



UNIVERSIDAD DE LOS LAGOS

PROYECTO FIPA N° 2023-15:

USO DE TECNOLOGÍA DE DETECCIÓN DE MATERIAL GENÉTICO (ADN), DE MICROORGANISMOS VISIBLES O MANTOS BLANQUECINOS EN FONDOS ACUÁTICOS CATEGORÍA 4.

Informe Final

Requirente : Subsecretaría de Pesca y Acuicultura
Mandante : Fondo de Investigación Pesquera y de Acuicultura
Ejecutor : Universidad de Los Lagos
Jefe(a) de proyecto : Dr. Carlos Aranda Borghero

Mayo, 2026



INFORMACIÓN DEL PROYECTO

Requirente	:	Subsecretaría de Pesca y Acuicultura
Mandante	:	Fondo de Investigación Pesquera y de Acuicultura
Supervisión	:	Consejo de Investigación Pesquera y de Acuicultura
Ejecutor	:	Universidad de Los Lagos
Jefe de proyecto	:	Carlos Aranda Borghero
Autores	:	Carlos Aranda Borghero Mauricio Quiroz Flores Alex González Pérez
Colaboradores	:	Intesal Australis Mar Salmones Blumar Cermaq Chile DVS Tecnologías Robótica Skyring Codebreaker Bioscience

Citar como: Aranda, C., M. Quiroz y A. González. 2026. Uso de tecnología de detección de material genético (ADN), de microorganismos visibles o mantos blanquecinos en fondos acuáticos categoría 4. Informe final FIPA 2023-15. 109 páginas.

Índice general	Pág.
Detalles de autores y funciones.....	6
1. Resumen ejecutivo.....	7
2. Executive summary.....	8
3. Antecedentes preliminares.....	9
3.1. Introducción.....	9
3.2. Objetivo general del proyecto FIPA 2023-15.....	10
3.3. Objetivos específicos.....	10
4. Objetivo específico 1: Propuesta metodológica.....	10
4.1. Revisión bibliográfica.....	10
4.1.1. Metabarcoding.....	10
4.1.2. Metagenómica.....	13
4.1.3. Comparación general metabarcoding vs. metagenómica.....	16
4.1.4. Opciones de uso combinado y aplicaciones en sedimentos impactados por acuicultura.....	18
4.1.5. Detalle de estudios metabarcoding para caracterización de bacterias formadoras de CMV bajo sitio de cultivo de salmónidos en el sur de Chile.....	19
4.1.6. Posibles sesgos en metabarcoding y estrategias de mitigación.....	23
4.1.7. Conclusión de la revisión bibliográfica.....	24
4.2. Protocolo propuesto.....	25
4.2.1. Obtención de muestras.....	25
4.2.2. Metabarcoding V3-V4 gen ARNr 16S.....	30
4.2.3. Procesamiento bioinformático.....	32
5. Objetivo específico 2: Evaluación de la propuesta.....	37
5.1. Antecedentes de contexto y preguntas a evaluar.....	37
5.2. Muestreos en centros Córdova 4 y Córdova 5, Región de Magallanes.....	38
5.2.1. Sitios de muestreo.....	38
5.2.2. Detalles de protocolo.....	42
5.2.3. Videos submarinos durante la toma de muestras.....	45
5.2.4. Observaciones al microscopio.....	46
5.2.5. Abundancia relativa y taxonomía de ASVs familia Beggiatoaceae.....	48
5.3. Evaluación en centro Tangbac, Región de Aysén.....	50
5.3.1. Sitios de muestreo.....	50
5.3.2. Videos submarinos durante la toma de muestras.....	53
5.3.3. Detalles de protocolo.....	53
5.3.4. Registro de microscopía óptica.....	54
5.3.5. Abundancia relativa y taxonomía de ASVs familia Beggiatoaceae.....	55
5.4. Evaluación en centro Isla Guzmán, Región de Magallanes.....	58
5.4.1. Sitios de muestreo.....	58
5.4.2. Videos submarinos durante la toma de muestras.....	60
5.4.3. Detalles de protocolo.....	60

5.4.4. Registro de microscopía óptica.....	61
5.4.5. Abundancia relativa y taxonomía de ASVs familia Beggiatoaceae.....	61
5.5. Evaluación en centro Williams, Región de Aysén.....	64
5.5.1. Sitios de muestreo y videos submarinos durante la toma de muestras.....	64
5.5.2. Detalles de protocolo.....	66
5.5.3. Registro de microscopía óptica.....	67
5.5.4. Abundancia relativa y taxonomía de ASVs familia Beggiatoaceae.....	67
5.6. Eficacia del procedimiento de metabarcoding.....	71
5.7. Análisis de sensibilidad y aproximación para un umbral de aceptabilidad.....	74
5.7.1. INFA actual.....	74
5.7.2. Metabarcoding.....	74
5.8. Requerimientos logísticos y factibilidad del metabarcoding.....	81
5.9. Conclusión de la evaluación de propuesta metodológica (OE2).....	83
6. Objetivo específico 3: Análisis comparativo con INFA actual.....	84
7. Ejecución de taller de expertos.....	87
8. Taller con empresas participantes.....	88
9. Conclusión general.....	89
10. Proyecciones y desafíos futuros.....	90
11. Agradecimientos.....	92
12. Bibliografía.....	93
13. Glosario de términos.....	101
14. Índice de anexos.....	107
14.1. Archivos individuales.....	107
14.2. Carpetas con grupos de anexos.....	108

Índice de figuras

	Pág.
Figura 1. Etapas del metabarcoding.....	11
Figura 2. Etapas y opciones del análisis metagenómico.....	14
Figura 3. ROV Deep Trekker DTG3 para toma de muestras.....	26
Figura 4. Muestreos en Córdova 4 (Farm 1) y Córdova 5 (Farm 2).....	39
Figura 5. Imágenes representativas que ilustran los grados de CMV (G1 a G6).....	41
Figura 6. Curvas de rarefacción.....	44
Figura 7. Filamentos de Ca. Isobeggiatoa Córdova 4.....	47
Figura 8. Abundancias relativas ASV Ca. Isobeggiatoa en Córdova 4 y 5.....	48
Figura 9. Muestreo centro Tangbac.....	52
Figura 10. Muestreo centro Isla Guzmán.....	59
Figura 11. Muestreo centro Williams.....	65
Figura 12. Gráfico de cajas de abundancia relativa para Beggiatoaceae.....	76
Figura 13. Cálculo de umbral de discriminación de anaerobiosis por metabarcoding.....	78

Índice de tablas

	Pág.
Tabla 1. Enfoque y tipo de datos para metabarcoding y metagenómica.....	16
Tabla 2. Sesgos, ventajas y limitaciones para metabarcoding y metagenómica.....	17
Tabla 3. Requerimientos, logística y costos para metabarcoding y metagenómica.....	17
Tabla 4. Coordenadas sitios de muestreo Córdova 4 y 5. WGS84 UTM 18S.....	42
Tabla 5. Videos de toma de muestras en Córdova 4 y 5.....	45
Tabla 6. Videos exploratorios de transectas INFA centro Tangbac.....	50
Tabla 7. Coordenadas sitios de muestreo centro Tangbac. WGS84 UTM 18S.....	51
Tabla 8. Videos de toma de muestras en centro Tangbac.....	53
Tabla 9. Abundancia relativa (%) ASVs familia Beggiatoaceae centro Tangbac.....	55
Tabla 10. Abundancia relativa (%) ASVs Ca. Isobeggiatoa centro Tangbac.....	56
Tabla 11. Abundancia relativa (%) ASVs Thiomargarita sp. centro Tangbac.....	56
Tabla 12. Abundancia relativa (%) ASVs Ca. Venteria ishoeyi centro Tangbac.....	57
Tabla 13. Abundancia relativa (%) ASVs BB20 sp025800385 centro Tangbac.....	57
Tabla 14. Coordenadas sitios de muestreo Isla Guzmán. WGS 84 UTM 18S.....	58
Tabla 15. Videos de toma de muestras en Centro Isla Guzmán.....	60
Tabla 16. Abund. relativa (%) ASVs familia Beggiatoaceae centro Isla Guzmán.....	62
Tabla 17. Abund. relativa (%) ASVs Ca. Isobeggiatoa centro Isla Guzmán.....	62
Tabla 18. Abund. relativa (%) ASVs BB20 sp025800385 centro Isla Guzmán.....	63
Tabla 19. Abund. relativa (%) ASVs UBA10656 sp030378085 centro Isla Guzmán.....	63
Tabla 20. Idem. Ca. Venteria ishoeyi.....	64
Tabla 21. Coordenadas sitios de muestreo en centro Williams. WGS 84 UTM 18S.....	66
Tabla 22. Videos de toma de muestras en centro Williams.....	66
Tabla 23. Abund. relativa (%) ASVs familia Beggiatoaceae centro Williams.....	68
Tabla 24. Abundancia relativa (%) ASVs Ca. Isobeggiatoa centro Williams.....	68
Tabla 25. Abund. relativa (%) ASVs JADGDF01 sp016745055 centro Williams.....	69
Tabla 26. Abund. relativa (%) ASVs Ca. Holobeggiatoa centro Williams.....	69
Tabla 27. Abund. relativa (%) ASVs Thiomargarita sp. (dudoso) centro Williams.....	70
Tabla 28. Abund. relativa (%) ASVs Ca. Venteria ishoeyi centro Williams.....	70
Tabla 29. Consolidado de abund. rel. (%) ASV familia Beggiatoaceae.....	73
Tabla 30. Comparación del criterio de inspección visual vs. el criterio metabarcoding....	79

Detalles de autores y funciones

Dr. Carlos Aranda Borghero

caranda@ulagos.cl; carabor@gmail.com

ORCID ID: 0000-0001-6219-622X

Jefe de proyecto e investigador principal, responsable de la planificación y ejecución de todas las actividades del proyecto. A cargo de la revisión bibliográfica, así como de la coordinación y realización de las campañas de muestreo en terreno, incluyendo el análisis microscópico *in situ*. Asume el rol de bioinformático definido en la propuesta original, liderando el análisis y la validación de los resultados de metabarcoding generados por un servicio externo, así como su comparación con la metodología INFA vigente. Responsable de la organización del taller, la elaboración de los informes y la difusión de resultados.

Mg. Cs. Mauricio Quiroz Flores

Profesional de apoyo en la preparación de las campañas de muestreo, la recepción de muestras y la verificación microscópica en laboratorio. Participa en la validación del análisis microscópico realizado en terreno por el Jefe de proyecto, colabora en el análisis comparativo con la metodología INFA vigente y aporta a la elaboración de informes.

Dr. Alex González Pérez

Investigador de apoyo en la revisión bibliográfica, la planificación de las campañas de muestreo y el procesamiento y análisis de resultados. Colabora en la coordinación de los requerimientos asociados al metabarcoding y en la elaboración de informes.

1. Resumen ejecutivo

El proyecto FIPA 2023-15 evaluó el uso de tecnologías de detección de ADN en comunidades de microorganismos visibles o mantos blanquecinos en fondos marinos categoría 4 bajo centros de cultivo de salmones, con el objetivo de analizar su potencial incorporación al marco regulatorio y mejorar la comprensión de su ocurrencia en estos ambientes. Para ello, se diseñó e implementó un protocolo de metabarcoding del gen ARNr 16S (región V3-V4, plataforma Illumina), enfocado en la familia Beggiatoaceae, que integró inspecciones mediante ROV, muestreos de sedimento y análisis microscópico en centros de las regiones de Aysén y Magallanes, junto con una revisión crítica de los procedimientos INFA vigentes.

Los resultados confirman la viabilidad técnica del enfoque molecular para caracterizar bacterias gigantes oxidadoras de azufre y detectar consistentemente Beggiatoaceae en sedimentos con cubierta de microorganismos visibles (CMV), incluso a bajas abundancias relativas. Asimismo, se observó un aumento progresivo de su señal desde sitios sin CMV hasta aquellos con alta cobertura, lo que valida la CMV como un bioindicador del tránsito desde condiciones aerobias a anaerobias y refuerza el uso de la inspección visual mediante video ROV como herramienta central en sitios categoría 4.

El análisis permitió proponer un umbral molecular de abundancia relativa coherente con el criterio visual binario vigente. No obstante, el enfoque molecular presenta limitaciones relevantes, incluyendo menor sensibilidad respecto a la inspección visual, alta variabilidad de los datos y una fuerte dependencia de condiciones logísticas, cadena de custodia y capacidades analíticas especializadas.

Desde una perspectiva operativa y económica, la inspección visual mediante video ROV presenta menor complejidad, mayor rapidez, menores costos y menor riesgo global, lo que la posiciona como la opción más adecuada para monitoreo rutinario. En contraste, las herramientas moleculares se proyectan como complementarias, con valor en investigación, calibración de indicadores, revisión normativa y estudios de diversidad microbiana.

En consecuencia, se recomienda mantener la inspección visual mediante video ROV como estándar para la evaluación INFA en sitios categoría 4 mientras la CMV se utilice bajo un enfoque binario. Adicionalmente, se propone avanzar hacia una gradación del bioindicador visual basada en un sistema tipo semáforo (verde, amarillo y rojo), que permita una evaluación más progresiva del estado ambiental, junto con promover pilotos colaborativos entre reguladores, industria y centros de investigación para facilitar la integración de herramientas moleculares y la automatización del análisis de video y reportes.

2. Executive summary

The FIPA 2023-15 project assessed the application of DNA-based detection technologies to communities of visible microorganisms that form whitish microbial mats on the seabed in Category 4 environments, defined as rocky substrates at depths of no more than 60 m beneath salmon farming sites. The study evaluated their potential integration into the regulatory framework and improved understanding of their occurrence in these environments. A 16S rRNA metabarcoding protocol (V3-V4 region, Illumina platform), focused on the Beggiatoaceae family, was developed and implemented, combining ROV inspections, sediment sampling and microscopic analyses at sites in the Aysén and Magallanes regions, alongside a critical review of current environmental compliance reporting (INFA).

Results confirm the technical viability of the molecular approach, enabling the characterisation of giant sulphur-oxidising bacteria and the consistent detection of Beggiatoaceae in sediments with visible microbial mats (VMM), even at low relative abundances. A clear increase in Beggiatoaceae signal from sites without VMM to those with high coverage supports the use of VMM as a practical bioindicator of the transition from aerobic to anaerobic conditions, consistent with current regulations, and reinforces video-ROV visual inspection as a core tool for INFA assessments in Category 4 environments.

Sensitivity and specificity analyses allowed the definition of a molecular relative abundance threshold aligned with the current binary visual criterion. However, key limitations were identified, including lower sensitivity compared with VMM visual inspection, high data variability, and strong dependence on complex sampling logistics, strict chain of custody, and advanced molecular and bioinformatics capabilities.

From an operational and economic perspective, video-ROV visual inspection offers lower logistical complexity, faster response times, reduced costs and lower overall risk, making it better suited for routine monitoring and regulatory application. Molecular approaches are better positioned as complementary tools, particularly for research, indicator calibration, regulatory development and detailed microbial diversity studies.

Accordingly, video-ROV visual inspection should remain the standard method for INFA assessments at Category 4 sites while the VMM bioindicator is applied in a binary framework. A gradual transition towards a graded visual system, based on a traffic light approach (green, amber and red), is recommended, alongside collaborative pilot initiatives between regulators, industry and research institutions to support the integration of molecular tools and the automation of video analysis and reporting.

3. Antecedentes preliminares

3.1. Introducción

En el Boletín Ambiental del Servicio Nacional de Pesca y Acuicultura (Sernapesca), que consideró el universo de informes ambientales para la acuicultura (INFAs) entre 2012 y 2019, se observó que en dicho periodo se mantiene una tendencia estable en los porcentajes de INFAs aeróbicas y anaeróbicas en las regiones de Los Lagos, Aysén y Magallanes. En este mismo periodo, la región de Los Lagos presenta los menores porcentajes de INFAs anaeróbicas (16%), mientras que la región de Magallanes registró los mayores (48%).

El análisis por separado de las distintas variables que determinaban la calificación anaeróbica, según los estándares establecidos en la Resolución Exenta N.º 3612-2009, que fija las metodologías para elaborar la caracterización preliminar de sitio y la información ambiental de la Subsecretaría de Pesca y Acuicultura, permitió a Sernapesca concluir que la variable que más destaca como indicador determinante de anaerobiosis en el periodo 2012-2019 fue la presencia de cubierta de microorganismos visibles (CMV), o mantos blanquecinos, utilizada como único indicador, con 39% para Los Lagos, 55% para Aysén y 34% para Magallanes.

