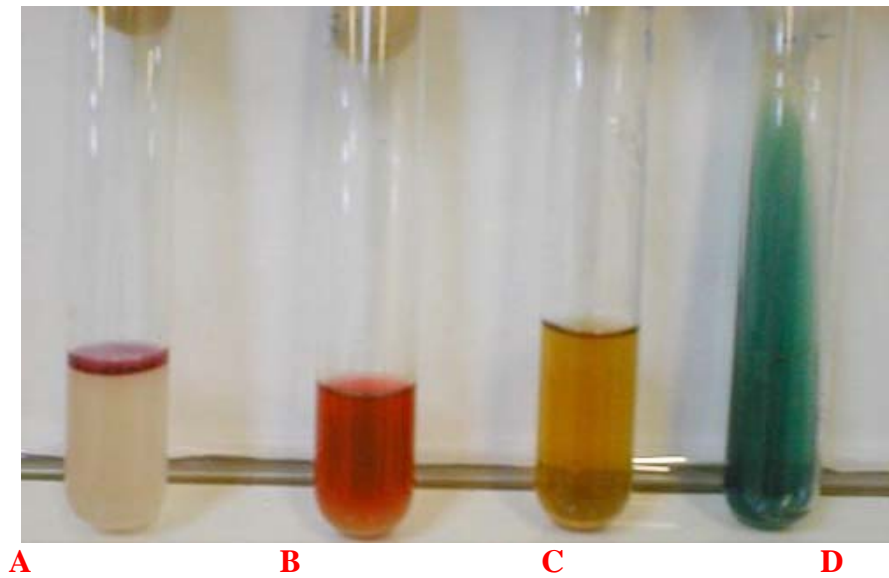
Como indicador de contaminación fecal del agua se pesquisa la presencia de *Escherichia coli*, para lo cual desde los tubos positivos de caldo lactosado se siembran en forma individual alícuotas en tubos que contienen caldo EC con campana Durham. Los tubos sembrados se incuban a 44.5° C por 24 horas. Se consideran positivos aquellos tubos que presentan a la vez turbidez y gas en la campana Durham. A partir de los tubos positivos de caldo EC se siembra un inóculo por estrías en placas Petri que contiene agar eosina azul de metileno (AEAM). Las placas sembradas se incubarán a 37° C por 24 horas. Como se aprecia en la Figura 2.



**Figura 2.** Coliformes fecales. A) Tubo de caldo E.C. sin sembrar. B) Tubo de caldo E.C. positivo. C) Placa de agar eosina azul de metileno (AEAM), con colonias de brillo metálico.

Tras el tiempo de incubación las colonias que presenten brillo metálico serán presumiblemente de *E. coli*, y a partir de ella se hacen subcultivos en tubos que contienen AP inclinado al 2 %, los que se incuban a 37° C por 24 horas. A los cultivos obtenidos en AP, se les realiza una tinción de Gram y si se determina la presencia de bacilos Gram negativos no esporulados se realiza la siembra de una batería bioquímica tipo IMVIC, constituida por

las pruebas: Indol, Rojo metilo, Voges Proskauer y Citrato. Sembrada la batería bioquímica se incuba a 37° C por 24 horas, tras lo cual se le agregan a los tubos que lo requieran los reactivos correspondientes. Para la prueba del Indol se utiliza el reactivo de Kovac, para la prueba del Rojo metilo el reactivo Rojo metilo, para la prueba de Voges Proskauer el reactivo de Barrit compuesto por dos solución A y B.



**Figura 3.** Batería bioquímica IMViC. A) Prueba del Indol positiva, B) Prueba Rojo metilo positiva, C) Prueba Voges Proskauer negativa, D) Prueba Agar Citrato negativa.

Si las pruebas de Indol y Rojo metilo son positivas y las pruebas de Voges Proskauer y Citrato son negativas, el ensayo se señala como positivo, indicando la presencia de coliformes fecales en el agua. (Figura 3).

### **3.2.4. Determinación de poblaciones bacterianas relacionadas con los ciclos biogeoquímicos del nitrógeno y fósforo.**

Como indicadores microbiológicos de una posible eutricación de las aguas del río Llollehue se realizo una determinación cuantitativa de las poblaciones bacterianas amonificantes, desnitrificantes, nitrificantes y proteolíticas que están relacionadas con el ciclo del nitrógeno, y cualitativamente se determinó la presencia de bacterias solubilizadoras de compuestos insolubles inorgánicos de fósforo, que están relacionadas con este ciclo biogeoquímico.

#### **3.2.4.1. Poblaciones bacterianas amonificantes**

En tubos que contienen 3 mL de caldo Asparragina se siembra en forma independiente y por triplicado 1 mL de dilución respectiva ( $10^{-1}$  a  $10^{-5}$ ) y 1 mL de la muestra concentrada de agua en estudio. Sembrados los tubos se incuban a  $23 \pm 2^\circ$  C por 15 días. Para determinar el proceso de amonificación, a partir de los tubos incubados se extrae 1 mL de la muestra respectiva y se deposita en un tubo de Kahm y luego se le agregan 0.2 mL del reactivo de Nessler. Una reacción positiva se refleja por una coloración amarillo-naranja del contenido del tubo. La población bacteriana amonificantes se determinó de acuerdo a la tabla de Mc Grady, que aparece indicada en Pochon y Tardieaux (1965).

#### **3.2.4.2. Poblaciones bacterianas desnitrificantes**

En tubos que contienen 3 mL de caldo nitrato se siembra en forma independiente y por triplicado de 1 mL de la dilución respectiva ( $10^{-1}$  a  $10^{-5}$ ) y 1 mL de la muestra concentrada de agua en estudio. Los tubos sembrados se incubaron a  $23 \pm 2^\circ$  C por 15 días. Para determinar las poblaciones desnitrificantes, tras el periodo de incubación, de cada tubo en forma individual se



extraen 0.5 mL y se deposita en un tubo Kahn, luego se le adiciona 50 mg de urea, 0.5 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  y 0.5 mL del reactivo d-fenilamina sulfúrica. Si el contenido de los tubos permanece incoloro indican la presencia de bacterias desnitrificantes. La población bacteriana desnitrificantes se determinó de acuerdo a la tabla de Mc Grady, que aparece indicada en Pochon y Tardieaux (1965).

#### **3.2.4.3. Poblaciones bacterianas nitrificantes**

En tubos que contienen 3 mL de caldo nitrato de sodio se siembran en forma independiente y por triplicado 1mL de la dilución respectiva ( $10^{-1}$  a  $10^{-3}$ ) y 1 mL de la muestra concentrada de agua en estudio. Sembrados los tubos se incuban a  $23 \pm 2^\circ \text{C}$  por 15 días. Para determinar las poblaciones de bacterias nitrificantes a cada tubo se le agregaron 50 mg de urea, 0.5 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  y 0.5 mL del reactivo d-fenilamina sulfúrica, Una reacción positiva se refleja por una coloración azul del contenido del tubo. La población bacteriana nitrificante se determinó de acuerdo a la tabla de Mc Grady, que aparece indicada en Pochon y Tardieaux (1965).

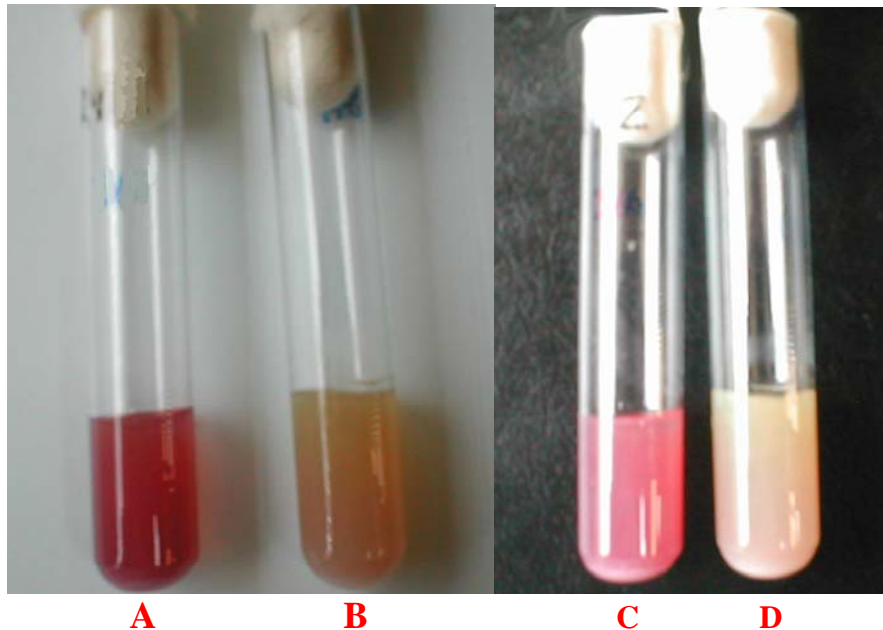
#### **3.2.4.4. Poblaciones bacterianas proteolíticas**

En tubos que contienen 3 mL de gelatina al 12 %se siembran en forma individual y por triplicado 1 mL de la dilución respectiva ( $10^{-1}$  a  $10^{-5}$ ) y 1 mL de la muestra concentrada de agua en estudio. Sembrados los tubos se incuban a  $23 \pm 2^\circ \text{C}$  por 5 días. La reacción es positiva cuando el 50% o más del contenido de los tubos se licuan. La población bacteriana proteolíticas

se determinó de acuerdo a la tabla de Mc Grady, que aparece indicada en Pochon y Tardieaux (1965).

### 3.2.4.5. Solubilización de fósforo inorgánico insoluble por cepas bacterianas

Cada una de las 400 cepas bacterianas obtenidas en cultivo puro fue sembrada independiente y por triplicado mediante picadura en tubos que contenían 5 mL de AP al 1.2 % adicionados de 0.4 g de fosfato de calcio ( $\text{CaHPO}_4$ ) y 2 mL de rojo alizarín al 1% por cada 200 mL de medio de cultivo. De igual manera cada cepa se sembró por picadura en tubos que contienen 5 mL del medio de cultivo antes citado, pero adicionado de 0.4 g de fosfato de fierro ( $\text{FePO}_4$ ). Sembrados los tubos se incubaron a  $23 \pm 2^\circ \text{C}$  por 7 días. Se considera que las cepas bacterianas son solubilizadoras de los compuestos fosforados si los medios de cultivo se tornan incoloros, como se puede apreciar en la Figura 4.



**Figura 4.** Test de solubilización de fósforo A) Tubo sin sembrar con medio adicionado con  $\text{FePO}_4$ ; B) Tubo positivo para la solubilización de fosfato de fierro. C) Tubo sin sembrar con medio adicionado de  $\text{CaHPO}_4$ ; D) Tubo positivo para la solubilización de fosfato de calcio

### **3.2.5. Caracterización morfológica y tintoriales de cepas bacterianas y pesquisa de bacterias resistentes a antibióticos**

Para determinar que tipos bacterianos morfológicos y tintoriales predominan en las muestras de agua analizadas del río Llollelhue se realizó una tinción de Gram y para comprobar la presencia de bacterias resistentes a antibióticos un antibiograma.

#### **3.2.5.1. Caracterización morfológica y tintorial de cepas bacterianas**

Cada una de las 400 cepas bacterianas obtenidas en cultivo puro fue sembrada en AP al 2 %, tras 24 h de incubación se les realizó una tinción de Gram que permitió determinar la forma bacteriana, su agrupación y reacción a la tinción de Gram.

#### **3.2.5.2. Pesquisa de bacterias resistentes a antibióticos**

Para investigar en las muestras de agua la presencia de cepas bacterianas resistentes a antibióticos, cada una de las 400 cepas aisladas fue sembrada individualmente y por triplicado en placas Petri que contenían agar Müller-Hinton adicionado de penicilina o estreptomicina. Ambos antibióticos fueron utilizados a la concentración de 0.1g por cada 200 mL de agar Müller-Hinton, el antibiótico es previamente diluido en agua destilada estéril. Sembradas las placas se incubaron a  $23 \pm 2^\circ \text{C}$  por 12 horas, tras este periodo se midieron los halos de inhibición de las colonias bacterianas.

