

UCH-FC  
B. Ambiental  
P 222  
C.1



**UNIVERSIDAD DE CHILE - FACULTAD DE CIENCIAS**

**“DIFERENCIAS EN EL ENSAMBLE DE MACROINVERTEBRADOS BENTÓNICOS MEDITERRÁNEOS EN LUGARES CONTAMINADOS Y NO CONTAMINADOS: USO DE UNA METODOLOGÍA BASADA EN TAXONOMÍA TRADICIONAL Y MOLECULAR.”**

Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Biólogo con mención en Medio Ambiente

**NICOLÁS IGNACIO PARADA BUSTAMANTE**

Director del Seminario de título: Dr. David Véliz Baeza

Co-Directores de título: Dr. Claudio Quezada Romegialli

Msc. Irma Vila Pinto

Diciembre 2016

Santiago – Chile

ESCUELA DE PREGRADO – FACULTAD DE CIENCIAS – UNIVERSIDAD DE CHILE



## INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, que el Seminario de Título presentado por el candidato:

**NICOLÁS IGNACIO PARADA BUSTAMANTE**

**“DIFERENCIAS EN EL ENSAMBLE DE MACROINVERTEBRADOS BENTÓNICOS MEDITERRÁNEOS EN LUGARES CONTAMINADOS Y NO CONTAMINADOS: USO DE UNA METODOLOGÍA EN TAXONOMÍA TRADICIONAL Y MOLECULAR.”**

Ha sido aprobado por la Comisión evaluadora y revisora, como requisito parcial, para optar al título profesional de Biólogo con Mención en Medio Ambiente.

Dr. David Véliz Baeza  
**Director Seminario de Título**

Dr. Claudio Quezada Romegialli  
**Co-Director Seminario de Título**

Msc. Irma Vila Pinto  
**Co-Director Seminario de Título**

### **Comisión Revisora y Evaluadora**

Dr. Elie Poulin  
**Presidente y evaluador**

Ing. Sr. Hernán Latuz Abarzúa  
**Evaluador**



## BIOGRAFÍA



Nací en Santiago de Chile el 24 de agosto de 1988. Desde pequeño tuve la inquietud por aprender de la naturaleza, gracias al incentivo de mi madre y las oportunidades de mi padre. Estudié en el colegio Instituto Zambrano, donde compartí con mis compañeros desde los 6 hasta los 18 años. El grupo de guías y scouts Wuau-Karu fue una gran oportunidad para conocer la naturaleza en directo; ver nuestra flora y fauna nativa. Ya en la Universidad aprendí diversas materias, sobretodo en el área de la Limnología y Ecología acuática, pero lo que más me ha quedado de ella ha sido la oportunidad de conocer las diversas realidades que existen en nuestro país.

*“Sólo después de que se haya talado el ultimo árbol,  
sólo después de que se haya envenenado el ultimo río,  
sólo después de que se haya pescado el último pez,  
sólo entonces se darán cuenta de que el dinero no puede comerse.”*

Profecía de los indios Cree

## AGRADECIMIENTOS

Agradecer a David por el apoyo, confiar en mí y guiar este seminario, por la innumerables revisiones y aportes que fueron fundamental en el escrito, como también en las conversaciones triviales y amenas en los almuerzos que coordinábamos. A Claudio que ha sido un pilar fundamental en este trabajo, gracias por tu tiempo, incluirme en trabajos e iniciativas, dedicación a enseñarme y por sobre todo por compartir momentos inolvidables desde que llegué al laboratorio de Limnología. Agradecer también a la profesora Irma, por sus enseñanzas en el área de la Limnología y macroinvertebrados y por las conversaciones en los almuerzos donde conocí a la persona detrás del profesor e investigador.

A mis padres y hermanos, por las enseñanzas y por su cariño. A Joana, mi esposa, por ser un motor fundamental en mi diario vivir y por colaborar en los terrenos. A Noemí y Rocío que han contribuido en este Seminario de Título. A Mis compañeros de laboratorio por su compañía amena.

Al FPA NAC-I- 052-2014 que permitió la realización de mi seminario de título, como también a la beca de verano del IEB

Muchas gracias.

## INDICE DE CONTENIDOS

INDICE DE TABLAS _____	vii
ÍNDICE DE FIGURAS _____	viii
LISTA DE ABREVIATURAS _____	ix
RESUMEN _____	xi
ABSTRACT _____	xiii
<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
1.1. Hipótesis.....	7
1.2. Objetivo general.....	7
1.3. Objetivos específicos:.....	7
<b>2. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>9</b>
2.1. Área de estudio.....	9
2.2. Muestreo químico del agua y variables ambientales.....	11
2.2.1. Muestreo químico del agua.....	11
2.2.2. Muestreo e identificación de macroinvertebrados.....	11
2.3. Análisis morfológico de las muestras.....	13
2.4. Análisis genético de las muestras: extracción, amplificación y secuenciación masiva de ADN integrado.....	14
2.5. Tratamiento estadístico de las muestras.....	15
2.5.1. Análisis de datos físicos y químicos.....	15
2.5.2. Análisis de datos comunitarios.....	15

2.5.3. Análisis de datos genéticos.....	16
2.5.4. Comparación de la metodología morfológica y genética. ....	18
<b>3. RESULTADOS .....</b>	<b>19</b>
3.1. Resultados de parámetros físico-químicos. ....	19
3.2. Resultados comunitarios.....	21
3.3. Resultados de datos genéticos.....	24
3.4. Resultados de la comparación de la metodología morfológica y genética. ..	30
<b>4. DISCUSIÓN .....</b>	<b>42</b>
4.1. Factores físicos y químicos.....	42
4.2. Diversidad morfológica .....	43
4.3. Diversidad genética.....	45
4.4. Comparación de la metodología morfológica y genética. ....	47
<b>5. CONCLUSIÓN.....</b>	<b>50</b>
<b>6. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>51</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>56</b>

## INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Coordenadas geográficas de los sitios de muestreo. Isla de Maipo (A y B) y Melipilla (C y D) _____	10
Tabla 2. Sustratos muestreados por sitio, con ponderación de la presencia en cada tramo. _____	13
Tabla 3. Mediciones físicas y químicas de Isla de Maipo (A y B) y Melipilla (C y D) y scores del CP1. _____	20
Tabla 4. Análisis SIMPER de la comunidad de macroinvertebrados bentónicos según sitio de muestreo. _____	24
Tabla 5. Presencia y ausencia de Phyla obtenidos mediante identificación morfológica y genética. _____	37
Tabla 6. Presencia y ausencia de Clases obtenidos mediante identificación morfológica y genética. _____	37
Tabla 7. Presencia y ausencia de Ordenes obtenidos mediante identificación morfológica y genética. _____	38
Tabla 8. Presencia y ausencia de Familias obtenidos mediante identificación morfológica y genética. _____	39 y 40
Tabla 9. Presencia y ausencia de Géneros obtenidos mediante identificación morfológica y genética. _____	40
Tabla 10. Presencia y ausencia de Especies obtenidos mediante identificación morfológica y genética. _____	41



## ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1. Localización geográfica de las zonas de muestreo. Isla de Maipo (Sitios A y B) y Melipilla (Sitios C y D) y fotografía de los sitios. \_\_\_\_\_ 10
- Figura 2. Biplot del Análisis de Componentes Principales (ACP) de las estaciones de muestreo de Isla de Maipo (A y B) y Melipilla (C y D), a partir de variables físico-químicas del agua. \_\_\_\_\_ 20
- Figura 3. Resultados del Análisis de Componentes Principales (ACP) de los sitios de muestreo del Río Maipo, a partir de las abundancias transformadas de las familias de macroinvertebrados bentónicos. El PC1 representa 50,8% de la varianza y el PC2 el 29,1%. \_\_\_\_\_ 22
- Figura 4. Ordenación EMD-NM de las muestras según sitio y sustrato. Los triángulos verdes indican muestras provenientes de Isla de Maipo (sitios A y B) y los triángulos azules las muestras provenientes de Melipilla (sitios C y D). \_\_\_\_\_ 23
- Figura 5. Árbol originado mediante Neighbour Joining del sitio A de la zona Isla de Maipo. \_\_\_\_\_ 26
- Figura 6. Árbol originado mediante Neighbour Joining del sitio B de la zona Isla de Maipo. \_\_\_\_\_ 27
- Figura 7. Árbol originado mediante Neighbour Joining del sitio C de la zona Melipilla. \_\_\_\_\_ 28
- Figura 8. Árbol originado mediante Neighbour Joining del sitio D de la zona Melipilla. \_\_\_\_\_ 29
- Figura 9. Diagrama de Venn realizados con datos presencia y ausencia de taxa identificados mediante metodología morfológica (arriba) y molecular (abajo) \_\_\_\_ 30
- Figura 10. Análisis de Correspondencia, en base a la presencia y ausencia de taxa identificados mediante morfología. \_\_\_\_\_ 32
- Figura 11. Análisis de Correspondencia, en base a la presencia y ausencia de taxa identificados mediante genética. \_\_\_\_\_ 32

## LISTA DE ABREVIATURAS

AC	Análisis de Correspondencia
ACP	Análisis de Componentes Principales
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ANOSIM	Análisis de Similitud
BLAST	Basic local alignment search tool (Herramienta básica de búsqueda de alineación local)
C1	Correspondencia 1
C2	Correspondencia 2
Ca <sup>+2</sup>	Catión Calcio +2
Cl <sup>-</sup>	Anión Cloruro
CO <sub>3</sub> <sup>-2</sup>	Anión Carbonato
COI	Citocromo Oxidasa subunidad 1
CP1	Componente principal 1
CP2	Componente principal 2
DIA	Declaración de Impacto Ambiental
DMA	Directiva Marco del Agua
DS 90/2000	Decreto Supremo 90/2000
EIA	Estudio de Impacto Ambiental
EMD-NM	Escalamiento Multidimensional No Métrico
HPLC	High Performance Liquid Chromatography (Cromatografía líquida de alta eficiencia)
K <sup>+</sup>	Catión Potasio +1
LGBMA	Ley N°19.300 Sobre Bases Generales del Medio Ambiente

Mg <sup>2+</sup>	Catión Magnesio +2
MiQu	Macroinvertebrats Quantitatiu (Macroinvertebrados cuantitativo)
Na <sup>+</sup>	Catión Sodio +1
NGS	Next Generation Sequencing (Secuenciación masiva de ADN)
PCR	Polymerase Chain Reaction (Reacción en Cadena de la Polimerasa)
pH	Concentración de iones hidrógeno
RSEIA	Reglamento del Servicio de Evaluación de Impacto Ambiental
SEIA	Servicio de Evaluación de Impacto Ambiental
SIMPER	Similarity Percentage (Porcentage de Similitud)
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	Anión Sulfato

## RESUMEN

Los estudios de Impacto ambiental (EIA) requieren de una descripción pormenorizada de los componentes bióticos del lugar que será intervenido para otorgar el permiso respectivo, considerando entre otras cosas, la descripción [taxonómica] de macroinvertebrados bentónicos. Debido a la baja resolución taxonómica alcanzada y su consecuente deficiente descripción comunitaria, esta información no es suficiente para determinar la calidad ambiental, por lo que es necesario desarrollar nuevas herramientas que permitan un EIA más preciso y menos cuestionable. Nuevas tecnologías genómicas desarrolladas en los últimos años pueden ser de gran utilidad. Por ejemplo, el gen mitocondrial Citocromo oxidasa I (COI) aumentaría la resolución taxonómica de los individuos lo que valida esta metodología para el uso en gestión ambiental. Considerando esta información, el presente seminario tiene como objetivo determinar las diferencias en las comunidades de macroinvertebrados bentónicos de zonas contaminadas y no contaminadas de la cuenca del río Maipo comparando una aproximación morfológica y una a través de la secuenciación masiva. Se muestreó una zona no contaminada (Isla de Maipo) y una contaminada (Melipilla) dentro del Río Maipo en la Región Metropolitana utilizando la metodología MiQu (Universidad de Barcelona) para tomar muestras de macroinvertebrados donde se incorpora la velocidad en los sustratos muestreados. Se complementó esta aproximación con un análisis físico y químico de las muestras de agua de ambas zonas. Los invertebrados obtenidos con redes Surber fueron primero identificados morfológicamente y luego secuenciados con tecnología de próxima generación usando partidores universales para el gen COI. Los análisis físicos y químicos del agua indicaron que Melipilla posee aguas

degradadas en comparación a Isla de Maipo. Los análisis de diversidad, comúnmente usados en EIA, no mostraron diferencias entre zonas, exhibiendo baja resolución de separación de los sitios contaminados y no contaminados en un plano bidimensional cuando se usó información morfológica. Sin embargo, el análisis genómico permitió una mejor separación entre los sitios contaminados y no contaminados. Como información adicional se pudo asignar nombre específico a organismos que no se tenía información en el país además de poder detectar especies invasivas en las muestras. La fortaleza del análisis genómico de próxima generación mostró que es una novedosa metodología que podría ser utilizada como método de gestión ambiental.

## ABSTRACT

Environmental Impact Assessment (EIA) requires a detailed description of the biotic components of the sites that will be altered in order to obtain a permit. This EIA considers, among other variables, the [taxonomic] description of benthic macroinvertebrates. Due to the low taxonomic resolution achieved with morphological identification, commonly this information is not sufficient nor it is an optimal description of the environmental quality, thus it is necessary to develop new tools that allow a more accurate assessment. Next generation sequencing technologies can be very useful; for example, the mitochondrial gene Cytochrome oxidase I (COI) would increase the taxonomic resolution of individuals, emerging as an interesting tool for environmental assessment. Considering this information, the present study aims to determine the differences in communities of benthic macroinvertebrates from contaminated and uncontaminated areas of the Maipo River Basin by comparing both a morphological and a next generation sequencing approach. Two contrasting areas were chosen within the Maipo River Basin: a non-polluted (Isla de Maipo) and a polluted (Melipilla) site to perform this analysis. Using the MiQu methodology (University of Barcelona), macroinvertebrates were collected considering the velocity of the substrates. In order to characterize the abiotic environment, this approach was complemented with a physical and chemical analysis of water samples from both areas. Invertebrates obtained with Surber nets were first identified morphologically and then sequenced with next generation technology using new universal primers for the COI gene. Physical and chemical data indicated that Melipilla possesses degraded water conditions when compared to Isla de Maipo. Diversity analysis, commonly used in EIA, did not show differences between zones, exhibiting low

segregation of contaminated and uncontaminated sites in a two-dimensional plane when morphological information was used. However, genomic analysis explained better the differences between polluted and non-polluted sites in a two-dimensional plane. It is important to note that genomic analysis allows to assign specific name to organisms that previously had no information in the country, and remarkably detected the presence of four invasive invertebrate species. The strength of the genomic analysis showed that it is a novel methodology that could be used as an environmental management method useful in EIA.

## 1.INTRODUCCIÓN

La Ley N° 19300, Sobre Bases Generales del Medio Ambiente (LBGMA) (Ley N°19300, 1994) cambió nuestro enfoque respecto al medio ambiente y la evaluación de proyectos ambientales. Por un lado, definió conceptos como biodiversidad o contaminación desde un punto de vista legal, y, por otro lado, introdujo en Chile el Sistema de Evaluación de Impacto Ambiental (SEIA). El SEIA definió 2 instrumentos de gestión principalmente, los Estudios de Impacto Ambiental (EIA) y las Declaraciones de Impacto Ambiental (DIA). La diferencia entre EIA y DIA radica en el tipo y magnitud de los impactos definidos en el artículo 11 de la LBGMA que indica lo siguiente: "a) Riesgo para la salud de la población, debido a la cantidad y calidad de efluentes, emisiones o residuos; b) Efectos adversos significativos sobre la cantidad y calidad de los recursos naturales renovables, incluidos el suelo, agua y aire; c) Reasentamiento de comunidades humanas, o alteración significativa de los sistemas de vida y costumbres de grupos humanos; d) Localización próxima a población, recursos y áreas protegidas susceptibles de ser afectados, así como el valor ambiental del territorio en que se pretende emplazar; e) Alteración significativa, en términos de magnitud o duración, del valor paisajístico o turístico de una zona, y f) Alteración de monumentos, sitios con valor antropológico, arqueológico, histórico y, en general, los pertenecientes al patrimonio cultural.", en el caso que el proyecto cumpla alguno de los puntos antemencionados, se deberá realizar un EIA.

Los EIA, al ser estudios más acabados, exigen una información mínima a presentar que está definida en el artículo 12 de la LBGMA, y uno de los requerimientos es la



Línea de Base que en la misma ley está definida como "la descripción detallada del área de influencia de un proyecto o actividad, en forma previa a su ejecución" y lo que debe ir en ella está definido en el artículo 18 literal e) del Reglamento del Servicio de Evaluación de Impacto Ambiental (RSEIA). Dos de los requerimientos de la LB contempla análisis del medio físico y biológico en el área de impacto. En los sistemas dulceacuícolas, los análisis físicos están relacionados con caracterizaciones físico-químicas del agua con mediciones *in situ* y en laboratorio y, por otra parte, los análisis biológicos destacan el uso de la diversidad biológica de peces, macrófitas, zooplancton, fitoplancton y macroinvertebrados. Dada la importancia de estos últimos, se ha estudiado su uso y aplicabilidad como bioindicadores.

Para ser válidos como indicadores biológicos, los macroinvertebrados bentónicos han sido utilizados desde hace más de cien años como indicadores de calidad de aguas inicialmente con el índice saprobio propuesto por Kolkwitz y Marsson (1908). Su aplicabilidad en esta área ha ido creciendo al transcurrir las décadas hasta transformarse en una herramienta que incluye índices unimétricos, multimétricos, multivariados y los rasgos biológicos de especies ("*species traits*") (Prat y col., 2009). En la actualidad, estos organismos son ampliamente utilizados como bioindicadores, destacándose porque: **i)** poseen una amplia distribución geográfica y habitan diferentes tipos de ambientes, **ii)** tienen una gran riqueza de especies con amplia diversidad de respuestas a los gradientes ambientales, **iii)** son en su mayoría sedentarios, lo que permite el análisis espacial de la contaminación, **iv)** en algunos casos, es posible utilizar su reacción de huida (deriva) como indicador de contaminación, **v)** algunas especies poseen ciclos de vida prolongados lo que permite integrar los efectos de la contaminación en el tiempo, **vi)** permiten ser

muestreados de forma sencilla y barata, **vii)** existe una taxonomía general bien conocida a nivel de orden y familia, **viii)** la sensibilidad es bien conocida en muchos taxa a diferentes tipos de contaminación, y **ix)** se utilizan un gran número de especies en estudios experimentales sobre efectos de la contaminación (Bonada y col., 2006).