Como se indica en las bases técnicas de la licitación pública del proyecto FIPA 2023-15, titulado "*Uso de tecnología de detección de material genético (ADN) de microorganismos visibles o mantos blanquecinos en fondos acuáticos categoría 4*", referido a sustratos duros o semiduros con profundidad menor o igual a 60 metros, se reconocen dificultades en la determinación de anaerobiosis en base al indicador CMV. Entre estas dificultades se incluye la falta de conocimientos sobre los microorganismos o bacterias que conforman los mantos blanquecinos que se generarían bajo condiciones anaeróbicas en los fondos duros de los centros de cultivo, así como la escasez de información sobre los ciclos biológicos de estos microorganismos o bacterias y los factores que intervienen en su aparición. No existe certeza respecto de si su presencia se debe al aporte orgánico de los centros de cultivo, a condiciones ambientales u oceanográficas naturales del sector o a una combinación de ambas.

Se hace necesario evaluar si la ocurrencia de CMV debe determinarse mediante tecnologías de detección de material genético (ADN) en estratos de sedimento, con el fin de establecer la condición de anaerobiosis en centros con fondo categoría 4 y apoyar la gestión. Estas tecnologías también permitirían conocer en mayor profundidad las características de los principales microorganismos o bacterias que conforman la CMV o mantos blanquecinos que habitan en las aguas marinas de nuestras costas y que se manifiestan en condiciones de anaerobiosis, con el propósito de comprender su comportamiento, identificando el tipo de microorganismos y las condiciones de su aparición.

3.2. Objetivo general del proyecto FIPA 2023-15

El objetivo general de esta propuesta es evaluar la presencia de microorganismos formadores de mantos blanquecinos asociados a cultivos intensivos de salmónidos, mediante el uso de tecnologías de detección de material genético (ADN) en sedimentos categoría 4.

3.3. Objetivos específicos

- OE1.** Proponer metodologías, en base a tecnología de detección de material genético (ADN), para identificar la presencia de microorganismos visibles (mantos blanquecinos) que son utilizados como indicadores de enriquecimiento orgánico en sedimentos asociados a centros categoría 4.
- OE2.** Evaluar las metodologías propuestas en el OE1 mediante mediciones y muestreos en centros de cultivo categoría 4 en las Regiones de Los Lagos, Aysén y Magallanes, que permitan evidenciar su eficacia y establecer índices o límites para la detección.
- OE3.** Realizar un análisis comparativo entre la metodología utilizada actualmente para la valoración ambiental de sitios categoría 4 según normativa vigente (filmaciones) y los resultados obtenidos en el OE2, que incluya tanto los resultados obtenidos como la valoración económica.

4. Objetivo específico 1: Propuesta metodológica

4.1. Revisión bibliográfica

La caracterización de comunidades microbianas en sedimentos marinos utiliza principalmente dos enfoques moleculares: **metabarcoding** y **metagenómica**, que ofrecen estrategias sustanciales para la evaluación y estudio de comunidades microbianas en ambientes complejos y/o perturbados, como los sedimentos influenciados por la acuicultura intensiva de salmónidos.

4.1.1. Metabarcoding

El metabarcoding es un método basado en la amplificación por PCR y secuenciación de regiones específicas de ADN, especialmente el gen ARNr 16S en procariontes (en adelante referido frecuentemente como 16S). Permite la identificación y cuantificación de taxones en comunidades complejas de sedimentos marinos, siendo el

16S el marcador estándar gracias a sus múltiples regiones hipervariables (V1 a V9) que discriminan bacterias y arqueas.

La aplicación del método ha evolucionado desde la secuenciación Sanger y la pirosecuenciación masiva 454, esta última muy utilizada con el segmento V1-V3 (Aranda y col. 2015, Hornick y Buschmann 2018), hasta el uso predominante de sistemas basados en síntesis, como Illumina, con tendencia al segmento V3-V4 (Klindworth y col. 2013). Este cambio ha permitido pasar de analizar decenas (o centenas) a miles (o millones) de secuencias por muestra, permitiendo aumentar la cobertura taxonómica en ambientes microbianos complejos.

El flujo de trabajo estándar comprende la toma y preservación de muestras, la extracción de ADN, la amplificación por PCR de regiones hipervariables, la preparación de bibliotecas, la secuenciación masiva y el análisis bioinformático (Fig. 1). Este proceso se encuentra ampliamente descrito y aplicado en diversos estudios de microbiomas marinos.



Figura 1. Etapas del metabarcoding.
Padilla-García y col (2021).

La plataforma Illumina utiliza tecnología de secuenciación por síntesis (SBS, por sus siglas en inglés) y detecta nucleótidos fluorescentes incorporados a una cadena de ADN en crecimiento, permitiendo la secuenciación paralela de millones de fragmentos. El proceso incluye preparación de bibliotecas, generación de grupos clonales de ADN (clusters) en una celda de flujo y ciclos de incorporación de nucleótidos y captura de imágenes. Con lecturas de 2×300 pb en plataformas como MiSeq y NextSeq 1000/2000, ofrece una cobertura completa de las regiones V4, V3-V4 y V4-V5, con alta resolución taxonómica y capacidad de multiplexar numerosas muestras por corrida. Los kits NextSeq 1000/2000 Reagent de 600 ciclos y Nextera XT DNA Index optimizan el rendimiento y la multiplexación. Esta metodología permite la identificación a nivel de género (a veces hasta especie) sin necesidad de cultivo previo, análisis de múltiples muestras por corrida y mayor sensibilidad que métodos tradicionales. Se recomiendan 10 a 20 mil lecturas por muestra para capturar adecuadamente la diversidad (Caporaso y col. 2011, Roslin y col. 2019), así como múltiples réplicas por sitio (Kato y col. 2010) y controles de extracción y PCR (Salter y col. 2014, Parada y col. 2016).

La selección de la región de amplificación del gen ARNr 16S merece revisión detallada. Fang y col. (2022) compararon conjuntos de partidores V4 y V3-V4 para analizar la comunidad microbiana en agua de fondo y sedimentos de arrecifes artificiales en la bahía de Laoshan (China), observando que V3-V4 entregó mayor asignación taxonómica, especialmente en sedimentos, mejorando la detección de taxones indicadores y la descripción de cambios finos asociados a gradientes de impacto antrópico, como los generados por la acuicultura. Otro estudio (Fadeev y col. 2021) comparó partidores V3-V4 y V4-V5 en diversos hábitats marinos árticos, incluyendo sedimentos profundos, mostrando asignaciones comparables hasta el nivel de género. Sin embargo, la elección del segmento hipervariable (V3-V4, V4 o V4-V5) modifica sistemáticamente las estimaciones de diversidad alfa y beta y las abundancias relativas de distintos grupos bacterianos, lo que limita la comparabilidad directa entre estudios que usan pares de partidores diferentes (Yang y col. 2016). Con todo, la región V3-V4 en sistemas Illumina se ha consolidado como una de las más utilizadas y normalizadas para caracterizar la microbiota asociada a cultivos acuícolas y su impacto ambiental (Dowle y col. 2015, Quero y col. 2020, Dully y col. 2021, Frühe y col. 2021, Keeley y col. 2021, Oladi y col. 2024, Gu y col. 2025), aunque otras regiones como V4-V5 (Johansen y col. 2024) o V1-V3 (Coutts y col. 2024) mantienen cierto uso. Por ello, es una buena práctica restringir las comparaciones entre trabajos que emplean regiones distintas a niveles taxonómicos más robustos, es decir, categorías superiores al género, donde se espera una menor discrepancia en los indicadores de diversidad.

Otra técnica es Ion Personal Genome Machine (PGM), basada en secuenciación por semiconductores. Utiliza chips con millones de micropocillos donde las moléculas de ADN se amplifican y se secuencian mediante síntesis. En este proceso, la incorporación de cada nucleótido libera un ion hidrógeno que provoca un cambio de pH detectado por sensores integrados, lo que permite registrar la secuencia en tiempo real sin etiquetas ópticas ni fluorescencia. Las longitudes de lectura típicas oscilan entre 200 y 600 bases, según el tipo de chip y el protocolo utilizado. Es una plataforma flexible y escalable,

adecuada para aplicaciones de metabarcoding, metagenómica, transcriptómica, análisis de variantes en el número de copias y secuenciación de novo. Sin embargo, para estudios de metabarcoding, diversos autores han señalado que las plataformas Illumina tienden a ser preferidas por sobre Ion PGM debido a menores tasas de errores de inserción y delección y a una mayor profundidad de lectura, aspectos críticos en análisis comparativos de diversidad ambiental.

Finalmente, la secuenciación de amplicones 16S-ITS-23S mediante PacBio permite identificar bacterias y arqueas e incluir hongos si se emplea ITS, facilitando estudios de composición del microbioma. Esta técnica se considera metabarcoding porque se basa en la amplificación y secuenciación dirigida de regiones informativas del genoma microbiano (Srinivas y col. 2025). Al secuenciar el operón completo, la resolución taxonómica supera la obtenida con regiones parciales de 16S, permitiendo discriminar hasta especie e incluso cepa. PacBio utiliza tecnología SMRT (Single-Molecule Real-Time), en la que se preparan bibliotecas de amplicones que se secuencian en una célula SMRT, produciendo lecturas muy largas (hasta 15 mil pb o más), ideales para cubrir el operón completo. Además, genera lecturas de alta calidad (HiFi Reads) mediante secuenciación circular (CCS), donde se reconstruye una secuencia consenso de alta precisión (>Q30, >99,9%) a partir de múltiples pasadas sobre la misma molécula, minimizando los errores típicos de las lecturas largas. Para el metabarcoding 16S-ITS-23S con PacBio se emplean protocolos de multiplexación para analizar múltiples muestras en paralelo, junto con kits SMRTbell y equipos Sequel II/IIe. El análisis de secuencias se realiza con programas como QIIME2 o DADA2 adaptados a lecturas largas, lo que permite una clasificación taxonómica de mayor resolución (especie/cepa), análisis filogenético y detección de variantes (Callahan y col. 2019). Esta técnica facilita la detección de microorganismos difíciles de distinguir utilizando solo 16S parcial y ofrece alta precisión de secuenciación con menor sesgo de PCR en regiones con contenido GC variable. Los amplicones típicos oscilan entre 4,2 y 4,7 kb (16S completo, ITS y parte de 23S). Como toda tecnología reciente, PacBio presenta limitaciones como alto costo y mayor tiempo de análisis respecto de las lecturas cortas, además de requerir infraestructura y personal bioinformático especializado para procesar lecturas largas, por lo que hoy se reserva principalmente para estudios que requieren máxima resolución taxonómica y filogenética (Martijn y col. 2019).

4.1.2. Metagenómica

La metagenómica implica la secuenciación directa de todo el ADN ambiental, sin un paso previo de amplificación de regiones específicas, habilitando análisis taxonómicos y funcionales detallados en comunidades microbianas.

La plataforma Illumina para secuenciación shotgun es una de las más utilizadas en metagenómica, permitiendo obtener millones de lecturas cortas paired-end que posibilitan un análisis profundo de la diversidad y funciones microbianas, la reconstrucción de genomas y la evaluación de rutas metabólicas (Quince y col. 2017).

Para el ensamblaje y la anotación se emplean herramientas bioinformáticas ejecutadas en servidores especializados, debido al gran volumen de datos generado. En este contexto, el flujo de trabajo metagenómico completo comprende: (1) un diseño de estudio y la aplicación de un protocolo experimental cuidadoso, cuya importancia suele subestimarse, incluyendo fragmentación del ADN, unión de adaptadores, generación de librerías y secuenciación; (2) un preprocesamiento computacional con control de calidad para eliminar adaptadores, recortar por calidad, remover duplicados, filtrar ADN no objetivo y, cuando es necesario, submuestrear las lecturas para normalizar el esfuerzo de secuenciación entre muestras; (3) un análisis de secuencias que combine enfoques basados en lecturas y en ensamblaje, seleccionados según los objetivos del estudio; (4) un posprocesamiento que aplica técnicas estadísticas multivariantes para interpretar patrones taxonómicos y funcionales; y (5) una fase de validación, imprescindible porque las conclusiones derivadas de datos biológicos de alta dimensionalidad son sensibles a sesgos del diseño y requieren de seguimiento para corroborar los hallazgos (Fig. 2).

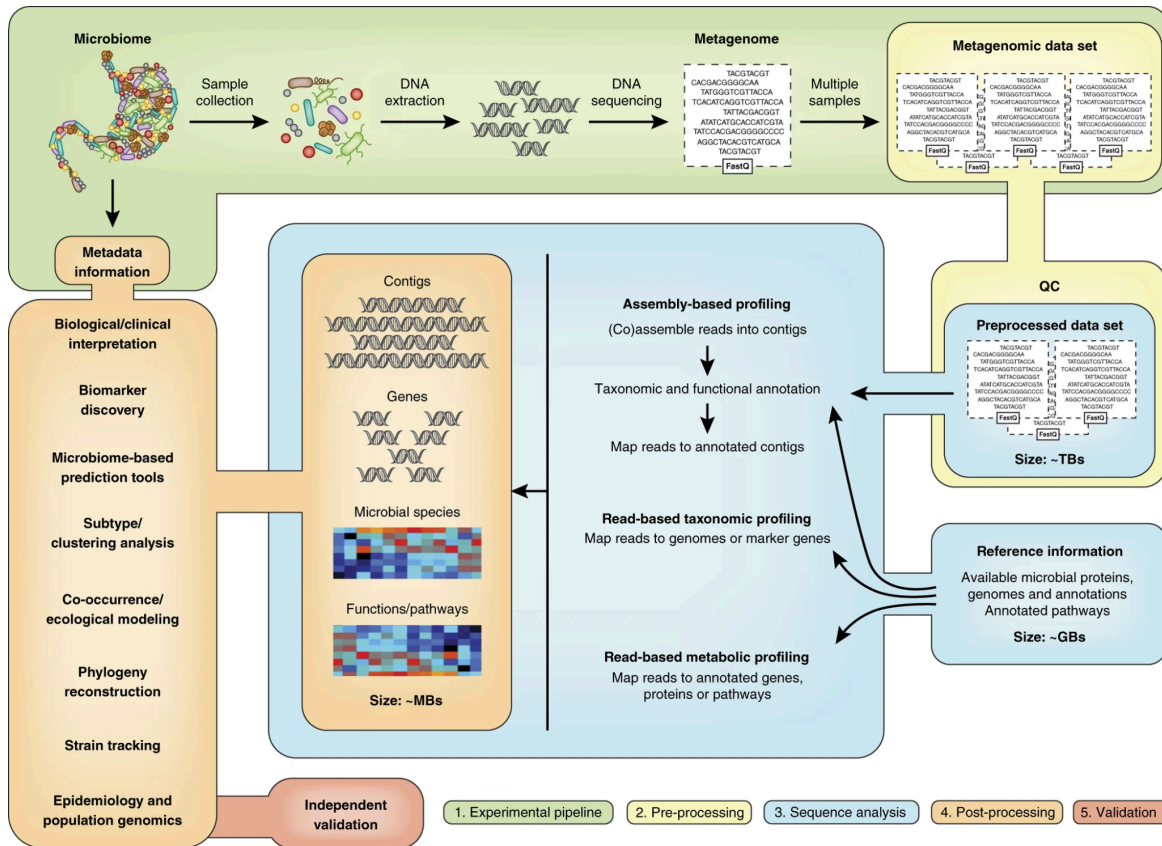


Figura 2. Etapas y opciones del análisis metagenómico.

Quince y col. (2017).

La metagenómica implica costos relevantes asociados no solo a la secuenciación, sino también a los requerimientos computacionales necesarios para procesar grandes volúmenes de datos. Cada corrida shotgun puede generar desde decenas de gigabytes hasta terabytes de archivos FASTQ, lo que exige infraestructura de almacenamiento de alto rendimiento, respaldo y gestión de datos a largo plazo. El análisis bioinformático (control de calidad, ensamblaje, mapeo, anotación y estadísticas multivariantes) requiere clústeres de cómputo o servidores con múltiples núcleos, amplia memoria RAM y, en muchos casos, acceso a colas de cómputo administradas y personal especializado capaz de mantener y actualizar flujos de trabajo complejos. A estos costos directos se suman eventuales licencias de software, tiempo de procesamiento prolongado y la necesidad de implementar buenas prácticas de documentación y reproducibilidad, lo que incrementa la inversión total frente a metodologías más simples basadas en marcadores (metabarcoding).

Se agrega también la tecnología Nanopore, que posibilita la secuenciación directa de moléculas individuales de ADN o ARN al hacerlas atravesar nanoporos incrustados en una membrana. Durante este proceso, los cambios en la corriente eléctrica generados por las bases que atraviesan el poro son detectados y traducidos en tiempo real, permitiendo obtener la secuencia sin pasos de amplificación por PCR ni procesamiento químico previo. Esta metodología destaca por su capacidad de producir lecturas ultra-largas, de hasta 4 Mb, permitiendo ensamblaje de genomas completos, resolución de regiones genómicas repetitivas y monitoreo en campo. Las principales plataformas comerciales de Nanopore incluyen MinION, GridION y PromethION, diseñadas para cubrir desde aplicaciones portátiles y de campo hasta laboratorios de alto rendimiento. Entre sus aplicaciones se cuentan estudios de biodiversidad de microbiota en agua marina (Liem y col. 2021), microbiomas de algas (Van Der Loos y col. 2021) y exploración de genomas de novo (Liu y col. 2022, Sereika y col. 2022). La flexibilidad y la generación de datos en tiempo real, junto con la posibilidad de operar sistemas portátiles como MinION en ambientes remotos, son ventajas distintivas de Nanopore, ampliando sus usos en investigación ecológica, clínica y de biodiversidad microbiana.