### 3.2.6. Determinación de parámetros químicos

Para establecer una relación entre las poblaciones bacterianas y su presencia en las muestras de agua, se determinaron cuantitativamente en las muestras de agua distintas formas de nitrógeno y el fósforo total mediante análisis químicos.

#### 3.2.6.1. Determinación de amonio

Para determinar la concentración de amonio presente en las muestras de agua se extrajeron 25 mL de la muestra de agua respectiva, se depositaron en un matraz y se le agregó 1 mL de solución de fenol al 25%, 1 mL de solución de citrato trisódico al 25% y 1 mL de solución de hipoclorito alcalino 10%. Luego la mezcla obtenida se dejó reposar por 12 horas en oscuridad. A partir de esta mezcla se extrajeron 15 mL que se depositaron en una cubeta y luego se leyó en un espectrofotómetro la absorbancia a 630 nm. La concentración de amonio se obtuvo utilizando la fórmula:

$$\frac{C(\text{problema})}{C(\text{estándar})} = \frac{A(\text{problema})}{A(\text{estándar})}$$

Donde: C (problema) = concentración desconocida de amonio. C (estándar) = corresponde a la concentración de amonio conocida, 10 ug/mL. A (problema) = absorbancia desconocida y A (estándar) = es la absorbancia conocida 0.047 de la solución patrón de amonio 10 ug/mL.

#### 3.2.6.2. Determinación de nitritos

Para medir la concentración de nitritos, en un matraz se depositan 25 mL de la muestra de agua y se les agregan 2 mL de reactivo de color, la mezcla obtenida se homogeniza y luego se lee

la absorbancia a 543nm en un espectrofotómetro, en cubeta de 5 cm. La concentración de nitritos se determina a través de la siguiente formula:

$$\frac{C(\text{problema})}{C(\text{estándar})} = \frac{A(\text{problema})}{A(\text{estándar})}$$

Donde: C (problema) = concentración desconocida de nitritos C (estándar) = corresponde a la concentración de nitritos conocida, 10 ug/mL. A (problema) = absorbancia desconocida y A (estándar) = es la absorbancia conocida 0.078 de la solución patrón de nitrito 10 ug/mL

### 3.2.6.3. Determinación de nitratos

Para obtener la concentración de nitratos presentes en las muestras de agua se siguió el siguiente procedimiento. Se extrajeron 50 mL de la muestra de agua en estudio y se depositaron en un matraz, se le adiciono 1mL de solución madre ( $\text{NO}_2^-$  al 1.2%), la mezcla obtenida se dejo decantar en una columna de cadmio, para transformar los nitratos a nitritos. Luego a los 50 mL de la muestra decantada se le agregaron 2 mL de solución de color al 8.5 %. Por último, se le midió la absorbancia a 543 nm en un espectrofotómetro. Se utilizo como blanco agua adicionada de 2 mL de solución color

Para obtener la concentración se utilizo la siguiente formula:

$$\frac{C(\text{problema})}{C(\text{estándar})} = \frac{A(\text{problema})}{A(\text{estándar})}$$

Donde: C (problema) = concentración desconocida de nitratos C (estándar) = corresponde a la concentración de nitratos conocida, 10 ug/mL. A (problema) = absorbancia desconocida y A (estándar) = es la absorbancia conocida 0.123 de la solución patrón de nitrato 10 ug/mL

Una vez que se obtiene la concentración de nitritos (como se señala en el punto 3.2.6.3) se le resta la concentración de nitritos inicial (obtenida el punto 3.2.6.2) de la muestra y ese resultado es la concentración de nitratos totales que posee la muestra de agua.

#### **3.2.6.4. Determinación de fósforo**

Para la determinación de la concentración de fósforo de las muestras de agua se utilizó el siguiente procedimiento. Se depositaron 50 mL de la muestra de agua en un matraz y se le agregaron 5 mL de solución oxidante 10%, luego el matraz conteniendo la mezcla se cerró herméticamente y se depositó en un autoclave a 121 °C por 30 minutos. Terminado el período de autoclavado se dejó enfriar y a continuación se le adicionaron 3 mL de ácido ascórbico al 7 % más 3 mL de solución mixta al 25%. La mezcla se dejó reposar por 15 a 20 minutos y luego se leyó la absorbancia en un espectrofotómetro a 890 nm.

Para obtener la concentración de fósforo total se usó la siguiente fórmula:

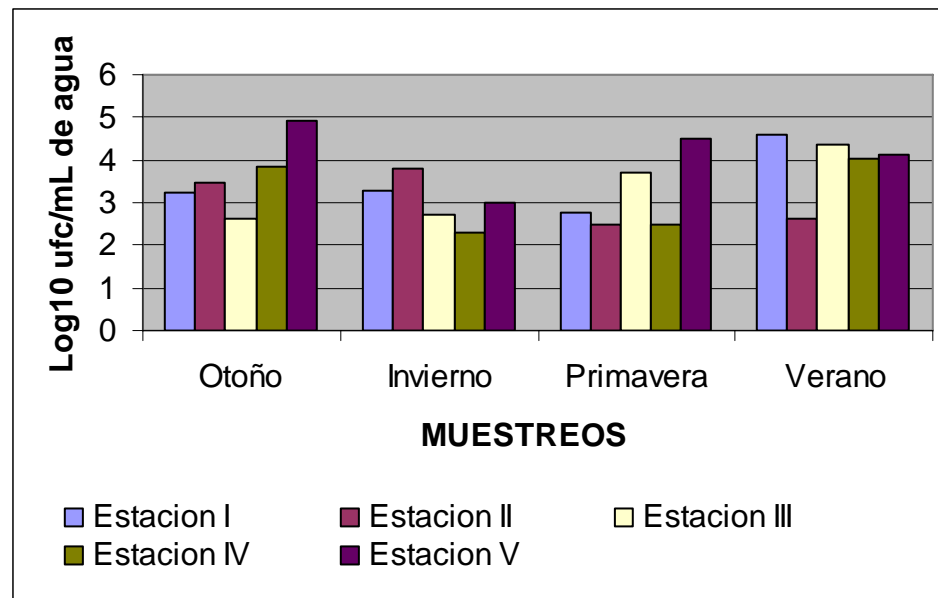
$$\frac{C(\text{problema})}{C(\text{estándar})} = \frac{A(\text{problema})}{A(\text{estándar})}$$

Donde: C (problema) = concentración desconocida de fósforo C (estándar) = corresponde a la concentración de fósforo conocida, 10 ug/mL. A (problema) = absorbancia desconocida y A (estándar) = es la absorbancia conocida 0.032 de la solución patrón de fósforo 10 ug/mL

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. Calidad bacteriológica de muestras de agua del río Llollehue

En la Figura 5, se presenta el  $\log_{10}$  de las poblaciones bacterianas organótrofas mesófilas viables, determinadas en muestras de agua recolectadas en el río Llollehue (X Región de Chile) en la época de otoño, invierno, primavera y verano del año 2004.



**Figura 5.** Poblaciones bacterianas organótrofas mesófilas viables.

Como se observa en la Figura 5, la mayor población bacteriana organótrofa mesófila viable ( $80.000 \text{ ufc/mL de agua} = \log_{10} 4.9$ ) se determinó en la muestra de agua de la quinta estación de muestreo (rivera oeste del fundo El Laurel) durante el otoño. Por su parte, la menor población de bacterias organótrofas mesófilas viables ( $200 \text{ ufc/mL de agua} = \log_{10} 2.3$ ) se determinó en la muestra de agua recolectada en la cuarta estación de muestreo (bajo el puente Arturo Prat) en invierno. (Ver Anexo, Tabla 7)

Si se analizan los resultados de la calidad bacteriológica de las aguas, independiente de la muestra de agua y época de muestro, en todas las muestras de agua se determinaron bacterias organótrofas mesófilas viables. Según Silva (2002) para determina el estado trófico del agua, el recuento de bacterias organótrofas no debe pasar de 130 ufc/mL para aguas oligotróficas. Basándose en lo indicado por Silva (2002) se puede decir que el estado del agua del río Llollehue es de carácter eutrófico, pues las ufc/mL sobrepasan las esperadas (130 ufc/mL), siendo el menor número (200 ufc/mL de agua) determinado en invierno, superando los indicadores. Una posible explicación para este fenómeno estaría relacionada por una parte con las grandes descargas de material orgánico que recibe las aguas del río Llollehue en su curso. En el curso del río Llollehue se encuentran en sus riveras grandes empresas, también existe una gran actividad agrícola y talvez el punto más importante son las aguas domiciliarias que hasta la fecha no son tratadas y son vertidas al río.

El mayor número de bacterias organótrofas mesófilas viables se determino siempre en la quinta estación de muestreo, ubicada en la rivera oeste del río, esto podría deberse a que a pocos metros más arriba de la ubicación de la estación de muestreo vierte sus aguas el estero Sagyue, el cual arrastra los líquidos que percolan desde el basural de la ciudad de La Unión. La temperatura (10.84 a 16.24° C) también juega un rol importante en el elevado recuento bacteriano, ya que los aumentos de la temperatura permiten que las reacciones químicas y enzimáticas de los microorganismos se produzcan a un ritmo más rápido y el crecimiento por lo tanto se acelere (Madigan et al, 1998). Los resultados obtenidos en el presente estudio concuerdan con los obtenidos por Tada et al (2001) en sus estudio indican que las distintas taxas de bacterias son las gestoras de una actividad oligotrófica o eutrófica del agua.



#### 4.1.1. Caracterización morfológica y tintoriales de cepas bacterianas

En la Tabla 1, se presenta la morfología, Gram y agrupación de las 400 cepas bacterianas organótrofas mesófilas viables, aisladas desde las muestras de agua recolectadas en el río Llollehue (X Región Chile), en la época de otoño, invierno, primavera y verano del año 2004.

**Tabla 1.** Morfología, Gram y agrupación de cepas organótrofas mesófilas viables en muestras de agua del río Llollehue.

Estación de Muestreo		Morfología, Gram y agrupación de cepas bacterianas												
		a	b	c	d	e	f	g	h	i	j	k	l	Total VGMA B
Otoño	1	1	12	0	0	2	0	2	2	1	0	0	0	6
	2	4	5	3	2	3	1	1	0	0	1	0	0	8
	3	1	5	3	1	4	0	4	0	1	0	1	0	8
	4	3	8	0	0	5	1	2	0	1	0	0	0	6
	5	3	6	4	0	2	2	1	0	0	1	1	0	8
Invierno	1	3	13	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	6
	2	2	12	0	0	1	2	3	0	0	0	0	0	5
	3	5	8	0	0	2	0	4	0	0	0	1	0	5
	4	4	9	0	1	0	1	4	0	1	0	0	0	6
	5	4	9	2	0	0	0	5	0	0	0	0	0	4
Primavera	1	3	12	1	0	1	0	3	0	0	0	0	0	5
	2	3	7	1	0	1	2	6	0	0	0	0	0	6
	3	2	11	0	0	1	0	4	0	0	0	1	1	6
	4	0	9	1	0	0	0	3	0	0	0	0	7	4
	5	0	10	1	0	1	1	3	0	0	0	0	4	6
Verano	1	0	7	1	0	3	2	0	0	0	0	6	1	6
	2	6	10	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	6
	3	5	10	2	0	1	1	1	0	0	0	0	0	6
	4	6	11	0	0	1	0	2	0	0	0	0	0	4
	5	4	14	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3
	<b>Total de cepas</b>	<b>59</b>	<b>188</b>	<b>22</b>	<b>4</b>	<b>30</b>	<b>14</b>	<b>50</b>	<b>2</b>	<b>5</b>	<b>2</b>	<b>11</b>	<b>13</b>	

a) Bacilos Gram positivos simples; b) bacilos Gram negativos simples; c) cocos Gram negativos simples; d) cocos Gram positivos simples; e) cocos Gram positivos en estáfido; f) bacilos Gram positivos en cadena; g) bacilos Gram negativos en cadena; h) bacilos Gram positivos en empalizada; i) cocos Gram positivos de a par; j) cocos Gram positivos en cadena; k) cocos Gram positivos en tetrada; l) cocos Gram positivos de a par. VGMA B: Variedad de grupos morfológicos y agrupaciones bacterianas.