Una de las principales formas de estudiar a los macroinvertebrados bentónicos ha sido utilizando la taxonomía, basándose en claves creadas a partir de la morfología, donde, generalmente es posible identificar hasta el nivel de familia (Bonada y col., 2006). Sin embargo, el hecho de aumentar el nivel de resolución hacia género o especie se ve dificultado por la escasez de información disponible en estos niveles taxonómicos, lo cual se relaciona al tiempo requerido para analizarlas, y a la escasez de especialistas que puedan interpretarlas. Esto último conlleva a que no se pueda conocer la diversidad real de especies presentes en un ecosistema, añadiendo incertidumbre taxonómica y reduciendo la calidad de la información que es utilizada generalmente en estudios de impacto ambiental.

En Chile, el problema es aún un poco más complejo. Nuestras normas y leyes, por ejemplo, las secundarias de calidad ambiental y la misma ley 19.300, requieren de un buen análisis de información, sin embargo, no poseemos suficientes especialistas que estén trabajando en taxonomía, lo cual impide conocer la real diversidad de especies y el desarrollo de claves taxonómicas. Esto ha llevado a que exista una gran información recopilada en informes técnicos y científicos con baja resolución taxonómica y con una calidad discutible.

En los últimos años, metodologías adicionales han ayudado a identificar especies como complemento del reconocimiento morfológico. De gran ayuda fueron los partidores universales para el gen Citocromo Oxidasa I (COI) descritos por Folmer y

col (1994) y luego potenciados con la utilización de este gen como un barcódigo el cual puede ser utilizado como complemento para la identificación de especies (Hebert y col., 2003 a, 2003 b, 2004). Por otro lado, el desarrollo de la secuenciación masiva de ADN (Ácido desoxirribonucleico) (NGS: Next Generation Sequencing) ha permitido el análisis de cientos de miles de secuencias en una sola corrida de secuenciación (Metzker, 2010). En este sentido, es posible analizar muchas especies dentro de una misma muestra, tal como se ha realizado para bacterias (Vayssier-Taussat y col., 2013, Salipante y col., 2014) y levaduras (Wilkening y col., 2013). Solo recientemente se ha utilizado esta técnica para estudiar la diversidad invertebrados marinos (Leray y col., 2013, Lejzerowicz y col., 2015) y de otros sistemas (Ej. Lee y col., 2012, Ashfaq y col., 2013).

En Chile, una de las cuencas más contaminadas es la del Río Maipo. En esta cuenca vive el 40% de la población de Chile, cerca de 6.7 millones de habitantes de acuerdo al último censo del 2012 (Vega y col., 2014). Por este motivo la cuenca ha experimentado un deterioro de la calidad del agua, principalmente por la eutrofización (Pardo y col., 2008) producto de la materia orgánica. Sin embargo, desde al año 2000 con la promulgación del Decreto Supremo 90 (DS 90/2000), que norma las emisiones de contaminantes asociados a descargas de residuos líquidos sobre aguas marinas y continentales, ha habido una mejora en la calidad del río Maipo. No obstante, no fue hasta el año 2013, con la construcción de la planta Mapocho más el Trebal y La Farfana, construidas en 2001 y 2003 respectivamente, que se tratan el 100% de aguas residuales de Santiago, liberando las aguas al río Mapocho e ingresando posteriormente al Río Maipo en el sector de El Monte. El retorno de estas aguas es sólo para fines agrícolas, ya que no se logra eliminar los nutrientes (Ramalho, 1996).

Este sector productivo extrae agua, para sus cultivos, en gran medida disminuyendo considerablemente el caudal durante el estiaje, período en el cual el régimen hidrológico depende principalmente del derretimiento de las nieves.

La heterogeneidad ambiental es uno de los factores que se deben considerar en estudios comunitarios. En el caso de los macroinvertebrados bentónicos, la riqueza taxonómica será mayor mientras más tipos de sustratos se consideren, mientras más grande sean los perímetros de los parches muestreados y mientras mayor sea la agregación de estos (Beisel y col., 2000).

En el caso de los métodos analíticos que permiten encontrar diferencias y similitudes entre sitios estudiados, Hughes (1978) indica que existen cuatro factores importantes que influyen de gran manera el valor del índice de Shannon ( $H'$ ), uno de los índices más utilizados y reconocidos dentro de los estudios comunitarios. Estos factores son: i) el método de muestreo, ii) la estación del año, iii) el nivel de resolución taxonómica y iv) el área muestreada. Los dos últimos factores están directamente relacionados con esta tesis, ya que, se pone a prueba el nivel de resolución de la taxonomía comparando una aproximación morfológica y una aproximación genética; además es relevante abarcar no solo un área mayor con esta metodología de muestreo, sino también considerar los distintos tipos de microhábitat presentes en los ríos.

Existen muchas metodologías de muestreo de macroinvertebrados bentónicos, y el uso dependerá del objetivo del estudio. En la cuenca del río Maipo se han llevado a cabo varios de ellos, destacando dos de ellos que han recabado una vasta información sobre macroinvertebrados: el informe del Centro de Ecología Aplicada (CEA) (2004) y el estudio realizado por EULA-CONAMA (2008). Sin embargo, en ambos trabajos, las muestras no se colectaron separadamente diferenciando el

sustrato y la velocidad, sino que se mezclaron en un contenedor común o se tomaron desde sustratos estandarizados para todos los sitios (cuando estos sustratos estuvieron presentes). Esto imposibilita un análisis previo para establecer la relevancia de cada sustrato en la abundancia y presencia-ausencia de taxa raros.

Con estos antecedentes se puede observar un escenario complejo, donde los científicos que investigan estos sistemas en reiteradas ocasiones suelen lidiar con problemas tanto en terreno como en laboratorio; esto es considerando un bajo número de sustratos y replicas, y utilizando claves taxonómicas que carecen de una mayor resolución que la de familia.

Considerando lo que se ha planteado, generar una metodología de muestreo para diferenciar la abundancia y riqueza de los distintos sustratos presentes en un río es fundamental para la conservación de las especies, identificando así, en qué tipo de sustrato y velocidad es más probable encontrar ciertas familias. Sumado a esto, el poder identificar genéticamente a los individuos otorga mayor precisión a la evaluación ambiental, de forma tal que para los estudios de impacto ambiental y tribunales ambientales brindaría evidencia objetiva al momento de dirimir entre un permiso o una multa, sin dejar de lado el valor intrínseco que tiene el saber "quiénes son y dónde están", cuando nos referimos a las especies de invertebrados acuáticos.

En el presente seminario, comparo la diversidad de organismos obtenidos desde el bentos de zonas contaminadas y no contaminadas en la cuenca del río Maipo. Para ello describo las diferencias físicas y químicas de los sitios, además realizo un análisis de identificación morfológica de las especies presentes y una identificación genética de éstas utilizando secuenciación masiva de muestras integradas de ADN. Además, corroboro y rectifico especies de macroinvertebrados que ya habían sido

descritas en los informes CEA (2004) y EULA-CONAMA (2008) con ayuda de herramientas genéticas.

Con esta información se podrá evaluar si el aumento de la resolución taxonómica con herramientas genéticas de próxima generación permite un mejor análisis de la diversidad con el fin de realizar mejores medidas de gestión.

### **1.1.Hipótesis**

Hipótesis 1: Considerando el muestreo de lugares contaminados y no contaminados, los sitios contaminados presentaran menor diversidad de especies que los lugares no contaminados, considerando tanto el análisis morfológico como el genético.

Hipótesis 2: El análisis morfológico de las muestras mostrará menor diversidad de grupos taxonómicos que la secuenciación masiva de las mismas muestras.

### **1.2.Objetivo general**

Determinar diferencias en las comunidades de macroinvertebrados bentónicos de zonas contaminadas y no contaminadas de la cuenca del río Maipo utilizando identificación morfológica y a través de la secuenciación masiva.

### **1.3.Objetivos específicos:**

1.- Caracterizar los sitios contaminados y no contaminados utilizando información física y química obtenida *in situ* y en laboratorio, considerando especialmente aniones y cationes.

2.- Analizar y comparar la diversidad y composición de la comunidad de macroinvertebrados bentónicos, en zonas contaminadas y no contaminadas.

3.- Secuenciar el gen mitocondrial Citocromo Oxidasa I (COI) de macroinvertebrados mediante secuenciación masiva y asignar ranking taxonómico de acuerdo al procedimiento BLAST a un árbol originado mediante Neighbor Joining.

4.- Cuantificar diferencias obtenidas en la identificación de los taxones mediante asignación taxonómica basada en morfología y basada en análisis molecular

## 2.MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1.Área de estudio

Se eligieron dos zonas previamente determinados como no contaminado (Isla de Maipo) y contaminado (Melipilla), según Vega-Retter y col. (2014). Estos se encuentran a 36 km aproximadamente entre sí. Dentro de cada zona, se tomaron dos réplicas separadas por 200 m, siendo réplicas los sitios A y B, en Isla de Maipo y, C y D, en Melipilla, denominados en adelante sitios (Fig. 1). Los terrenos fueron realizados en los meses de enero (campana exploratoria) y entre el 6 y el 23 de marzo de 2015 (Tabla 1).

Tabla 1. Coordenadas geográficas de los sitios de muestreo. Isla de Maipo (A y B) y Melipilla (C y D)

Sitio	Latitud	Longitud
Isla de Maipo A	-33.771182°	-70.908856°
Isla de Maipo B	-33.768651°	-70.910396°
Melipilla C	-33.721684°	-71.211813°
Melipilla D	-33.722974°	-71.215015°

Cabe destacar que los sitios muestreados fueron seleccionados en base al acceso, al parentesco de los sustratos y a la geografía de las zonas con el fin de evitar que otros factores influyan en las mediciones de los parámetros físicos-químicos y biológicos.



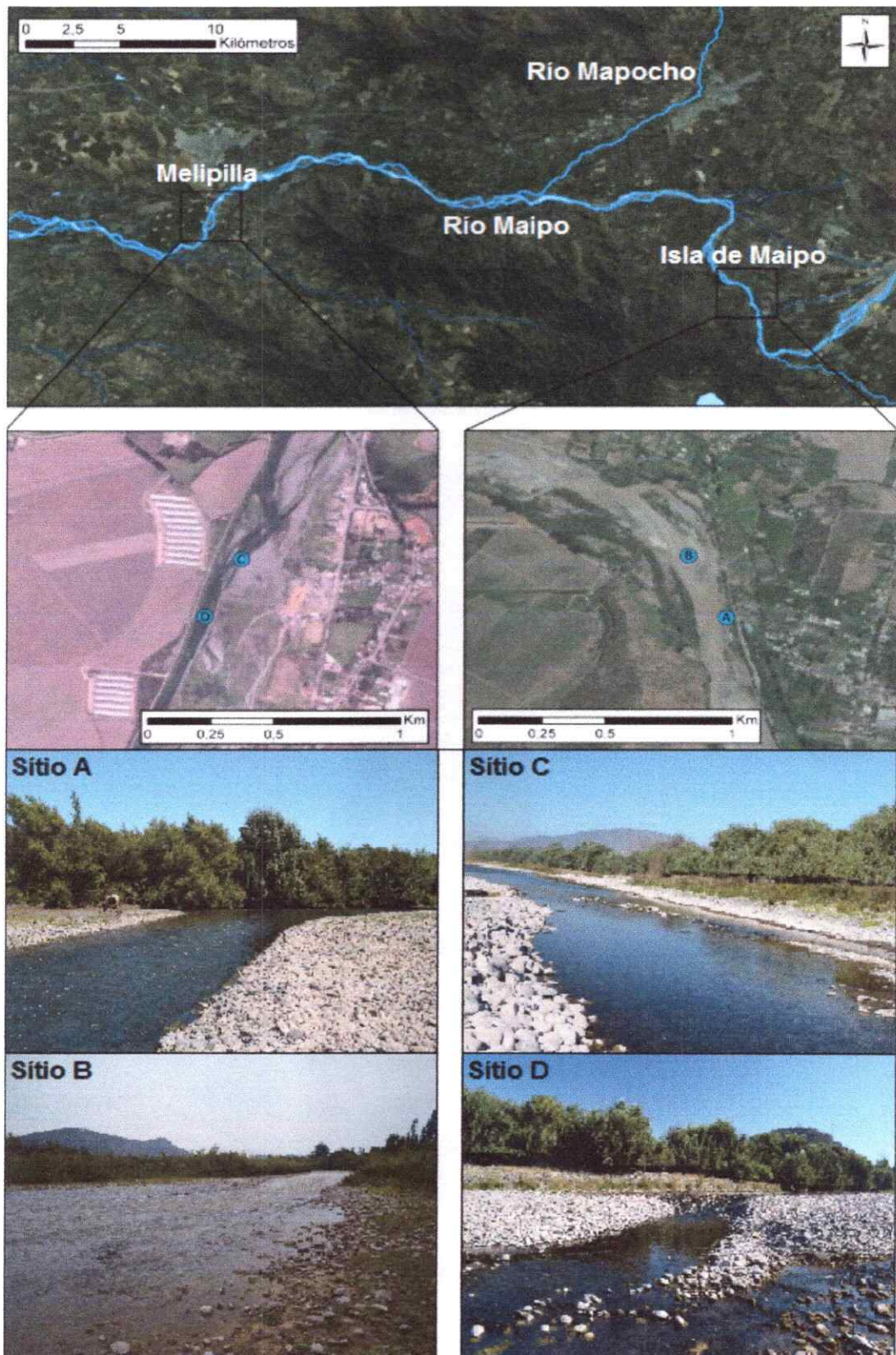


Figura 1. Localización geográfica de las zonas de muestreo. Isla de Maipo (Sitios A y B) y Melipilla (Sitios C y D), y fotografías de los sitios.

## **2.2.Muestreo químico del agua y variables ambientales**

### **2.2.1.Muestreo químico del agua**

Datos *in situ* fueron tomados con la ayuda de una sonda multiparámetro marca Wissenschaftlich-Technische Werkstätten (WTW) modelo Multi 3430 Set G. En cada punto de muestreo y de forma aleatoria dentro del agua, se tomaron dos mediciones de pH, temperatura (°C), conductividad ( $\mu\text{S}/\text{cm}^{-1}$ ), oxígeno disuelto ( $\text{mg l}^{-1}$ ) y salinidad. Posteriormente se tomaron muestras de agua en contenedores de 0.5 L, cuidando que no entren burbujas de oxígeno u otros objetos contaminantes como ramas u hojas; se guardaron en frío para el transporte y luego fueron analizadas en el laboratorio de Química Ambiental de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile.

En laboratorio se cuantificaron los cationes: Sodio +1 ( $\text{Na}^+$ ), Calcio +2 ( $\text{Ca}^{2+}$ ), Potasio +1 ( $\text{K}^+$ ) y Magnesio +2 ( $\text{Mg}^{2+}$ ) y aniones: Cloruro ( $\text{Cl}^-$ ), Carbonato ( $\text{CO}_3^{2-}$ ), y Sulfatos ( $\text{SO}_4^{2-}$ ) utilizando cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) con el protocolo descrito en Sadzawka y col. (2006) y Copaja y col. (2014).

### **2.2.2. Muestreo e identificación de macroinvertebrados**

Para obtener la mejor representación de la diversidad de organismos lo importante es considerar la mayor cantidad de microhábitats en cada sitio que será muestreado, por ejemplo, arena, rocas, curso de agua con rápidos, etc. Para lograr esto, se modificó el protocolo MiQu (Macroinvertebrats Quantitatiu) propuesto por Prat y col. (2012). En cada sitio, el área de muestreo abarcó una longitud de aproximadamente

200 m. con una separación entre sitios de 150 m. a 200 m., posterior a este proceso, se revisó y analizó la cobertura del lecho del río mediante análisis visual en un terreno previo en ambas zonas donde se determinó los sustratos presentes, con sus respectivas velocidades determinadas cualitativamente por el rizado del agua (pudiendo ser velocidad Rápida *Rá*, Media *Me* y Lenta *Le*). Las dos coberturas que estuvieron presente en todos los sitios de muestreo (sustratos "comparables") fueron Roca (Ro) y Microalga Filamentosa (Ma), donde se colectaron muestras con estos dos sustratos y asignando una de las velocidades antemencionadas, por ejemplo, Ma-Ro-Rá, siendo Microalga Filamentosa y Roca en velocidad Rápida, teniendo, en consecuencia, 3 sustratos comparables para todos los sitios. Posteriormente se colectaron 2 sustratos, denominados "no comparables" que no estuvieron presentes en todos los sitios de muestreo. En total, se obtuvo 5 muestras por sitio con sus respectivas réplicas. Por último, se asignó a cada sustrato la proporción al área total de muestreo. Los respectivos sustratos y velocidades de las muestras de cada sitio se resumen en la Tabla 2.

Una vez que se determinó los sustratos presentes en cada sitio, se utilizó una red Surber (0,09 m<sup>2</sup> y 250 µm de abertura) para extraer las muestras, rotulando en los frascos los dos sustratos y la velocidad predominante en ese microhábitat. Las muestras fueron fijadas y preservadas en etanol 95%.

Tabla 2. Sustratos muestreados por sitio, con ponderación de la presencia en cada tramo.