Finalmente, la plataforma Ion PGM (mencionada previamente como alternativa tecnológica en el metabarcoding) también se ha utilizado eficazmente en metagenómica shotgun de ambientes marinos. Un ejemplo es el estudio de Guerrero y col. (2022), donde se aplicó Ion PGM para secuenciar el ADN total de sedimentos en el Golfo de México, identificando a Proteobacteria como filo dominante y describiendo la estructura comunitaria en función de condiciones físico-químicas y factores antropogénicos. A pesar de avances como la mejora en la precisión de lectura bruta hasta ~99% (Q20), la tecnología Illumina sigue siendo preferida cuando se priorizan máxima exactitud de secuencia y menor costo por muestra en corridas múltiples, especialmente en análisis metagenómicos 16S y estudios de microbiomas complejos.

4.1.3. Comparación general metabarcoding vs. metagenómica.

El metabarcoding se centra en la secuenciación de marcadores específicos como el gen ARNr 16S para describir la composición taxonómica y los patrones de diversidad de las comunidades, mientras que la metagenómica trabaja con el ADN ambiental total y amplía el alcance desde la simple presencia de taxones hacia la reconstrucción de genomas y el análisis del potencial funcional de la comunidad, incluyendo rutas metabólicas y genes de relevancia ecológica. En otras palabras, el metabarcoding responde principalmente a la pregunta “quién está ahí” en muchos sitios y momentos, mientras que la metagenómica se orienta a responder “qué puede hacer la comunidad” y “cómo se organizan sus funciones” en menos sitios pero con mayor profundidad en el análisis (Tabla 1).

Tabla 1. Enfoque y tipo de datos para metabarcoding y metagenómica.

Aspecto	Metabarcoding	Metagenómica
Principio	Amplificación y secuenciación de uno o pocos marcadores (ARNr 16S).	Secuenciación <i>shotgun</i> de todo el ADN ambiental sin amplificación dirigida.
Información obtenida	Composición taxonómica, buena para diversidad alfa/beta y comparación de comunidades.	Composición taxonómica y repertorio funcional (genes, rutas metabólicas, GRAs, etc.).
Resolución taxonómica	Generalmente hasta género, a veces especie según marcador y base de datos.	Potencialmente hasta especie/cepa si la cobertura y las bases de datos lo permiten.

Por otro lado, el metabarcoding está condicionado por sesgos de PCR, elección de partidores, diferencias en número de copias del gen marcador y composición GC, lo que puede distorsionar abundancias relativas, aunque ofrece un marco muy estandarizado para evaluar diversidad y cambios comunitarios en series largas de monitoreo. En cambio, la metagenómica evita la amplificación dirigida y reduce estos sesgos, permitiendo detectar genes y rutas funcionales incluso en grupos poco conocidos, aunque introduce otras limitaciones asociadas a la complejidad de los análisis, la dependencia de bases de datos funcionales incompletas y la dificultad de interpretar grandes volúmenes de datos en términos ecológicos (Tabla 2).

Tabla 2. Sesgos, ventajas y limitaciones para metabarcoding y metagenómica.

Aspecto	Metabarcoding	Metagenómica
Sesgos principales	PCR (partidores, número de copias 16S, quimeras, GC, kitoma, ADN degradado).	Menos sesgo de amplificación, pero sensible a contaminación y ADN dominante de eucariotas metazoos.
Ventajas clave	Más barato, mayor número de muestras, protocolos e interpretación muy estandarizados (Illumina V3-V4).	Permite inferir funciones, rutas metabólicas, genes de resistencia y descubrir taxones poco conocidos.
Limitaciones clave	Escaso poder funcional, fuerte dependencia del marcador y de la base de datos, difícil cuantificación absoluta.	Mucho mayor costo, alto volumen de datos, bioinformática compleja y riesgo de diluir la señal de bacterias raras frente a ADN abundante.

Finalmente, el metabarcoding demanda cantidades moderadas de ADN, infraestructura de laboratorio y capacidades bioinformáticas relativamente accesibles, y permite procesar muchas muestras por corrida a un costo manejable, lo que lo hace adecuado para programas de vigilancia ambiental y evaluación comparativa de múltiples sitios. La metagenómica, por su parte, requiere ADN de mayor calidad y cantidad, capacidades de cómputo avanzadas y presupuestos sustancialmente superiores para alcanzar una cobertura informativa equivalente, por lo que suele reservarse para campañas focalizadas donde el detalle funcional y genómico resulta crítico para la toma de decisiones o la generación de hipótesis mecanísticas (Tabla 3).

Tabla 3. Requerimientos, logística y costos para metabarcoding y metagenómica.

Aspecto	Metabarcoding	Metagenómica
Calidad/cantidad de ADN	Requiere ADN de calidad moderada, kits tipo PowerSoil/Zymo son suficientes.	Requiere más ADN total y alta calidad para buena cobertura y ensamblaje.
Logística de laboratorio	Flujo relativamente estándar: extracción, PCR de marcador, librerías, secuenciación (Illumina MiSeq/NextSeq).	Fragmentación de ADN total, librerías shotgun y análisis en servidores de alto desempeño.
Costos relativos	Menor costo por muestra, adecuado para monitoreo rutinario con muchas réplicas.	Varias veces más costoso por muestra para lograr coberturas equivalentes.

En resumen, el metabarcoding es la herramienta preferente para el monitoreo rápido, amplio y comparativo de la estructura microbiana en sedimentos marinos. La metagenómica, en cambio, aporta una capa adicional de resolución funcional y taxonómica fina y resulta más adecuada cuando se requiere caracterizar en detalle los procesos ecológicos y las funciones clave subyacentes. El diseño óptimo de los estudios ambientales suele combinar ambas aproximaciones. Se utiliza metabarcoding para abarcar grandes escalas espacio temporales y se recurre a metagenómica en subconjuntos estratégicos de muestras que necesitan un análisis más profundo. En este contexto, el metabarcoding ofrece un monitoreo taxonómico rápido y de menor costo, mientras que la metagenómica se reserva para preguntas que demandan un nivel superior de detalle funcional y genómico, con un costo y una complejidad mayores.

4.1.4. Opciones de uso combinado y aplicaciones en sedimentos impactados por acuicultura

Diversos estudios recientes han explorado de manera comparativa y complementaria el uso de metabarcoding y metagenómica para caracterizar comunidades microbianas en ambientes acuáticos y sedimentos marinos. Rieder y colaboradores (2023) analizaron sistemas de recirculación acuícola (RAS) para caracterizar las comunidades presentes en biopelículas de paredes de tanque, agua y biofiltros, implementando tres enfoques. Estos enfoques fueron amplicones cortos 16S (V4, V3-V4 y V1-V3) con Illumina MiSeq, amplicones largos 16S-ITS-23S con PacBio y metagenómica shotgun sin amplificación dirigida. El procesamiento bioinformático utilizó DADA2 y SILVA para las lecturas de Illumina, Athena para las lecturas de PacBio y Kraken y Bracken para las lecturas metagenómicas. La diversidad alfa y beta se evaluó mediante índices de riqueza y Shannon, distancias Bray-Curtis, MDS y PERMANOVA. Los autores concluyeron que V3-V4 y V4 generan amplicones de alta calidad, mientras que V1-V3 presenta menor rendimiento. Ambas regiones recuperan patrones similares de diversidad y composición a nivel de filo, pero V3-V4 ofrece mejor resolución a nivel de género, y las lecturas largas 16S-ITS-23S de PacBio permiten identificaciones más precisas a nivel de especie.

Semenov (2021), en una revisión sobre suelos, enfatiza que el metabarcoding ha sido clave para describir de manera eficiente y comparativa la diversidad microbiana, aunque con alcance funcional limitado, mientras que la metagenómica posibilita un análisis funcional y taxonómico integrado, incluyendo rutas metabólicas y genes de resistencia, a costa de mayores demandas de recursos computacionales y de interpretación. Plantea que la integración de ambas aproximaciones, junto con mejoras en herramientas bioinformáticas y bases de datos, es esencial para desentrañar la compleja ecología microbiana de suelos, desafío análogo al de los sedimentos marinos.

En un contexto directamente ligado a la salmonicultura chilena, Ortiz-Severín y col. (2024) combinaron metabarcoding 16S (Illumina MiSeq) y metagenómica shotgun (Illumina) para evaluar el impacto de la acuicultura en aguas superficiales, detectando

incrementos significativos en diversidad y abundancia de genes de resistencia a antibióticos (ARGs) y alteraciones marcadas en la composición bacteriana respecto de áreas no intervenidas. En este caso, ambas técnicas se complementaron para mejorar la evaluación del efecto de las prácticas productivas sobre la salud y funcionalidad del microbioma marino.

En conjunto, estos antecedentes confirman que el metabarcoding sigue siendo la herramienta de elección para monitoreo rápido con muchas muestras y objetivos comparativos, gracias a su menor costo, alta estandarización y capacidad para describir patrones de diversidad y composición, aunque limitado por sesgos de PCR, dependencia del fragmento amplificado y escasa resolución funcional. La metagenómica, en contraste, ofrece una visión más completa de la composición y el potencial funcional de las comunidades, con alta resolución taxonómica por secuencia, detección directa de genes y rutas metabólicas y ausencia de sesgos de amplificación, lo que la hace crítica para estudiar procesos como rutas biogeoquímicas, resistencia a antibióticos, identificación de taxones poco conocidos y evaluación de impactos antrópicos, incluida la resistencia bacteriana asociada a la acuicultura. Sin embargo, su aplicación se ve restringida por costos elevados, altos requerimientos de secuenciación y procesamiento de datos y considerable complejidad bioinformática y de interpretación, especialmente en matrices con alta proporción de material genómico desconocido (Quince y col. 2017), situación esperable en sedimentos marinos donde gran parte de la diversidad procarionota corresponde a taxones poco descritos o con escasa información disponible (Aranda y col. 2015, Miranda y col. 2021).

La combinación de enfoques de metabarcoding y metagenómica en sedimentos marinos y ambientes afines permite así atenuar las limitaciones de cada método por separado, optimizar la caracterización ecológica y funcional y abordar de manera más adecuada la complejidad y diversidad de estos ecosistemas. Sin embargo y como conclusión preliminar, y considerando los objetivos de monitoreo y los menores costos y requerimientos analíticos, la secuenciación masiva para caracterización de la composición microbiana en sedimentos sigue favoreciendo, por ahora, el uso de estrategias de metabarcoding en plataforma Illumina, particularmente con la región V3-V4 del gen ARNr 16S (Dowle y col. 2015, Quero y col. 2020, Dully y col. 2021, Frühe y col. 2021, Keeley y col. 2021, Oladi y col. 2024).

4.1.5. Detalle de estudios metabarcoding para caracterización de bacterias formadoras de CMV bajo sitio de cultivo de salmónidos en el sur de Chile

Aranda y col. (2010) efectuaron el primer reporte en Chile sobre cubiertas de microorganismos visibles bajo un centro de cultivo de salmónidos categoría 3 en Calbuco, Región de Los Lagos. El manto, ausente en el lecho marino alejado de la influencia directa de la instalación (a 360 m de las balsas jaulas), se estudió mediante una estrategia que combinó observaciones microscópicas de muestras enriquecidas de bacterias formadoras de cubierta con metabarcoding de primera generación, basado en

clonamiento y secuenciación Sanger de amplicones del gen ARNr 16S. Se generó una librería de 53 secuencias (V1-V3) y algunas casi completas (V1-V9), que permitió identificar tricomas vacuolados tipo *Beggiatoa* con hasta 97% de homología respecto de secuencias descritas como *Beggiatoa* spp. en sedimentos eutrofizados de baja profundidad en Dinamarca (Limfjorden) y el norte de Alemania (Dangast), en concordancia con su morfología característica de células discoidales vacuoladas con gránulos de azufre dispuestas en tricomas de 18-28 µm de diámetro. Estas secuencias sirvieron luego de base para definir las especies “*Candidatus Isobeggiatoa divulgata*” y “*Candidatus Parabeggiatoa communis*” (Salman y col. 2011, 2013) y son actualmente referencia clave para la asignación de los géneros “*Ca. Isobeggiatoa*” y “*Ca. Parabeggiatoa*” dentro de la familia *Beggiatoaceae* (Teske y Salman 2014). Además, las 53 secuencias parciales evidenciaron *deltaproteobacterias* reductoras de sulfato y géneros como *Sulfurospirillum*, *Sulfurovum* y *Fusibacter*, cuya coexistencia con los filamentos tipo *Beggiatoa* sugiere un ciclo del azufre particularmente intenso y complejo en la superficie de estos sedimentos impactados.

En un estudio posterior realizado en un centro categoría 3 de Estero Pichicolo, Región de Los Lagos, Aranda y colaboradores (2015) combinaron nuevamente observaciones microscópicas con clonamiento y secuenciación Sanger de amplicones V1-V9 y pirosecuenciación 454 de amplicones V1-V3, utilizando ADN de bacterias enriquecidas mediante el mismo protocolo de incubación descrito en 2010. El manto bacteriano estuvo dominado por tricomas vacuolados de “*Ca. Isobeggiatoa*” y “*Ca. Parabeggiatoa*”, junto con bacterias oxidantes de azufre del género *Arcobacter* y abundantes anotaciones de *Sulfurimonas* y *Sulfurovum*, lo que refuerza la presencia de un ciclo de azufre complejo y acelerado en los sedimentos. El enriquecimiento consistió en incubar sedimentos con cubierta y la capa de agua suprayacente hasta agotar el oxígeno. Este procedimiento favoreció la migración de tricomas tipo *Beggiatoa* por las paredes del recipiente y estas fracciones enriquecidas fueron luego sometidas a análisis genómico. El estudio mostró que una muestra enriquecida que retenía pequeñas impurezas de sedimento presentaba una abundancia relativa mucho menor de OTUs de *Beggiatoaceae* (27%) que una fracción más limpia (98%). Esto sugiere que, en ausencia de enriquecimiento, se requeriría una cobertura de lectura muy alta en análisis de metabarcoding para detectar anotaciones de variantes de secuencia de amplicón (ASV) de *Beggiatoaceae*, aun cuando estas formen mantos visibles detectables por inspección submarina. Esta observación subraya la importancia de comparar de manera sistemática los resultados obtenidos a partir de muestras enriquecidas y de muestras directas. Finalmente, se detectaron también anotaciones indicadoras de *Thiomargarita* sp., bacteria gigante oxidante de azufre de morfología globular potencialmente formadora de CMV dentro de *Beggiatoaceae*, aunque solo representó alrededor de 0,4% de las secuencias de ARNr 16S en las fracciones enriquecidas, tanto limpias como con impurezas.

En resumen, ambos reportes, separados por varios kilómetros en la Región de Los Lagos y por un intervalo de cinco años, mostraron una microbiota de la cubierta visible prácticamente idéntica, dominada por “*Ca. Isobeggiatoa*” y “*Ca. Parabeggiatoa*”,

acompañadas de bacterias que evidencian un ciclo de azufre acelerado en la superficie del sedimento. Además, en el estudio de Estero Pichicolo las secuencias de referencia más cercanas para estos géneros correspondieron precisamente a las anotaciones previamente obtenidas en el sitio de cultivo de Calbuco.

Otros trabajos han analizado cambios en las comunidades bacterianas de sedimentos impactados por la acuicultura de salmónidos en el sur de Chile mediante metabarcoding. Hornick y Buschmann (2018)¹ aplicaron pirosecuenciación 454 de amplicones V1-V3 a ADN extraído directamente de sedimentos superficiales, sin el paso de enriquecimiento utilizado en los estudios anteriores, en dos centros de cultivo categoría 3 en Isla Quenac, uno en Isla Traiguén (Chiloé insular) y tres sitios de referencia adyacentes. Encontraron una diversidad bacteriana menor en los sitios de cultivo que en los de referencia (inverso del índice de Simpson), sin diferencias significativas en riqueza de especies (estimador Chao), y un enriquecimiento de Gammaproteobacteria, pero no identificaron familias o géneros claramente asociados al tipo de impacto ni OTUs indicadoras de GSOB de la familia Beggiatoaceae.