Como se observa en la Tabla 1, las cepas de bacterias organótrofas mesófilas viables aisladas desde las muestras de agua correspondieron a cocos y bacilos Gram positivos y negativos con algunas agrupaciones características o sin ellas. Por otra parte, el mayor número de cepas (188) corresponde a bacilos Gram negativos sin agrupación definida y el menor número de cepas (2) corresponden a bacilos Gram positivos agrupados en empalizada y a cocos Gram positivos agrupados en cadena.

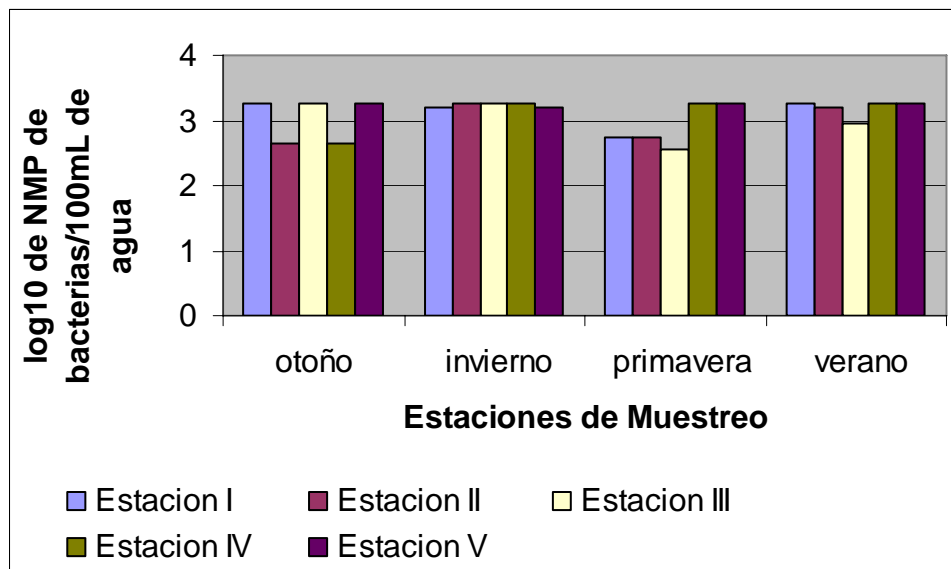
Por su parte, la mayor variedad de grupos morfológicos y agrupaciones bacterianas (8) se determinó en la muestra de agua recolectadas en la estación de muestreo 2 (puente Dollinco), 3 (puente Rapaco) y 5 (fundo El Laurel) durante el otoño y la menor variedad de grupos morfológicos y agrupaciones bacterianas (3) se determinó en la muestra de agua recolectada en la estación 5 (fundo El Laurel) del muestreo de verano.

Como se aprecia en la Tabla 1, predominaron los bacilos Gram negativos sin agrupación, los bacilos Gram negativo en cadena y los bacilos Gram positivos sin agrupación. En total se determinaron 13 grupos morfológicos y agrupaciones bacterianas para las 400 cepas ensayadas, rescatadas desde las muestras de aguas recolectadas durante el año 2004. Rheinheimer (1987) y García-Tello (1985) indican que en los cuerpos de agua dulce predominan las formas bacilares y cocoides Gram negativa no esporulados y con menores frecuencias las formas Gram positivas. Los resultados obtenidos en el presente estudio coinciden con lo descrito por estos autores. El mayor número de grupos morfológicos y agrupaciones bacterianas se determinó en la época de otoño, el número máximo de bacterias de agua dulce coincide con la época de mayor producción de principios nutritivos, es decir, en primavera o comienzos de otoño. Si bien las otras estaciones

del año presentan un número no despreciable de bacterias/mL de agua habría que determinar la cantidad de materia orgánica que recibió el río para saber si hay relación directa con este parámetro y la población bacteriana organótrofa mesófila viable. Dentro de los géneros bacterianos descritos para agua dulce se pueden encontrar, de acuerdo con García-Tello (1985) y Silva (2002): organismos Gram positivos: *Staphylococcus* y *Corynebacterium*; organismos Gram negativos: *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Flavobacterium*, *Flexibacter* y *Alcaligenes*. Lo más probable que estas taxas se encuentren dentro de los grupos morfológicos y agrupaciones bacterianas determinados en las aguas del río Llollehue

#### 4.2. Coliformes Totales

En la Figura 6, se presenta el  $\log_{10}$  del número más probable (NMP) de bacterias coliformes totales, determinadas desde las muestras de aguas recolectadas en el río Llollehue (X Región Chile) durante la época de otoño, invierno, primavera y verano del año 2004.



**Figura 6.** Bacterias coliformes totales. Número más probable (NMP) de bacterias/100 mL de agua en muestras de agua del río Llollehue.

Como se observa en la Figura 6, el mayor número de coliformes totales (1.800 coliformes totales/ 100 mL de agua =  $\log_{10} 3.25$ ) se determinó en la muestra de agua recolectada en la cuarta estación de muestreo (puente Arturo Pratt) del muestreo de verano. Por su parte, el menor número de coliformes totales (350 coliformes totales/ 100 mL de agua =  $\log_{10} 2.54$ ) se determinó en la muestra de agua recolectada en la tercera estación de muestreo (puente Rapaco) del muestreo de primavera. (Ver Anexo, Tabla 7).

Cabe destacar que en el muestreo realizado en invierno el número de bacterias coliformes totales se mantuvo prácticamente invariable (entre 1.600 a 1.800 bacterias coniformes totales/100 mL de agua) entre las estaciones de muestreos. También se puede apreciar que la quinta estación de muestreo siempre presentó el mayor número de coliformes totales (1.800 bacterias/100 mL de agua =  $\log_{10} 3.25$ ).

El número de coliformes totales permitidos depende del uso que se le da al agua, por ejemplo, para el agua de beber y de riego se aceptan 100 coliformes totales/L de agua, el agua para piscicultura 500 a 1000 coliformes totales/L. (Servicio Agrícola y Ganadero SAG, 2000). En el presente estudio se determina que las muestras de agua de invierno registraron los valores más altos. Una explicación para este fenómeno podría deberse a que esta es la época del año donde hay un aumento en la ganadería, y las lluvias arrastran los desechos de origen fecal al cuerpo de agua más cercano. Cabe destacar que la primera y última estación de muestreo son las que presentaron los valores más elevados de coliformes totales. Para la primera estación de muestreo se podría explicar por la actividad ganadera, ya que esta estación se encuentra ubicada cerca de grandes lecherías y para la quinta estación de muestreo por las aguas domiciliarias sin

tratamiento que son vertidas durante todo el año. Los resultados obtenidos en el presente estudio superan los indicadores de calidad del agua. Indicando que las aguas del río Llollehue no son aptas para ninguna de las actividades nombradas anteriormente.

En lo que respecta a los coliformes fecales, cuyo indicador en el presente estudio correspondió a *Escherichia coli*, este microorganismo se determinó en todas las muestras de agua analizadas independiente de la estación y época de muestreo. Según Villanova et al (2002) la contaminación fecal de las aguas puede afectar a las poblaciones típicas de los cuerpos de agua dulce, produciendo un desbalance entre poblaciones organótrofas y fecales, aumentando estas últimas.

Según el manual de monitoreo de calidad de aguas del Servicio Agrícola y Ganadero (2002), ningún tipo de agua que se utilice para uso humano, animal y con fines agrícolas debe presentar coliformes fecales. Esto demuestra el grado de peligrosidad del agua del río Llollehue, ya que se utilizan en la agricultura y ganadería (Gonzalez\*, 2004).

En cuanto al indicador de contaminación fecal utilizado en este estudio, *Escherichia coli*, presenta una morfología bacilar, Gram negativo y no presenta formación de endosporas (Cossart et al, 2000). Este patrón concuerda con el que predominó en las cepas aisladas desde las muestras de agua del río Llollehue.

(\*)\*: Gonzalez, L. (2004) conversación personal. Médico Veterinario Jefe servicio de salud de La Unión

### **4.3. Determinación de poblaciones bacterianas relacionadas con el ciclo biogeoquímicos del nitrógeno**

Como bioindicadores de una posible eutricación de las aguas del río Llollehue se determinaron las poblaciones bacterianas relacionadas con el ciclo del nitrógeno.

En la figura 7A a 7D se presenta el  $\log_{10}$  de las poblaciones bacterianas relacionadas con el ciclo del nitrógeno determinadas en las distintas estaciones del año 2004.

En lo que respecta a las bacterias amonificantes la mayor población (250.000 Bacterias/mL =  $\log_{10}$  5.39) se determinó durante el invierno, primavera y verano en todas las estaciones de muestreo (Figura 7B, 7C, 7D) y la menor población (3.000 bacterias/mL =  $\log_{10}$  3.47) se determinó durante el otoño en la estación de muestreo 4 (Figura 7A).

Por su parte, la mayor población bacteriana nitrificante (9.5 bacterias/mL =  $\log_{10}$  0.97) se determinó durante la primavera en la estación de muestreo 5 (Figura 7C) y el menor número de bacterias nitrificantes (1 bacteria/mL =  $\log_{10}$  0) se determinó en el muestreo de invierno en la estación de muestreo 1, 2, 3 (Figura 7B).

En cuanto a las poblaciones desnitrificantes, su mayor población (250.000 bacterias/mL =  $\log_{10}$  5.39) se determinó en el muestro de otoño en la estación 1 (Figura 7 A) y la menor (2 bacterias/mL =  $\log_{10}$  0.30) se determinó en el muestro realizado en primavera en la estación de muestreo 1 (Figura 7C). Por su parte, la mayor población de bacterias proteolíticas (250.000 bacterias/mL =  $\log_{10}$  5.39) se determinó en el muestreo de invierno y primavera en todas las

estaciones de muestreo (Figura 7B y 7C), y la menor población (25 bacterias/mL =  $\log_{10} 1.39$ ) se determinó en el muestro realizado en verano en la estación de muestreo 2 (Figura 7D).

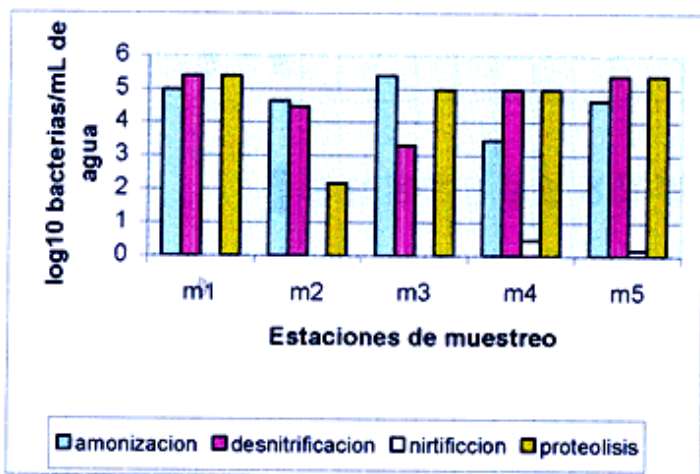
Durante los muestreos las poblaciones bacterianas amonificantes se presentaron siempre en mayor número que las poblaciones desnitrificantes, nitrificantes y proteolíticas y las bacterias nitrificantes se presentaron siempre en menor un número que las demás poblaciones en todo el periodo de muestreo. La mayor variación entre muestreos se observó en las poblaciones bacterianas desnitrificantes (250.000 a 1 bacteria/mL =  $\log_{10} 5.39 - 0$ ) por su parte las poblaciones bacterianas amonificantes no presentaron variación entre los muestreos de las épocas de invierno, primavera y verano (250.000 bacterias/mL =  $\log_{10} 5.39$ ).