Muestra	Isla de Maipo				Melipilla			
	A	%	B	%	C	%	D	%
1	Ma-Ro-Rá	15	Ro-Ma-Rá	60	Ma-Ro-Rá	15	Ro-Ma-Rá	10
2	Ma-Ro-Me	15	Ro-Ma-Me	10	Ma-Ro-Me	15	Ro-Ma-Me	10
3	Ma-Ro-Le	15	Ro-Ma-Le	10	Ma-Ro-Le	20	Ro-Ma-Le	10
4	Ro-Rá	10	Ma2-Ro-Me	10	Ma2-Se-Le	10	Se-Le	35
5	Se-Le	45	Ro-Se-Le	10	Ro-Se-Le	40	Ro-Se-Le	35

Sustratos: Ma (Microalga Filamentosa), Ro (Roca), Se (Sedimento), Ma2 (Macrófita)  
 Velocidades: Rá (Rápido), Me (Media), Le (Lento). Muestras 1,2 y 3: Sustratos Comparables.  
 Muestras 4 y 5: Sustratos no comparables

### 2.3. Análisis morfológico de las muestras

La identificación de insectos mediante morfología se realizó bajo una lupa estereoscópica Nikon y se utilizó las guías de Dominguez y Fernández (2009), Palma (2013) y Tachet (2010). Los insectos/macroinvertebrados fueron asignados a la categoría taxonómica de Familia, en lo posible. En las muestras que presentaron una gran abundancia de individuos, se analizó 1/6 de ésta y posteriormente se procedió a una revisión general de la muestra, por si aparecen otros taxa. Si la fracción analizada contuvo menos de 300 individuos, se procedió a contar otra fracción hasta que se completaron los 300 o más individuos contabilizados, luego se ponderó por la fracción analizada para obtener los individuos totales en cada muestra. Los macroinvertebrados fueron separados, contados, fotografiados y conservados en tubos Eppendorf con etanol al 95%.





## **2.4. Análisis genético de las muestras: extracción, amplificación y secuenciación masiva de ADN integrado**

Desde los tubos Eppendorf que contienen los macroinvertebrados obtenidos anteriormente, se realizó la extracción de ADN mezclando individuos enteros (en el caso de que sean pequeños) o trozos de tejido (en el caso de que sean de gran tamaño) de la misma familia por sitio y se cuantificó el número de individuos que fueron integrados. En este sentido, se utilizaron seis tubos de extracción por cada sitio de muestreo.

Para la obtención del ADN se utilizó un kit QiaGen. Posteriormente se midió la concentración de ADN en un microespectrofotómetro Nanodrop (Thermo Scientific) para luego realizar una "*Polymerase chain reaction*" (PCR, Reacción en cadena de la polimerasa). Luego, las muestras fueron limpiadas con AMPure. Los ciclos de PCR consistieron en 3 minutos a 95°C, luego 16 ciclos que incluyen: 10 segundos a 95°C, 30 segundos a 62°C (bajando 1°C por cada ciclo) para finalizar con 1 min a 72°C, posterior a esto, 25 ciclos: 10 segundos a 95°C, 30 segundos a 46°C y un minuto a 72°C por cada ciclo. Se finalizó la PCR con una elongación final de 10 minutos a 72°C.

Para el estudio se amplificó una región de 300 pb del gen COI del ADN mitocondrial utilizando dos partidores degenerados: el primero, jgHCO2198: 5' TAIACYTCIGGRTGICCRAARAAYCA 3' descrito por Geller y col. (2013) y el segundo: WACWGGWTGAACWGTWTAYCCYCC descrito por Leray y col. (2013) con el fin de amplificar una gran cantidad de especies. Estos dos partidores permiten amplificar un fragmento de 300 pares de bases, tamaño ideal para ser tratados en un secuenciador masivo Ion Torrent.

Para lograr esta secuenciación masiva, se realizó una segunda PCR sobre la primera PCR (mismos ciclos de amplificación) con partidores modificados que contenían la región de reconocimiento del secuenciador masivo Ion Torrent y barcódigos (Anexo 1) que permitieron la identificación bioinformática de las muestras de cada sitio analizado. Estos partidores se modificaron siguiendo las recomendaciones de Whiteley y col. (2012).

## **2.5.Tratamiento estadístico de las muestras**

### **2.5.1.Análisis de datos físicos y químicos**

Las variables físicas (Temperatura, pH, conductividad eléctrica, oxígeno disuelto y salinidad) y químicas (cationes:  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^+$  y  $\text{Mg}^+$ , y aniones:  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{CO}_2^{-3}$  y  $\text{SO}_4^{-2}$ ) obtenidas en los sitios muestreados se tabularon para ser tratados con el software Primer 6.0 (Clarke y Gorley, 2006). Se realizó un Análisis de Componentes Principales (ACP) con el fin de ordenar en el espacio multivariado los sitios muestreados además de determinar que variables físicas y químicas permiten la segregación de estos sitios en los dos primeros componentes que expliquen de mayor forma la varianza. Se realizó un análisis estadístico no paramétrico de Kruskal-Wallis con los valores de los scores obtenidos del Componente Principal 1 (CP1) del ACP.

### **2.5.2.Análisis de datos comunitarios**

Se tabuló los datos en una matriz de doble entrada con taxa y muestras por sitio, posteriormente se transformaron a abundancias relativas, se multiplicó por el área de

la red Surber (0,09 m<sup>2</sup>) y se ponderó por la cobertura porcentual del sustrato correspondiente de la superficie total de cada tramo muestreado (Tabla 2). Para cada sitio, se evaluó aquellas variables ecológicas que caracterizan la comunidad de macroinvertebrados bentónicos: riqueza total de taxa (S), diversidad de Shannon-Wiener (H'), dominancia de Simpson (D), y abundancia relativa. También se realizó un ACP con las abundancias previamente transformadas. Las variables ecológicas fueron calculadas en el programa PRIMER 6.0 (Clarke y Gorley, 2006) y el ACP en R versión 3.3.0 (R Core Team, 2016).

Con el fin de ordenar los sitios, con la tabla de doble entrada se creó una matriz de similitud con medida de similaridad de Bray Curtis, luego se realizó un escalamiento multi-dimensional no métrico (EMD-NM o non-metric Multidimensional scaling NMDS en inglés) y dos Análisis de Similitud (ANOSIM): el primero de una vía entre los sustratos comparables utilizando como factor la contaminación (contaminado v/s no contaminado), y el segundo de dos vías anidado donde todos los sustratos están anidados en el factor principal, contaminación. Para ambos ANOSIM se utilizó 9999 permutaciones. Para explicar las diferencias en la composición entre sitios se realizó finalmente un análisis de Porcentajes de Similitud (Similarity Percentage o SIMPER). En todos los análisis se aplicó una transformación Log (X+1) a la tabla de datos tratados previamente para disminuir las diferencias entre las grandes abundancias y los datos que corresponden a ausencia de individuos en cada muestra.

### **2.5.3. Análisis de datos genéticos**

Los datos obtenidos de cada sitio (A y B de Isla de Maipo, C y D Melipilla) de la secuenciación masiva fueron separados según su barcodigo y luego se eliminó los

segmentos correspondientes a estos y a los partidores con el programa ClinQC (<https://sourceforge.net/projects/clinqc/>), obteniendo archivos en formato FASTQ para cada sitio con secuencias limpias del gen COI (Pandey y col., 2016). Estos últimos fueron tratados con el programa online PRINSEQ versión 0.20.4 utilizando los siguientes parámetros: eliminación de secuencias que tuvieran menos de 200 pares de bases, una puntuación mínima de la calidad (Minimum Quality Score) de 10, un promedio de puntuación mínima de la calidad (Minimum mean quality score) de 20, que tuvieran caracteres que no sean ATCGN, que sean secuencias exactas duplicadas, nivel de entropía (Entropy) de 20 y se cortaron las 15 primeras bases del extremo 5' (Trim nucleotides 5'). El archivo resultante se exportó en un formato FASTA para el mejor manejo de los análisis comparativos.

Utilizando el software MEGA v 6.06 se alinearon las secuencias con el método ClustalW, con las opciones por defecto y exportando el archivo a un formato MEGA. Posteriormente se seleccionaron las primeras 300 secuencias (menos en el caso del sitio C donde se usaron 227 secuencias que corresponden al máximo disponible) para generar otro archivo con el que se generaron los árboles de ordenación. Para esto se construyeron los árboles con el mismo programa con el método del "*vecino más cercano*" (Neighbor Joining) con 1000 remuestreos (bootstrap = 1000). Las secuencias de cada árbol fueron contrastadas con la base de datos genética de Genbank con BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) y se anotó el taxa correspondiente con el porcentaje de identificación. Por último, los árboles fueron editados con el software FigTree v 1.4.2 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>).



#### **2.5.4.Comparación de la metodología morfológica y genética.**

Con el fin de comparar los resultados obtenidos en base al análisis morfológico versus el análisis genético se cuantificó el número de taxa obtenido por cada uno de los análisis. Considerando que el análisis genético sólo permite obtener valores de presencia de especie, se construyó bases de datos conteniendo 0 (ausencia) y 1 (presencia) tanto para el análisis morfológico y el análisis genético. La segregación en el espacio multivariado se comparó cualitativamente al realizar un Análisis de Correspondencia (Correspondence Analysis, AC) para cada base de datos. Borcard y col. (2012) indican que este tipo de análisis es ideal para ordenar en el espacio bases de datos de presencia (1) y ausencia (0) de especies. El AC fue realizado en R versión 3.3.0 (R Core Team, 2016).

## 3.RESULTADOS

### 3.1.Resultados de parámetros físico-químicos.

El Análisis de Componentes Principales (ACP) realizado con las variables fisicoquímicas mostró una segregación espacial de los sitios (Figura 2). El ACP mostró que los dos primeros componentes representaron el 75,8% de la varianza (Figura 2), en el CP1, que representó el 52,4 % de la varianza total, las variables que más pesaron fueron pH, conductividad eléctrica, oxígeno disuelto, temperatura, Cl<sup>-</sup> y Ca<sup>+</sup>. A su vez, en el CP2, que representó el 23,4% de la varianza total, las variables que más pesaron fueron salinidad, Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> y Mg<sup>+</sup>. Además, el ACP mostró una segregación en torno al eje del CP1 de los sitios correspondientes a no contaminado, Isla de Maipo (A y B), y contaminado, Melipilla (C y D). Por el contrario, el CP2 mostró una segregación contraria a la del CP1. Reafirmando esta diferencia cualitativa, de los sitios el test de Kruskal-Wallis realizado con los scores del CP1 (Tabla 3), mostró diferencias significativas en las características físicas y químicas entre las zonas Isla de Maipo y Melipilla, utilizando los sitios como réplicas (Chi cuadrado del test de Kruskal Wallis = 5,34 p <0,02). Las mediciones físicas y químicas de los sitios se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Mediciones físicas y químicas de Isla de Maipo (A y B) y Melipilla (C y D) y scores del CP1.

Parámetro	Isla de Maipo				Melipilla			
	A	B	C	D	A	B	C	D
T(°C)	18,90	19,00	18,60	18,60	18,30	18,10	18,20	18,30
pH	9,20	9,20	9,12	9,11	8,05	8,07	8,10	8,12
Conductividad ( $\mu\text{S}/\text{cm}^{-1}$ )	1399,00	1402,00	1394,00	1400,00	1448,00	1449,00	1445,00	1453,00
Oxígeno disuelto ( $\text{mg l}^{-1}$ )	12,19	11,91	11,79	12,10	9,00	9,04	9,11	9,07
Salinidad	0,70	0,70	0,60	0,70	0,70	0,70	0,70	0,70
Na <sup>+</sup> (ppm)	9,06	10,79	15,06	14,99	8,90	13,80	6,75	13,37
K <sup>+</sup> (ppm)	2,22	2,10	1,09	1,07	1,59	2,52	1,27	2,67
Ca <sup>2+</sup> (ppm)	3,25	3,32	2,99	2,97	3,23	4,51	3,44	4,45
Mg <sup>2+</sup> (ppm)	2,35	2,40	3,68	3,61	2,79	3,00	2,77	3,03
CO <sub>2</sub> <sup>3-</sup> ( $\text{mg l}^{-1}$ )	25,36	23,89	35,49	33,76	60,76	37,80	31,88	31,20
Cl <sup>-</sup> ( $\text{mg l}^{-1}$ )	68,65	63,21	76,54	73,89	97,12	161,56	122,87	140,95
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> ( $\text{mg l}^{-1}$ )	115,78	121,65	256,31	253,89	203,35	363,62	256,08	353,80
Scores CP1	2,49	2,57	2,63	2,11	-1,66	-3,43	-1,75	-2,79

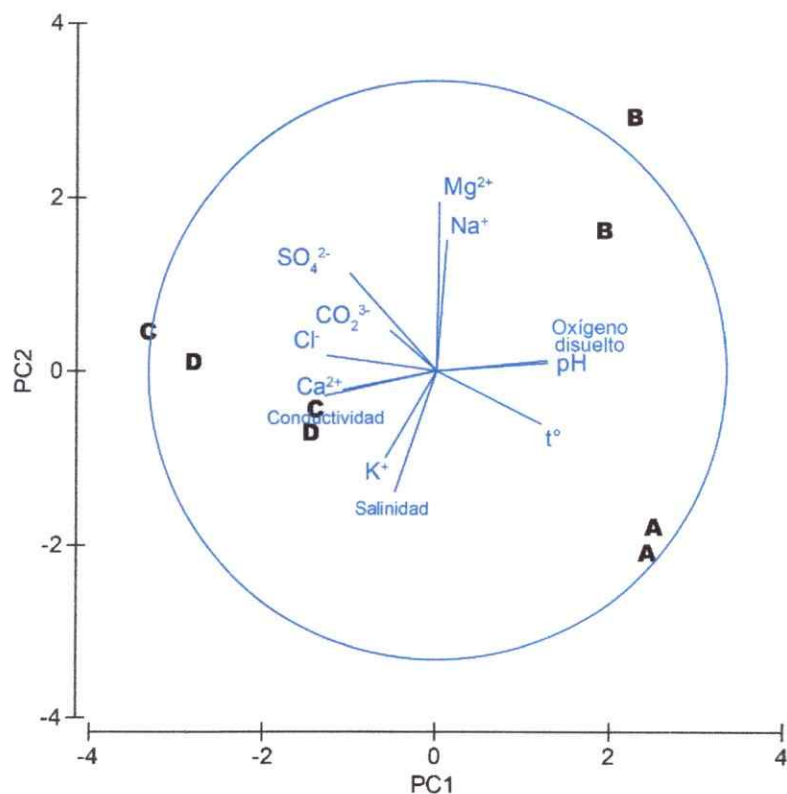


Figura 2. Biplot del Análisis de Componentes Principales (ACP) de las estaciones de muestreo de Isla de Maipo (A y B) y Melipilla (C y D), a partir de variables físico-químicas del agua.

### 3.2.Resultados comunitarios

Un total de 29 taxa de macroinvertebrados bentónicos fueron identificados mediante morfología, tres de estos no pudieron ser identificados a nivel de familia (Verme No Identificado, Diptera No Identificado y Heteroptera No Identificado). La abundancia (Anexos 2, 3, 4 y 5) y riqueza no mostraron diferencias cualitativas aparentes cuando se observa el número de taxa, así como los índices de diversidad calculados (Shannon-Wiener, Simpson y Equitatividad) (Anexo 6).

El ACP mostró que los CP 1 y 2 representaron el 79,9 % de la varianza con 50,8 % y 29,1 % respectivamente (Figura 3). En el CP1, las variables que más pesaron fueron: Hydrophilidae, Elmidae, Hydropsychidae, Verme No Identificado y Dugesidae. Además, el ACP mostró una segregación en torno al eje del CP1 de los sitios correspondientes al sector no contaminado, Isla de Maipo (A y B), y los sitios correspondientes al sector contaminado, Melipilla (C y D) (Figura 3).

El escalamiento multidimensional no métrico (EMD-NM) igualmente mostró una segregación espacial de los sitios contaminados y no contaminados en un plano bidimensional (Figura. 4), lo cual confirma lo observado con el ACP. Considerando únicamente los sustratos comparables, los resultados del ANOSIM de una vía mostraron diferencias significativas entre las abundancias relativas de macroinvertebrados bentónicos de las zonas Isla de Maipo y Melipilla con un R global de 0,466 ( $p < 0.001$ ). Considerando todos los sustratos, el ANOSIM de dos vías anidado mostró diferencias significativas entre los sitios ( $R = 0,519$ ;  $p < 0.001$ ) y sustratos dentro de los sitios ( $R = 0,828$ ;  $p < 0.001$ ).