Posteriormente, y también mediante metabarcoding V1-V3 por pirosecuenciación 454, Miranda y colaboradores (2021)² analizaron tres centros de cultivo categoría 3 en la Región de Los Lagos (Puerto Montt, Calbuco y Chiloé insular) y uno en la Región de Aysén (Melinka). El estudio consideró periodos de máxima actividad y de descanso, junto con sitios de referencia. Los autores concluyeron que los sitios más impactados presentan una disminución de la diversidad microbiana y la aparición específica de ciertos grupos que podrían actuar como marcadores de enriquecimiento orgánico en la capa superficial del sedimento. Entre estos grupos destacan Sulfurovaceae, que incluye bacterias oxidantes de sulfuro y de azufre elemental, y Desulfobulbaceae, que incluiría probables bacterias “cable” oxidantes de sulfuro. A estos se suman Desulfobacteraceae, asociadas a bacterias sulfato-reductoras productoras de sulfuro, así como Thiotrichaceae y Anaerolineaceae, vinculadas a bacterias heterotróficas anaerobias. Pese a la evidencia de fuerte enriquecimiento orgánico, en ninguna de las librerías se detectaron OTUs asignadas a Beggiatoaceae ni a bacterias gigantes oxidadoras de azufre formadoras de CMV, lo que plantea la interrogante de si es necesario aplicar incubaciones de enriquecimiento para capturar estas bacterias y permitir su detección en estudios basados en metabarcoding. Análisis adicionales realizados por el primer autor de este informe, mediante una comparación rigurosa de todas las OTUs cercanas filogenéticamente a Beggiatoaceae, no revelaron variantes que pudieran atribuirse de manera confiable a esta familia (resultados no mostrados).

Con todo, y en concordancia con los antecedentes reportados en las bases de esta propuesta, se dispone de muy pocos datos que describan el tipo de bacterias que generan cubiertas de microorganismos visibles en las inmediaciones de sitios de

¹ El primer autor de este informe participó en el análisis bioinformático para la generación y asignación de las librerías, pero no intervino en el análisis ni en la interpretación de los resultados.

² El primer autor de este informe es co-autor de la publicación.

acuicultura en Chile. La escasa información disponible hasta ahora solo permite realizar descripciones iniciales de cubiertas de bacterias visibles asociadas a cultivo intensivo de salmónidos en fondos blandos de la Región de Los Lagos.

La evidencia disponible también sugiere que la detección genómica de bacterias formadoras de mantos o CMV, en particular las bacterias gigantes oxidadoras de azufre de la familia Beggiatoaceae, puede verse fuertemente limitada por la abrumadora abundancia relativa de otras bacterias presentes en los sedimentos. Las Beggiatoaceae corresponden a células de gran volumen y presentan un menor contenido relativo de ADN por unidad de biomasa en comparación con bacterias más pequeñas, lo que reduce su representación en los extractos de ADN obtenidos a partir de sedimento total. En consecuencia, la aplicación de procedimientos de enriquecimiento que reduzcan la fracción de sedimento y de bacterias de menor tamaño, para luego extraer ADN desde una biomasa con mayor proporción de estas bacterias gigantes, podría resultar necesaria para asegurar su correcta anotación genómica, especialmente en zonas donde las CMV se observan solo de forma incipiente. Sin embargo, las plataformas actuales de secuenciación masiva y las mejoras en profundidad de lectura abren la posibilidad de detectar estas bacterias incluso sin un enriquecimiento intensivo. Por ello, la evaluación comparativa entre ambas estrategias, con y sin enriquecimiento, constituye un eje central de la metodología propuesta en este proyecto.

En un estudio reciente, Zárata y colaboradores (2025) caracterizaron la estructura espacial del microbioma bentónico en sedimentos del norte de la Patagonia chilena expuestos a acuicultura intensiva, identificando taxones clave con potencial como indicadores ecológicos frente a perturbaciones locales y riesgo ambiental. El trabajo analizó sedimentos blandos superficiales de dieciséis estaciones entre 42 y 44° S en el mar interior de Chiloé y en fiordos adyacentes mediante metabarcoding 16S (región V3-V4, plataforma Illumina), evaluaciones de diversidad alfa y beta, estadística multivariada y redes de coocurrencia microbiana. Los autores describieron comunidades dominadas por taxones especialistas de nicho, entre ellos familias como Flavobacteriaceae, Gemmataceae, Humimicrobiaceae, Clostridiaceae y Sulfurovaceae, típicamente asociadas a enriquecimiento orgánico y presión antrópica, cuyas abundancias se correlacionan con gradientes de nitrato, fosfato, silicato, pH, salinidad y feopigmentos. La diversidad alfa fue mayor en los fiordos que en el mar interior. Los análisis de diversidad beta y de coocurrencia revelaron ensamblajes diferenciados y redes más complejas y conectadas en los fiordos, compatibles con una mayor estabilidad ecológica relativa frente a condiciones de mayor impacto en el mar interior. En conjunto, la identificación de taxones de nicho y de nodos centrales en las redes de coocurrencia respalda su uso como indicadores tempranos de reorganización comunitaria y de cambios funcionales del sedimento asociados a la acuicultura, lo que proporciona una base microbiológica para integrar el microbioma bentónico en estrategias de monitoreo y manejo en la salmonicultura patagónica.

Finalmente, Aranda y colaboradores (2026) (Anexo 2) investigaron comunidades procarióticas en sedimentos marinos subantárticos afectados por la acuicultura del

salmón, con el doble objetivo de validar el análisis visual de la cobertura de bacterias gigantes oxidantes de azufre (GSOB, familia Beggiatoaceae) como bioindicador del impacto bentónico y de describir los cambios estructurales y taxonómicos del microbioma a lo largo de un gradiente de cobertura de estos mantos. El estudio empleó metabarcoding 16S, con la región V3-V4 y partidores modificados para incluir arqueas en plataforma Illumina, combinado con análisis físico-químicos, observaciones microscópicas y muestreos mediante ROV y buceo en sedimentos con gradiente de CMV en dos centros categoría 4 de Estero Córdova, en la Región de Magallanes. Las muestras se obtuvieron de manera preliminar a la propuesta FIPA 2023-15 y el análisis de metabarcoding se desarrolló en paralelo a su ejecución. Se reportó una representación muy baja de ASV de Beggiatoaceae en el metabarcoding, pese al claro predominio visual de sus filamentos en zonas con alta incidencia de CMV. Específicamente, para *Ca. Isobeggiatoa* se obtuvieron promedios de abundancia relativa que alcanzaron hasta 0,23% en la zona con máxima cobertura de GSOB y abundancia visible de filamentos bajo el microscopio. Además, los resultados describieron un patrón en forma de “U” de la diversidad alfa procariótica a lo largo del gradiente de GSOB, con una caída marcada, cercana al 30%, en las zonas transicionales y una recuperación parcial en áreas de alta cobertura, tendencia coherente con los patrones observados en la diversidad beta. En los tramos intermedios del gradiente, *Sulfurovum* y *Sulfurimonas* emergieron como géneros dominantes, mientras que en los sectores con mayor grado de CMV aumentó la abundancia relativa de anaerobios quimiolitotróficos y fermentativos. En conjunto, el estudio concluyó que la escala de cobertura de mantos de microorganismos visibles constituye un bioindicador suficientemente sensible para la gestión ambiental en estos ecosistemas, aunque su interpretación debe complementarse con otros indicadores debido a la marcada variabilidad espacial de las comunidades microbianas asociadas al impacto acuícola.

4.1.6. Posibles sesgos en metabarcoding y estrategias de mitigación

Degradación del ADN: El ADN es un polímero particularmente vulnerable a la degradación por nucleasas presentes en las matrices biológicas, por lo que resulta esencial controlar este proceso desde la colecta hasta la extracción y el almacenamiento. Si no se hace, disminuye la calidad de las bibliotecas y se introducen sesgos a favor de ciertos grupos bacterianos (Brooks y col. 2015).

Para mitigar este problema, se implementó previamente un protocolo de congelación en terreno de las muestras destinadas a extracción. Para ello, se instalaron congeladores dedicados en los centros de cultivo y el material fue transportado por vía aérea en contenedores refrigerados hasta su almacenamiento a -80 °C. Esta estrategia se utilizó en el análisis de metabarcoding 16S V3-V4 en muestras provenientes de centros ubicados en Estero Córdova, en el Estrecho de Magallanes, aunque implicó una logística compleja debido a la ubicación remota de los sitios (Aranda y col. 2026).

Ante la necesidad de operar en áreas aisladas, resulta preferible utilizar soluciones estabilizadoras de ADN que eliminen la dependencia de la congelación inmediata. Distintos estudios señalan que preservantes como RNAlater (marca registrada de Ambion, ahora Invitrogen/Thermo Fisher) y otros formulados comerciales, o caseros, mejoran la calidad y el rendimiento del ADN, favorecen la detección de taxones raros y permiten mantener las muestras a temperatura ambiente sin alterar de forma relevante los patrones de diversidad, por lo que constituyen una buena práctica recomendada para el muestreo y el almacenamiento previo al metabarcoding (Clasen y col. 2020, Baricevic y col. 2022, Sahu y col. 2025).

Otros sesgos: Además de la degradación, el metabarcoding está expuesto a múltiples fuentes de sesgo que pueden alterar las abundancias relativas observadas y limitar la comparabilidad entre estudios. Entre ellas destacan: (1) la eficiencia diferencial de lisis celular, que tiende a subrepresentar a bacterias con paredes más resistentes como muchas Firmicutes y Actinobacteria (Brooks y col. 2015, Bergsten y col. 2020, Elie y col. 2023); (2) la contaminación de reactivos (kitoma), especialmente relevante en muestras de baja biomasa (Demkina y col. 2023); (3) la selección y desempeño de los partidores, que pueden favorecer determinados linajes (Bergsten y col. 2020); (4) la formación de quimeras durante la PCR; (5) el número variable de copias del gen 16S entre especies; (6) el bajo contenido relativo de ADN en ciertos grupos, como las GSOB formadoras de CMV (Aranda y col. 2015, 2026); y (7) las dificultades para amplificar regiones con alto contenido de GC. Todos estos factores pueden provocar la no detección, así como la subrepresentación o sobrerrepresentación de taxones, generando estimaciones sesgadas de la diversidad. Además, las diferencias en los protocolos de extracción de ADN y amplificación empleados entre estudios pueden dar lugar a resultados inconsistentes y de difícil comparación (Demkina y col. 2023).

Para reducir estos efectos, se recomienda el uso sistemático de controles negativos y positivos que permitan evaluar la contaminación de los reactivos, la eficiencia de la lisis y el rendimiento de la PCR, así como realizar un análisis crítico de los alcances y limitaciones de los índices basados en 16S cuando se busca cuantificar bioindicadores, como las GSOB, con un bajo contenido relativo de ADN.

Finalmente, la presencia de ADN extracelular o de células muertas también puede generar una sobreestimación de algunas comunidades. Este sesgo solo puede evaluarse mediante la comparación con resultados obtenidos por amplificación directa de segmentos del ARNr, aunque este enfoque introduce sus propios sesgos, ya que se desconoce el número de copias de ARN que aporta cada individuo a la población (Von Hoyningen y col. 2022).

4.1.7. Conclusión de la revisión bibliográfica

La estrategia de metabarcoding es la preferida cuando se desea una visión rápida y comparativa de la diversidad microbiana, especialmente útil en estudios con muchas muestras o cuando el presupuesto es limitado. Mientras que la estrategia

metagenómica, que es más potente para estudios específicos, resulta más útil cuando el objetivo incluye estudiar las capacidades funcionales (por ejemplo, metabolismo, genes de resistencia a antibióticos) o identificar organismos específicos con mayor resolución taxonómica, ventajas que de todas maneras implican una mayor demanda en costo, tiempo e infraestructura para análisis bioinformáticos.

Dentro de la estrategia de metabarcoding, la plataforma Illumina con secuenciación de la región V3-V4 sigue siendo la opción preferente para estudios taxonómicos profundos en comunidades complejas, debido a su precisión, relación costo beneficio y a la disponibilidad de flujos de trabajo bioinformáticos bien establecidos. En este contexto, Illumina se seleccionó como tecnología de detección de material genético para identificar la presencia de GSOB que forman CMV.

En Chile ya existe una base incipiente de estudios de microbiomas en sedimentos marinos bajo influencia de la acuicultura generados mediante metabarcoding 16S (región V3-V4). Por ejemplo, Zárata y col. (2025) demostraron que estos datos permiten detectar indicadores tempranos de reorganización comunitaria y cambios funcionales en sedimentos cercanos a centros de cultivo. A su vez, Aranda y col. (2026) utilizaron el mismo enfoque para respaldar una escala estandarizada de cobertura visual de bacterias gigantes oxidantes de azufre (GSOB) como bioindicador sensible de impacto bentónico asociado a esta acuicultura.

4.2. Protocolo propuesto

Esta sección describe la metodología basada en metabarcoding V3-V4 para la detección de material genético (ADN) asociada a microorganismos visibles (mantos blanquecinos) que se utilizan como indicadores de enriquecimiento orgánico en sedimentos de centros categoría 4. Considerando las etapas generales del metabarcoding (Fig. 1), la propuesta se organiza en tres componentes: (1) obtención de muestras, (2) metabarcoding V3-V4 del gen ARNr 16S y (3) procesamiento bioinformático, presentando en cada subsección un protocolo consolidado para la implementación de cada etapa.

4.2.1. Obtención de muestras

La propuesta metodológica se inicia con los procedimientos de obtención de muestras para el análisis de ADN de sedimentos categoría 4, desarrollados para condiciones frecuentemente adversas, lo que obliga a utilizar procedimientos robustos y realistas. En sitios de categoría 4, la presencia de sustratos rocosos dificulta o impide la obtención de muestras representativas mediante equipos de lance como dragas o box core, y el muestreo por buceo autónomo o asistido deja de ser operativo debido a profundidades usualmente superiores a 40 m, que según la normativa chilena requieren

logística especializada (incluida cámara hiperbárica de doble esclusa a menos de 500 m del lugar de buceo).

En este escenario, los vehículos operados remotamente (ROV) constituyen la alternativa más adecuada, y la industria los emplea regularmente para inspecciones INFAs, revisión y reparación de redes, así como para la supervisión y registro de operaciones. Se propone utilizar un ROV modelo DTG3 de la marca Deep Trekker, ampliamente adoptado por la industria nacional por su maniobrabilidad, diseño robusto y bajo costo relativo. Este equipo ofrece cámara Full HD para baja luminosidad con rotación de 270°, sensores integrados de profundidad, rumbo y temperatura, capacidad de inmersión hasta 200 m de profundidad, control de estabilización para mayor maniobrabilidad y buena autonomía. Este equipo puede acoplarse a un dispositivo (grabber) para manipulación de objetos y operación de instrumentos, permitiendo el uso de un muestreador de sedimentos de doble valva de 10 cm de diámetro, capaz de recolectar aproximadamente 250 cc de sedimento (Fig. 3), cuya capacidad de rotación de las valvas y mecanismo de cierre impulsado con el tornillo del grabber permiten capturar de manera efectiva muestras de sedimentos en fondos marinos categoría 4.



Figura 3. ROV Deep Trekker DTG3 para toma de muestras.

ROV acoplado a un dispositivo grabber y muestreador de sedimentos de doble valva de 10 cm de diámetro para muestra de sedimento.

Para minimizar el riesgo de contaminación cruzada entre muestras, es crucial eliminar cualquier traza de ADN de las valvas del muestreador del ROV. El NaOH 0,1 N es un descontaminante eficaz y ampliamente validado en biología molecular, ya que degrada tanto el ADN como las ADNasas presentes en las superficies (Wang y col., 2014). Se recomienda aplicar la solución, dejarla actuar durante 10 minutos y enjuagar abundantemente con agua libre de ADN, a fin de asegurar la inactivación de restos genéticos y evitar amplificaciones inespecíficas en PCR. Aunque existen alternativas comerciales, como DNA AWAY™, que incorporan aditivos que potencian su efecto y se encuentran ampliamente disponibles, la escasa información pública sobre su composición hace preferible el uso de NaOH en muestreos ambientales sensibles.

Tras la descontaminación y con el ROV ya en el agua, se recomienda que el operador abra y cierre las valvas del muestreador tres veces, combinando este movimiento con la rotación para lograr un enjuague efectivo y verificar la operatividad del sistema. La navegación hacia el sitio de muestreo se realiza guiándose por la cámara y los sensores integrados, y antes de la colecta se repite la apertura y cierre de las valvas para minimizar el arrastre de microbiota exógena. Durante la toma de muestra, el muestreador se posiciona sobre el sedimento con las valvas abiertas a 45°, se inserta la valva inferior y luego se acciona el cierre para capturar el sedimento. A continuación, el ROV asciende a superficie con la muestra asegurada. La manipulación y transferencia del material requieren el uso obligatorio de guantes y la participación de dos personas, un operador de ROV y un profesional capacitado en muestreo para ADN.