El ciclo del nitrógeno posee cinco pasos estos son: fijación de nitrógeno, proteólisis, nitrificación, amonificación y desnitrificación.

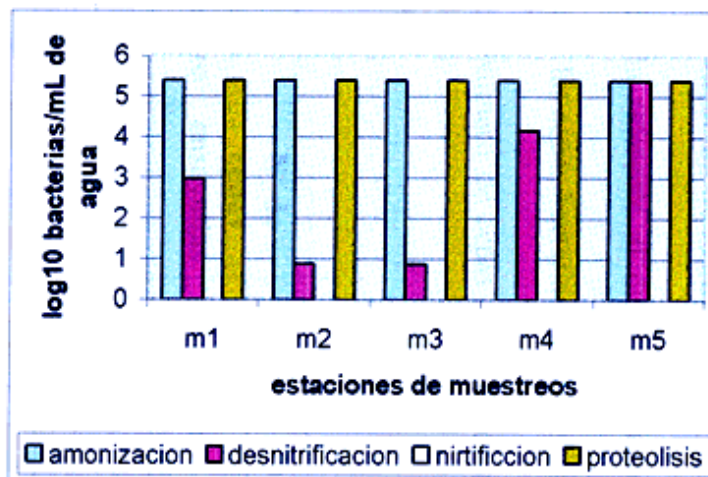
Según Madigan et al, (1998) muchas bacterias anaerobias facultativas como *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, que anaeróbicamente pueden crecer por realizar una respiración anaerobia, pueden resultar beneficiadas por la presencia de nitrato, ya que pueden transferirle los electrones del sustrato y producir nitrito. Este fenómeno se aprecia en las épocas de otoño y primavera, donde hay un aumento en el ingreso de materia orgánica a los cuerpos de agua. Las bacterias amonificantes y desnitrificantes son bacterias anaerobias facultativas, que utilizan el nitrato para su metabolismo, cuando escasea el oxígeno en el agua y es precisamente en estas dos épocas de muestreo (otoño y primavera) donde se determinaron el mayor número de bacterias amonificantes y desnitrificantes. Por otra parte, los microorganismos utilizan el  $\text{NH}_3$  o  $\text{NH}_4$  para la síntesis de aminoácidos y nucleótidos que forman partes de las proteínas, ácidos nucleicos respectivamente, estructuras que necesitan y liberan el exceso de nitrógeno como amoníaco o

amonio. Los resultados obtenidos indican que las bacterias proteolíticas se encuentran en gran número en las épocas de otoño, invierno y primavera. Según Schlegel (1997), el elevado número de bacterias proteolíticas en otoño y primavera es esperable, pues es en estas épocas del año donde aumenta la producción de principios nutritivos por parte del fitoplancton y otras bacterias, en el presente estudio se registro un aumento de las bacterias proteolíticas en el agua en las dos épocas anteriormente nombradas. Por otra parte, el aumento de las bacterias proteolíticas en la época de invierno podría explicarse por un aumento en el ingreso de materia orgánica al agua. Habría que medir la cantidad de materia orgánica disponible que se encontró en el agua en la época de invierno para saber si esta relacionado el incremento de las bacterias proteolíticas. Las bacterias nitrificantes son aerobias estrictas, la importancia de los microorganismos nitrificantes se basa en gran parte en su capacidad para producir nitrato, que es la principal fuente de nitrógeno para la asimilación por parte del fitoplancton (Silva, 2002). En el presente estudio se determinaron bajos números de bacterias nitrificantes, a pesar de la gran concentración de amonio en el agua del río Llollehue. Una razón para este bajo conteo de bacterias nitrificantes pondría ser la escasa concentración de oxígeno del agua en la época de otoño y primavera y las bajas temperaturas determinadas en las épocas de invierno. (Ver Anexo, Tablas 9, 10, 11, 12)

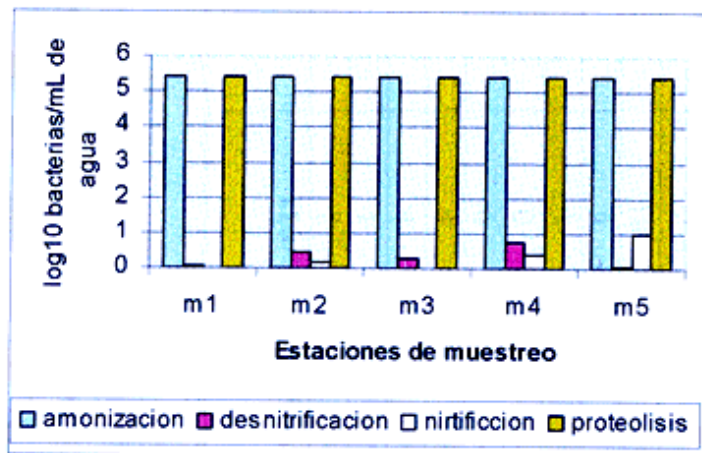




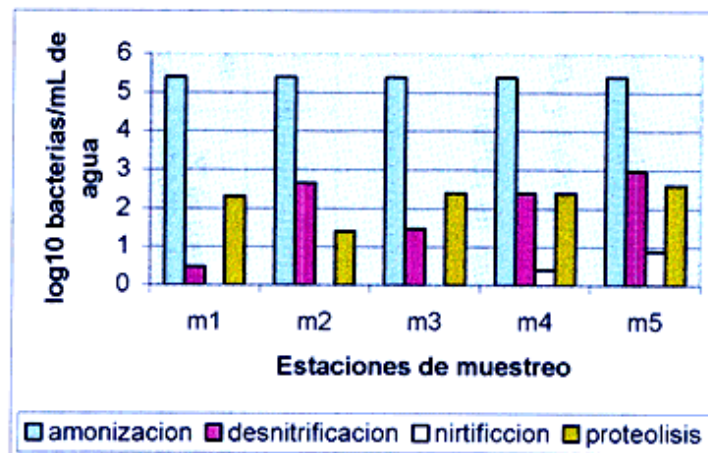
**Figura 7A.** Poblaciones bacterianas relacionadas con el ciclo del nitrógeno, época de otoño.



**Figura 7B.** Poblaciones bacterianas relacionadas con el ciclo del nitrógeno, época de invierno.



**Figura 7C.** Poblaciones bacterianas relacionadas con el ciclo del nitrógeno, época de primavera



**Figura 7D.** Poblaciones bacterianas relacionadas con el ciclo del nitrógeno, época de verano.

#### 4.4. Solubilización de fósforo inorgánico insoluble por cepas bacterianas

En lo referente al ciclo del fósforo se determinó cualitativamente la capacidad que presentaron las bacterias para solubilizar el  $\text{CaHPO}_4$  y  $\text{FePO}_4$ .

**Tabla 2.** Número de cepas solubilizadoras de  $\text{CaHPO}_4$  y  $\text{FePO}_4$  en muestra de agua del río Llollehue.

Estación de muestreo	Nº de cepas ensayadas	$\text{CaHPO}_4$		$\text{FePO}_4$		
		Nº de cepas solubilizadoras	Porcentaje de cepas solubilizadoras	Nº de cepas solubilizadoras	Porcentaje de cepas solubilizadoras	
Otoño	1	20	2	0.50 %	2	0.50 %
	2	20	5	1.25 %	4	1.00 %
	3	20	6	1.50 %	7	1.75 %
	4	20	7	1.75 %	9	2.25 %
	5	20	8	2.00 %	4	1.00 %
Invierno	1	20	10	2.50 %	9	2.25 %
	2	20	8	2.00 %	7	1.75 %
	3	20	9	2.25 %	8	2.00 %
	4	20	8	2.00 %	9	2.25 %
	5	20	11	2.75 %	14	3.50 %
Primavera	1	20	10	2.50 %	2	0.50 %
	2	20	11	2.75 %	10	2.50 %
	3	20	11	2.75 %	5	1.25 %
	4	20	10	2.50 %	3	0.75 %
	5	20	4	1.00 %	0	0.00 %
Verano	1	20	3	0.75 %	6	1.50 %
	2	20	3	0.75 %	4	1.00 %
	3	20	2	0.50 %	4	1.00 %
	4	20	3	0.75 %	1	0.25 %
	5	20	6	1.50 %	2	0.50 %
	Total de cepas	<b>400</b>	<b>137</b>	<b>34.3 %</b>	<b>110</b>	<b>27.5 %</b>

En la Tabla 2, se indican el número de cepas y el porcentaje de ellos referidos al total de cepas ensayadas de solubilizar  $\text{CaHPO}_4$  y  $\text{FePO}_4$  en muestras de agua de río Llollehue.

Como se observa en la Tabla 2, del total de cepas ensayadas (400 cepas) 137 de ellas (34.3 %) solubilizaron el fósforo inorgánico a partir de  $\text{CaHPO}_4$  y 110 cepas (27.5%) a partir de  $\text{FePO}_4$ .

Si se analiza los datos obtenidos en relación a la estación del año, se observa que el mayor número de cepas capaces de solubilizar  $\text{CaHPO}_4$  se determino en la época de invierno y primavera con igual numero de cepas (46 cepas = 11.5 %). Por su parte, el mayor número de cepas capaces de solubilizar  $\text{FePO}_4$  se determino en la época de invierno (47 cepas = 11.75 %) y como se aprecia en la Tabla 1, el menor número de cepas capaces de solubilizar tanto  $\text{CaHPO}_4$  y  $\text{FePO}_4$  se determino en la época de varano (17 cepas = 4.25 %).

Si se analizan los datos de acuerdo a la estación de muestreo, se observa que el mayor número de cepas solubilizadoras de  $\text{CaHPO}_4$  (11 cepas = 2.75 %) se determino en la segunda, tercera y quinta estación de muestreo y el menor número de cepas capaces de solubilizar  $\text{CaHPO}_4$  (2 cepas = 0.5 %) en la primera y tercera estación de muestreo. En cuanto a las cepas solubilizadoras de  $\text{FePO}_4$  el mayor número (14 cepas = 3.5 %) se determino en la quinta estación de muestreo y el menor número (0 = 0 %) se determino en primavera en la quinta estación de muestreo.

El ciclo del fósforo posee desbalance, ya que el suelo ha perdido fósforo y ha aumentado en los cuerpos de agua. Los detergentes poseen fósforo y se ha incrementado el fósforo inorgánico como fertilizante. Las bacterias requieren del fósforo para la formación de macromoléculas, es por esto que las bacterias capaces de solubilizar compuestos fosforados tienen gran importancia en los cueros de agua. Las bacterias que pueden solubilizar fósforo

inorgánico insoluble lo realizan por medio de ácidos orgánicos e inorgánicos, aquí destacan, entre otros, los géneros bacterianos *Clostridium*, *Tiobacillus* y *Bacillus*. El fósforo disuelto ( $\text{PO}_4$ ) es la fracción mas importante desde el punto de vista de la calidad de agua, ya que esta disponible en forma directa para las algas y microorganismos (Mena, 1997). El alto número de cepas bacterianas solubilizadoras de fósforo (137 (34.25 %)  $\text{CaHPO}_4$  y 110 (27.5 %)  $\text{FePO}_4$ ), permiten que el fosfato quede soluble y esto conduce a una eutricación de las aguas, sobre todo favoreciendo a las cianobacterias fijadoras de nitrógeno (Madigan et al, 1998).

#### **4.5. Cepas bacterianas resistentes a antibiótico**

En la Tabla 3, se presenta el número de cepas bacterianas determinadas en muestras de agua del río Llolehue (X Región de Chile) resistentes a los antibiótico, penicilina y estreptomicina.