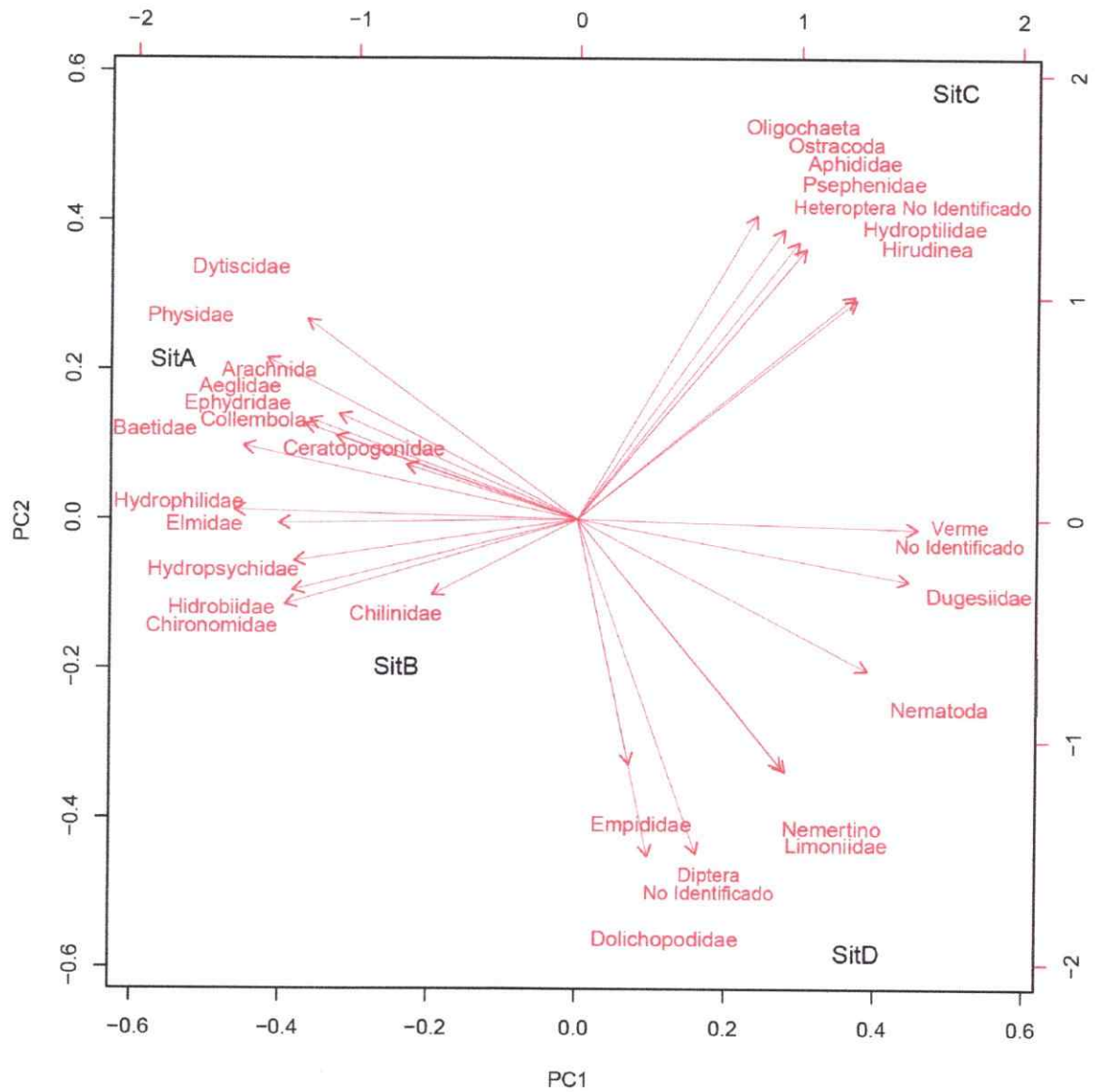


Figura 3. Resultados del Análisis de Componentes Principales (ACP) de los sitios de muestreo del Río Maipo, a partir de las abundancias transformadas de las familias de macroinvertebrados bentónicos. El PC1 representa 50,8% de la varianza y el PC2 el 29,1%

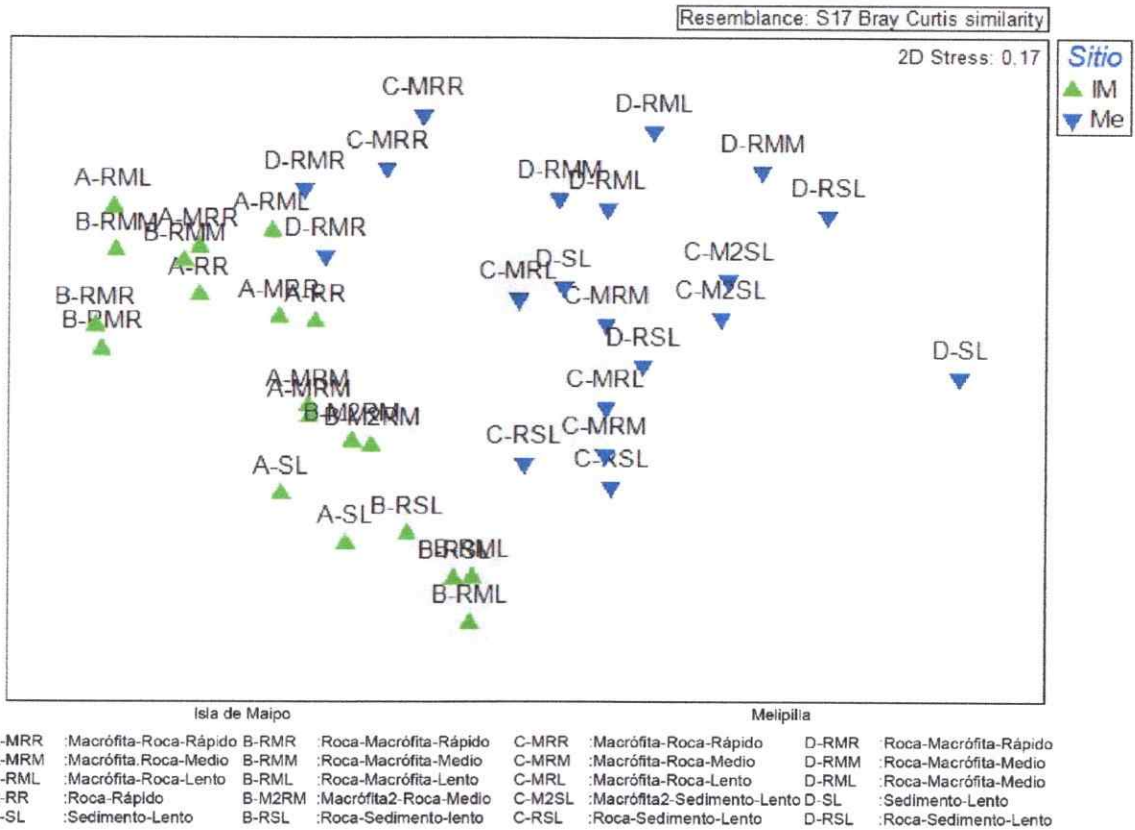


Figura 4. Ordenación EMD-NM de las muestras según sitio y sustrato. Los triángulos verdes indican muestras provenientes de Isla de Maipo (sitios A y B) y los triángulos azules las muestras provenientes de Melipilla (sitios C y D).

El análisis SIMPER (Tabla 4) mostró que la similitud dentro de Isla de Maipo fue de 32,92 % donde 4 familias (Hydropsychidae, Physidae, Chironomidae y Elmidae) contribuyen al 92 % de similitud. En el caso de Melipilla la similitud fue de 22,50 % donde 8 taxa (Nematoda, Verme No Identificado, Dugesidae, Hydroptilidae, Elmidae, Nemertea, Ostracoda y Physidae) contribuyen al 94 % de similitud. Entre Isla de Maipo y Melipilla se observó una disimilitud de 89,42 %.

Tabla 4. Análisis SIMPER de la comunidad de macroinvertebrados bentónicos según sitio de muestreo.

Sitio	Familia	Similitud promedio	Contribución %	Acumulado %
Isla de Maipo (Promedio Similitud = <b>32,92 %</b> )	Hydropsychidae	9,70	29,48	29,48
	Physidae	9,03	27,43	56,91
	Chironomidae	7,78	23,62	80,53
	Elmidae	3,78	11,47	<b>92,00</b>
Melipilla (Promedio Similitud = <b>22,50 %</b> )	Nematoda	7,76	34,50	34,50
	Verme No Id	2,97	13,21	47,71
	Dugesidae	2,25	10,00	57,70
	Hydroptilidae	2,24	9,97	67,67
	Elmidae	1,79	7,93	75,61
	Nemertea	1,51	6,71	82,32
	Ostracoda	1,50	6,68	89,00
	Physidae	1,22	5,43	<b>94,43</b>
Promedio de Disimilitud Isla de Maipo & Melipilla = <b>89,42 %</b>				

### 3.3. Resultados de datos genéticos

La cantidad de secuencias para los sitios de Isla de Maipo fue de 1231 (sitio A) y 845 (sitio B), y en Melipilla 227 (sitio C) y 621 (sitio D). Es importante indicar que se obtuvo más de 30000 secuencias validadas para cada corrida, sin embargo y como se explicó en Materiales y Métodos, para garantizar la calidad de la información entregada se retuvieron solo secuencias que mostraban una muy alta calidad, esto es altos valores promedios y por base del índice Q.

Con esta información se construyeron árboles de distancias en los cuales se pudo definir grupos genéticos y su relación con información presente en GenBank. Cabe destacar que estos árboles no son filogenéticos. En este análisis, los árboles obtenidos de Isla de Maipo (árboles A y B, Figuras 5 y 6 respectivamente) reflejan que existe una riqueza de grupos mayor en comparación con los árboles de Melipilla (árboles C y D, Figuras 7 y 8 respectivamente). Es importante indicar que gran parte

de los grupos fue posible de asignar a organismos de vida dulceacuícola, excepto algunas secuencias que no pueden ser reconocidas con organismos presentes en la base de datos. La mayor parte de las secuencias correspondieron a insectos, sin embargo, la mayoría no fue posible identificar hasta el nivel de especies.

Es importante indicar que esta metodología permitió identificar grupos a nivel de género y especie. En la zona de Isla de Maipo, el sitio A, por ejemplo, tuvo presencias de *Potamopyrgus antipodarum* (Phylum Nemertea), *Aegla laevis* (Clase Malacostraca) e inclusive la sub especie *laevis* (*Aegla laevis laevis*) y *Smicridea murina* (Orden Trichoptera). En el sitio B se logró identificar *Protostoma graecense* (Phylum Nemertea), el género Chilina (*Chilina sp.*), *Potamopyrgus antipodarum* (Clase Gastropoda), *Physa acuta* (Clase Gastropoda) y *Smicridea murina*. En la zona de Melipilla, el sitio C se registró los géneros Chilina, Eucypris (Clase Ostracoda) y la especie *Eucypris virens*. Por último, en el sitio D, se encontraron los géneros Chilina y Scatella (Orden díptera) y las especies *Physa acuta*, *Smicridea murina* y *Eucypris virens*.



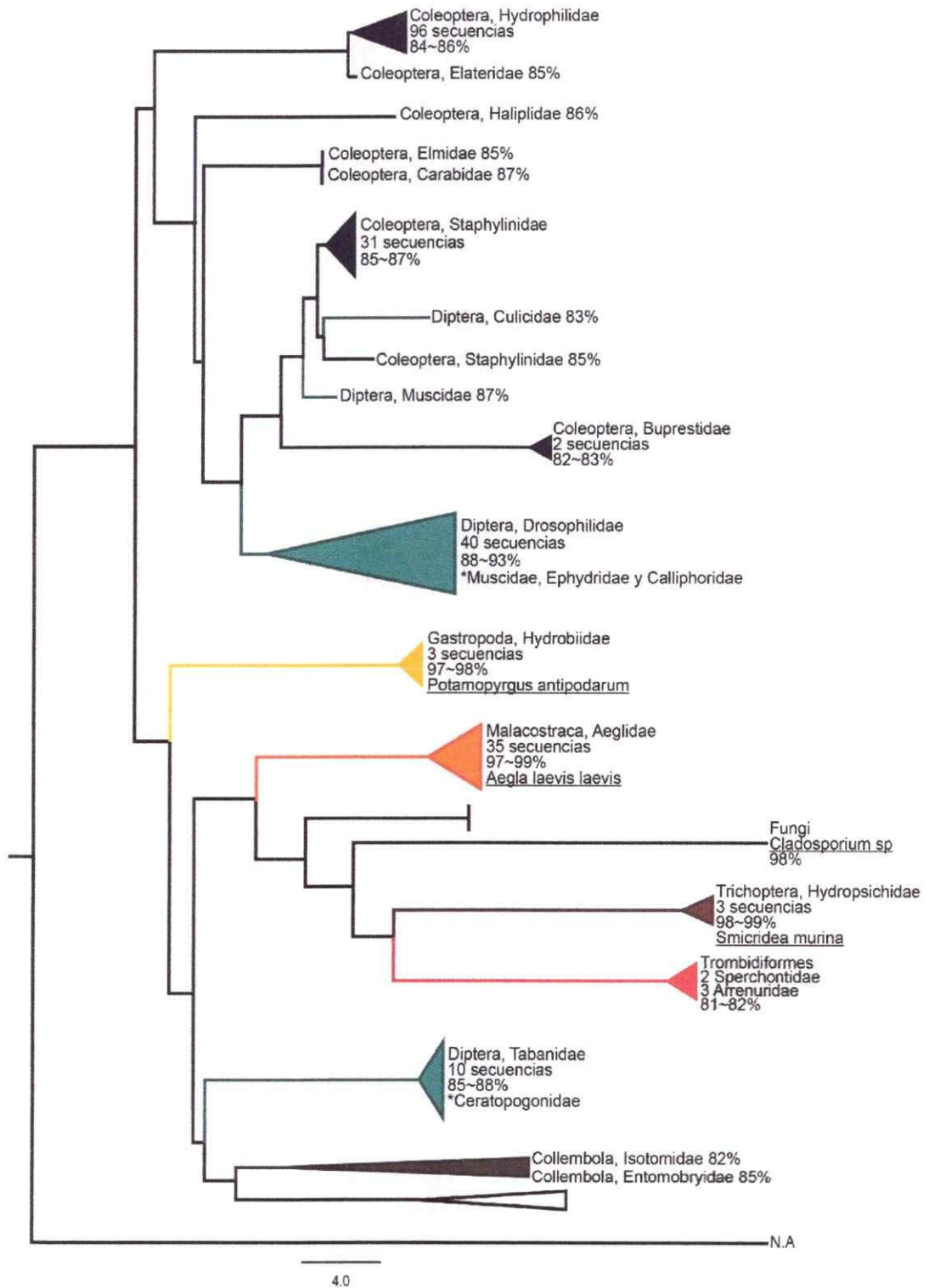


Figura 5. Árbol originado mediante Neighbour Joining del sitio A de la zona Isla de Maipo.

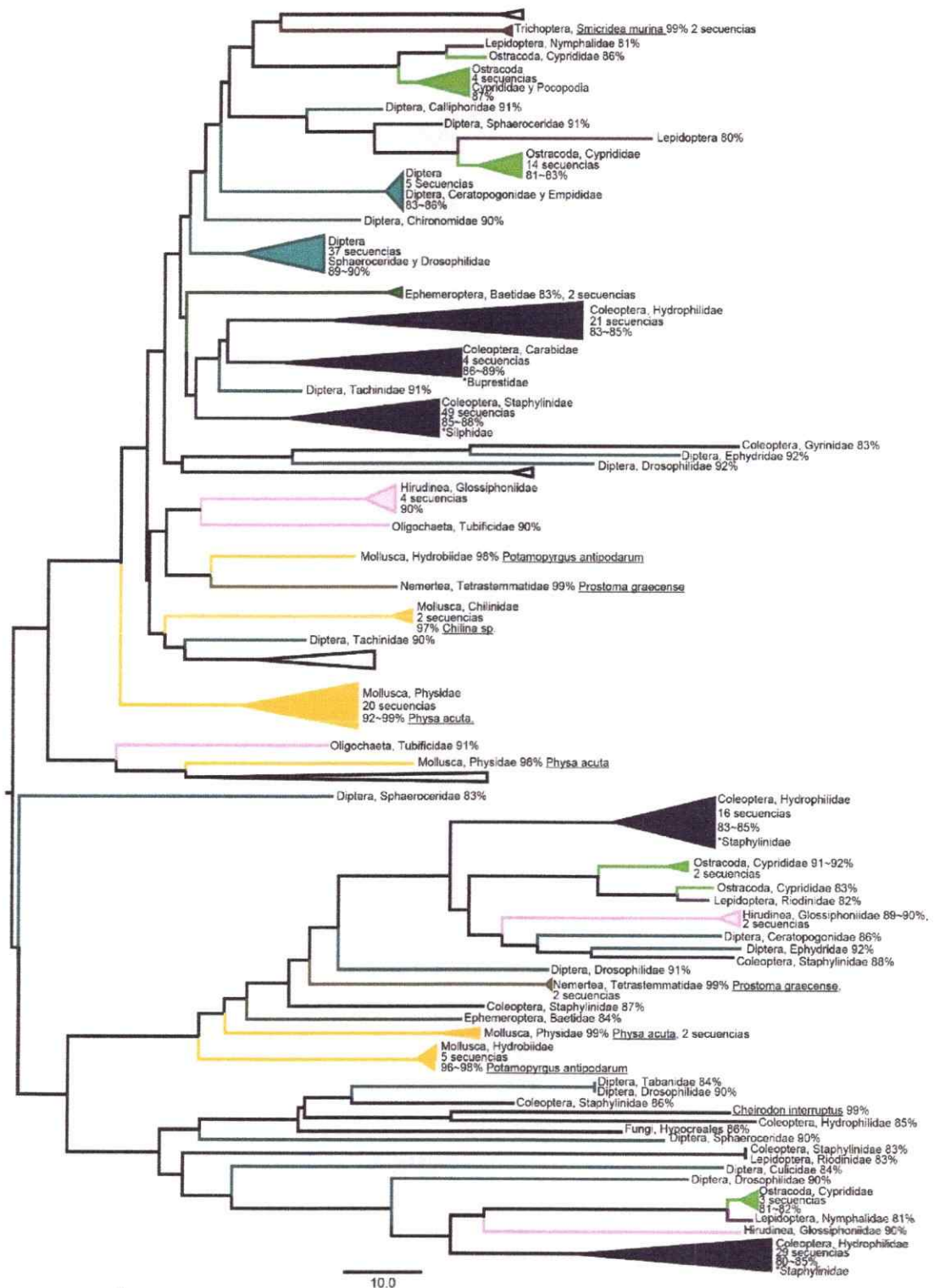


Figura 6. Árbol originado mediante Neighbour Joining del sitio B de la zona Isla de Maipo.