Se colectan muestras en triplicado que se estabilizan en una solución protectora de ADN, lo que evita la criopreservación en zonas remotas y simplifica la cadena logística hasta laboratorios especializados. En Chile existen diversas soluciones comerciales desarrolladas inicialmente para microbioma fecal y matrices biológicas o de suelo, pero aplicables al estudio del microbioma en sedimentos marinos siempre que se consideren sus ventajas, limitaciones, requerimientos operativos y costo por muestra.

DNA/RNA Shield (Zymo Research, distribuido en Chile por Grupo BIOS y Grupo SIBI) es una solución líquida versátil disponible en múltiples formatos de volumen, que preserva la integridad de ADN y ARN a temperatura ambiente y desactiva patógenos, reduciendo las exigencias de bioseguridad durante el transporte. Su formulación, basada en agentes caotrópicos y detergentes, estabiliza ácidos nucleicos y desnaturaliza nucleasas, permitiendo un almacenamiento y transporte seguros de muestras clínicas y ambientales. Su principal desventaja es un precio moderado a alto cuando se requieren grandes volúmenes o un número elevado de muestras, lo que puede tensionar el presupuesto en campañas extensivas.

FastDNA Spin Kit for soil (MP Biomedicals, distribuido recientemente en Chile por Galénica) integra en un solo sistema la lisis, estabilización y purificación de ADN mediante detergentes, sales caotrópicas y matrices de adsorción en columnas, con buen desempeño en suelos y sedimentos, incluyendo sedimentos marinos. Entre sus fortalezas destacan la eficiencia en matrices complejas, el procesamiento rápido y la mitigación de la degradación del material genético durante el transporte. Estas ventajas

se equilibran con un costo alto por muestra, una complejidad operativa mayor que la de soluciones líquidas simples, la necesidad de equipamiento menor y el riesgo de saturación de la matriz en muestras con alta carga de materia orgánica, por lo que resulta más apropiado para volúmenes moderados y estudios que priorizan la máxima calidad del extracto por sobre la simplicidad de operación en terreno.

Las soluciones de *DNA Genotek* (comercializadas en Chile por Biosonda) incluyen formulaciones orientadas a estabilizar y transportar ADN desde matrices biológicas y ambientales, manteniendo la calidad de la muestra por periodos prolongados y bajo condiciones de temperatura variables. Su principal fortaleza radica en la diversidad de formatos y en la capacidad de estabilizar el material genético a temperatura ambiente en matrices complejas, lo que las hace particularmente adecuadas para muestreos remotos con ventanas operacionales restringidas por el clima. La desventaja predominante es un costo intermedio a alto según el volumen requerido, que debe ponderarse frente al ahorro en infraestructura de frío y equipamiento de laboratorio en terreno.

Finalmente, *Micro-Safe* (Codebreaker Bioscience) es una solución estabilizadora validada en matrices biológicas y ambientales como sedimento marino, heces humanas y animales, suelo, tejidos agrícolas y matrices de peces, que permite almacenamiento a temperatura ambiente y cuenta con disponibilidad a nivel local. Sus ventajas se relacionan con la logística simplificada en terreno, la compatibilidad con múltiples matrices y la reducción del riesgo de quiebres de stock por dependencia de importaciones. Como contrapartida, su composición es propietaria y su validación internacional aún es limitada, aspecto que puede ser relevante en estudios comparativos que requieran estricta estandarización entre laboratorios.

Estas soluciones comparten componentes clave, como agentes caotrópicos, por ejemplo sales de guanidina o de tiocianato, que desactivan nucleasas y estabilizan el ADN. Además, incluyen detergentes que favorecen la liberación del ADN y la desnaturalización de proteínas, junto con sales que estabilizan el material genético o inhiben enzimas degradativas. También incorporan agentes quelantes, como EDTA, y en el caso de los kits matrices adsorbentes que permiten una purificación eficiente del ADN a partir de matrices complejas.

Los precios varían según proveedor, formato y volumen, y los kits que integran procesos completos de extracción y purificación suelen ser sensiblemente más costosos que las soluciones líquidas estabilizadoras simples. Aunque se desarrollaron principalmente para heces y suelos, *FastDNA Spin Kit for Soil* y *Micro-Safe* han mostrado buen desempeño en sedimentos marinos, contribuyendo a superar la presencia de sales y alta materia orgánica.

En muestreos remotos en centros de cultivo de Magallanes, Aysén y, en menor medida, Los Lagos, donde el acceso a criopreservación y a laboratorio en terreno es limitado, resulta especialmente ventajoso utilizar soluciones líquidas independientes del proceso de extracción, como *DNA/RNA Shield*, las formulaciones de *DNA Genotek* y

Micro-Safe. En este contexto, el criterio central es reducir al mínimo la dependencia de equipamiento y reactivos adicionales en terreno, priorizando formulaciones listas para usar que solo requieran tubos, solución estabilizadora y manejo básico de bioseguridad. Todas permiten estabilizar las muestras directamente en el punto de muestreo, sin necesidad de centrifugas, columnas, buffers de lisis adicionales ni infraestructura de frío, lo que simplifica la operación en campañas extensivas y disminuye los riesgos logísticos asociados a fallas de equipamiento o retrasos en el transporte. Facilitan así la movilización de muestras y el trabajo con ventanas temporales condicionadas por la variabilidad climática, permitiendo que la extracción y purificación se realicen posteriormente en laboratorios especializados y reduciendo el riesgo de contaminación cruzada frente a procesamientos en terreno sin infraestructura adecuada.

En resumen, para muestreos remotos resulta necesario utilizar soluciones estabilizadoras de ADN, siendo más conveniente emplear soluciones líquidas independientes del kit de purificación de ADN. Se recomienda particularmente el uso de formulaciones de DNA Genotek (Biosonda) y de la solución Micro-Safe (Codebreaker Bioscience) por su adecuación logística a campañas extensivas y remotas, sin descartar el uso de DNA/RNA Shield cuando la disponibilidad y el presupuesto lo permitan.

Protocolo consolidado propuesto. Parte 1: Obtención de muestras

- Utilizar un ROV DTG3 Deep Trekker, o superior, equipado con cámara HD, sensores integrados de profundidad, rumbo y temperatura, autonomía adecuada de profundidad y un grabber acoplado a un muestreador de sedimentos de doble valva de 10 cm de diámetro y capacidad aproximada de 250 cc.
- Descontaminar las valvas aplicando NaOH 0,1 N con rociador, dejar actuar 10 minutos y luego posicionar el ROV en el mar, abriendo y cerrando las valvas tres veces con rotación para un enjuague final y verificación del sistema.
- Navegar hasta el punto de muestreo utilizando la cámara y los sensores del ROV, manteniendo las valvas cerradas en posición vertical para optimizar la hidrodinámica.
- Antes de capturar sedimento, abrir y cerrar nuevamente las valvas para eliminar microbiota exógena al ambiente de fondo marino.
- Ubicar el muestreador con las valvas horizontales y abiertas a 45°, sumergir la valva inferior en el sedimento, accionar el cierre para coleccionar la muestra y emerger el ROV con el muestreador asegurado.
- Manipular y transferir la muestra siempre con guantes, con la participación de dos personas: un especialista en operaciones de ROV y un técnico o especialista en muestreo biológico o de ADN.

- Tomar tres réplicas usando tórula sintética con segmento de precorte, cargando aproximadamente 200 µl de sedimento húmedo por réplica al sumergir y rotar cinco veces en la zona de muestreo directamente desde el contenido de las valvas del muestreador del ROV.
- Almacenar cada tórula en un tubo Falcon de 15 ml con 2 ml de solución estabilizadora, preferentemente formulaciones de *DNA Genotek*, *Micro-Safe* o *DNA/RNA Shield*.
- Conservar las muestras a temperatura ambiente, idealmente por debajo de 18 °C, y transportar en contenedor refrigerado cuando las condiciones ambientales lo hagan necesario.

4.2.2. *Metabarcoding V3-V4 gen ARNr 16S*

Como se explicó en el análisis bibliográfico, el sistema seleccionado para detectar ADN de CMV en sedimentos categoría 4 corresponde al metabarcoding de la región V3-V4 del gen ARNr 16S en plataforma Illumina, lo que permite caracterizar con alta resolución la comunidad bacteriana asociada a Beggiatoaceae en fondos marinos impactados. El flujo de trabajo incluye la extracción de ADN genómico, la preparación de librerías, la secuenciación y el procesamiento bioinformático para obtener variantes de secuencia de amplicones (ASVs) de la familia Beggiatoaceae y de sus géneros validados o candidatos, reconocidos como bacterias gigantes del azufre (GSOB) formadoras de CMV en sedimentos marinos.

Extracción y verificación de ADN genómico: La extracción de ADN se realiza en un laboratorio acreditado y/o habilitado, utilizando kits comerciales optimizados para sedimentos y capaces de remover inhibidores ambientales de la PCR, tales como DNeasy PowerSoil, UltraClean Soil DNA o Zymo BIOMICS 96 MagBead, siguiendo las recomendaciones del fabricante para matrices ricas en materia orgánica. Cada procedimiento debe respetar las condiciones de calidad exigidas para el manejo rutinario de muestras de ADN, minimizando degradación, contaminación cruzada y variabilidad entre lotes.

La concentración y calidad del ADN purificado se determina mediante una combinación de técnicas complementarias que incluye fluorimetría con Qubit (o equipo equivalente), espectrofotometría (razón 260/280 $\geq 1,8$) y electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido (idealmente GelRED u otro en vez de bromuro de etidio). Idealmente, se recomienda usar electroforesis capilar cuando está disponible para mejorar la resolución de fragmentos. Adicionalmente, se verifica la capacidad de amplificación mediante una

PCR universal del gen 16S, asegurando que el ADN extraído sea apto para la generación de librerías y reduzca el riesgo de fallas en la secuenciación.

Preparación de librería y secuenciación: La preparación de la librería se basa en la amplificación de la región V3-V4 del gen ARNr 16S mediante cebadores universales 341f (CCTACGGGNGGCWGCAG) y 806r (GACTACHVGGGTATCTAATCC) (especificidad 84,2% bacterias y 75,8% arqueas (0% Eukarya), en combinación con un kit de metabarcoding para 16S compatible con Illumina, por ejemplo kit NGS Quick-16S™ (Zymo Research), incorporando adaptadores e índices necesarios para la multiplexación. Los amplicones resultantes se cuantifican, se normalizan a igual molaridad y se agrupan en pools equimolares, asegurando una representación equilibrada de las muestras en la corrida de secuenciación.

En cada placa o corrida se incluye al menos un control negativo (agua libre de nucleasas) y un control positivo constituido por una mezcla de taxones bacterianos definidos o estándares comerciales, lo que permite evaluar contaminación, sensibilidad y desempeño del flujo de trabajo bioinformático. La mezcla final de librerías se purifica mediante kits de limpieza de ADN, por ejemplo Select-a-Size DNA Clean & Concentrator™, y se cuantifica nuevamente (por ejemplo, con Qubit y un sistema de análisis de fragmentos), antes de su carga en la plataforma Illumina NextSeq 1000™ (o superior) en modo paired-end (2x300 pb) usando una longitud de lectura adecuada para V3-V4 (600 ciclos) e incorporando un control PhiX cercano a 10% para monitorear la calidad de la corrida.

Protocolo consolidado propuesto. Parte 2: Metabarcoding V3-V4 gen ARNr 16S

- Extraer ADN de sedimentos usando kits optimizados con remoción de inhibidores (PowerSoil, UltraClean, Zymo BIOMICS o equivalentes) en laboratorio acreditado
- Verificar concentración y pureza del ADN mediante Qubit, espectrofotometría 260/280 y electroforesis (gel o capilar), confirmando amplificabilidad por PCR universal 16S.
- Amplificar la región V3-V4 del gen 16S con partidores 341f/806r y kit de metabarcoding compatible con Illumina, siguiendo las condiciones recomendadas para amplicón 16S.
- Incluir en cada corrida un control positivo (mezcla bacteriana estándar) y un control negativo (agua libre de nucleasas) para evaluar contaminación y desempeño de la amplificación
- Cuantificar los amplicones, normalizar a concentraciones equimolares, agrupar en pools y purificar las librerías antes de la cuantificación final.

- Preparación de librería, purificación y cuantificación con kits comerciales, utilizando especificaciones del fabricante.
- Secuenciar las librerías en Illumina NextSeq 1000 (o superior) en modo paired-end, incorporando un control PhiX (~10%) y asegurando profundidad suficiente para el análisis de comunidades bacterianas en sedimentos.

4.2.3. *Procesamiento bioinformático*

El flujo de trabajo bioinformático requerido para el análisis de metabarcoding V3-V4 en la detección de CMV en sedimentos de categoría 4 contempla una secuencia de etapas que comienza con el control de calidad y el filtrado de las lecturas, continúa con el ensamblado de pares, la remoción de quimeras y el agrupamiento en unidades taxonómicas operativas (OTUs) o en variantes de secuencia de amplicones (ASVs), y finaliza con la asignación taxonómica. Esta estructura representa el estándar internacional recomendado, por lo que resulta fundamental documentar en detalle el flujo de trabajo utilizado, incluyendo versiones de software, parámetros y base de datos taxonómica, con el fin de asegurar la reproducibilidad y la comparabilidad, tanto en estudios científicos como en aplicaciones de gestión ambiental. En este proyecto, el resultado clave para fines de gestión corresponde a tablas de abundancias relativas de la familia Beggiatoaceae y de los géneros asociados, que permitan describir su presencia, variación y contribución en sedimentos impactados por la acuicultura.

Como software de procesamiento se pueden utilizar QIIME2 o mothur, asignando la taxonomía con bases de datos como SILVA, RDP, Greengenes o GTDB, idealmente en sus versiones más actualizadas. La elección entre QIIME2 y mothur para el análisis de metabarcoding V3-V4 del gen ARNr 16S ha ido evolucionando en la última década y depende de las tendencias científicas, de los objetivos del estudio (por ejemplo, investigación o gestión ambiental) y de la experiencia o preferencia de los usuarios especializados.

Mothur: Lanzado en 2009, fue uno de los pioneros para análisis de comunidades microbianas mediante OTUs (principalmente con umbral de semejanza típico de 97%). Es robusto, bien documentado y ampliamente citado. Por años fue el estándar “de facto” para estudios de ecología microbiana, sobre todo, antes de la generalización de flujos de trabajo basados en variantes exactas de secuencia (ASVs). Su fortaleza está en la transparencia y en la posibilidad de comparar resultados en estudios históricos. Actualmente, puede generar ASVs empleando el método “unique” (Schloss y col. 2020), por lo que se mantiene vigente y aún preferido por parte de la comunidad científica.

QIIME1 y QIIME2: QIIME1 (2010) se fundamentaba en OTUs, mientras que QIIME2 (Bolyen y col. 2019) impulsó el uso de ASVs al integrar DADA2 (Callahan y col.

2016) y Deblur (Amir y col. 2017) como métodos principales de procesamiento. QIIME2 es actualmente la plataforma preferida en estudios de microbioma por su modularidad, la amplia comunidad científica que lo respalda, su reproducibilidad y la fácil integración con bases de datos y flujos de control de calidad rigurosos. El uso de ASVs permite alta resolución, reproducibilidad y comparabilidad entre estudios, superando las limitaciones de los OTUs tradicionales (Hakimzadeh y col. 2024). DADA2 (Callahan y col. 2016) es un paquete muy utilizado y ampliamente referenciado para el procesamiento de datos 16S, y su énfasis en la identificación y corrección de errores y en el uso de variantes exactas lo convierte en la opción preferida para obtener ASVs, tanto en R como integrado a QIIME2. Varios estudios comparativos indican que DADA2 ofrece mayor sensibilidad y especificidad, identifica más variantes únicas y evita el colapso artificial de la diversidad (Bolyen y col. 2019), y en conjunto la salida basada en ASVs se ha consolidado como la tendencia recomendada internacionalmente y es la opción preferida en estudios recientes por su reproducibilidad (Prodan y col. 2020, Hakimzadeh y col. 2024). Por otro lado, en QIIME2 también se emplea el paquete Deblur (Amir y col. 2017), un algoritmo de “denoising” que utiliza un perfil de error estático pre-calculado y un enfoque deconvolutivo codicioso (“greedy”), asignando las lecturas observadas a secuencias biológicas reales mediante distancias de Hamming (Amir y col. 2017) y umbrales de error conservadores. A diferencia de DADA2, que modela de forma explícita el perfil de error para cada conjunto de datos, Deblur trabaja con lecturas de longitud fija, habitualmente sólo la lectura forward, y aplica un filtrado positivo frente a una base de referencia 16S, lo que facilita su aplicación consistente en estudios comparativos y meta-análisis de múltiples proyectos. Esta estrategia tiende a ser computacionalmente rápida, con alta especificidad y baja generación de ASVs espurios, aunque puede colapsar algunas variantes muy cercanas entre sí, por lo que se considera especialmente adecuada cuando se prioriza la comparabilidad entre conjuntos de datos y la estandarización de flujos de trabajo en QIIME2.