**Tabla 3.** Cepas bacterianas resistentes a los antibióticos penicilina y estreptomicina.

Estación de muestreo		N° de cepas ensayadas	Número de cepa resistentes a antibiótico			
			Penicilina		Estreptomicina	
			N° de cepas resistentes	Porcentaje de cepas resistentes	N° de cepas resistentes	Porcentaje de cepas resistentes
Otoño	1	20	4	1.00 %	1	0.25 %
	2	20	6	1.50 %	4	1.00 %
	3	20	6	1.50 %	6	1.50 %
	4	20	3	0.75 %	3	0.75 %
	5	20	2	0.50 %	7	1.75 %
Invierno	1	20	2	0.50 %	7	1.75 %
	2	20	1	0.25 %	6	1.50 %
	3	20	2	0.50 %	7	1.75 %
	4	20	3	0.75 %	5	1.25 %
	5	20	4	1.00 %	3	0.75 %
Primavera	1	20	2	0.50 %	9	2.25 %
	2	20	3	0.75 %	5	1.25 %
	3	20	2	0.50 %	9	2.25 %
	4	20	0	0.00 %	4	1.00 %
	5	20	0	0.00 %	4	1.00 %
Verano	1	20	1	0.25 %	5	1.25 %
	2	20	7	1.75 %	5	1.25 %
	3	20	2	0.50 %	10	2.50 %
	4	20	6	1.50 %	9	2.25 %
	5	20	1	0.25 %	3	0.75 %
<b>Total de cepas</b>		<b>400</b>	<b>57</b>	<b>14.25 %</b>	<b>112</b>	<b>28.0 %</b>

Como se observa en la Tabla 3, del total de cepas analizadas (400 cepas), 57 (14.25 %) de ellas fueron resistentes a penicilina y 112 cepas (28 %) fueron resistentes a estreptomicina. Con respecto a las cepas bacterianas resistentes a penicilina, el mayor número de ellas (21 cepas) se determinó entre las cepas que fueron obtenidas desde las muestras de agua recolectadas en otoño y el menor número de cepas (7 = 1.75 %) de aquellas obtenidas desde las muestras de agua recolectadas durante primavera. En lo que respecta a las cepas bacterianas resistentes a

estreptomicina, el mayor número (32 cepas = 8 %) se determinó entre las cepas obtenidas desde las muestras de agua recolectadas en verano y el menor número (21 = 5.25 %) de entre aquellas obtenidas desde las muestras de agua recolectadas durante el otoño. Si se analizan las cepas bacterianas resistentes a penicilina de acuerdo a la estación de muestreo, el mayor número de cepas (7 cepas = 1.75 %) corresponden a aquellas que fueron obtenidas desde los muestreos de agua de la estación 2 (puente Dollinco durante el verano) y el menor número de cepas (1 cepa) fueron obtenidas desde la muestra de agua de la estación 1 y 5 del muestreo de verano y otra cepa obtenida desde la estación 2 del muestreo de invierno. En lo que respecta a las cepas resistentes a estreptomicina el mayor número de cepas (10 cepas) se determinó desde las muestras de agua recolectada en la estación 3 de muestreo en verano y el menor número en la estación 1 (estero Amancay, muestreo de otoño).

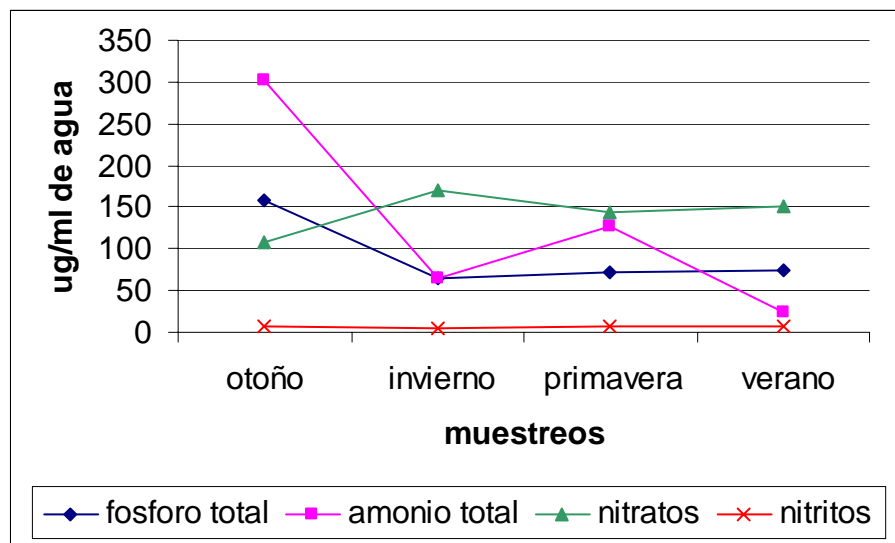
Según Schlegel (1997) y Alcamo (2000) la resistencia bacteriana frente a antibióticos puede deber a la presencia de genes codificadores en el cromosoma bacteriano, un ejemplo es lo que ocurre con la estreptomicina, la resistencia frente a este antibiótico determinada cromosómicamente se basa en la modificación de la subunidad 30S de los ribosomas. Por el contrario, la resistencia debido a un plásmido de resistencia se fundamenta en la modificación enzimática del antibiótico que se inactiva por adenilación. Así como la penicilina se inactiva por la acción de una penicilinasas.

En el presente estudio se determinó que un 14.25 % de las cepas estudiadas son resistentes a la penicilina y un 28% resistente a estreptomicina, tal vez los antibióticos más utilizados por la población, esto puede deberse a que las aguas de la ciudad no tienen tratamiento y

los residuos de antibióticos llegan al agua del río Llollehue directamente, trayendo como resultado una selección positiva para la supervivencia de las bacterias resistentes a estos antibióticos. Los resultados obtenidos concuerdan con Boon & Cattarach (1999) que indica que la aparición de resistencia a antibióticos entre las bacterias es por causas de el contacto que presentan las bacterias en los cuerpos de agua con el respectivo antibiótico.

#### 4.6. Parámetros Químicos y Físicos de Muestras de agua

En la Figura 8, se presentan los valores de los parámetros químicos (fósforo total, nitritos, nitratos y amonio en  $\mu\text{g/L}$ ) determinados en muestras de aguas extraídas desde el río Llollehue X Región Chile, en la época de otoño, invierno, primavera y verano durante el año 2004.



**Figura 8.** Valores de fósforo total, nitritos, nitratos y amonio determinados en muestras de agua del río Llollehue.

En la figura 8, se observa que el valor de fósforo en otoño registro la mayor concentración (158  $\mu\text{g/L}$ ), determinándose una disminución de estos valores en la época de invierno, primavera y verano (75 – 64  $\mu\text{g/L}$ ). En cuanto al amonio este presento su mayor concentración (301  $\mu\text{g/L}$ ) en el muestro de otoño y la menor concentración (109  $\mu\text{g/L}$ ) en verano. Por su parte los nitratos se presentaron en mayor concentración (170  $\mu\text{g/L}$ ) en las aguas recolectadas en el muestreo de invierno, y la menor concentración (109  $\mu\text{g/L}$ ) se determino en las aguas recolectadas en el muestreo de otoño. Los nitritos que se presentaron en menor concentración que los parámetros químicos anteriores, presentaron su mayor concentración (8  $\mu\text{g/L}$ ) en el agua recolectada en el muestreo de primavera, y la menor concentración (5  $\mu\text{g/L}$ ) se determino en el muestreo realizado en otoño.

El fósforo determinado en las muestras de aguas se encuentra en alta concentración, estudios realizados por Brown y Zimmerman (2000) a los ríos Alemán, Lucas, Molco, Suizo y Trancura, indican que estos presentan elevados concentraciones de fósforo, llegando a los 104  $\mu\text{g/L}$ , en los resultados obtenidos desde las muestras de aguas del río Llollehue se observan mayores concentraciones de fósforo. Estudios físico-químicos realizados al río Damas (Donoso et al, 2000) con características ambientales muy similares a las que posee el río Llollehue, muestran que los parámetros químicos medidos están íntimamente relacionados a las actividad agrícola-ganadera, industrial y la actividad propia del hombre. La concentración de amonio en el agua del río Llollehue concuerda con lo expuesto por Silva (2002) que señala que las altas concentraciones de este sustrato indicaría que el proceso de amonificación se esta llevando acabo. La alta concentración de nitratos y nitritos podrían indicar que en la época de invierno y verano esta ingresando una alta cantidad de sustrato al agua. Esta situación tiene efectos sobre la salud



de la población aledaña, producto de la formación de compuestos tóxicos volátiles ( $\text{NH}_4$ ,  $\text{CO}_2$  y  $\text{CH}_4$ ), que terminan no solamente contaminando el agua, sino también la atmósfera.

Por otra parte, según el cuadro comparativo de normas de agua y riles de Servicio Agrícola y Ganadero (2002) la concentración de fósforo total, amonio total, nitratos y nitritos determinados en el agua del río Llollehue son superiores a las permitidas en el agua de clase de excepción (excelente calidad, forma parte del patrimonio ambiental de la republica, adecuadas para comunidades acuáticas y los demás usos definidos en las demás clases), clase 1 (agua apta para la protección y conservación de las comunidades acuáticas, para riego irrestringido), Clase 2 (buena calidad, apta para el desarrollo de acuicultura y pesca deportiva), Clase 3 (regular calidad, agua adecuada para bebida de animales y riego restringido).

En la Tabla 4, se muestran los valores de pH y temperatura determinados en las muestras de agua del río Llollehue.

**Tabla 4.** pH y temperatura de muestras de agua del río Llollehue de acuerdo a la época del año.

<b>EPOCA DEL AÑO</b>	<b>MUESTRAS DE AGUA</b>	
	<b>pH</b>	<b>TEMPERATURA (° C)</b>
<b>Otoño</b>	5.9	14.08
<b>Invierno</b>	5.5	10.84
<b>Primavera</b>	5.7	13.94
<b>verano</b>	5.7	16.24

Como se observa en la Tabla 4, pH y temperatura mas bajo se determino en las muestras de agua recolectadas en invierno. El mas bajo pH determinado en invierno podría deberse a que las lluvias propias de esta estación del año pueden acarrear desde el suelo y la atmósfera

compuestos ácidos que finalmente se depositan en el río Llollehue, al respecto Godoy et al, (2002) han señalado una depositación húmeda de compuestos nitrogenados a nivel de la depresión intermedia durante la época de invierno.

Por otra parte, en la tabla 4 se observa en las muestras de agua de río Llollehue que en otoño se determinó el mayor pH (5.9) y la mayor temperatura (16.24° C) en verano. Este mayor pH podría deberse a que durante el otoño en las muestras de agua del río se deposita una gran cantidad de restos de vegetales (hojas, ramas, tallos, etc.) lo que incrementa la actividad microbiana que mayoritariamente transforma o mineraliza los constituyentes metabólicos de los residuos vegetales (proteínas, azúcares simples, ácidos nucleicos, etc.) liberando metabolitos como  $\text{NH}_4^+$ , bases púricas y pirimidicas, péptidos que podrían ser los que determinan un aumento del pH del agua del río Llollehue.

En cuanto al pH del agua podemos decir que varía entre: 5.9 y 5.5, siendo este apto para la vida de los organismos y microorganismos de agua dulce. El pH de las muestras de agua mostraron una tendencia un poco bajo por lo permitido por la normativa chilena, la cual permite un pH entre 6.0 y 9.0 para aguas dulces y 6.5 y 8.3 para aguas de recreación con contacto directo.

La temperatura varió entre: 14.1 °C a 10.8 °C, Permitiendo el desarrollo de bacterias psicófilas (0° a 30° C, con un óptimo de 15° C)

#### 4.7. Relación entre parámetros químicos y poblaciones bacterianas del ciclo del nitrógeno

En la Figura 9, 10, 11 y 12 se presentan las relaciones entre poblaciones bacterianas del ciclo del nitrógeno (amonificantes, desnitrificantes, nitrificantes y proteolíticas) y las concentraciones de los compuestos inorgánicos nitrogenados (amonio, nitrato y nitrito) determinados en las muestras de agua del río Llollehue recolectadas el año 2004.