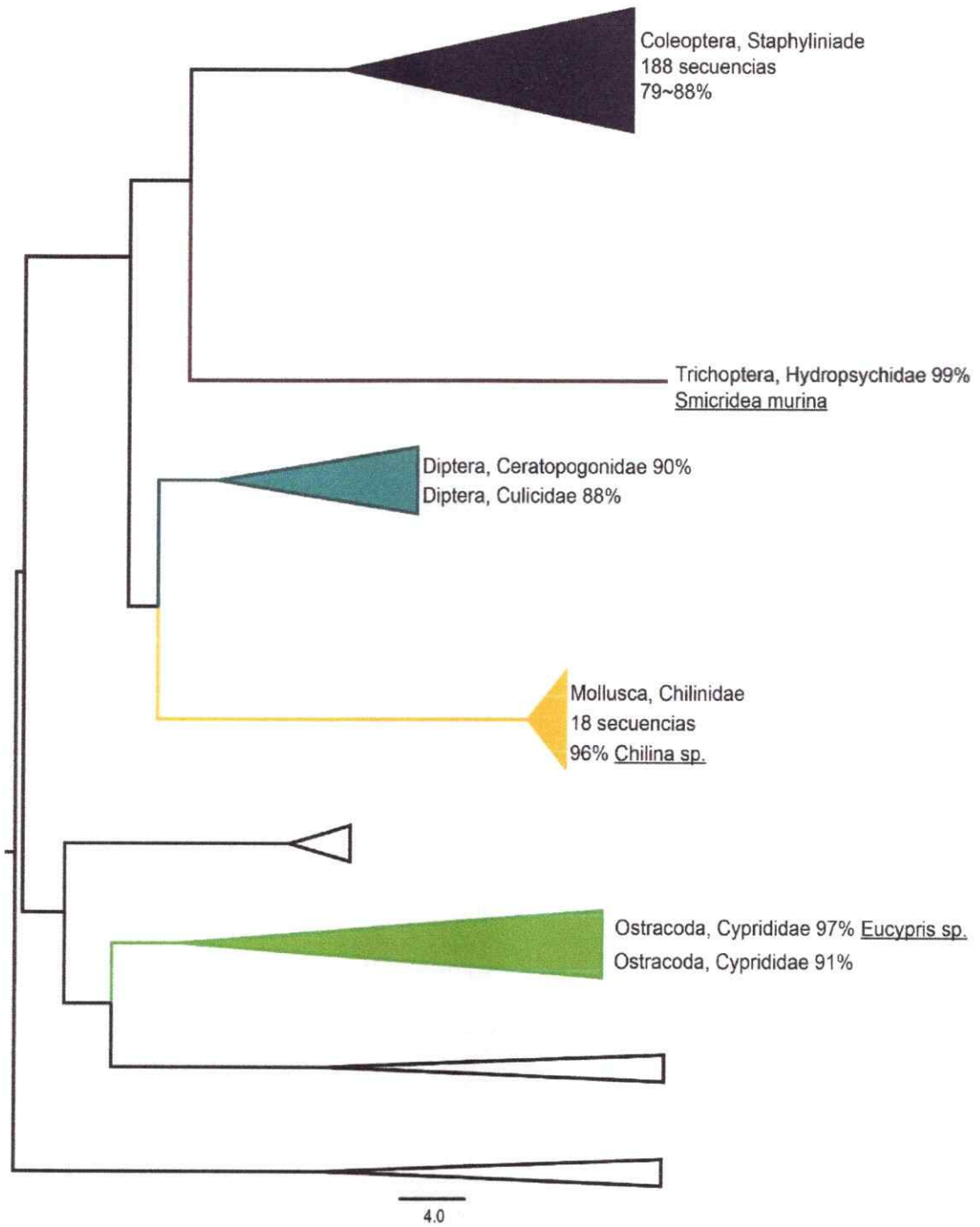


Figura 7. Árbol originado mediante Neighbour Joining del sitio C de la zona Melipilla.

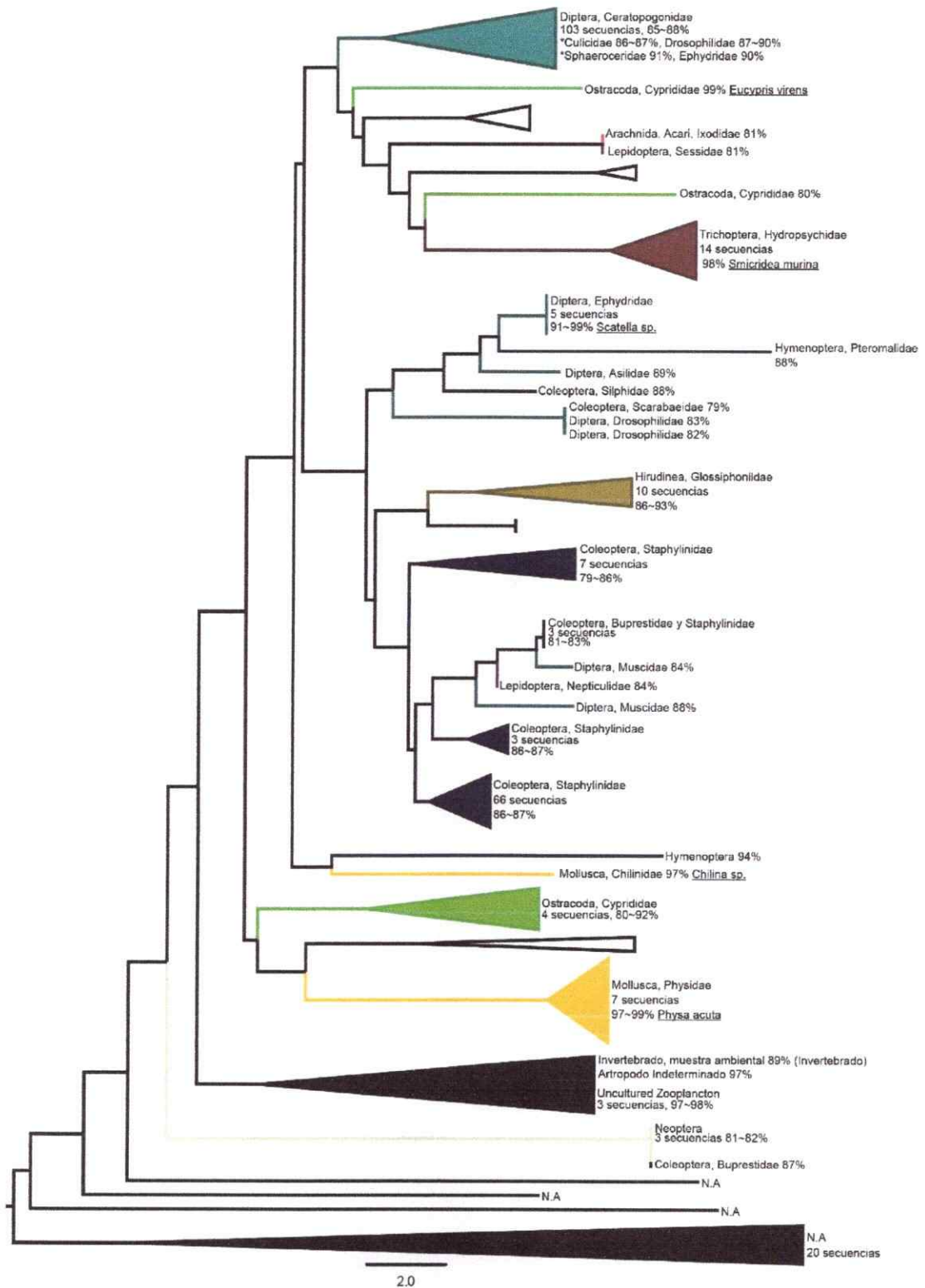


Figura 8. Árbol originado mediante Neighbour Joining del sitio C de la zona Melipilla.

### 3.4.Resultados de la comparación de la metodología morfológica y genética.

De los 29 taxa identificados mediante la metodología morfológica, 25 se compartieron en ambas zonas y, fueron únicos 2 taxa en Isla de Maipo y 2 en Melipilla. La metodología de identificación molecular permitió identificar 46 taxa, de los cuales solo 13 se comparten en ambas zonas y, fueron únicos 23 taxa en Isla de Maipo y 10 en Melipilla (Figura 9).

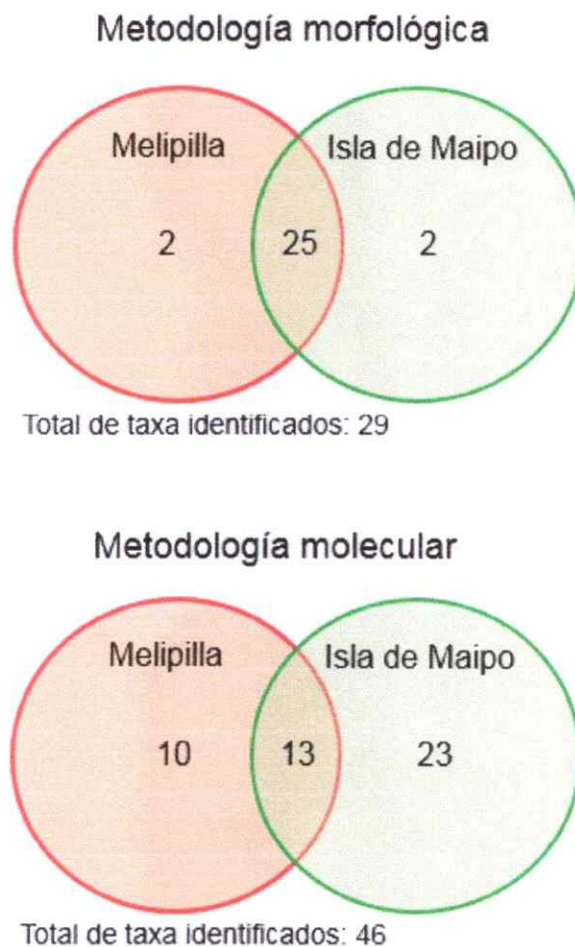


Figura 9. Diagrama de Venn realizados con datos presencia y ausencia de taxa identificados mediante metodología morfológica (arriba) y molecular (abajo)

El resultado de los AC, en base a la presencia/ausencia de taxa identificados mediante morfología y genética, se muestran en las Figuras 10 y 11 respectivamente. En la gráfica de los datos morfológicos, la correspondencia de los dos primeros ejes es de 85%, donde la correspondencia 1 (C1) y 2 (C2) es de 44 y 41% respectivamente. En torno al eje de la C1 y C2 se observa que las disposiciones de los sitios en el gráfico se encuentran cercanos al centro, por lo que no se logra ver una diferencia clara.

En la figura de datos genéticos la correspondencia de los primeros 2 ejes es de 76%, donde la correspondencia 1 (C1) y 2 (C2) es de 41 y 35% respectivamente. En torno al eje de la C1 se observa la segregación de los sitios correspondientes a no contaminado y contaminado (izquierda y derecha del eje respectivamente).

De forma interesante, con los datos genéticos es posible ver que los sitios están más segregados en el espacio multivariado encontrándose los sitios limpios en los cuadrantes a la izquierda del eje x y los contaminados a la derecha del mismo eje.



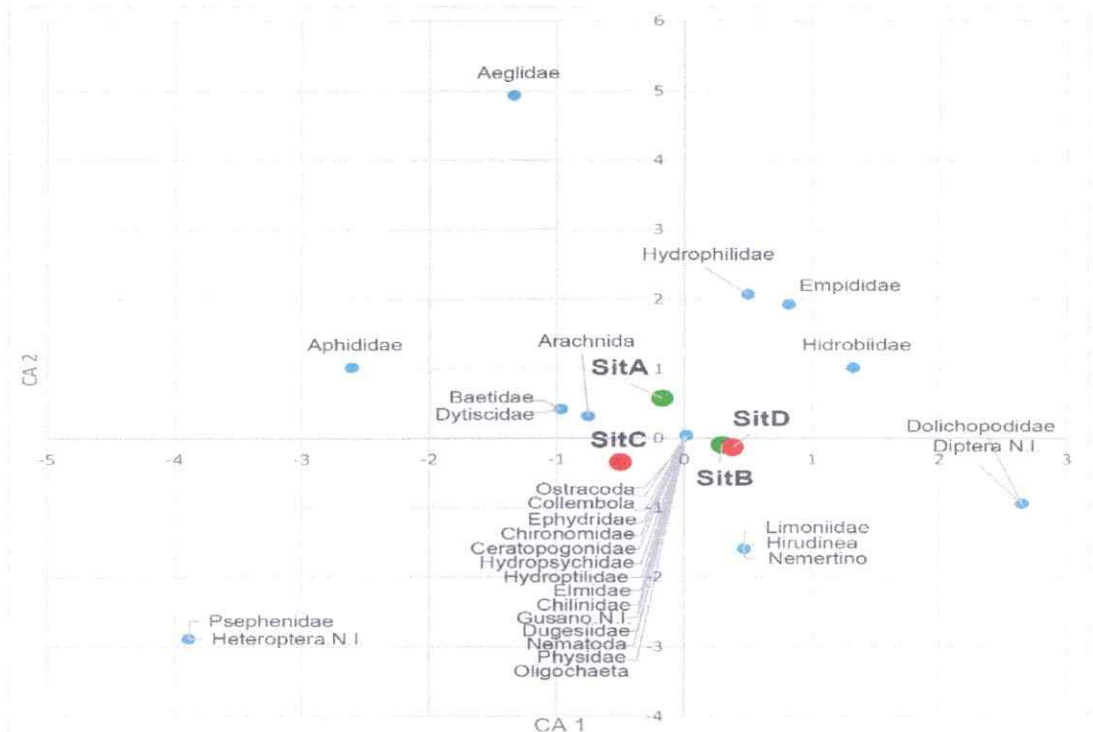


Figura 10. Análisis de Correspondencia, en base a la presencia y ausencia de taxa identificados mediante morfología



Figura 11. Análisis de Correspondencia, en base a la presencia y ausencia de taxa identificados mediante genética

En las Tablas 5, 6, 7, 8, 9 y 10 se muestra la presencia/ausencia de los macroinvertebrados encontrados mediante morfología y genética para los distintos niveles taxonómicos (Phylum, Clase, Orden, Familia, Género y Especie respectivamente). Los phyla Platyhelminthes, Nematoda, Annelida, Mollusca y Arthropoda fueron detectados en todos los sitios mediante morfología, sin embargo, genéticamente solo fueron encontrados los phyla Nemertea (sitio B), Annelida (sitio D), Mollusca (todos los sitios) y Arthropoda (todos los sitios). Los phyla Platyhelminthes y Nemertea no fueron detectados con herramientas genéticas. (Tabla 5).

La clase Turbellaria (único taxón del phylum Platyhelminthes) fue detectada en todos los sitios mediante morfología (con un único morfotipo; familia Dugesiidae), sin embargo, mediante genética en ninguno de ellos (Tablas 6 y 8). Enopla, única clase del Phylum Nemertea (nivel taxonómico identificado mediante morfología), fue encontrado en los sitios B, C y D, sin embargo, la herramienta genética sólo lo pudo detectar en el sitio B, muestra que incluso pudo asignarse al nivel taxonómico de especie (*Prostoma graecense*). Las clases Oligochaeta e Hirudinea, ambos del phylum Annelida, pudieron ser reconocidos morfológicamente, solo hasta dicho nivel, lo que no correspondió con los datos genéticos (Tabla 6). Oligochaeta se identificó mediante morfología en todos los sitios y genéticamente (familia Tubificidae) solo en B (Tablas 6 y 8). La clase Hirudinea en tanto, morfológicamente se detectó en los sitios B, C y D, y genéticamente (Familia Glossiphiniidae) en los sitios B y C (Tablas 6 y 8).

La clase Gastropoda (única clase del phylum Mollusca), tuvo 2 órdenes. Pulmonata y Sorbeoconcha (Tabla 7). Del Orden Pulmonata se identificó la Familia Chiliniidae



con características morfológicas y a *Chilina sp.* con información obtenida desde el ADN, así mismo, estuvo en todos los sitios y genéticamente solo estuvo ausente en A (Tablas 7, 8 y 9). El orden Sorbeoconcha tuvo 2 familias asociadas, Hidrobiidae y Physidae, donde el primero morfológicamente estuvo presente en A, B y D y genéticamente en A y B. El segundo estuvo morfológicamente en todos los sitios y genéticamente en B y D. De estas dos familias se identificó mediante genética a nivel de especie 2 taxones: *Potamopyrgus antipodarum* (Hidrobiidae) y *Physa acuta* (Physidae) (Tablas 7, 8, 9 y 10).

Respecto a las clases del Phylum Arthropoda, Arachnida solo pudo ser identificado morfológicamente hasta orden en los sitios A y D, sin embargo, se pudieron diferenciar 3 morfotipos (Anexo 7) que genéticamente corresponden a las familias Specrchontidae, Arrenuridae e Ixodidae, donde los dos primeros estuvieron presentes en el sitio A y el tercero en el sitio D (Tablas 6, 7 y 8).

La clase Malacostraca solo estuvo presente en el sitio A, reconocida morfológica y genéticamente (Tabla 6). Además, morfológicamente solo pudo ser identificado a nivel de Familia (Aeglidae), y genéticamente se logró identificar hasta nivel de sub especie (*Aegla laevis laevis*) (Tablas 8, 9 y 10).

La clase Ostracoda morfológicamente estuvo presente en los 4 sitios y solo pudo ser identificada hasta dicho nivel, además se pudieron discriminar 3 morfotipos diferentes (Anexo 8) lo cual también fue detectado mediante genética. La presencia de datos genéticos tuvo concordancia con los sitios B, C y D, pero no en A donde estuvo ausente (Tabla 6). En cuanto a los niveles taxonómicos, en los 3 casos fue reconocido a nivel de Familia (Cyprididae), en el sitio C se pudo reconocer a nivel de

Género (*Eucypris* sp.) y en el sitio D a nivel de especie (*Eucypris virens*) (Tablas 8, 9 y 10).

La clase Entognatha morfológicamente estuvo presente en los 4 sitios, sin embargo, genéticamente solo estuvo presente en el sitio A (Tabla 6). Además, se registraron 2 morfotipos (Anexo 9) los cuales concordaron con la identificación genética, identificando 2 familias, Isotomidae y Entomobryidae (Tabla 8).

La clase Insecta fue la que tuvo mayor diversidad de taxa en el phylum Arthropoda. Se observó que en algunas familias de esta clase no hubo concordancia con lo identificado entre la aproximación morfológica y la genética, teniendo una mayor diversidad y cantidad de taxa mediante genética. Por ejemplo, el orden Ephemeroptera solo tuvo una familia, Baetidae (Tabla 8), que mediante morfología se encontró en los sitios A, B y C, sin embargo, con la genética solo estuvo presente en el sitio B. Para el orden Hemiptera, mediante morfología se encontraron en los sitios A y C, sin embargo, mediante genética no hubo presencia (Tabla 7). En este orden solo se pudo identificar una familia (Aphididae) (Tabla 8).

Del orden Hymenoptera no hubo registros mediante morfología, sin embargo, hubo presencia mediante genética de la familia Pteromalidae en el sitio D. Lo mismo ocurrió con el orden Lepidoptera, y en este se encontraron 3 familias: Nymphaelidae y Rionidae en el sitio B, y Sessidae en el sitio C. El orden Neoptera, también fue registrado con genética, en el sitio D, y no hubo registros mediante morfología. En este caso, la genética no dio más información de otros niveles taxonómicos, pudiendo solo identificar hasta orden (Tablas 7 y 8).