Como resumen de tendencias y recomendaciones actuales, QIIME2 con DADA2 y Deblur, trabajando con agrupaciones y asignación taxonómica basadas en ASVs, se ha consolidado como la opción preferida para estudios de investigación de frontera y publicaciones internacionales. Por otro lado, en aplicaciones regulatorias o de gestión ambiental, donde existen repositorios históricos y bases de referencia construidos sobre OTUs, sigue siendo pertinente el uso de plataformas como mothur cuando se requiere continuidad histórica y comparaciones de largo plazo. No obstante, los proyectos y manuales recientes de gestión ambiental también están migrando progresivamente hacia ASVs, debido a las ventajas ya señaladas en términos de resolución, reproducibilidad y comparabilidad. QIIME2 es además preferido en entornos multidisciplinarios por su trazabilidad, la generación automática de metadatos y una comunidad mundial activa que garantiza soporte, documentación y actualizaciones frecuentes. En cualquier caso, resulta crucial documentar detalladamente la versión, el flujo de trabajo, los parámetros y la base de datos taxonómica utilizados, ya que la reproducibilidad y la estandarización son prioridades tanto en la investigación como en la gestión ambiental.

El flujo de trabajo bioinformático (pipeline) requiere incluir:

Control de calidad y filtrado de lecturas: La etapa inicial consiste en analizar los archivos fastq crudos para el control de calidad y el filtrado de secuencias. El software fastp (Chen y col. 2018, 2023) se utiliza ampliamente para el recorte de adaptadores y la eliminación de secuencias de baja calidad, bases poco confiables y lecturas excesivamente cortas. Una vez demultiplexadas las muestras, QIIME2 emplea el plugin q2-demux para la inspección de calidad y, posteriormente, la eliminación de ruido y el filtrado se realizan con el algoritmo DADA2, que integra un modelo propio de corrección de errores y remueve secuencias de baja calidad. En el pipeline MiSeq de mothur, el filtrado de calidad se efectúa principalmente con el comando screen.seqs, que permite ajustar el rango de longitudes, el número de posiciones ambiguas y otros parámetros definidos por el usuario para excluir secuencias indeseadas. De este modo, tanto QIIME2, mediante DADA2, como mothur, mediante screen.seqs, ofrecen enfoques robustos y configurables para asegurar datos de alta calidad en las etapas analíticas posteriores.

Ensamblado de lecturas pareadas: En la mayoría de los experimentos con Illumina, los datos se generan en formato paired-end, es decir, se secuencia cada fragmento de ADN desde ambos extremos obteniendo una lectura forward y otra reverse para el mismo amplicón. En esta etapa se unen esas lecturas emparejadas para reconstruir una secuencia consensuada que cubre completamente el amplicón V3-V4.

Remoción de quimeras: Las quimeras son secuencias artefactuales generadas durante la primera amplificación por PCR, que deben detectarse y eliminarse mediante algoritmos incluidos en los flujos de trabajo bioinformáticos. Entre las opciones más utilizadas se encuentran DADA2, que incorpora una etapa específica de detección de quimeras basada en la comparación de secuencias dentro de cada muestra y en todo el conjunto de datos, modelando abundancias y patrones de combinación parental para identificar artefactos. Otra alternativa ampliamente extendida es UCHIME, implementada en vsearch y USEARCH, que puede operar en modo *de novo*, sin referencia, o en modo referenciado comparando contra bases de datos como SILVA, y que está disponible en múltiples plataformas, incluyendo mothur, QIIME2 y vsearch. Perseus se empleó en versiones antiguas de QIIME, aunque su uso es hoy mucho menos frecuente, mientras que ChimeraSlayer corresponde a un algoritmo clásico aún disponible pero ya muy poco utilizado en los flujos de trabajo actuales.

Agrupamiento: Ante la escasez de datos históricos sobre detección de CMV en sedimentos impactados por acuicultura intensiva en Chile, con excepción de los estudios de Aranda y col. (2010, 2015 y 2026), y considerando la necesidad de maximizar la resolución y la comparabilidad de los análisis actuales y futuros, se recomienda utilizar agrupación basada en ASVs mediante QIIME2 con DADA2 o Deblur, o bien emplear mothur en modo de secuencias únicas.

Asignación taxonómica: Las secuencias resultantes (ASVs) se comparan contra bases de datos actualizadas y curadas para asignar la clasificación taxonómica a cada unidad, hasta el mejor nivel resolutivo posible según la calidad y cobertura del marcador. Se debe verificar siempre la utilización de la última versión de base de datos disponible.

Tanto QIIME2 como mothur utilizan un clasificador bayesiano ingenuo (naive) introducido por Wang y col. (2007), el cual en ambos casos es entrenado con las secuencias de referencia de las bases de datos depuradas. QIIME2 lo implementa con el paquete q2-feature-classifier (Bokulich y col. 2018), mientras que mothur utiliza el comando classify.seqs.

Las bases de datos más usadas para asignación taxonómica en metabarcoding 16S (V3-V4) son SILVA, GTDB, Greengenes y RDP. SILVA es la opción más completa y actualizada. GTDB destaca por su clasificación filogenética moderna y coherente. RDP se valora por su curación manual, aunque con cobertura algo más baja. Finalmente, Greengenes, aunque muy usada históricamente, ya no recibe actualizaciones. En estudios actuales se recomienda preferir GTDB o SILVA, usando la versión más reciente y especificando la base de datos y su versión para asegurar comparabilidad y reproducibilidad de los resultados. Se debe tener presente que las tendencias de elección suelen cambiar muy rápidamente, hoy por ejemplo ya se está introduciendo, pero aún no se ha masificado, el uso de bases de datos curadas integradas (como GSR, ITGDB), hecho que combina ventajas de varias fuentes (Greengenes, SILVA, RDP) para mejorar cobertura y precisión, especialmente en entornos muy diversos o para nuevas aplicaciones de investigación (Hsieh y col. 2022, Molano y col. 2024). Dependiendo de la experiencia y preferencias del analista, se recomienda la comparación de asignaciones de ASVs representativas con secuencias de referencia usando BLAST+ (NCBI (Camacho y col. 2009), junto con la verificación cruzada de asignaciones en SILVA Tree Viewer 1.1 (Beccati y col. 2017) o similar.

Rarefacción: Para homogeneizar el esfuerzo de muestreo y facilitar la comparación entre sedimentos, se recomienda normalizar todas las librerías de metabarcoding a una misma profundidad de secuenciación. En este contexto, se propone un umbral de 15 mil lecturas por muestra (15k), que representa un compromiso entre capacidad de cómputo, fidelidad y profundidad analítica, ya que permite capturar adecuadamente la diversidad relevante para los objetivos de gestión ambiental y conservar el mayor número posible de muestras en el análisis. Esta normalización del tamaño de librería asegura que las abundancias relativas de los taxones, en particular de la familia Beggiatoaceae como bioindicadora de condición ambiental, y de otros grupos de interés, sean comparables entre muestras y evita sesgos derivados de diferencias en el número total de lecturas, lo que permite una interpretación coherente de las variaciones observadas en la composición microbiana. Con estos valores normalizados es posible generar tablas de abundancia relativa de taxones de interés que pueden utilizarse como bioindicadores de condiciones ambientales en sedimentos impactados por la acuicultura.

Protocolo consolidado propuesto. Parte 3: Procesamiento bioinformático

- Realizar control de calidad inicial de archivos fastq crudos utilizando fastp para recortar adaptadores y eliminar lecturas de baja calidad, seguido de la demultiplexación de muestras.
- Inspeccionar la calidad de las lecturas y aplicar filtros adicionales mediante QIIME2 (q2-demux y módulos de filtrado) o mothur (screen.seqs u órdenes equivalentes).
- Ensamblar lecturas paired-end para reconstruir el amplicón V3-V4 y generar ASVs mediante QIIME2 con DADA2 o Deblur, o bien, mediante mothur en modo secuencias únicas.
- Remover quimeras empleando algoritmos validados como UCHIME/UCHIME2 (vía vsearch en QIIME2 o chimera.uchime en mothur), ajustando parámetros según longitud y calidad de las lecturas.
- Asignar taxonomía con clasificadores bayesianos ingenuos (q2-feature-classifier o classify.seqs) entrenados con bases de datos SILVA o GTDB, dejando constancia de base y versión utilizadas (y considerando bases integradas como GSR o ITGDB cuando sea pertinente).
- Aplicar rarefacción a 15 mil lecturas por muestra (15k) para homogeneizar el esfuerzo de muestreo y facilitar comparaciones entre sedimentos. El umbral de 15k permite la optimización entre el compromiso de capacidad de cómputo, de fidelidad, profundidad analítica y retención de muestras.
- Generar tablas de abundancia de taxones relevantes (familia Beggiatoaceae y géneros validados o candidatos involucrados) y documentar rigurosamente versión de software, pipeline y parámetros empleados para garantizar trazabilidad y reproducibilidad.
- Reportar resultados de controles positivos y negativos.
- Entregar archivos fastq crudos y datos procesados (matrices ASV, taxonomía, métricas de calidad, curvas de rarefacción), asegurando su almacenamiento y trazabilidad para estudios futuros y aplicaciones de gestión ambiental.

5. Objetivo específico 2: Evaluación de la propuesta

5.1. Antecedentes de contexto y preguntas a evaluar

Los antecedentes bibliográficos indican que los estudios previos en sedimentos marinos impactados por la acuicultura del salmón y con presencia de cubiertas de microorganismos visibles (CMV) han mostrado una baja detección de OTUs indicadoras de bacterias gigantes del azufre (GSOB, familia Beggiatoaceae) al aplicar metabarcoding con el marcador V1-V3 del gen ARNr 16S y pirosecuenciación 454, una tecnología de generación anterior (Aranda y col. 2015). Esta baja recuperación de señal sugiere la presencia de factores que limitan la detección de ADN de Beggiatoaceae en estos ambientes, en concordancia con su fisiología particular, caracterizada por un bajo contenido relativo de ADN celular. Posteriormente, las campañas de muestreo realizadas en febrero de 2023 en Estero Córdova, Región de Magallanes, aportaron antecedentes valiosos que respaldaron el uso del indicador CMV en combinación con datos de diversidad alfa y beta de comunidades de procariontas en sedimentos con distinto grado de cobertura de mantos (Aranda y col. 2026). En ese estudio se aplicó la mayor parte de la metodología que se propone en el presente proyecto, con la principal excepción del uso de tómulas sintéticas y de estabilizador de ADN, recomendaciones que surgieron a partir de la experiencia logística asociada al congelamiento y transporte del material, por lo que sus resultados se incluyen en este informe debido a su relevancia para el proyecto FIPA 2023-15.

En la propuesta técnica original del proyecto FIPA 2023-15 se definió que, en cada centro de cultivo, se considerarían entre tres y cinco puntos de muestreo, con tres réplicas de muestras directas recolectadas por el ROV y tres réplicas adicionales sometidas a un enriquecimiento selectivo de las bacterias de la cubierta blanquecina, siguiendo metodologías previamente probadas (Aranda y col. 2010, 2015). Esta matriz de muestras permite evaluar la sensibilidad del protocolo consolidado Illumina V3-V4, con rarefacción a quince mil lecturas por muestra, para la detección de ASVs de GSOB en sedimentos de categoría 4 y, de manera complementaria, determinar en qué medida la estrategia de enriquecimiento selectivo de filamentos migratorios de Beggiatoaceae mejora la señal molecular asociada a CMV. Las pruebas de campo permiten además evaluar la eficacia del procedimiento de obtención de muestras con ROV, la estrategia de procesamiento en terreno y la capacidad de detección de ASVs de GSOB, integrando esta información con la observación microscópica de las muestras obtenidas y con la detección de CMV en los registros de video del propio ROV. Para abordar estas preguntas se comparan de forma sistemática el protocolo consolidado estándar, definido como OE1, y su variante con etapas de enriquecimiento selectivo, analizadas en paralelo mediante microscopía óptica y revisión de los videos de inspección durante o previo a la toma de muestras, lo que permite validar el protocolo propuesto y recomendar ajustes específicos orientados a maximizar la detección de Beggiatoaceae en la caracterización de CMV en sedimentos de sitios categoría 4 bajo influencia de acuicultura intensiva.

Originalmente, el proyecto contemplaba evaluar la propuesta de metabarcoding en un centro de cultivo de cada una de las regiones de la Patagonia chilena, es decir, en las regiones de Los Lagos, Aysén y Magallanes. Sin embargo, durante la ejecución no fue posible realizar el muestreo en la Región de Los Lagos, en parte debido a la menor disponibilidad de centros categoría 4 en dicha región, lo que dificultó concretar la campaña planificada. Como alternativa, se incorporó un segundo muestreo en la Región de Aysén, lo que permitió equilibrar la disponibilidad de datos considerando el estudio previo en Estero Córdova. De este modo, se analizaron dos centros en la Región de Aysén y un centro en la Región de Magallanes, complementados con los datos previos de dos centros en Estero Córdova, también en la Región de Magallanes. En las secciones siguientes se presentan primero los resultados preliminares de la evaluación del protocolo de metabarcoding en los centros de Estero Córdova, en la Región de Magallanes, y luego las evaluaciones realizadas en este proyecto, ordenadas según la fecha de muestreo, comenzando por el centro Tangbac en la Región de Aysén, seguido por el centro Isla Guzmán en la Región de Magallanes y finalizando con el centro Williams en la Región de Aysén.

5.2. Muestreos en centros Córdova 4 y Córdova 5, Región de Magallanes.

Como se indicó previamente, en las campañas de muestreo realizadas en febrero de 2023 en Estero Córdova, Región de Magallanes, ya se aplicó la mayor parte de la metodología propuesta para este estudio. Aranda y col. (2026) presentaron en detalle los resultados obtenidos con un equivalente del protocolo consolidado estándar, definido como OE1. En esta sección del informe se organizan y describen esos resultados para facilitar su comparación con los obtenidos posteriormente en las campañas de muestreo realizadas en los sitios Tangbac, Isla Guzmán y Williams, en las regiones de Aysén y Magallanes.

5.2.1. Sitios de muestreo

Se examinaron dos centros de cultivo de salmón del Atlántico (*Salmo salar*), ubicados en el Estero Córdova en la zona noroccidental del Estrecho de Magallanes, Centros Córdova 4 y Córdova 5, respectivamente (Fig. 4). El fondo marino bajo estas concesiones se compone de sustratos blandos y rocosos, predominando estos últimos. Todas las muestras se recolectaron en febrero de 2023, durante el periodo de descanso sanitario obligatorio. Ambos centros resultaron con INFA anaeróbica luego del periodo previo de cultivo, debido a la presencia de CMV en las transectas de análisis.

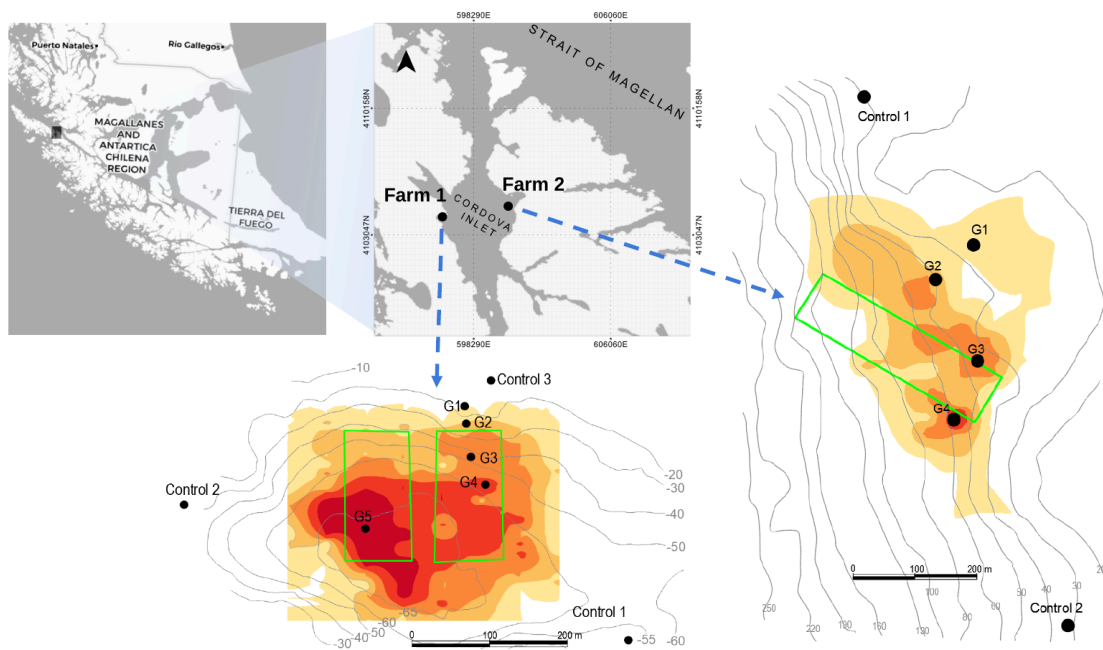


Figura 4. Muestreos en Córdova 4 (Farm 1) y Córdova 5 (Farm 2).