En la Figura 9, se observa que el menor número de bacterias amonificantes (42.864 bacterias/mL de agua =  $\log_{10} 4.632$ ) se determinó en otoño al igual que la menor concentración de nitrato (109  $\mu\text{g/L}$  de agua). En invierno, primavera y verano el número de bacterias fue el mismo (250.000 bacterias/mL de agua =  $\log_{10} 5.398$ ) y las concentraciones de nitrato fueron mayores que la determinada en otoño. En la Figura 10, se observa que la menor concentración de nitratos (109  $\mu\text{g/L}$  de agua) se determinó en otoño y el menor número de bacterias desnitrificantes (2,128 bacterias/mL de agua =  $\log_{10} 0.328$ ) en primavera. La mayor concentración de nitratos se determinó en la época de invierno (170  $\mu\text{g/L}$  de agua) y el mayor número de bacterias desnitrificantes se determinó en otoño (51.286 bacterias/mL de agua =  $\log_{10} 4.710$ ).

En lo que respecta a las bacterias nitrificantes en la Figura 11, se aprecia que en el agua del río Llollehue la menor concentración de amonio (24  $\mu\text{g/L}$  de agua) se determinó en verano y el menor número de bacterias nitrificantes se registró en invierno (1 bacteria/mL de agua =  $\log_{10} 0$ ). La mayor concentración de amonio (301  $\mu\text{g/L}$  de agua) se determinó en otoño y el mayor número de bacterias nitrificantes (2.128 bacterias/mL de agua =  $\log_{10} 0.328$ ) en primavera. También en la Figura 11, se aprecia que la menor concentración de nitritos (5  $\mu\text{g/L}$  de agua) y el menor número de bacterias nitrificantes (1 bacterias/mL de agua =  $\log_{10} 0$ ) se determinaron en la

época de invierno, por su parte, la mayor concentración de nitritos ( $8 \mu\text{g/L}$  de agua) y el mayor número de bacterias nitrificantes ( $2,013$  bacterias/mL de agua =  $\log_{10} 0.304$ ) se determinaron en la época de primavera. Por último en la Figura 12, se observa que el menor número de bacterias proteolíticas ( $165.576$  bacterias proteolíticas/mL de agua =  $\log_{10} 2.219$ ) y la menor concentración de amonio ( $24 \mu\text{g/L}$  de agua) se determinaron en la época de verano, en tanto que, la mayor concentración de amonio ( $301 \mu\text{g/L}$  de agua) se determinó en la época de otoño y el mayor número de bacterias proteolíticas ( $250.000$  bacterias proteolíticas/mL de agua =  $\log_{10} 5.398$ ) se determinó en la época de invierno y primavera.

En todo ecosistema, en lo referente al ciclo del Nitrógeno se distinguen las siguientes etapas: (1) fijación de nitrógeno que es realizada exclusivamente por bacterias de vida libre o simbiótica y que finaliza con la producción de  $\text{NH}_3$ . (2) Proteólisis llevado a cabo por bacterias y hongos, y culmina con la formación de  $\text{NH}_3$  y  $\text{CO}_2$ . (3) Nitroamonificación o amonificación, proceso realizado por bacterias y hongos anaerobios facultativos que culmina con la formación de  $\text{NH}_3$ . (4) Desnitrificación proceso llevado a cabo mayoritariamente por bacterias anaerobias facultativos que finaliza con la formación de  $\text{N}_{2(\text{g})}$ . (5) Nitrificación proceso realizado por bacterias litótrofas que transforman mediante oxidación los compuestos reducidos del nitrato (entre otros  $\text{NH}_3$  y  $\text{NO}_2$ ) a  $\text{NO}_3$ .

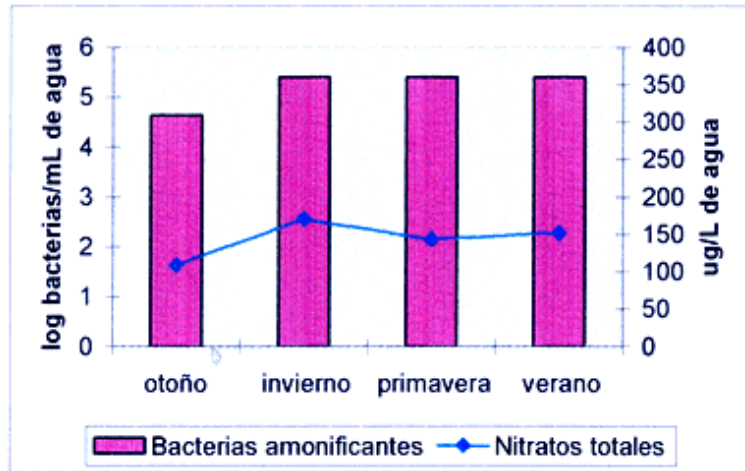


Figura 9. Relación entre poblaciones bacterianas amonificantes/mL de agua y concentración de nitratos total (mg/L) en muestras de agua del río Llolellhue

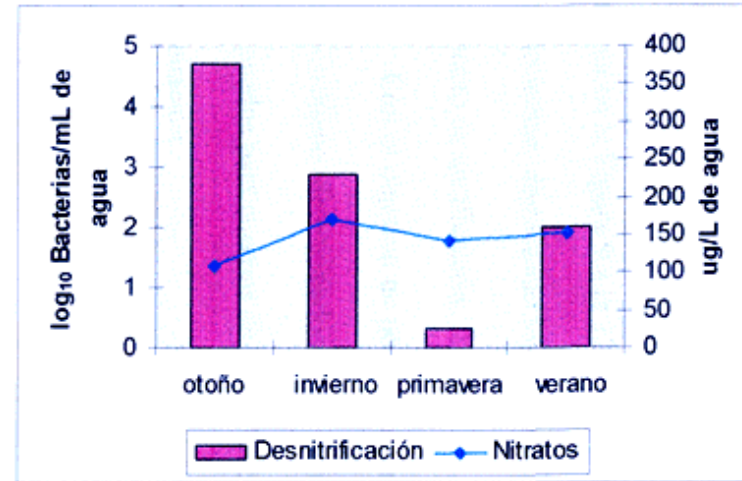


Figura 10. Relación entre poblaciones bacterianas desnitrificantes/mL de agua y concentración de nitratos totales (mg/L) en muestras de agua del río Llolellhue

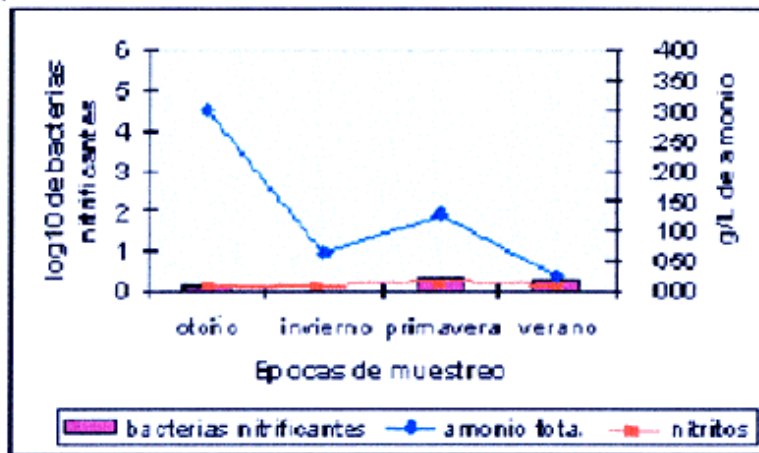


Figura 11. Relación entre poblaciones bacterianas nitrificantes/mL de agua y Concentración de amonio total (mg/l) y nitritos totales en muestras de agua del río Llolellhue

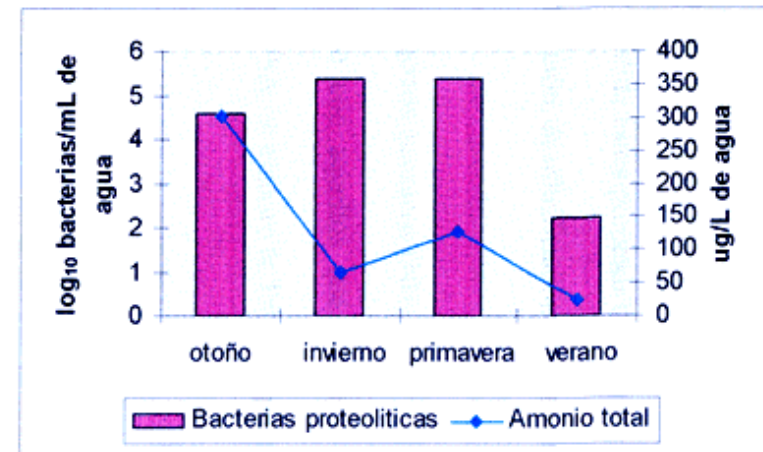


Figura 12. Relación entre poblaciones bacterianas proteolíticas/mL de agua y amonio total

En el presente trabajo de los procesos enunciados del ciclo del nitrógeno se determinaron la nitroamonificación (amonificación), desnitrificación, nitrificación y proteolisis, como se observa en la Figura 9 a la 12, en mayor o menor medida estos procesos ocurren en las aguas del río Llolehue, destacando los procesos de amonificación, desnitrificación y proteolisis por sobre el proceso de nitrificación.

Con el objetivo de poder comparar los parámetros químicos ( $\text{NH}_4$ ,  $\text{NO}_3$  y  $\text{NO}_2$ ) del ciclo del Nitrógeno determinados en el presente estudio con aquellos que aparecen normados o consignados para cuerpos de agua dulce de Chile y USA, se elaboro la Tabla 5. Que se presenta a continuación.

**Tabla 5.** Concentraciones de NH<sub>4</sub>, NO<sub>3</sub>, NO<sub>2</sub> y N-Orgánico en cuerpos de agua dulce y según normas chilenas.

<b>Lugares y Normas</b>	<b>AMONIO</b> (µg/L de H <sub>2</sub> O)	<b>NITRATO</b> (µg/L de H <sub>2</sub> O)	<b>NITRITO</b> (µg/L de H <sub>2</sub> O)	<b>N- ORGANICO</b> (µg/L de H <sub>2</sub> O)
Presente estudio	24 – 301 (verano/otoño)	109 – 170 (otoño/invierno)	5 – 8 (invierno/primavera)	---
<sup>1</sup> Cuenca río Valdivia	8.25 – 14.25	---	---	---
<sup>2</sup> Lago Puyehue	---	0.1 - 0.1	---	---
<sup>2</sup> Río Chanlelfú	---	20.3 – 72.2	---	---
<sup>2</sup> Río Gol – Gol	---	22.6 – 67.7	---	---
<sup>3</sup> Río Alemán	---	---	---	111 – 266
<sup>3</sup> Río Lucas	---	---	---	48 – 522
<sup>3</sup> Río Molco	---	---	---	22 – 205
<sup>3</sup> Río Suizo	---	---	---	11.3 – 33.7
<sup>3</sup> Río Trancura	---	---	---	12 – 37
<sup>4</sup> Campell	50 - 100 (S.) 100 - 1000 (F.)	---	---	---
<sup>4</sup> Lago Mendota USA	70- 200 (S.) 200 – 700 (F.)	10- 50 (S.) 10 – 100 (F.)	---	---
<sup>5</sup> Estándares Nacionales de Calidad Ambiental	---	10.000	1000	---
<sup>6</sup> Calidad de agua. Gobierno de Chile	250 (bebida animal)* < 1000 (Clase I)** 1500 (Clase II)*** 2500 (Clase III)****	10.000* 10.000 (riego)	1000* 60** >60*** >60****	---

1 = Little (2005). 2 = Campos *et al.*, (1989). 3 = Brouwn and Zimmermann (2000). 4 = Campell (1987). 5 = Estándares Nacionales de Calidad Ambiental <http://lauca.usach.cl/ima/apendc.htm> (31/11 2005). 6 = Servicio Agrícola y Ganadero. Departamento de Recursos naturales (2002). S = superficie. F = fondo