El orden Coleoptera mostró una baja concordancia de datos morfológicos y genéticos, cuatro taxa fueron identificados mediante morfología al nivel de familia: Dytiscidae (sitios A, B y C mediante morfología y ninguna presencia en cuanto a la genética), Psephenidae (sitio C y no tuvo presencia mediante genética), Elmidae (presente en todos los sitios mediante morfología y genética solo en el sitio A) e Hydrophilidae (presentes morfológica y genéticamente en los sitios A y B). Además, se logró identificar 8 taxa diferentes mediante genética, sin embargo, no se logró identificar estos mediante morfología. Las familias identificadas mediante genética fueron: Buprestidae (sitios A y D), Carabidae (sitios A y B), Elateridae (sitio A), Haliplidae (sitio A), Gyrinidae (sitio B), Scarabaeidae (Sitio D), Silphidae (sitio D) y Staphylinidae (sitios A, C y D) (Tabla 8).

El orden Trichoptera solo tuvo 2 taxa identificados: la familia Hydroptilidae, que estuvo presente en los 4 sitios morfológicamente, sin embargo, no se detectó en ninguno de ellos con las herramientas genéticas, y la familia Hydropsychidae que estuvo presente en todos los sitios tanto morfológica como genéticamente, e incluso fue posible aumentar la resolución taxonómica hasta nivel de especie (*Smicridea murina*) (Tablas 8, 9 y 10).

El orden Diptera presentó una situación similar a la del orden Coleoptera, donde varias familias de este orden no se detectaron mediante morfología, sin embargo, fueron detectadas genéticamente. Fue el caso de Asilidae (sitio D), Caliphoridae (sitios A y B), Chloropidae (sitio A), Culicidae (sitios A, B, C y D), Muscidae (sitios A, B, C y D), Drosophilidae (sitios A, B y D), Tabanidae (sitios A y B), Tachinidae (sitio B) y Sphaeroceridae (Sitio B y D). En el caso contrario, donde hubo presencia de taxa morfológica pero no genéticamente, está el orden Diptera (sitios B y D) y la

familia Limoniidae (todos los sitios). Las familias que sí tuvieron presencia tanto morfológica como genéticamente son: Chironomidae (morfológicamente en todos los sitios y genéticamente solo en B), Dolichopodidae (morfológicamente en sitios B y D, y genéticamente en sitio B), Empididae (morfológicamente en sitios A y D, y genéticamente en sitio B), Ceratopogonidae (sitios A, B, C y D genética y morfológicamente) y Ephydriidae (morfológicamente en todos los sitios, y genéticamente en sitios A, B y D) que pudo ser identificado hasta género (*Scatella* sp.) mediante información genética (Tablas 8, 9 y 10).

Tabla 5. Presencia y ausencia de Phyla obtenidos mediante identificación morfológica y genética.

Phylum	Genética				Morfología			
	A	B	C	D	A	B	C	D
Platyhelminthes	0	0	0	0	1	1	1	1
Nemertea	0	1	0	0	1	1	1	1
Nematoda	0	0	0	0	1	1	1	1
Annelida	0	1	0	1	1	1	1	1
Mollusca	1	1	1	1	1	1	1	1
Arthropoda	1	1	1	1	1	1	1	1

Tabla 6. Presencia y ausencia de Clases obtenidos mediante identificación morfológica y genética.

Phylum	Clase	Genética				Morfología				Rango Taxonómico	Nivel Taxonómico
		A	B	C	D	A	B	C	D		
Platyhelminthes	Turbellaria	0	0	0	0	1	1	1	1	Phylum	Nemertea
Nemertea	Enopla	0	1	0	0	0	1	1	1		
Annelida	Oligochaeta	0	1	0	0	1	1	1	1		
Annelida	Hirudinea	0	1	0	1	0	1	1	1		
Mollusca	Gastropoda	1	1	1	1	1	1	1	1		
Arthropoda	Arachnida	1	0	0	1	1	0	1	1		
Arthropoda	Malacostraca	1	0	0	0	1	0	0	0		
Arthropoda	Ostracoda	0	1	1	1	1	1	1	1		
Arthropoda	Entognatha	1	0	0	0	1	1	1	1		
Arthropoda	Insecta	1	1	1	1	1	1	1	1		

Tabla 7. Presencia y ausencia de Ordenes obtenidos mediante identificación morfológica y genética.

Phylum	Clase	Orden	Genética				Morfología				Rango Taxonómico	Nivel Taxonómico
			A	B	C	D	A	B	C	D		
Platyhelminthes	Turbellaria	Tricladida	0	0	0	0	1	1	1	1		
Nemertea	Enopla	Hoploneurtea	0	1	0	0	0	1	1	1	Phylum	Nemertea
Annelida	Oligochaeta	Tubificida	0	1	0	0	1	1	1	1	Clase	Oligochaeta
Annelida	Hirudinea	Rhynchobdellida	0	1	0	1	0	1	1	1	Clase	Hirudinea
Mollusca	Gastropoda	Pulmonata	0	1	1	1	1	1	1	1		
Mollusca	Gastropoda	Sorbeoconcha	1	1	0	1	1	1	1	1		
Arthropoda	Arachnida	Ixodida	0	0	0	1	0	0	0	0	Clase	Arachnida
Arthropoda	Arachnida	Trombidiformes	1	0	0	0	0	0	0	0	Clase	Arachnida
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	1	0	0	0	1	0	0	0		
Arthropoda	Ostracoda	Podocopida	0	1	1	1	1	1	1	1		
Arthropoda	Entognatha	Collembola	1	0	0	0	1	1	1	1	Orden	Collembola
Arthropoda	Insecta	Ephemeroptera	0	1	0	0	1	1	1	0		
Arthropoda	Insecta	Hemiptera	0	0	0	0	1	0	1	0		
Arthropoda	Insecta	Hymenoptera	0	0	0	1	0	0	0	0		
Arthropoda	Insecta	Lepidoptera	0	1	1	0	0	0	0	0		
Arthropoda	Insecta	Neoptera	0	0	0	1	0	0	0	0		
Arthropoda	Insecta	Coleoptera	1	1	1	1	1	1	1	1		
Arthropoda	Insecta	Trichoptera	1	1	1	1	1	1	1	1		
Arthropoda	Insecta	Diptera	1	1	1	1	1	1	1	1		





Tabla 8. Presencia y ausencia de Familias obtenidos mediante identificación morfológica y genética.

Phylum	Clase	Orden	Familia	Genética				Morfología				Rango Taxonómico	Nivel Taxonómico		
				A	B	C	D	A	B	C	D				
Platyhelminthes	Turbellaria	Tricladida	Dugesidae	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1		
Nemertea	Enopla	Hoploneurtea	Tetrastemmatidae	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1	Phylum	Nemertea
Annelida	Oligochaeta	Tubificida	Naididae	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1	Clase	Oligochaeta
Annelida	Hirudinea	Rhynchobdellida	Glossiphoniidae	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	Clase	Hirudinea
Mollusca	Gastropoda	Pulmonata	Chiliniidae	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1		
Mollusca	Gastropoda	Sorbeoconcha	Hidrobiae	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1		
Mollusca	Gastropoda	Sorbeoconcha	Physidae	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1		
Arthropoda	Ostracoda	Podocopodia	Cypridae	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	Clase	Ostracoda
Arthropoda	Entognatha	Collembola	Isotomidae	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	Orden	Collembola
Arthropoda	Entognatha	Collembola	Entomobryidae	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	Orden	Collembola
Arthropoda	Arachnida	Ixodida	Ixodidae	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	Clase	Arachnida
Arthropoda	Arachnida	Trombidiformes	Sperchontidae	1	0	0	0	1	0	1	0	1	1	Clase	Arachnida
Arthropoda	Arachnida	Trombidiformes	Arrenuridae	1	0	0	0	1	0	1	0	1	1	Clase	Arachnida
Arthropoda	Insecta	Ephemeroptera	Baetidae	0	1	0	0	1	1	1	1	1	0		
Arthropoda	Insecta	Hemiptera	Aphididae	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0		
Arthropoda	Insecta	Hymenoptera	Pteromalidae	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0		
Arthropoda	Insecta	Lepidoptera	Nymphaelidae	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0		
Arthropoda	Insecta	Lepidoptera	Rionidae	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0		
Arthropoda	Insecta	Lepidoptera	Sessidae	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0		
Arthropoda	Insecta	Coleoptera	Buprestidae	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0		
Arthropoda	Insecta	Coleoptera	Carabidae	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0		
Arthropoda	Insecta	Coleoptera	Elatidae	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
Arthropoda	Insecta	Coleoptera	Halplidae	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
Arthropoda	Insecta	Coleoptera	Gyrinidae	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0		
Arthropoda	Insecta	Coleoptera	Scarabaeidae	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0		
Arthropoda	Insecta	Coleoptera	Silphidae	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0		
Arthropoda	Insecta	Coleoptera	Staphylinidae	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0		
Arthropoda	Insecta	Coleoptera	Dytiscidae	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0		
Arthropoda	Insecta	Coleoptera	Psephenidae	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0		
Arthropoda	Insecta	Coleoptera	Elmidae	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1		
Arthropoda	Insecta	Coleoptera	Hydrophilidae	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0		
Arthropoda	Insecta	Trichoptera	Hydroptilidae	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1		

Arthropoda	Insecta	Trichoptera	Hydropsychidae	1	1	1	1	1	1	1
Arthropoda	Insecta	Diptera	Asilidae	0	0	0	1	0	0	0
Arthropoda	Insecta	Diptera	Calliphoridae	1	1	0	0	0	0	0
Arthropoda	Insecta	Diptera	Chloropidae	1	0	0	0	0	0	0
Arthropoda	Insecta	Diptera	Culicidae	1	1	1	1	0	0	0
Arthropoda	Insecta	Diptera	Muscidae	1	1	1	1	0	0	0
Arthropoda	Insecta	Diptera	Drosophilidae	1	1	0	1	0	0	0
Arthropoda	Insecta	Diptera	Tabanidae	1	1	0	0	0	0	0
Arthropoda	Insecta	Diptera	Tachinidae	0	1	0	0	0	0	0
Arthropoda	Insecta	Diptera	Sphaeroceridae	0	1	0	1	0	0	0
Arthropoda	Insecta	Diptera	Limoniidae	0	0	0	0	0	1	1
Arthropoda	Insecta	Diptera	Ephydriidae	1	1	0	1	1	1	1
Arthropoda	Insecta	Diptera	Ceratopogonidae	1	1	1	1	1	1	1
Arthropoda	Insecta	Diptera	Chironomidae	0	1	0	0	1	1	1
Arthropoda	Insecta	Diptera	Dolichopodidae	0	0	0	1	0	1	0
Arthropoda	Insecta	Diptera	Empididae	0	1	0	0	1	0	0

Tabla 9. Presencia y ausencia de Géneros obtenidos mediante identificación morfológica y genética.

Phylum	Clase	Orden	Familia	Genero	Genética				Morfología				Rango Taxonómico	Nivel Taxonómico	
					A	B	C	D	A	B	C	D			
Nemertea	Enopla	Hoploneurtea	Tetrastemmatidae	<i>Prostoma</i>	0	1	0	0	0	1	1	1	1	Phylum	Nemertea
Mollusca	Gastropoda	Pulmonata	Chiliniidae	<i>Chilina</i>	0	1	1	1	1	1	1	1	1	Familia	Chiliniidae
Mollusca	Gastropoda	Sorbeoconcha	Hidrobiidae	<i>Potamopyrgus</i>	1	1	0	0	1	1	0	1	1	Familia	Hydrobiidae
Mollusca	Gastropoda	Sorbeoconcha	Physidae	<i>Physa</i>	0	1	0	1	1	1	1	1	1	Familia	Physidae
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Aegliidae	<i>Aegla</i>	1	0	0	0	1	0	0	0	0	Familia	Eagliidae
Arthropoda	Ostracoda	Podocopida	Cypridae	<i>Eucypris</i>	0	0	1	1	1	1	1	1	1	Clase	Ostracoda
Arthropoda	Insecta	Trichoptera	Hydropsychidae	<i>Smicridea</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	Familia	Hydropsychidae
Arthropoda	Insecta	Diptera	Ephydriidae	<i>Scatella</i>	0	0	0	1	1	1	1	1	1	Familia	Ephydriidae

Tabla 10. Presencia y ausencia de Especies obtenidos mediante identificación morfológica y genética.

Phylum	Clase	Orden	Familia	Genero	Especie	Genética				Morfología				Rango Taxonómico	Nivel Taxonómico	
						A	B	C	D	A	B	C	D			
Nemertea	Enopla	Hoploneurtea	Tetrastemmatidae	<i>Prostoma</i>	<i>graecense</i>	0	1	0	0	0	1	1	1	1	Phylum	Nemertea
Mollusca	Gastropoda	Pulmonata	Chiliniidae	<i>Chilina</i>	<i>sp.</i>	0	1	1	1	1	1	1	1	1	Familia	Chiliniidae
Mollusca	Gastropoda	Sorbecoconcha	Hidrobiidae	<i>Potamopyrgus</i>	<i>antipodarum</i>	1	1	0	0	1	1	0	1	1	Familia	Hidrobiidae
Mollusca	Gastropoda	Sorbecoconcha	Physidae	<i>Physa</i>	<i>acuta</i>	0	1	0	1	1	1	1	1	1	Familia	Physidae
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Aegidae	<i>Aegla</i>	<i>laevis</i>	1	0	0	0	1	0	0	0	0	Familia	Aegidae
Arthropoda	Ostracoda	Podocopida	Cypridae	<i>Eucypris</i>	<i>virens</i>	0	0	0	1	1	1	1	1	1	Clase	Ostracoda
Arthropoda	Ostracoda	Podocopida	Cypridae	<i>Eucypris</i>	<i>sp.</i>	0	0	1	0	1	1	1	1	1	Clase	Ostracoda
Arthropoda	Insecta	Trichoptera	Hydropsychidae	<i>Smicridea</i>	<i>murina</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	Familia	Hydropsychidae
Arthropoda	Insecta	Diptera	Ephydriidae	<i>Scatella</i>	<i>sp.</i>	0	0	0	1	1	1	1	1	1	Familia	Ephydriidae



## 4.DISCUSIÓN

### 4.1.Factores físicos y químicos

Las diferencias significativas encontradas en las características físicas y químicas de los sitios estudiados, sugieren que ambas zonas (isla de Maipo y Melipilla) presentan características diferentes. El ACP segregó en diferentes cuadrantes los sitios no contaminados (Sitios A y B de Isla de Maipo) y los sitios contaminados (Sitios C y D de Melipilla). Las variables analizadas en el ACP tienen concordancia con el efecto de la contaminación, ya que en la zona no contaminada presenta mayor oxígeno disuelto, mayor pH, y menor conductividad, Cl<sup>-</sup> y Ca<sup>+</sup> en comparación a la zona contaminada. El oxígeno disuelto se relaciona directamente con demanda bioquímica de oxígeno (DBO) (Ramalho, 1996). Sardíñas y col. (2006) sugieren que valores altos de DBO están relacionados con valores bajos de oxígeno disuelto. Teniendo en cuenta los valores del DS 90/2000, de igual manera siguen existiendo diferencias entre ambas zonas de muestreo que se ven reflejadas en los análisis comunitarios del ensamble de macroinvertebrados bentónicos.

A pesar de que las diferencias mayoritariamente pueden ser por el ingreso de las aguas tratadas del río Mapocho, también existen otros factores que pueden estar influenciado estas diferencias. Por ejemplo, a pesar de que ambas zonas de muestreo se encuentran en la misma cuenca, pueden existir algunas variables geomorfológicas que no fueron consideradas. Sin embargo, mediante la inspección de las zonas (respaldando con registros fotográficos), se infirió que los sitios de

muestreo de ambas zonas podrían ser comparables, donde las diferencias son atribuibles a la contaminación. También podrían existir zonas donde ingresa aguas residuales sin registrar en algún punto posterior a la descarga del río Mapocho. Cabe destacar que, a pesar de este motivo, las zonas muestreadas fueron estadísticamente diferentes. Estudios realizados en otras cuencas del mundo muestran patrones similares, donde una misma cuenca posee zonas contaminadas y no contaminadas, siendo las zonas contaminadas producto de aguas residuales domiciliarias (Sardiñas y col., 2006; Correa-Aranera y col., 2010)

#### **4.2.Diversidad morfológica**

La riqueza, abundancia y los índices de diversidad obtenidos a partir de la información morfológica de las especies reflejan que no es posible determinar diferencias claras entre zonas, sitios y réplicas. Por lo general, este tipo de métricas (índices unimétricos) suelen tener ciertos niveles de respuesta a los contaminantes, pero cuando son de baja intensidad no se logra apreciar cambios en los valores de estas métricas (Prat y col., 2009). Este último caso se logra apreciar en este estudio, por lo que se infiere que, a pesar de lo leve de las diferencias y los datos de la física y química del agua, la zona de Melipilla está más contaminada que la de Isla de Maipo.

En conjunto, los análisis multivariados utilizados permitieron detectar diferencias entre las zonas contaminadas y no contaminadas. Por una parte, el ACP mostró la segregación conjunta de los sitios contaminados y no contaminados, sin embargo,

son pocas las familias (5 de los 29 taxa encontrados) que contribuyeron en gran medida a estas diferencias. El escalamiento multidimensional no métrico EMD-NM, ANOSIM y SIMPER aportaron información relevante, congruente y complementaria a la del ACP. Es importante indicar que ANOSIM aportó sustento estadístico que detectó diferencias significativas entre los sustratos comparables de cada sitio y entre todos los sustratos (comparables y no comparables) por lo que se sugiere fuertemente que las comunidades de macroinvertebrados de ambas zonas, Isla de Maipo y Melipilla, son diferentes, en composición y distribución.

Es importante indicar que los análisis realizados en esta parte de la tesis son los mismos que la autoridad requiere cuando se realiza una evaluación de impacto ambiental. En la letra b artículo 6 del RSEIA se define lo siguiente “... *Para la evaluación del impacto se deberá considerar la diversidad biológica, así como la presencia y abundancia de especies silvestres...*” por lo que la exigencia de los EIA es baja en comparación a los avances de índices utilizados en otros países. Por ejemplo, en la Unión Europea, la Directiva Marco del Agua (DMA) a parte de usar los índices de diversidad utilizados en este trabajo, usan índices que incorporan variables como la tolerancia de los individuos antes los contaminantes. En Chile, se han adaptado algunos índices bióticos para su uso en zonas mediterráneas (Figueroa y col. 2007), que a pesar de las particularidades de los ríos de Chile (poco conectados y cada uno se considera como una entidad única) podrían ser utilizados para los estudios de impacto ambiental de la zona mediterránea de Chile.