Febrero de 2023 en Región de Magallanes. Los recuadros ampliados muestran mapas de cobertura de mantos GSOB y la ubicación relativa de los sitios de muestreo, con distintos grados de cobertura indicados mediante un gradiente de color que va de naranja a rojo oscuro (a mayor cobertura). Los rectángulos verdes representan la posición relativa de las jaulas de salmón. La batimetría se indica mediante curvas de nivel en gris. Todos los mapas están representados en proyección WGS 84 UTM 18S y fueron elaborados utilizando el software QGIS. Aranda y col. (2026).

Antes del muestreo, la empresa DVS Tecnologías S.A. (Puerto Varas, Chile) realizó un levantamiento del fondo marino para evaluar la cobertura de la CMV utilizando imágenes de alta resolución capturadas mediante la cámara submarina disponible en el ROV Deep Trekker DTG3. El mapeo mostrado en la Fig. 4 se efectuó mediante un método semicuantitativo basado en imágenes que integra análisis cuantitativo por conteo de puntos y evaluación visual cualitativa, empleando un enfoque estereológico modificado según la técnica de Weibel (Weibel y col., 1966). Sobre cada imagen se superpuso digitalmente una malla sistemática PNG sin solapamientos, compuesta por 21

líneas paralelas dispuestas en siete hileras equidistantes, las que generaron 42 puntos extremos formando una trama triangular equilátera. Cada punto, representando un área absoluta fija, se usó como referencia para la medición planimétrica, en tanto las líneas asociadas funcionaron como sondas para la evaluación de cobertura. Se contabilizaron las intersecciones coincidentes con CMV o sedimentos, excluyendo los puntos ubicados sobre vacíos. Las cuentas se transformaron en porcentajes de cobertura y se clasificaron en los siguientes grados: G0 (sin manto visible), G1 (2,3-19%), G2 (>19-35%), G3 (>35-51%), G4 (>51-67%), G5 (>67-84%) y G6 (>84-100%). Aunque el método está sujeto a cierto error de estimación por la inclusión u omisión de puntos individuales, la clasificación por intervalos minimiza el sesgo y facilita tanto la interpretación cuantitativa como cualitativa.

Cualitativamente, este gradiente se describe de la siguiente manera. En G1 se observa CMV incipiente, por lo general restringida a los intersticios rocosos. En G2 la cubierta de microorganismos es escasamente visible y aparece dispersa sobre el sedimento y alrededor de las rocas. En G3 se identifican parches delgados pero dispersos de CMV sobre los sedimentos. En G4 se observan parches más consolidados, aunque todavía dispersos y sin extenderse sobre grandes áreas rocosas. En G5 la CMV es continua, pero no cubre superficies rocosas de gran tamaño. Finalmente, en G6 se reconoce una CMV gruesa y continua que abarca todo el lecho marino, incluyendo grandes superficies rocosas (Fig. 5).

Los mapas de grados de cobertura CMV obtenidos (insertos en Fig. 4) se utilizaron para seleccionar los sitios de muestreo de sedimentos. Se incluyeron sitios de control adyacentes a los centros de cultivo que no presentaban CMV (G0), con el fin de establecer una línea base para comparaciones.

El muestreo en Córdova 4 se realizó en los sitios con CMV G1 a G5 y en tres sitios de control (C1 a C3), mientras que en el centro Córdova 5 se muestrearon los sitios con CMV G1 a G4 y dos sitios de control (C1 y C2) (Tabla 4, Fig. 4).

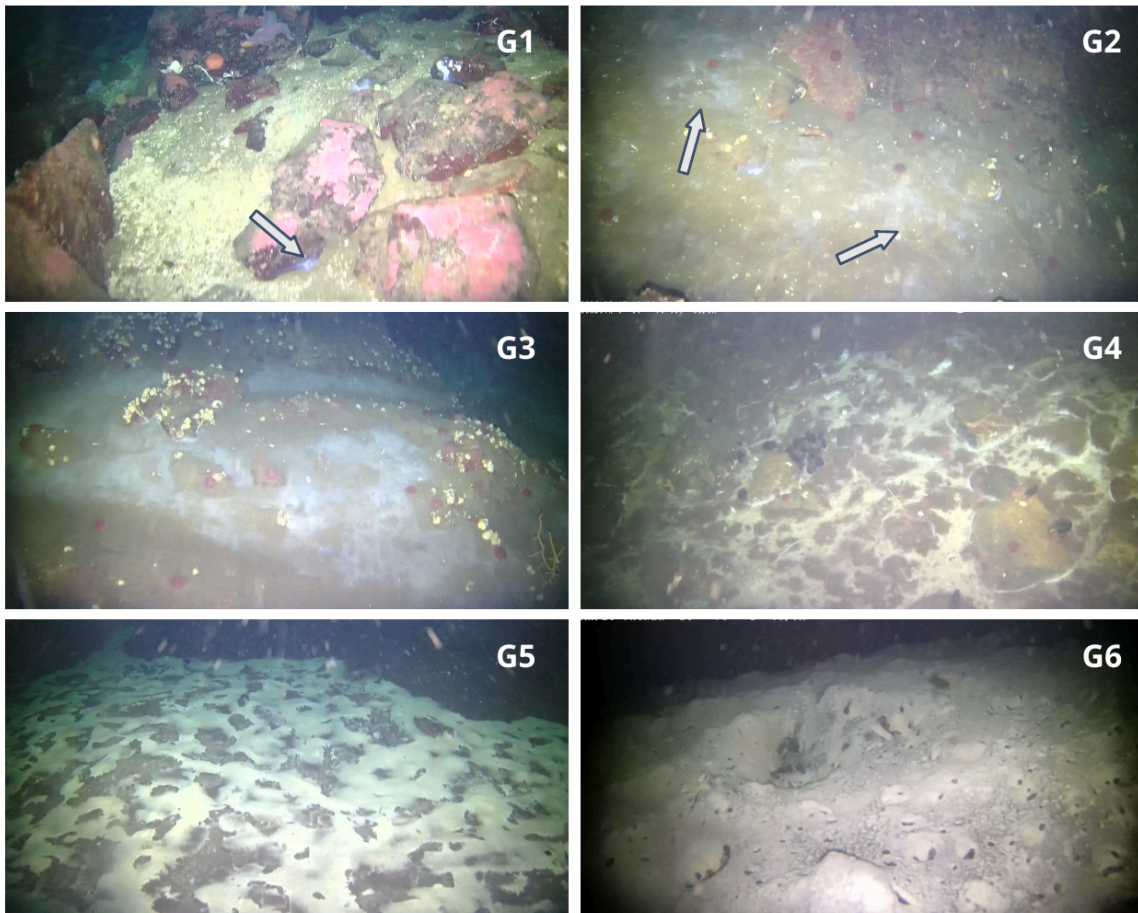


Figura 5. Imágenes representativas que ilustran los grados de CMV (G1 a G6). Escala elaborada e implementada por DVS Tecnologías (Puerto Varas, Chile). G1 muestra una presencia mínima, principalmente confinada a las cavidades rocosas (flecha). G2 exhibe cubiertas de microorganismos apenas visibles, dispuestas de forma dispersa sobre el sedimento (flechas) y alrededor de las rocas. G3 presenta parches delgados pero distribuidos de manera dispersa sobre los sedimentos. G4 muestra parches más consolidados, aunque todavía dispersos, que no se extienden sobre rocas de gran tamaño. G5 exhibe una CMV continua, excluyendo las grandes superficies rocosas. G6 corresponde a una CMV continua y gruesa que abarca también grandes rocas. Aranda y col. (2026).

Tabla 4. Coordenadas sitios de muestreo Córdova 4 y 5. WGS84 UTM 18S.

Centro	Punto	Descripción	UTM (E)	UTM (N)
Córdova 4	E1	CMV G1	596575	4104172
	E2	CMV G2	596577	4104149
	E3	CMV G3	596583	4104105
	E4	CMV G4	596602	4104068
	E5	CMV G5	596447	4104010
	Control 1	Sin CMV, zona oriente	596786	4103863
	Control 2	Sin CMV, zona poniente	596213	4104042
	Control 3	Sin CMV, zona norte	596609	4104206
Córdova 5	E1	CMV G1	600367	4104860
	E2	CMV G2	600306	4104805
	E3	CMV G3	600374	4104675
	E4	CMV G4	600335	4104581
	Control 1	Sin CMV, zona norte	600191	4105097
	Control 2	Sin CMV, zona sur	600519	4104252

5.2.2. Detalles de protocolo

El protocolo de muestreo fue, en términos generales, consistente con el protocolo consolidado propuesto en el OE1 de este proyecto. La obtención de muestras se realizó prácticamente como se describe en la parte 1 del protocolo consolidado, con la principal diferencia de que el sedimento recogido en las valvas del ROV se transfirió por triplicado a tubos Falcon de 50 ml mediante espátulas desechables y pipetas Pasteur plásticas, para luego transportarlo en un contenedor refrigerado hasta el pontón Córdova 4, donde se efectuó el procesamiento inicial. De cada réplica se tomó de inmediato una alícuota de 1 ml, que se congeló *in situ* entre -10 y -15 °C y se mantuvo a esa temperatura durante el traslado aéreo al laboratorio de la Universidad de Los Lagos en Osorno, donde posteriormente se almacenó a -80 °C hasta la extracción de ADN, realizada cuatro meses después de la colecta. Aunque este procedimiento se considera aceptable para muestreos remotos según la literatura científica, implicó desafíos logísticos

importantes debido a la ubicación aislada de los centros y a los tiempos de transporte involucrados. Para asegurar la preservación del material se instaló un congelador horizontal dedicado, ajustado a -15°C , en el pontón, ya que no era posible utilizar los equipos destinados a alimentos. El uso de hielo seco o nitrógeno líquido se descartó por la incertidumbre logística asociada al transporte marítimo dependiente de las condiciones meteorológicas y por las restricciones regulatorias del transporte aéreo. En conjunto, el método de preservación empleado resultó funcional, pero complejo desde el punto de vista operativo, por lo que en los muestreos posteriores estos inconvenientes se superaron mediante la incorporación de una solución estabilizadora de ADN, tal como se establece en el protocolo consolidado propuesto en el OE1 de este proyecto.

El metabarcoding V3-V4 del gen ARNr 16S fue consistente con la parte 2 del protocolo consolidado propuesto en el OE1, con algunas decisiones específicas dentro de las opciones definidas. La extracción de ADN se realizó en el laboratorio de la Universidad de Los Lagos utilizando el kit DNeasy PowerSoil (Qiagen), y cada extracto se cuantificó por espectrofotometría a 260/280 nm, verificando una relación superior a 1,8. La integridad del ADN se evaluó en gel de agarosa al 1 % teñido con GelRED y, además, en cada extracto se comprobó el potencial de amplificación por PCR mediante cebadores universales para el gen ARNr 16S y visualización en gel.

La secuenciación masiva del gen 16S se llevó a cabo en las instalaciones de Codebreaker Bioscience, en Puerto Varas. Para la amplificación se utilizaron los partidores 341f (CCTACGGGNGGCWGCAG) y 806r (GACTACHVGGGTATCTAATCC), dirigidos a la región V3-V4 del 16S (Klindworth y col. 2013, Parada y col. 2016), junto con el kit Quick-16S™ NGS Library Preparation Kit (Zymo Research, CA). Como control negativo se empleó agua libre de DNasa/RNasa apta para biología molecular (Zymo Research, CA) y como control positivo una mezcla de ADN que define taxones conocidos del mismo proveedor. Tras la amplificación, los productos de PCR se cuantificaron por fluorescencia mediante qPCR y se agruparon en proporciones equimolares. La librería agrupada se purificó con el kit Select-a-Size DNA Clean & Concentrator™ (Zymo Research) y se cuantificó nuevamente con Qsep1 (Bioptic) y Qubit (Thermo). La secuenciación se efectuó en una plataforma Illumina NextSeq 1000 con un kit de reactivos P1 de 600 ciclos, configurada para lecturas paired-end de 2×300 pb e incorporando un control PhiX al 10 %.

El procesamiento bioinformático fue completamente consistente con la parte 3 del protocolo consolidado. Los archivos FASTQ crudos se procesaron con fastp versión 0.23.4 para el control de calidad y el recorte de secuencias. El análisis posterior se realizó en QIIME 2 versión 2023.5, donde los datos se sometieron a demultiplexado y filtrado de calidad con el complemento q2-demux, seguido de desreplicación y eliminación de artefactos derivados de la PCR y de quimeras mediante DADA2, con una retención promedio cercana al 20% de las secuencias originales. Las bibliotecas que no alcanzaron el umbral de quince mil lecturas tras el procesamiento con DADA2 se excluyeron del análisis.

La asignación taxonómica de las variantes de secuencia del amplicón (ASVs) se realizó con el complemento q2-feature-classifier, utilizando un clasificador naïve Bayes entrenado con las secuencias completas de SILVA 138 SSURef NR99 (Quast y col. 2012, Robeson y col. 2020). Las asignaciones clasificadas como “desconocidas”, Eukaryota o plástidos se eliminaron de los análisis posteriores. Los controles negativos resultaron adecuados para muestras con baja carga biológica y el control positivo permitió identificar correctamente el 100% de los taxones bacterianos esperados, en las proporciones indicadas por el fabricante, lo que respalda la selección de herramientas bioinformáticas y la confiabilidad de los análisis subsecuentes. Las curvas de rarefacción mostraron una meseta en torno al valor de corte de quince mil lecturas, lo que permitió equilibrar una exclusión mínima de muestras con la profundidad necesaria para realizar análisis robustos basados en 16S (Weiss y col. 2017) (Fig. 6).

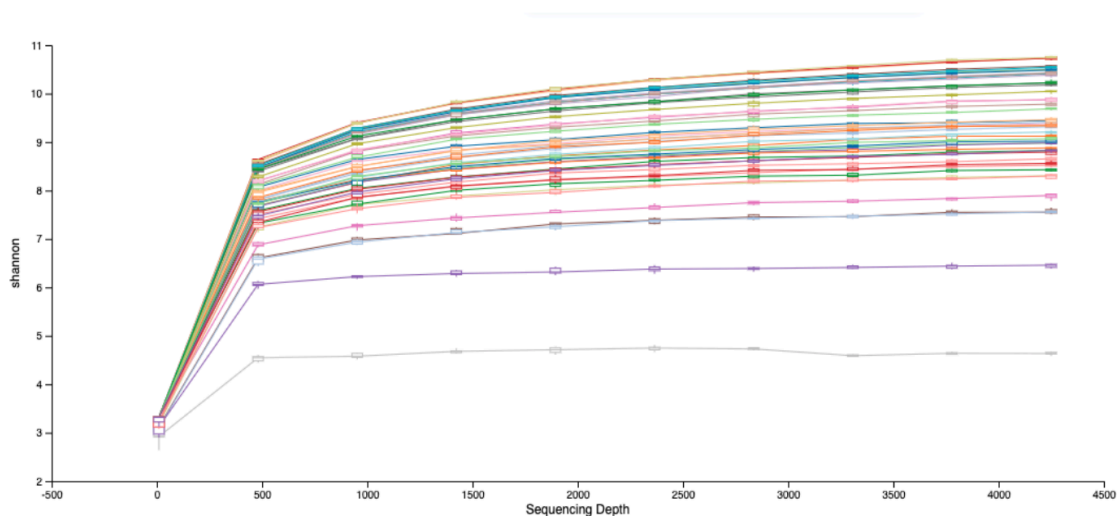


Figura 6. Curvas de rarefacción.

Rarefacción alpha usando algoritmo de Shannon en librerías obtenidas de muestras Córdova 4 y Córdova 5. Procesado en DADA2. Sobre 10000 lecturas no hay cambio de valores (no mostrado).

5.2.3. Videos submarinos durante la toma de muestras

Los registros HD obtenidos con el ROV DTG3 Deep Trekker durante la captura de muestras, resumidos en la Tabla 5, muestran que este sistema facilita una obtención eficiente de sedimentos en sitios de categoría 4, incluso sobre sustratos rocosos, al permitir seleccionar con precisión las zonas de muestreo. En contraste, métodos tradicionales como la draga o el box corer requieren múltiples lances, ya que no permiten elegir áreas específicas, lo que reduce la probabilidad de éxito y aumenta el esfuerzo operativo, y en muchas ocasiones ni siquiera es factible en fondos muy irregulares o rocosos.

Tabla 5. Videos de toma de muestras en Córdova 4 y 5.

Disponibles en Anexos.