Como se observa en la Tabla 5, las concentraciones de NH<sub>4</sub> (24 – 301 µg/L de H<sub>2</sub>O) determinadas en el presente estudio son superiores a las señaladas por Little (2005) para la cuenca del río Valdivia y la concentración mayor de NH<sub>4</sub> (301 µg/L de H<sub>2</sub>O) del presente estudio cae dentro del rango señalado por Campell (1987) para las aguas de fondo o sedimentos de cuerpos de agua dulce de USA. Por su parte y de acuerdo a la concentración de NH<sub>4</sub> determinada en el río Llollelhue la calidad del agua se clasifica como Clase 1. En lo que se refiere a la

concentración de  $\text{NO}_3$  la determinada en el presente estudio (109 – 170  $\mu\text{g/L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$ ) supera largamente a las señaladas por Little (2005); Campos et al., (1989) y Campell (1987) para cuerpos de agua dulce nacionales e internacional respectivamente y semejan más a los determinados por Brown and Zimmermann (2000) para N-orgánico determinados en los ríos Gol – Gol, Alemán y Lucas. Por su parte y de acuerdo a la concentración de  $\text{NO}_3$  determinada en el río Llollehue cumple con los Estándares Nacionales de Calidad Ambiental (2005) y de acuerdo a su calidad, el agua se clasifica como apta para ser bebida por animales y regadío. Por último para las concentraciones de  $\text{NO}_2$  determinadas en el presente estudio (5 – 8  $\mu\text{g/L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$ ) en la literatura consultada no se encontraron datos comparativos referidos a agua dulce, pero el agua del río Llollehue cumple con los Estándares Nacionales de Calidad Ambiental (2005) y de acuerdo a su calidad, el agua se clasifica como apta para ser bebida por animales y regadío.

Campbell (1987) al respecto señala que en los cuerpos de agua los niveles de nitrógeno mineral varían de una estación del año a otra y dependen en su mayoría del escurrimiento del suelo, así como de la cantidad contenida en el agua de lluvia. Este mismo autor señala que en las aguas superficiales de los lagos hay poco  $\text{NH}_4^+$  (por lo general entre 50 a 100  $\mu\text{g L}^{-1}$ ), a menos que exista una alta contaminación con materia orgánica, donde el  $\text{NH}_4^+$  se acumula en las capas inferiores mal aireadas y su contenido varía entre 100 a 1000  $\mu\text{g L}^{-1}$ , principalmente como resultado de la descomposición de la materia orgánica que hay en los sedimentos. El nivel de nitrato  $\text{NO}_3$  en las capas superiores del cuerpo de agua es bajo, porque lo usa el fitoplancton, pero pueden aumentar con la profundidad, también el  $\text{NO}_3$  se pierde por desnitrificación en condiciones anóxicas.



En lo que respecta cuantitativamente a las poblaciones bacterianas relacionadas con el ciclo del Nitrógeno (amonificantes, desnitrificantes, nitrificantes y proteolíticas), en la Tabla 6 se muestran las determinaciones realizadas en cuerpos de agua dulce chilenos y se comparan con las del presente estudio.

**Tabla 6.** Poblaciones bacterianas relacionadas con el ciclo del Nitrógeno

Autor	Poblaciones Bacterianas (bacterias/mL de H <sub>2</sub> O)			
	Amonificantes	Desnitrificantes	Nitrificantes	Proteolíticas
Solís	$1 \times 10^2 - 1 \times 10^4$	$10 - 1 \times 10^2$	0 - 0	---
Garay	0 - $140 \times 10^3$ * $25 \times 10^3 - 2 \times 10^5$	0 - 250 * $0 - 14 \times 10^4$	0 - $140 \times 10^3$ * 9 - 25	0 - $140 \times 10^3$ * $25 - 140 \times 10^3$
Von Jhonn	$42.864 - 25 \times 10^4$	$2.128 - 51.286$	1 - 2.128	$165.576 - 25 \times 10^4$

Solís (2002) Lago Budí. Garay (2003) fiordos y canales de la XI Región de Chile.

von Johnn (2005) río Llollehue (trabajo actual de tesis). \* = Poblaciones bacterianas de sedimentos (bacterias/g de sedimento) de fiordos y canales de la XI Región de Chile.

Las poblaciones bacterianas del presente estudio relacionadas con el ciclo del Nitrógeno, en lo que respecta a amonificantes y desnitrificantes son similares a las determinadas por Garay (2003) desde sedimentos de fiordos y canales de la XI Región de Chile y mayores a las registradas por Solís (2002) para el Lago Budí, que según los estudios de este autor se encuentra eutrificado. En lo que respecta a las bacterias nitrificantes, las poblaciones determinadas en el presente estudio son similares a las determinadas por Garay (2003) para el agua de fiordos y canales de la XI Región de Chile. Por último, las poblaciones proteolíticas determinadas en el presente estudio son mayores a las señaladas por Garay (2003) para sedimentos de fiordos y canales de la XI Región de Chile. Campbell (1987) al respecto indica que altas poblaciones

proteolíticas en los cuerpos de agua, son un claro indicio de posible contaminación del cuerpo de agua con nutrientes orgánicos provenientes del suelo o por compuestos orgánicos producto de la actividad industrial o contaminación antrópica, además como se señaló en párrafos anteriores en los cuerpos de agua con una alta contaminación con materia orgánica el  $\text{NH}_4^+$  se acumula en las capas inferiores mal aireadas y su contenido varía entre 100 a 1000  $\mu\text{g L}^{-1}$ , aspecto que se determinó en el presente estudio.

En consecuencia, se podría indicar que el agua del río Llollehue de acuerdo a las concentraciones de algunos de los compuestos nitrogenados y poblaciones bacterianas relacionadas con este ciclo que fueron determinadas, indicaría una alta contaminación con materia orgánica y por ende este cuerpo de agua tiende a la eutricación.

## 5. CONCLUSIÓN

En todas las muestras de agua recolectadas en el río Llollehue predominaron las bacterias bacilares Gram negativas sin agrupación y se obtuvo un alto número de bacterias organótrofas mesófilas viables (sobre 130 bacterias/mL de H<sub>2</sub>O), indicando que el agua del río presenta una alta actividad bacteriana.

En todas las muestras de agua recolectadas en el río Llollehue se aislaron coliformes totales y fecales, indicando que el agua del río presenta una contaminación fecal.

En todas las muestras de agua recolectadas desde el río Llollehue se determinaron bacterias relacionadas con el ciclo del Nitrógeno, predominado en número las amonificantes.

Se registró un mayor número de cepas bacterianas obtenidas desde las muestras de agua del río Llollehue para solubilizar CaHPO<sub>4</sub> (137 cepas) que para solubilizar FePO<sub>4</sub> (110 cepas).

Un alto número de cepas bacterianas obtenidas desde las muestras de agua del río Llollehue presentan resistencia a penicilina (57 cepas) y estreptomicina (112 cepas).

El agua del río Llollehue presentan altas concentraciones de fósforo (161.25 ug/L), NO<sub>3</sub> (178.54 ug/L) y NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (304.25 ug/L) que superan las permitidas por el Servicio Agrícola y Ganadera (SAG) para algunos usos del agua.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

**Alcamo, E.** (2000). *Fundamentals of Microbiology*. sixth edition. Jones and Bartlett publishers Sudbury, Massachusetts. 832p.

**American Public Health Association (APHA)** (1981). *Standard methods for the xamination of water*. 15a ed. Washington: American Public Health association. 1134p.

**Barbieri, A. & Simona, M.** (2001). Trophic evolution of lake Ligano related to external load reduction: changes in phosphorus and nitrogen as well as oxygen balance and biological parameters. *Lakes & reservoirs. Reserch and Management* 6: 37 – 47.

**Bordalo, A. Onrossami, R. & Dechkulwatana, C.** (2002). Survival of faecal indicator bacteria in tropical estuarine watwer (Bangpakong river, Thailand). *Journal Applied Microbiology* 93, 864 – 871.

**Boon, P. & Cattarach, M.** (1999). Antibiotic resistance of native and faecal bacteria isollated from rivers, reservoirs and sewagw treatment facilities in Victoria, south-eastern Australia. *Letters in Applied Microbiology* 28, 164 – 168.

**Brown, A. & Zimmermann, R.** (2000). Bacteriological análisis of lake Villarrica, Chile and some of its affluents. *Medio Ambiente*, 13 (2): 62-67.

**Campell, R.** (1987). Ecología Microbiana. Editorial Limusa S. A. Mexico D. F. 267 p.

**Campos, H. Steffen, W. Agüero, G. Parra, O. & Zúñiga, L.** (1989) estudios limnológicos en el lago Puyehue (Chile): morfometría, factores físicos y químicos, plancton y productividad primaria. Medio ambiente, 10 (2) : 36 – 53.

**Canosa, A. and Pinilla, G.** (1999). Bacteriological eutrophication indicators in four Colombian water bodies (South America). Lakes & reservoirs. Research and Management 4: 23 – 27

**Castagneto, H.** (1980). Farmacología, guías teórico-prácticas. By ediciones Toray Argentina S.A.C.I. Buenos Aires. 176 p.

**Cossart, P. Boquet, P. Normark, S. Rappuoli, R.** (2000). Cellular microbiology. American society for microbiology 1752 N street NW Washington, DC 20036. 362p.

**Donoso T., Nuñez J. & Barra J.** (2000). Calidad físico-químicas del agua del río Damas Osorno, Chile. Medio ambiente 13(2): 97 – 119.

**Droop M. and Jannasch H.** (1977). Advances in Aquatic Microbiology. Academic Press Inc. New York. 265 p.

**Estandares nacionales de calidad ambiental.** (2005) on line,  
<http://lauca.usach.cl/ima/apendc.htm> (31/11/2005)

**Firth, J. R. & Edwards, C.** (2000). Denitrification by indigenous microbial populations of river water measured using membrane inlet mass spectrometry. *Journal Applied Microbiology* 89, 123 – 129.

**Garay, Y.** (2003). Determinación cuanti-cualitativa de bacterias heterótrofas relacionadas con el ciclo del nitrógeno, calidad bacteriológica de agua y sedimentos recolectados en fiordos y canales de la XI región de Chile. Tesis de Licenciado en Ciencias Biológicas. Universidad Austral de Chile. Valdivia - Chile. 72 p.

**García-Tello P.** (1985). Microbiología Marina. Universidad Católica de Valparaíso. Edita UCV - Chile. 102 p.

**Geshe E., Vallejos A. & Saez M.** (2003). Eficiencia de anaerobiosulfito-reductores como indicadores de calidad sanitaria de agua, Método número más probable. *Arch. Med. Vet.* v 35 (1)

**Harner- Devine, M. Leibold, M Smith, V. & Bahannan, B.** (2003) Bacterial diversity Patterns along a gradient of primary productivity. *Ecology Letters* 6: 613 – 622.

**Harper, D.** (1992). Eutrophication of freshwater principles, problems and restoring. Chapman & Hall. 327p.

**Heard T. & Winterton S.** (2000). Interaction between nutrient status and weevil herbivory in the biological control of water journal of applied ecology 37: 117-127.

**Instituto Geográfico Militar.** (1985). Atlas Geográfico para la educación, primera edición. Edita Instituto Geográfico Militar. 125p.

**Johnson, P. and Chase, J.** (2004). Parasitism in the food web: linking amphibian malformations and aquatic eutrophication. *Ecology Letters* 7: 521 – 526.

**Kleeberg, A. Hämmerling, R. & Nixdorf, B.** (2001). Effect of hypolimnetic discharge on the faster deprivation of phosphorus from lake sediment (lake Jabel, north-east Germany). *Lakes & Reservoirs. Research and Management* 6: 289 – 295.