### 4.3. Diversidad genética

No cabe duda que los análisis genéticos realizados aportaron bastante en la detección de un mayor número de grupos taxonómicos que podrían ser homologables a especies. Después de realizar este análisis fue posible detectar que si bien tiene fortalezas también tiene bastantes debilidades las cuales pueden ser solucionadas en el tiempo. El primer problema surge al momento de asignar un nombre científico a las secuencias observadas, se pudo constatar que la información genética del gen COI en GenBank referida a especies nativas de/en Chile es escasa. Es importante indicar que este tipo de metodologías es bastante estándar para microorganismos. En este momento existen kits comerciales que permiten la amplificación del gen 16S (con partidores universales) de bacterias presentes en un hábitat (ejemplo: kit QIAmp DNA microbiome, Qiagen), además existe bases de datos genéticas que permite realizar una identificación de OTUS para estos grupos (Scholss y col., 2009). En el caso de invertebrados, son escasos los estudios realizados hasta el momento. Los esfuerzos por utilizar esta herramienta genética que permita la identificación masiva de especies de macroinvertebrados han encontrado en ellos un incremento en la resolución taxonómica y promueven la incorporación de NGS en gestión ambiental (Hajibabei y col., 2011; Hajibabei y col., 2012; Carew y col., 2013). Por lo tanto, es urgente ampliar la base de datos genéticos de las especies de invertebrados bentónicos chilenas para utilizarla como medida de gestión.

Algunos árboles de distancia presentaron incongruencias respecto a los taxa identificados mediante BLAST, donde algunos de ellos estuvieron presentes en

varias ramas del árbol. Esto se puede deber que el gen COI no es lo suficientemente conservado como para ordenar la amplia diversidad de grupos taxonómicos presentes en el conjunto de macroinvertebrados. Una posible solución es realizar árboles por familia como se realiza en Lee y col. 2010.

Es importante dejar claro que existen otros tipos de problemas que también deben ser solucionado, por ejemplo:

1.- Calidad de la lectura. Para esto utilizaré el caso del único individuo de la familia Aeglidae. Considerando que en una de las muestras del sitio A en Isla de Maipo se obtuvo un solo individuo el cual fue secuenciado, se esperaba muchas secuencias COI idénticas de esta especie. Sin embargo, se obtuvieron secuencias del gen COI las cuales presentaban pasos mutacionales entre ellas lo cual influyó en el porcentaje de identificación mediante BLAST. Esta evidencia presupone que existen al menos dos variables a considerar para evaluar este fenómeno: i) IonTorrent tiene errores de secuenciación que han sido registrados entre el 1,71% (Quail y col., 2012) y 2,84% (Bragg y col., 2013) y ii) que los partidores no tienen el mismo desempeño en todos los organismos encontrados en este trabajo.

2.- Especies no amplificadas. Como los individuos utilizados para la secuenciación masiva fueron analizados morfológicamente, se conocía que grupos debían estar presentes. Sin embargo, algunos no fueron encontrados dentro de las secuencias obtenidas, este fue el caso de dos phyla: Platyhelminthes y Nematoda. El desempeño también fue menor en los phyla Annelida y Nemertea, aunque en estos dos casos se pudo lograr una identificación a nivel de familia y especie respectivamente. Esto

podría deberse a que no se conoce cuan universales son los partidores diseñados en este trabajo y no estarían permitiendo amplificar el gen COI de estos phyla. Por lo tanto, es necesario construir nuevos partidores que permitan amplificar estos grupos o realizar las PCRs con un grupo de partidores que eviten perder estos grupos en la secuenciación.

#### **4.4. Comparación de la metodología morfológica y genética.**

La identificación de los taxa mediante la metodología morfológica no logró establecer diferencias entre las zonas ya que la mayoría de los taxa se compartieron. No así la metodología molecular, que aumentó la cantidad de taxa identificados y además se logró ver diferencias, donde en la zona no contaminada (Isla de Maipo) tuvo mayor cantidad de taxa únicos en comparación a la zona no contaminada (Melipilla).

La comparación de los AC indicó que las presencias obtenidas mediante herramientas genéticas, en comparación con los datos morfológicos, tuvieron una mejor resolución en los análisis comunitarios. Es importante señalar que en la mayoría de los casos la identificación mediante genética tuvo una mayor resolución taxonómica, sin embargo, podría haber sido mejor si existiera mayor información genética en GenBank. Por ejemplo, ciertas familias tuvieron un bajo porcentaje de identificación, como las familias del orden Coleoptera. Esto último quiere decir que no existe información disponible para comparar las secuencias obtenidas y que es escasa la información genética de la mayoría de macroinvertebrados encontrados en este trabajo.

Sin embargo, la utilización de herramientas genéticas permitió determinar la presencia de ciertas especies invasoras, como lo es el caso del nemertino *Prostoma graecense*, de los moluscos *Potamopyrgus antipodarum* y *Physa acuta*, y del ostracodo *Eucypris virens*. *Prostoma graecense* ha sido encontrado y descrito en Europa, Kenya, Sud África, Australia, Nueva Zelanda, Japón, Rusia (Sundberg y Gibson, 2008), Estados Unidos (Cook y Scott, 1997), Argentina (Tamburi y Cazzaniga, 2006) y en este trabajo en Chile, por lo que este sería el primer registro de este taxa en el territorio nacional. *Physa acuta* es capaz de sobrevivir en las ruedas de vehículos que ingresan a los ríos y desprenderse en otros cuerpos de agua a los cuales vaya el vehículo (Banha y col., 2014). Existe información que indica que *Potamopyrgus antipodarum*, molusco originario de Nueva Zelanda (Winterbourn, 1970, 1972) ya ha colonizando Australia y Europa (Ponder, 1988) y recientemente Chile mediante herramientas genéticas (Collado, 2014), siendo el presente estudio el primer registro en el Rio Maipo. *Eucypris virens*, ostrácodo originario del Oeste de Europa, ha colonizado el Oeste de Australia (Koenders y col., 2012) y en este trabajo también sería el primer registro en Chile Central. Esta información es importante para comprender el estado actual de la zona media del rio Maipo, ya que, al conocer la información sobre las especies invasoras, cuatro de las seis que se logró identificar, se puede estudiar el grado de intervención por especies invasoras de un sistema y velar por la integridad biótica de los nuestros ríos.

Además, se halló en las muestras un hongo entomopatógeno (*Beauveria bassiana*) que es comúnmente utilizado en cultivos para protegerlos de insectos parásitos (Feng y col., 1994). En algunas muestras se pudo observar individuos con manchas blancas distribuidas en el tejido blando que evidencian el ingreso de este hongo en especies

acuáticas. Lamentablemente no existe información en otros lugares que hayan utilizado esta misma metodología por lo que no podemos comparar lo obtenido en este estudio.

Finalmente, estos antecedentes revelan que los análisis genéticos son una buena herramienta que podrían ser utilizadas en gestión ambiental. Esta metodología no depende del ojo del identificador ya que el ADN podría verificar la localidad de las muestras además que podrían ser resecuenciadas para verificación de la autoridad.



## 5.CONCLUSIÓN

En base a la identificación morfológica este estudio muestra que, los índices de diversidad de ambas zonas muestreadas (Isla de Maipo y Melipilla) aporta menos información (en calidad y cantidad) respecto a un análisis genómico. Los análisis comunitarios, en conjunto con los análisis físicos y químicos, añadieron información clave para determinar que la contaminación influye en la distribución y diversidad del ensamble de macroinvertebrados.

El uso de herramientas genómicas complementó de gran manera la identificación morfológica de las especies aumentando la resolución taxonómica y el número de taxa identificados. Este método permitió identificar individuos a nivel de especies además de mostrar nuevos registros de especies invasoras las cuales estuvieron presentes en mayor proporción en la zona no contaminada (Isla de Maipo). Desafortunadamente falta mucha información genética de insectos de Chile lo cual impidió realizar un trabajo más acabado a nivel de género o especies.

Finalmente, la fuerza que posee el análisis genético en mostrar un gran grupo de especies nos indica que es una metodología que podría ser utilizada como método de gestión ambiental.



## 6.BIBLIOGRAFÍA

- Ashfaq, M., Akhtar, S., Khan, A.M., Adamowicz, S.J. y Hebert, P.D. 2013. DNA barcode analysis of butterfly species from Pakistan points towards regional endemism. *Molecular Ecology Resources*. Rev. **13**: 832-843
- Bahna, F., Marques, M. y Anastácio, P. 2014. Dispersal of two freshwater invasive macroinvertebrates, *Procambarus clarkii* and *Physella acuta*, by off-road vehicles. *Aquatic Conservation*. Rev. **24**: 582-591
- Beisel, J.N., Usseglio-Polatera, P. y Moreteau, J.C. 2000. The spatial heterogeneity of a river bottom: a key factor determining macroinvertebrate communities. *Hydrobiología*. Rev. **422/423**: 163-171
- Bonada, N., Prat, N., Resh, V.H. y Statzner, B. 2006. Developments in aquatic insect biomonitoring: a comparative analysis of recent approaches. *Annual Review of Entomology*. Rev. **51**: 495-523
- Borcard, D., Gillet, F. y Legendre, P. (Eds). 2011. Chapter 9: Ordination in reduced space. *Numerical Ecology*. Third edition. pp 990. Elsevier. Great Britain.
- Bragg, L.M., Stone, G., Butler, M.K., Hugenholtz, P. y Tyson, G.W. 2013. Shining a light on dark sequencing: Characterising errors in Ion Torrent PGM Data. *PLoS Comput Biol Rev*: **9(4)**: e1003031
- Carew, M.E., Pettigrove, V.J., Metzeling, L. y Hoffman, A.A. 2013. Environmental monitoring using next generation sequencing: rapid identification of macroinvertebrate bioindicator species. *Frontiers in Zoology*. Rev. **10**: 45
- Centro de Ecología Aplicada. 2004. Metodología para la determinación de la calidad hídrica mediante comunidades zoobentónicas. Río Maipo. Informe Final.
- Clarke, K.R. y Gorley, R.N. (Eds). 2006. *PRIMER v6: User Manual/Tutorial*. PRIMER-E. 192pp. Plymouth, United Kingdom.
- Collado, G.A. 2014. Out of new Zeland: molecular identification of the highly invasive freshwater mollusk *Potamopyrgus antipodarum* (Gray, 1843) in South America. *Zoological Studies*. Rev. **53**: 70
- Cook, J.L. y Scott, J.H. 1997. New Record of *Prostoma graecense* (Nemertea: Hoplonemertea) from Southern Colorado, with observations on its feeding behavior and habitat. *The Southwestern Naturalist*. Rev. **42**: 162-169
- Copaja, S.V., Núñez, V. y Véliz, D. 2014. Determination of soluble salts in interstitial water of fluvial sediments by IE- HPLC. *Journal of the Chilean Chemical Society*. Rev. **59**: 1

Correa-Araneda, F., Rivera, R., Urrutia, J., De Los Ríos, P., Contreras, A. y Encina-Montoya, F. 2010. Efectos de una zona urbana sobre la comunidad de macroinvertebrados bentónicos de un ecosistema fluvial del sur de Chile. *Limnetica. Rev.* **29(2)**: 183-194

Domínguez, E. y Fernández, H.R. (Eds). 2009. Macroinvertebrados bentónicos sudamericanos. pp 654. Fundación Miguel Lillo. Tucumán, Argentina.  
Centro de Ciencias Ambientales EULA-Chile y CONAMA. 2004. Estandarización de especies bioindicadoras de calidad del agua en la cuenca del río Maipo. Informe Final.

EULA-CONAMA. 2008. Estandarización de especies bioindicadoras de calidad del agua en la cuenca del río Maipo. Informe Final.

Feng, M.G., Propawsky, T.J. y Khachatourians, G.G. 1994. Production, formulation and application of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* for insect control: current status. *Biocontrol Science and Technology. Rev.* **4**: 3-34

Figuroa, R., Palma, A., Ruiz, V. y Niell, X. 2007. Análisis comparativo de índices bióticos utilizados en la evaluación de la calidad de las aguas en un río mediterráneo de Chile: río Chillán, VII Región. *Revista Chilena de Historia Natural. Rev.* **80**: 225-242

Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R. y Vrijenhoek, R. 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology. Rev.* **3(5)**: 294-299

Geller J., Meyer C., Parker M. y Hawk H. 2013. Redesign of PCR primers for mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I for marine invertebrates and application in all-taxa biotic surveys. *Molecular Ecology Resources. Rev.* **5**: 854-861

Hajibabaei, M., Shokralla, S., Zhou, X., Singer, G.A. y Baird, D. 2011. Environmental barcoding: A Next-Generation Sequencing approach for biomonitoring applications using river benthos. *PLoS ONE. Rev.* **6(4)**: e17497

Hajibabaei, M., Spall, J.L., Shokralla, S. y van Konynenburg, S. 2012. Assessing biodiversity of a freshwater benthic macroinvertebrate community through non-destructive environmental barcoding of DNA from preservative ethanol. *BMC Ecology. Rev.* **12**: 28-37

Hebert, P.D., Stoeckle, M.Y., Zemplak, T.S. y Francis, C.M. 2004. Identification of birds through DNA barcodes. *PLoS Biol. Rev.* **2(10)**: e312

Hebert, P.D., Ratnasingham, S. y deWaard, J.R. 2003a. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proceedings of the Royal society of London B. Rev.* **270**: S96-S99

Hebert, P.D., Cywinska, A., Ball, S.L. y deWaard, J.R. 2003b, Biological identifications through DNA barcodes. Proceedings of the Royal society of London B. Rev. **270**: 313-321

Hughes, B.D. 1978, The influence of factors other than pollution on the value of Shannon's diversity index for benthic macro-invertebrates in streams. Water Reseach. Rev. **12**: 359-364

Koenders, A., Martens, K., Halse, S. y Schön, I. 2012. Cryptic species of the *Eucypris virens* species complex (Ostracoda, Crustacea) from Europe have invaded Western Australia. Biological Invasions. Rev. **14**: 2178-2201

Kolkwitz, R. y Marson, M. 1908 Ökologie der pflanzlichen saprobien. Bot. Ges. Rev. **26a**: 505-519

Lee, W., Koh, S.H., Choi, W.I., Jung, C.S., Kim, I.K., Byun, B.K., Lee, B.W., Kim, Y.S., Lim, J., Kim, S., Akinomoto, S.I. y Lee, S. 2010. Barcoding forest insect pests in South Korea: Constructing a basic species dataset. Journal of Asia-Pacific Entomology. Rev. **15**: 363-368

Lejzerowicz, F., Esling, P., Pillet, L., Wilding, T.A., Black, K.D. y Pawloski, J. 2015. High-throughput sequencing and morphology perform equally well for benthic monitoring of marine ecosystems. Scientific Reports. Rev. **5**: 1-10

Leray, M., Yang, J.Y., Meyer, C.P., Mills, S.C., Agudelo, N., Ranwez, V., Boehm, J.T. y Machida, R.J. 2013. A new versatile primer set targeting a short fragment of the mitochondrial COI region for metabarcoding metazoan diversity: applications for characterizing coral reef fish gut contents. Frontiers in Zoology. Rev. **10**: 34

Metzker, M.L. 2010. Sequencing technologies - the next generation. Nature Reviews Genetics. Rev. **1**: 31-46

Ley N°19300. Diario Oficial de la República de Chile, Santiago, Chile, 1 de marzo de 1994.

Palma, A. 2013. Guía para la identificación de invertebrados acuáticos. 1era Edición. 122pp.

Pandey, R.V., Pabinger, S., Kriegner, A. y Weinhäusel, A. 2016. ClinQC: a tool for quality control and cleaning of Sanger and NGS data in clinical research. BMC Bioinformatics. Rev. **17**: 56

Pardo, R., Vila, I. y Bustamante, R. 2008. Demographic response of *Stratioidrilus aeglaphilus* (Anelida, Histiobdellidae) to organic enrichment: experimental assessment. Hydrobiologia. Rev. **598**:11-16

Ponder, W.F. 1988. *Potamopyrgus antipodarum*-a molluscan coloniser of Europe and Australia. Journal of Molluscan Studies. Rev. **54**: 271-285

Prat, N., Rieradevall, M. y Fortuño, P. 2012. Metodología F.E.M. para la evaluación del Estado Ecológico de los ríos Mediterráneos. Grupo de Investigación F.E.M. (Freshwater Ecology and Management). Departament d'Ecologia. Universitat de Barcelona. Documento técnico disponible online en: [http://www.ub.edu/fem/docs/protocols/fem\\_%20prot\\_cast\\_2012.pdf](http://www.ub.edu/fem/docs/protocols/fem_%20prot_cast_2012.pdf)

Prat, N., Ríos, B., Acosta, R. y Rieradevall, M. 2009. Los macroinvertebrados como indicadores de calidad de las aguas. En Dominguez, E. y Fernández, H.R. (Eds), Macroinvertebrados bentónicos sudamericanos. pp 631-654. Fundación Miguel Lillo. Tucumán, Argentina.

Quail, M.A., Smith, M., Coupland, P., Otto, T.D., Harris, S.R., Connor, T.R., Bertoni, A., Swerdlow, H.P. y Gu, Y. 2012. A tale of three next generation sequencing platforms: comparison of Ion Torrent, Pacific Biosciences and Illumina MiSeq sequencers. BMC Genomics. Rev. **13**: 341-353

R Core Team. 2016. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <http://www.R-project.org/>.

Ramalho, R.S. 1996, Tratamiento de aguas residuales. pp 705. Editorial Reverté. Barcelona, España.

Sadzawka, A., Carrasco, M. A., Grez, R., Mora, M., Flores, H. y Neaman, A. 2006. Métodos de análisis recomendados para suelos de Chile. Revisión 2006. Instituto de Investigaciones Agropecuarias, Serie Actas INIA N° 34, Santiago, Chile. p 164.

Salipante, S., Kawashima, T., Rosenthal, C., Hoogestraat, D. Cummings, L., Sengupta, D., Harkings, T., Cookson, B. y Hoffman, N. 2014. Performance comparison of Illumina and Ion Torrent Next-Generation Sequencing platforms for 16S rRNA-based Bacterial Community Profiling. Applied Environmental Microbiology. Rev.**80(24)**: 7583-7591

Sardiña, P., Chirols, R., Fernández, N., Hernández, R y Pérez, C. 2006. Evaluación físico-química y microbiológica del agua de la presa El Cacao (Cotorro, Cuba). Higiene y Sanidad Ambiental. Rev **6**: 202-206

Schloss, P.D., Westcott, S.L., Ryabin, T., Hall, J.R., Hartmann, M., Hollister, E.B., Lesniewski, R.A., Oakley, B.B., Parks, D.H., Robinson, C.J., Sahl, J.W., Stres, B., Thallinger, G.G., Van Horn, D.J. y Weber, C.F. 2009. Introducing mothur: Open-Source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. Applied and Environmental Microbiology. Rev. **75(23)**: 7537-7541

Sundberg, P. y Gibson, R. 2008. Global diversity of nemerteand (Nemertea) in freshwater. Hydrobiologia. Rev. **595**: 61-66

Tachet, H., Richoux, P., Bournaud, M. y Usseglio-Polatera, P. 2010. Invertébrés d'eau douce systématique, biologie, écologie. pp 607. CNRE Éditions. Paris.

Tamburi, N. y Cazzaniga, N. 2006, The freshwater ribbon-worm *Prostoma graecense* (Hoplonemertea: Monostilifera) in South America (Argentina). *Zootaxa*. Rev **1248**: 27-34

Vayssier-Taussat, M., Moutailler, S., Michelet, L., Devillers, E., Bonnet, S., Cheval, J., Hébert, C. y Eloit, M. 2013. Next Generation Sequencing uncovers unexpected bacterial pathogens in tick in Western Europe. *PLoS ONE*. Rev. **8(11)**: e81439

Vega-Retter, C., Muñoz-Rojas, P., Vila, I., Copaja, S. y Véliz, D. 2014. Genetics effects of living in a highly polluted environment: the case of the silverside *Basilichthys microlepidotus* (Jenyns) (Teleostei: atherinopsidae) in the Maipo River basin, central Chile. *Population Ecology*. Rev. **56**: 569-579

Whiteley, A.S., Jenkins, S., Waite, I., Kresoje, N., Payne, H., Mullan, B., Allcock, R. y O'Donnell, A. 2012. Microbial 16S rRNA Ion Tag community metagenome sequencing using the Ion Torrent (PGM) platform. *Journal of Microbiological Methods*. Rev. **91**: 80-88

Wilkening, S., Tekkedil, M.M., Lin, G., Fritsch, E.S., Wei, W., Gagneur, J., Lazinski, D.W., Camilli, A. y Steinmetz, L.M. Genotyping 1000 yeast strains by next-generation sequencing. *BMC Genomics*. Rev. **14**: 90-99

Winterbourn, M.J. 1970. The New Zealand species of *Potamopyrgus* (Gastropoda: Hydrobiidae). *Malacología*. Rev. **10**: 283-321

Winterbourn, M.J. 1972. Morphological variation of *Potamopyrgus jenkinsi* (Smith) from England and a comparison with the New Zealand species, *Potamopyrgus antipodarum* (Gray). *Proceedings of the Malacological Society of London*. Rev. **40**: 133-145

## ANEXOS

**Anexo 1. Tabla De barcódigos utilizados para la secuenciación masiva.**

Barcódigo	Secuencia
mICOlintF_B 1	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGGATCTGCGATCCGTGGWACWGGWTGAACWG TWTAYCCYCC
mICOlintF_B 2	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCAGCTCATCAGCGTGGWACWGGWTGAACWG TWTAYCCYCC
mICOlintF_B 3	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCAAACAACAGCTGTGGWACWGGWTGAACWGT WTAYCCYCC
mICOlintF_B 4	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGGCAACACCATCCGTGGWACWGGWTGAACWG TWTAYCCYCC
mICOlintF_B 5	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGGGGATATATCGCGTGGWACWGGWTGAACWG TWTAYCCYCC
mICOlintF_B 6	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCGAGCAATCCTAGTGGWACWGGWTGAACWG TWTAYCCYCC
mICOlintF_B 7	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGAGTCGTGCACATGTGGWACWGGWTGAACWG TWTAYCCYCC
mICOlintF_B 8	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGGTATCTGCGCGTGTGGWACWGGWTGAACWG TWTAYCCYCC
mICOlintF_B 9	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCGAGGGAAAGTCGTGGWACWGGWTGAACWG TWTAYCCYCC
mICOlintF_B 10	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCAAATTCGGGATGTGGWACWGGWTGAACWGT WTAYCCYCC
mICOlintF_B 11	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGAGATTGACCAACGTGGWACWGGWTGAACWGT WTAYCCYCC
mICOlintF_B 12	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGAGTTACGAGCTAGTGGWACWGGWTGAACWGT WTAYCCYCC
mICOlintF_B 13	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGGCATATGCACTGGTGGWACWGGWTGAACWG TWTAYCCYCC
mICOlintF_B 14	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCAACTCCCGTGGTGGWACWGGWTGAACWG TWTAYCCYCC
mICOlintF_B 15	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTTGCGTTAGCAGGTGGWACWGGWTGAACWG TWTAYCCYCC
mICOlintF_B 16	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTACGAGCCCTAAGTGGWACWGGWTGAACWG TWTAYCCYCC
mICOlintF_B 17	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCACTACGCTAGAGTGGWACWGGWTGAACWG TWTAYCCYCC
mICOlintF_B 18	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTGCAGTCTCGAGTGGWACWGGWTGAACWG TWTAYCCYCC
mICOlintF_B 19	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGACCATAGCTCCGGTGGWACWGGWTGAACWG TWTAYCCYCC
mICOlintF_B 20	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTCGACATCTTGTGGWACWGGWTGAACWGT WTAYCCYCC
mICOlintF_B 21	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGGAACACTTTGGAGTGGWACWGGWTGAACWGT WTAYCCYCC
mICOlintF_B 22	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGGAGCCATCTGTAGTGGWACWGGWTGAACWG TWTAYCCYCC
mICOlintF_B 23	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTTGGGTACACGTGTGGWACWGGWTGAACWG TWTAYCCYCC
mICOlintF_B 24	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGAAGGCGCTCCTTGTGGWACWGGWTGAACWG TWTAYCCYCC
mICOlintF_B 25	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTAATACGGATCGGTGGWACWGGWTGAACWGT WTAYCCYCC
mICOlintF_B 26	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTCGGAATTAGACGTGGWACWGGWTGAACWGT WTAYCCYCC
mICOlintF_B 27	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTGTGAATTCGGAGTGGWACWGGWTGAACWGT WTAYCCYCC
mICOlintF_B 28	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCATTTCGTGGCGTGTGGWACWGGWTGAACWG TWTAYCCYCC

Anexo 2. Abundancias de macroinvertebrados del sitio A de la zona de Isla de Maipo.

Taxa	Sustratos comparables					Sustratos no comparables					
	Ma-Ro-Rá	Ma-Ro-Rá	Ma-Ro-Me	Ma-Ro-Me	Ro-Ma-Le	Ro-Ma-Me	Ro-Rá	Ro-Rá	Ro-Rá	Se-Le	Se-Le
Verme No Identificado	0	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Dugesitiidae	0	1	1	2	0	0	0	0	0	2	0
Nemertea	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Nematoda	0	2	0	0	2	2	0	0	0	0	0
Oligochaeta	0	0	0	0	0	0	9	3	1	0	0
Hirudinea	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Hidrobittidae	1	7	19	9	0	1	2	1	2	0	0
Physidae	0	15	80	99	0	0	6	1	175	8	0
Chiliniidae	0	0	1	1	0	0	2	1	1	0	0
Arachnida	0	0	0	2	0	0	0	1	0	0	0
Aegidae	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
Ostracoda	0	5	4	0	0	0	1	0	0	0	0
Collembola	0	2	0	0	21	0	77	1	2	0	0
Baetidae	1	6	12	6	3	1	6	0	1	0	0
Aphididae	0	1	0	0	1	0	2	1	0	0	0
Heteroptera No Identificado	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
Elmidae	65	76	54	59	5	6	63	35	14	3	0
Dytiscidae	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0
Hydrophilidae	0	2	1	0	0	0	2	0	9	0	0
Psephenidae	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Hydroptilidae	107	6	3	1	0	2	7	5	0	0	0
Hydropsychidae	465	109	11	17	47	476	61	195	0	1	0
Ceratopogonidae	0	0	0	0	0	0	1	1	8	7	0
Chironomidae	247	110	197	161	8	28	29	48	13	2	0
Dolichopodidae	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Empididae	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ephydriidae	0	1	2	1	0	0	0	1	45	2	0
Limonidae	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Diptera No Identificado	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>TOTAL</b>	<b>886</b>	<b>350</b>	<b>385</b>	<b>358</b>	<b>87</b>	<b>516</b>	<b>268</b>	<b>295</b>	<b>277</b>	<b>23</b>	<b>0</b>



Anexo 3. Abundancias de macroinvertebrados del sitio B de la zona de Isla de Maipo.

Taxa	Sustratos comparables						Sustratos no comparables					
	Ro-Ma-Rá	Ro-Ma-Rá	Ro-Ma-Me	Ro-Ma-Le	Ro-Ma-Le	Ro-Ma-Le	Ma2-Ro-Rá	Ma2-Ro-Me	Ma2-Ro-Me	Ma2-Ro-Me	Ro-Se-Le	Ro-Se-Le
Verme No Identificado	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Dugesidae	0	0	0	16	7	0	2	5	2	2	2	10
Nemertino	0	0	0	0	0	0	7	0	0	0	0	0
Nematoda	0	0	0	0	2	2	1	0	2	2	2	2
Oligochaeta	1	0	0	7	0	0	0	0	6	6	6	6
Hirudinea	0	0	0	2	0	0	0	0	1	1	3	3
Hidrobidae	1	0	0	84	44	44	26	5	19	19	31	31
Physidae	1	2	2	568	635	635	1260	165	167	167	358	358
Chiliniidae	0	2	1	11	58	58	107	27	20	20	37	37
Arachnida	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Aegidae	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ostracoda	0	0	0	2	2	2	1	1	1	1	4	4
Collembola	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0
Baetidae	0	0	1	0	0	0	15	13	0	0	0	0
Aphididae	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Heteroptera No Identificado	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Elmidae	27	60	9	66	15	3	198	23	11	11	5	5
Dytiscidae	0	0	0	0	11	6	0	0	0	0	0	0
Hydrophilidae	0	0	0	0	9	6	7	5	15	15	34	34
Psephenidae	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Hydroptilidae	3	20	2	10	1	5	21	4	1	1	2	2
Hydropsychidae	197	507	519	464	4	0	161	2	10	10	1	1
Ceratopogonidae	0	0	0	0	58	6	14	1	0	0	2	2
Chironomidae	93	513	169	241	4	2	395	57	7	7	9	9
Dolichopodidae	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
Empididae	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ephydriidae	0	0	0	0	19	36	1	0	0	0	9	9
Limoniidae	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
Diptera No Identificado	0	0	0	0	0	0	5	0	0	0	1	1
<b>TOTAL</b>	<b>323</b>	<b>1104</b>	<b>700</b>	<b>784</b>	<b>815</b>	<b>812</b>	<b>2221</b>	<b>310</b>	<b>262</b>	<b>310</b>	<b>262</b>	<b>514</b>

Anexo 4. Abundancias de macroinvertebrados del sitio C de la zona de Melipilla.

Taxa	Sustratos comparables						Sustratos no comparables					
	Ma-Ro-Rá	Ma-Ro-Rá	Ma-Ro-Me	Ma-Ro-Me	Ma-Ro-Le	Ma-Ro-Le	Ma2-Se-Le	Ma2-Se-Le	Ma2-Se-Le	Ma2-Se-Le	Ro-Se-Le	Ro-Se-Le
Verme No Identificado	27	58	0	11	65	31	0	194	0	0	0	1
DugesIIDae	12	15	9	0	21	9	4	1	0	0	0	6
Nemertino	0	0	28	0	16	0	58	0	0	0	0	0
Nematoda	6	22	180	241	8	4	177	404	1	3	0	3
Oligochaeta	0	0	0	0	0	0	0	3	2	0	0	0
Hirudinea	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0
Hidrobilidae	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Physidae	20	2	19	129	11	9	3	7	2	2	0	8
Chiliniidae	0	0	0	0	2	0	0	1	0	0	0	0
Arachnida	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
Aegliidae	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ostracoda	1	2	22	66	25	32	6	16	8	0	0	14
Collembola	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Baetidae	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Aphididae	0	0	0	9	0	0	2	1	1	0	0	0
Heteroptera No Identificado	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Elmidae	42	117	8	3	12	2	5	11	1	1	0	0
Dytiscidae	0	0	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Hydrophilidae	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Psephenidae	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Hydroptilidae	651	793	28	3	10	0	3	4	1	1	0	1
Hydropsychidae	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ceratopogonidae	0	1	7	9	0	0	1	6	1	1	0	1
Chironomidae	10	110	3	3	4	0	0	0	0	0	0	0
Dolichopodidae	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Empididae	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ephydriidae	2	3	7	5	0	0	0	0	0	0	0	0
Limoniidae	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Diptera No Identificado	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>TOTAL</b>	<b>773</b>	<b>1126</b>	<b>320</b>	<b>479</b>	<b>174</b>	<b>88</b>	<b>259</b>	<b>649</b>	<b>18</b>	<b>18</b>	<b>0</b>	<b>34</b>

Anexo 5. Abundancias de macroinvertebrados del sitio D de la zona de Meipilla.

Taxa	Sustratos comparables						Sustratos no comparables						
	Ma-Ro-Rá	Ma-Ro-Rá	Ro-Ma-Me	Ro-Ma-Me	Ro-Ma-Le	Ro-Ma-Le	Se-Le	Se-Le	Ro-Se-Le	Ro-Se-Le	Ro-Se-Le	Ro-Se-Le	
Verme No Identificado	0	26	0	45	0	108	0	32	0	0	30		
Dugesidae	7	20	3	20	17	107	0	5	81	14			
Nemertino	22	0	100	0	73	0	0	0	407	0			
Nematoda	6	5	26	2	2	77	14	79	41	74			
Oligochaeta	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
Hirudinea	0	0	0	3	0	0	0	0	0	1			
Hidrobidae	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1			
Physidae	0	2	2	3	1	1	0	2	3	6			
Chiliniidae	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0			
Arachnida	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0			
Aegliidae	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
Ostracoda	0	0	0	1	3	0	0	7	4	1			
Collembola	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0			
Baetiidae	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
Aphididae	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
Heteroptera No Identificado	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
Elmidae	60	156	1	2	3	36	0	28	0	8			
Dytiscidae	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
Hydrophilidae	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
Psephenidae	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
Hydroptilidae	237	194	0	1	0	4	0	14	0	0			
Hydropsychidae	12	25	0	0	0	0	0	0	0	0			
Ceratopogonidae	0	1	0	20	6	257	0	0	1	0			
Chironomidae	476	334	0	3	0	2	0	2	0	0			
Dolichopodidae	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0			
Empicidae	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0			
Ephydriidae	0	2	0	0	0	1	0	2	0	1			
Limoniidae	0	0	0	0	1	13	0	0	0	0			
Diptera No Identificado	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0			
<b>TOTAL</b>	<b>821</b>	<b>765</b>	<b>133</b>	<b>102</b>	<b>108</b>	<b>608</b>	<b>14</b>	<b>171</b>	<b>538</b>	<b>136</b>			

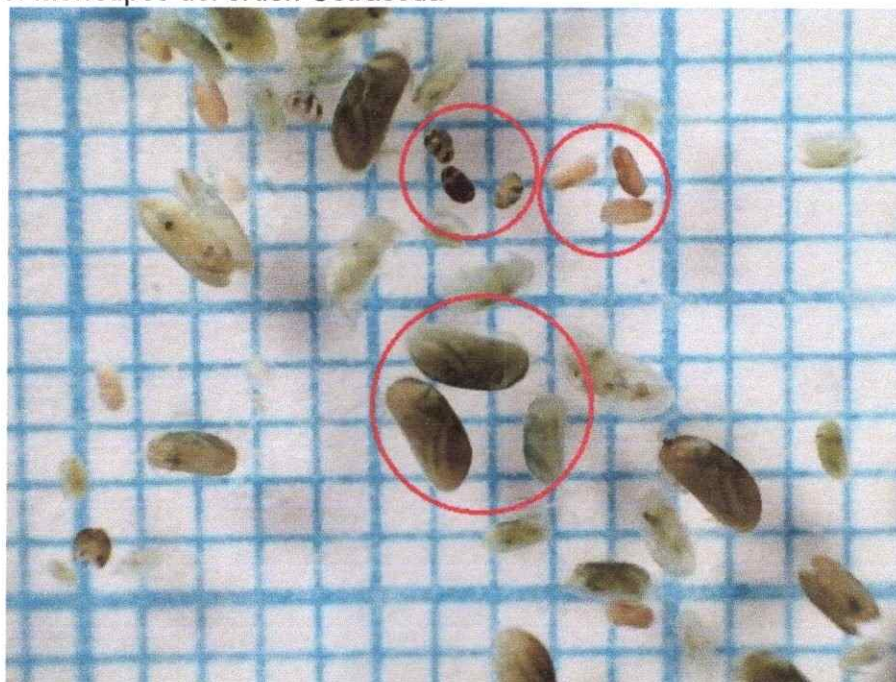
Anexo 6. Índices de diversidad de los 4 sitios muestreados

Sitio	S	N	J'	H'
A	10,6	344,5	0,579	1,324
B	11,3	784,5	0,488	1,134
C	10,1	392,0	0,599	1,351
D	8,4	339,6	0,511	1,138

Anexo 7. Morfotipos de la clase Arachnida



Anexo 8. Morfotipos del orden Ostracoda



Anexo 9. Morfotipos de la clase Collembola