**Kleeberg, A. Nixdorf, B & Mathes, J.** (2000) Lake Jabel restoration project: Phosphorus status and possibilities and limitations of diversion of its nutrient-rich main inflow. *Lakes & Reservoirs. Research and Management* 5: 23 – 33.

**Leiva, S.** (1996). Distribución, composición y contaminación bacteriana en los lagos Ranco y Yelcho, X Región, Chile. Tesis de Licenciado en Biología Marina. Universidad Austral de Chile. Valdivia - Chile. 104 p.

**Little, C.** (2005) Exportación de nitrógeno desde la cuenca del río Valdivia, Chile. Tesis de magister en ciencias mención en recursos forestales. Universidad austral de Chile. Valdivia – Chile. 81 p.

**Madigan, T., Martinko, J. and Parker, J.** (1998). *Biología de los Microorganismos*. Octava edición, Madrid, impreso por Grafilles (grupo Fupoin) España. 1064 p.

**Magadza, C.** (2003). Lake Chivero: A management case study. *Lakes & reservoirs. Reserch and Management* 8: 60 – 81.

**Mena, G.** (1997) Evaluación experimental de la capacidad de *Diplodon chilensis* para procesar lo excedentes orgánicos generados por la salmonicultura. Tesis para optar al grado de Licenciado en Biología Marina. Universidad Austral de Chile. Valdivia – Chile. 65p.

**Pochon, J. & Tardieux, P.** (1965). *Técnicas de Análisis en Microbiología del suelo*. Editorial T. E. I apartado 276 Berge. 116 p.

**Rheinheinmer, G.** (1987). *Microbiología de las aguas*. Edición Acribia, S.A. Zaragoza. 229 p

**Ryding, S. & Rast, W.** (1992) *El control de la eutrofización en lagos y pantanos*. Ediciones Pirámide Samadri.



**Servicio Agrícola y Ganadero (SAG)** (2002). Manal Monitoreo de Calidad de Aguas. Depto. Protección de recursos naturales renovables. Gobierno de Chile. 67p.

**San Martín B., Kruze J. and Morales M.** (2002). Resistencia bacteriana en cepas patógenas de mastitis en vacas lecheras de la V región, región Metropolitana y X<sup>a</sup> región, Chile. Arch. Med. Vet v 34 n.2. Valdivia julio. Minga On line.

**Sangüeza, .** (2005)

**Schlegel, H.** (1997). Microbiología general, Ediciones Omega, S.A., Barcelona. 654 p.

**Sernatur** (2004). La Unión ciudad turística, edita Municipalidad de La Unión, 3 p.

**Silva A.** (2002). Caracterización bacteriana del lago Budi (IX Región, Chile), con énfasis en el aislamiento de bacterias del ciclo del nitrógeno. Tesis de Licenciado en Biología Marina. Universidad Austral de Chile. Valdivia – Chile. 75 p.

**Sugiura, N., Utsumi, M., Wei, B. Iwami, N., Kunihiro, O., Kawauchi, Y. and Maekawa, T.** (2004) assessment for the complicated occurrence of nuisance odorous from phytoplankton and environmental factors in a eutrophic lake. Lakes & Reservoirs. Research and Management 9: 195 – 201.

**Tada, Y. Kabata, T. And Nakaoka, C.** (2001) A simple and easy method for the monitoring of environmental pollutants using oligotrophic bacteria. Letters in Applied Microbiology 32: 12 – 25.

**Valenzuela, E.** (2003). Guía Pasos Prácticos Microbiología 112, Edita Instituto de Microbiología Universidad Austral de Chile, 40 p.

**Villanova, X., Manero, A., Cerdà–Cuellar, M. and Blanch, A..** (2002). The effect of a sewage treatment plant effluent on the reception river waters. *Journal of applied Microbiology* 92, 210 – 214.

## 7. ANEXO

**Tabla 7.** Determinación de poblaciones bacterianas organótrofas mesófilas viables, coliformes totales.

	Estaciones de muestreo	Poblaciones bacterianas	
	Nº	NMP bacterias/100ml de agua	UFC /mL de agua
<b>Muestreo 1</b>	<b>1</b>	1800	1800
	<b>2</b>	430	3000
	<b>3</b>	1800	430
	<b>4</b>	430	7000
	<b>5</b>	1800	80000
<b>Muestreo 2</b>	<b>1</b>	1600	2000
	<b>2</b>	1800	6000
	<b>3</b>	1800	530
	<b>4</b>	1800	200
	<b>5</b>	1600	1000
<b>Muestreo 3</b>	<b>1</b>	540	600
	<b>2</b>	540	300
	<b>3</b>	350	5000
	<b>4</b>	1800	310
	<b>5</b>	1800	31000
<b>Muestreo 4</b>	<b>1</b>	1800	10000
	<b>2</b>	1600	400
	<b>3</b>	920	22000
	<b>4</b>	1800	11000
	<b>5</b>	1800	13000

**Tabla 8.** Determinación de poblaciones bacterianas relacionadas con el ciclo del nitrógeno y

	Estación de muestreo	<b>Poblaciones bacterianas</b>			
		<b>Nº</b>	<b>Amonización B/mL</b>	<b>Desnitrificación B/mL</b>	<b>Nitrificación B/mL</b>
<b>Muestreo 1</b>	<b>1</b>	95000	250000	0	250000
	<b>2</b>	45000	30000	0	150
	<b>3</b>	250000	2000	0	95000
	<b>4</b>	3000	95000	3	95000
	<b>5</b>	45000	250000	1.5	250000
<b>Muestreo 2</b>	<b>1</b>	250000	950	0.4	250000
	<b>2</b>	250000	7.5	0	250000
	<b>3</b>	250000	7.5	0	250000
	<b>4</b>	250000	15000	0.4	250000
	<b>5</b>	250000	250000	0.9	250000
<b>Muestreo 3</b>	<b>1</b>	250000	1.1	0.4	250000
	<b>2</b>	250000	3	1.4	250000
	<b>3</b>	250000	2	0	250000
	<b>4</b>	250000	6	2.5	250000
	<b>5</b>	250000	1.1	9.5	250000
<b>Muestreo 4</b>	<b>1</b>	250000	3	0	200
	<b>2</b>	250000	450	0	25
	<b>3</b>	250000	30	0	250
	<b>4</b>	250000	250	2.5	250
	<b>5</b>	250000	900	7.5	400

**Tabla 9.** Determinación de parámetros químicos muestreo de otoño.

	<b>Fósforo total ug/L</b>	<b>Nitratos ug/L</b>	<b>Nitritos ug/L</b>	<b>Amonio ug/L</b>
<b>M1</b>	157,5	123,58	5,72	304,25
<b>M1</b>	161,25	107,97	5,79	298,29
<b>M1</b>	155,625	0	0	0
<b>Blanco</b>	48,43	1,382	1,13	14,68
<b>Blanco</b>	47,1875	1,463	1,07	14,89

**Tabla 10.** Determinación de parámetros químicos muestreo de invierno.

	<b>Fósforo total ug/L</b>	<b>Nitratos ug/L</b>	<b>Nitritos ug/L</b>	<b>Amonio ug/L</b>
<b>M2</b>	64,06	176,26	5,22	64,68
<b>M2</b>	64,375	178,54	5,22	64,47
<b>M2</b>	64,6875	0	0	0
<b>Blanco</b>	48,43	1,382	1,13	14,68
<b>Blanco</b>	47,1875	1,463	1,07	14,89

**Tabla 11.** Determinación de parámetros químicos muestreo de primavera.

	<b>Fósforo total ug/L</b>	<b>Nitratos ug/L</b>	<b>Nitritos ug/L</b>	<b>Amonio ug/L</b>
<b>M3</b>	73,75	152,94	8,36	127,87
<b>M3</b>	69,375	151,21	9,3	127,87
<b>M3</b>	75,9375	0	0	0
<b>Blanco</b>	48,43	1,382	1,13	14,68
<b>Blanco</b>	47,1875	1,463	1,07	14,89

**Tabla 12.** Determinación de parámetros químicos muestreo de verano.

	<b>Fósforo total ug/L</b>	<b>Nitratos ug/L</b>	<b>Nitritos ug/L</b>	<b>Amonio ug/L</b>
<b>M4</b>	75,9375	159,02	5,79	24,68
<b>M4</b>	75	158,54	5,72	23,4
<b>M4</b>	74,6875	0	0	0
<b>Blanco</b>	48,43	1,382	1,13	14,68
<b>Blanco</b>	47,1875	1,463	1,07	14,89

### Preparación de reactivos

Determinación de fósforo total.

Reactivos:

1.- Ácido sulfúrico:

-ácido sulfúrico concentrado..... 250 mL

-agua destilada..... 750 mL

2.- Solución heptomolibdato de amonio:

-heptomolibdato de amonio..... 3.25 g

-agua destilada..... 100 mL

3.- Solución de tartrato de potasio y antimonio:

-tartrato de potasio y antimonio... 9g

-agua destilada .....100 mL

## 4.-Reactivo mixto:

- ácido sulfúrico.....200 mL
- solución de heptomolibdato de amonio.....45 mL
- solución de tartrato de potasio y antimonio.....5 mL

## 5.- Reactivo oxidante

- persulfato de potasio..... 5g
- ácido bórico..... 3g
- NaOH 0.375 mol./dm.....100 mL

## 6.- Ácido bórico:

- ácido bórico..... 7g
- agua destilada .....100 mL

Procedimiento: tomar 50 mL de muestra y agregar 5mL solución oxidante, luego autoclavar a 121° C/30 minuto. Dejar enfriar y adicionar 3mL de ácido ascórbico y 3mL de solución mixta.

## Determinación de amonio total

## 1.-Solución de NaOH 0.8N:

- NaOH..... 32g
- Agua destilada..... 100 mL

## 2.- Solución fenol:

-fenol.....	9.5 g
-etanol.....	100 mL
-agua destilada.....	250 mL

## 3.- Solución citrato trisódico:

-citrato trisódico.....	120g
-agua desionizada .....	250 mL
-NaOH 0.8N.....	5mL

## 4.- hipoclorito alcalino:

-hipoclorito alcalino.....	0.5g
-NaOH 0.8N.....	100mL

5.- Solución madre NH<sub>4</sub>Cl

-NH <sub>4</sub> Cl.....	0.3819g
-Agua desionizada.....	1000 mL

Procedimiento: 25 mL de muestra agregar 1 mL de solución fenol, 1 mL de solución citrato trisódico y 1 mL de solución de hipoclorito alcalino.



### Determinación de nitritos

#### 1.-Solución madre $\text{NO}^{-2}$

- $\text{NaNO}_2$ .....1.232g
- Agua destilada .....100 mL
- Cloroformo.....1mL

#### 2.- Solución intermedia

- solución madre  $\text{NO}^{-2}$ ..... 50 mL
- agua destilada .....250 mL

#### 3.- Solución de trabajo de nitrito:

- solución intermedia..... 50 mL
- agua exenta de nitrito..... 500 mL

Procedimiento: pasar 100 mL de muestra por la columna reductora, descartar los primeros 50 mL de muestra a los 50 mL restantes agregar 2 mL del reactivo de color.

#### 1.-Reactivo colorante:

- $\text{H}_3\text{PO}_4$  85% .....100mL
- sulfanilamida .....10 g
- N-(1-naftil) etilendiamina..... 1g

-agua destilada .....900 mL

Medio para solubilización de fosfatos:

1.-Medio ácido:

-agar peptona 1.2% .....200 mL

-FePO<sub>4</sub>.....0.4g

-Rojo alizarin.....0.2 mL

2.- Medio básico:

-agar peptona 1,2% .....200mL

-CaHPO<sub>4</sub>..... 0.4g

-Rojo alizarin.....0.2 mL

Medio para antibiograma:

-agar Müller- Hinton.....200 mL

-antibiótico..... 0.1g

Procedimiento: licuar el agar Müller-Hinton a 50° C, adicionar el antibiótico, luego agitar cuidadosamente el agar y verter en las placas petri.