Centro	Punto	Video
Córdova 4	E1	2023-02-11_18-32-11_CORDOVA_4_HD E1.mp4
	E2	2023-02-11_16-32-51_CORDOVA_4_HD E2.mp4
	E3	2023-02-11_16-52-46_CORDOVA_4_HD E3.mp4
	E4	2023-02-10_17-11-30_CORDOVA_4_E4.mp4
	E5	2023-02-12_16-50-17_CORDOVA_4_E5 ROV.mp4
	Control 1	2023-02-12_17-23-04_CORDOVA_4_C1.mp4
	Control 2	2023-02-12_17-51-30_CORDOVA_4_C2.mp4
	Control 3	Sin registro
Córdova 5	E1	2023-02-13_18-16-23_CORDOVA_5_E1.mp4
	E2	2023-02-14_10-25-39_CORDOVA_5_E2.mp4
	E3	2023-02-13_17-25-57_CORDOVA_5_E3.mp4
	E4	2023-02-13_16-04-54_CORDOVA_5_E4.mp4
	Control 1	2023-02-14_10-56-22_CORDOVA_5_C1.mp4
	Control 2	Sin registro

5.2.4. Observaciones al microscopio

Se efectuaron observaciones microscópicas de ejemplares vivos utilizando un microscopio portátil (Barride Optics modelo BM 42), empleando tanto microscopía óptica de campo claro convencional como microscopía de campo oscuro con iluminación oblicua incidente desde arriba.

Adicionalmente, todas las muestras fueron fijadas en glutaraldehído al 2,5% para análisis posterior y más exhaustivo mediante microscopía óptica en laboratorio, así como para microscopía electrónica de barrido (SEM) de tricomas de Beggiatoaceae usando un equipo Zeiss EVO 15. Los filamentos fijados se enjuagaron suavemente dos veces en agua destilada y se deshidrataron progresivamente en una serie de etanol (5-100% v/v). Las muestras se procesaron luego en un secador de punto crítico Quorum K850 con CO₂ líquido según el protocolo del fabricante. Los tricomas deshidratados se montaron en soportes de aluminio con cinta adhesiva de carbono de doble cara y se recubrieron con oro durante 4,0 minutos a 20 mA en recubridor Quorum K850. Las observaciones se realizaron bajo alto vacío a 5,0 kV utilizando un detector de electrones secundarios.

El examen microscópico reveló una distribución variable de tricomas de Beggiatoaceae entre las muestras de Córdova 4 y Córdova 5. Se observaron tricomas abundantes en las muestras E5 de Córdova 4 (Fig. 7), con una disminución en la abundancia en E4. Las muestras de E2 y E3 de Córdova 4, y de E2 a E3 de Córdova 5 requirieron mayor esfuerzo de observación para detectar tricomas, mientras que en las muestras E1 y control (C) de ambos centros no mostraron tricoma alguno.

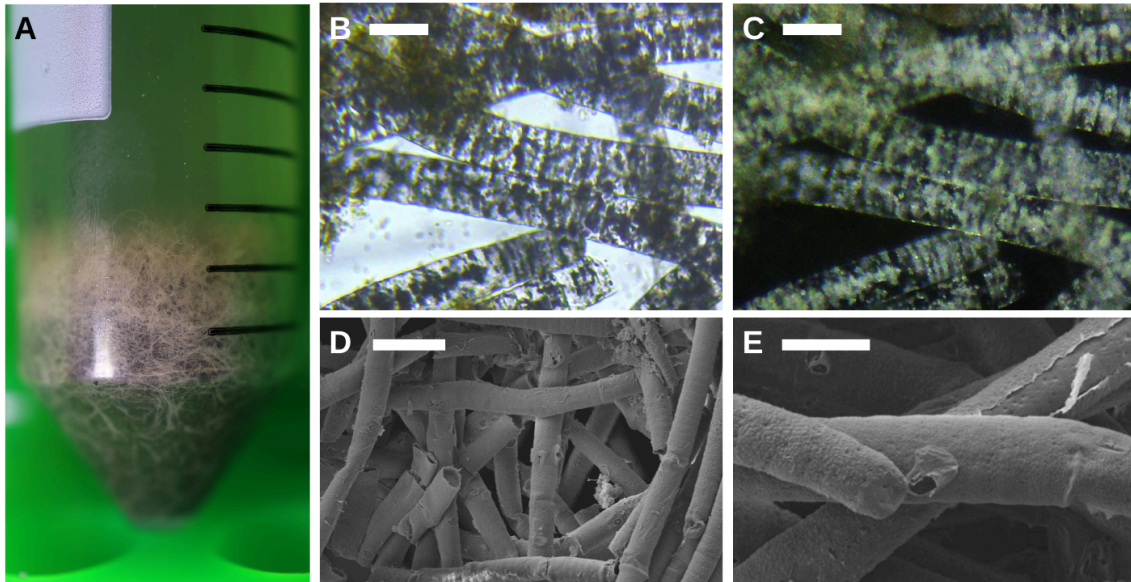


Figura 7. Filamentos de *Ca. Isobeggiatoa* Córdova 4.

Muestra con interfaz agua-sedimento del sitio E5 de Córdova 4 (A). Tricomas vivos observados por microscopía de campo claro y de campo oscuro, con una vacuola central e inclusiones ópticamente densas y reflectantes de azufre elemental (B y C). Imágenes obtenidas mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) con electrones secundarios muestran estos tricomas a 1.000× y 3.040× de aumento (D y E) registradas bajo alto vacío a 5,0 kV utilizando un detector de electrones secundarios (Aranda y col. 2026).

5.2.5. Abundancia relativa y taxonomía de ASVs familia Beggiatoaceae

El 0,079% de las ASVs obtenidas se asignaron a Beggiatoaceae, predominando *Candidatus Isobeggiatoa* en el 97,4% de las secuencias de esta familia. La abundancia relativa promedio de *Ca. Isobeggiatoa* tendió a incrementar progresivamente desde sitios con menor a mayor grado de cobertura de CMV. En Córdoba 4 varió desde 0,002% en sitio E1, hasta 0,23% en sitio E5 (n=3). En el Centro Córdoba 5 se observó un patrón similar de incremento en muestras con mayor grado de CMV, aunque menos pronunciado (Fig. 8).

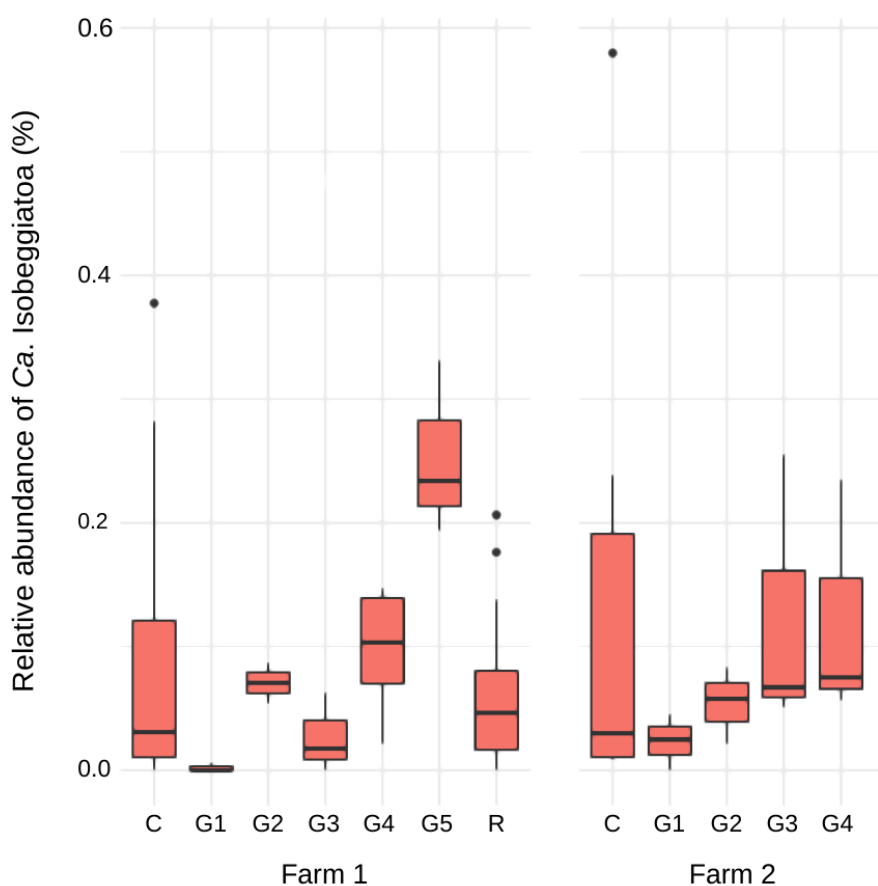


Figura 8. Abundancias relativas ASV *Ca. Isobeggiatoa* en Córdoba 4 y 5.

Abundancias relativas de *Ca. Isobeggiatoa* en muestras de Córdoba 4 (Farm 1) y Córdoba 5 (Farm 2) en zonas con cobertura creciente de CMV. Diagramas de caja C corresponden a sitios control (C1-C3 en Córdoba 4 y C1-C2 Córdoba 5). Muestras R corresponden a detrito superficial de base de 7 rocas (R2 y R4-R9) en el sitio E2 de Córdoba 4. Aranda y col (2026).

Se confirma entonces que el procedimiento de metabarcoding con 15 mil lecturas por muestra, permite la detección de bacterias de la familia en sitios categoría 4. Sin embargo, la abundancia relativa es extremadamente baja, con máximos valores que en promedio no superan el 0,3% del total de asignaciones de procariotas (bacterias y arqueas) en muestras que visiblemente muestran una alta abundancia de GSOB formadoras de CMV (videos de captura de muestras y observación por microscopía). De este modo, la baja abundancia relativa de estas bacterias, incluso en muestras con alta cobertura de tapetes GSOB, es coherente con su elevado biovolumen y bajo contenido relativo de ADN.

Cabe destacar que se detectaron ASVs de *Ca. Isobeggiatoa* en algunos sitios Control en los que la inspección por video submarino no mostró evidencia alguna de CMV. En Córdova 4 los niveles de detección fueron 0,22% en el sitio Control 2 (n = 3, DE = 0,19%) y 0,05% en el sitio Control 3 (n = 2, DE = 0,06%). En Córdova 5, la detección alcanzó 0,29% en el sitio Control 1 (n = 3, DE = 0,27%) (Fig. 8) (Tabla S2.csv incluida en Anexos, Carpeta 3). Sin embargo, no se observaron tricomas en estos controles mediante microscopía directa en terreno ni durante la inspección de material fijado en laboratorio.

Esta detección inesperada de *Ca. Isobeggiatoa* en algunos sitios control resulta intrigante, ya que se detectaron en muestras donde no se observaron GSOB microscópicamente ni CMV en registro de video en los sitios muestreados. Esta detección de ADN podría explicarse por la amplificación de fragmentos provenientes de detritos de GSOB, lo que sugiere posibles mecanismos de persistencia o transporte de ADN. Los controles positivos y negativos del metabarcoding permiten validar los resultados, pero de todos modos no se deben descartar factores metodológicos como la eficiencia de extracción de ADN y el sesgo de la PCR, que pueden influir en la cuantificación de bacterias filamentosas de gran tamaño como *Beggiatoaceae*.

Por otra parte, la comparación de abundancias relativas sin conocer el contenido total de ADN bacteriano o el recuento de bacterias por gramo de sedimento puede afectar las interpretaciones. Estas observaciones subrayan la complejidad al interpretar datos moleculares en conjunto con las observaciones visuales y ponen de relieve la necesidad de integrar múltiples enfoques para el estudio de comunidades microbianas en ambientes marinos dinámicos.

Los ASVs de *Ca. Isobeggiatoa* mostraron relaciones filogenéticas cercanas a las previamente reportadas bajo centros de cultivo de salmón en la Región de Los Lagos (IDs de secuencias KP994500.1 y FJ875195.1) (Aranda y col. 2010, 2015). La identidad de las regiones V3-V4 en algunas secuencias del 16S sugiere una distribución amplia de *Ca. Isobeggiatoa* en la Patagonia chilena, indicando que esta bacteria podría estar más extendida en estos ambientes de lo previamente entendido.

El 2,6% restante de las ASVs de *Beggiatoaceae* correspondieron a *Candidatus Maribeggiatoa*, detectadas exclusivamente en sedimentos de Córdova 4, incluyendo el sitio E1 y dos de siete muestras de rocas (R2 y R6) con CMV en E2. En estos casos, la

abundancia relativa de *Ca. Maribeggiatoa* (0,008% a 0,028%) fue comparable o superior a la de *Ca. Isobeggiatoa* (Tablas S1 y S2 incluidas en Anexos, Carpeta 3). Las cuatro ASVs identificadas exhibieron una homología $\geq 97\%$ en la región V3-V4 con secuencias de referencia del clado *Ca. Maribeggiatoa* (AF064543, FJ814753).

5.3. Evaluación en centro Tangbac, Región de Aysén

5.3.1. Sitios de muestreo

Con fecha 17 de mayo de 2024, Sernapesca notificó oficialmente la condición anaeróbica del Centro Tangbac, por lo cual no se autorizó el ingreso de nuevos ejemplares hasta el restablecimiento de condiciones aeróbicas.

La variable que incumplió el límite de aceptabilidad en la INFA fue la presencia de bacterias en todas las transectas (T1 a T8) correspondientes a las zonas de categoría 4. El valor de oxígeno a 1 m de fondo mostró valores entre 6,5 y 7,3 mg/L, valores por sobre el límite de aceptabilidad que es 2,5 mg/L a 1 m del fondo.

Durante el muestreo para fines de este proyecto, no se contó con los registros de transectas oficiales de la INFA, por lo que durante la campaña en octubre 2024 se efectuó primero una revisión *in situ* de transectas definidas en la INFA (Anexo 3), según se expone en la siguiente tabla.

Tabla 6. Videos exploratorios de transectas INFA centro Tangbac
Disponibles en Anexos.

Trans.	Video(s)
T1	T1_2024-10-03_16-27-39_111_HD.mp4
T2	T2_2024-10-03_16-51-13_111_HD.mp4 y T2_2024-10-03_18-10-49_111_HD.mp4
T3	T3_2024-10-04_11-03-42_111_HD.mp4 y T3_2024-10-03_17-15-35_111_HD.mp4
T4	T4_2024-10-03_10-38-40_111_HD.mp4
T5	T5_2024-10-03_11-00-41_111_HD.mp4 y T5_2024-10-03_11-17-49_111_HD.mp4
T7	T7_2024-10-03_11-49-21_111_HD.mp4

Como primer hallazgo, se observa una abundante presencia de bivalvos, principalmente mitílidos, a lo largo de todo el lecho marino de la concesión. La mayor parte corresponde a restos de conchas o individuos muertos y solo una fracción menor se aprecia en los registros de video como posibles mejillones vivos. Este patrón podría estar asociado al desprendimiento de fouling desde los módulos y sistemas de fondeo.

Sin embargo, la extensión y la distribución observadas sugieren la presencia de un banco natural que cubre gran parte de la concesión. En cualquier caso, la acumulación de restos cárnicos y de material biogénico puede contribuir al enriquecimiento orgánico del sedimento y favorecer estados iniciales de proliferación de CMV, en concordancia con lo descrito para gradientes de enriquecimiento orgánico y la aparición de mantos de bacterias oxidantes de azufre en la literatura clásica (Jørgensen 1982).

En cuanto a la presencia de CMV, solo se detectaron superficialmente en la transecta T2 entre todas las transectas exploradas. Un primer intento de muestreo en T2 (E2) no resultó satisfactorio debido a la presencia escasa de CMV y a limitaciones técnicas del ROV. Posteriormente se inspeccionó el lecho marino (categoría 4) bajo la jaula ubicada en la cabeza norte, adyacente al vértice 4 del módulo, donde la ausencia de redes permitió una mejor visualización. En ese sector se identificó un punto con abundantes restos de bivalvos (principalmente mitílidos) y una mayor presencia de CMV que en T2, definiendo así el primer punto de muestreo efectivo (Ta_E1). Luego se re-exploró T2 en busca de un segundo punto (E2), nuevamente sin éxito, por lo que se optó por fondear la embarcación en boyas situadas a unos 30 a 40 m del extremo de T2, generando un nuevo punto de muestreo efectivo (Ta_E3). Adicionalmente, se incorporaron sitios de control alejados del centro en direcciones opuestas (norte y sur). La Tabla 7 y la Figura 9 resumen la ubicación de los sitios de muestreo finalmente seleccionados.

Tabla 7. Coordenadas sitios de muestreo centro Tangbac. WGS84 UTM 18S.

Punto	Descripción	UTM (E)	UTM (N)
Ta_E1	CMV tipo G3 bajo la jaula M_118, adyacente al vértice nor-oeste del módulo	600705	5014088
Ta_E3	CMV tipo G2 cercano a T2f	600621	5014173
Ta_Control_1	Sin CMV, sector norte	600750	5014361
Ta_Control_2	Sin CMV, sector oriente	601009	5013880

* Grado aproximado según escala DVS (Fig. 5).

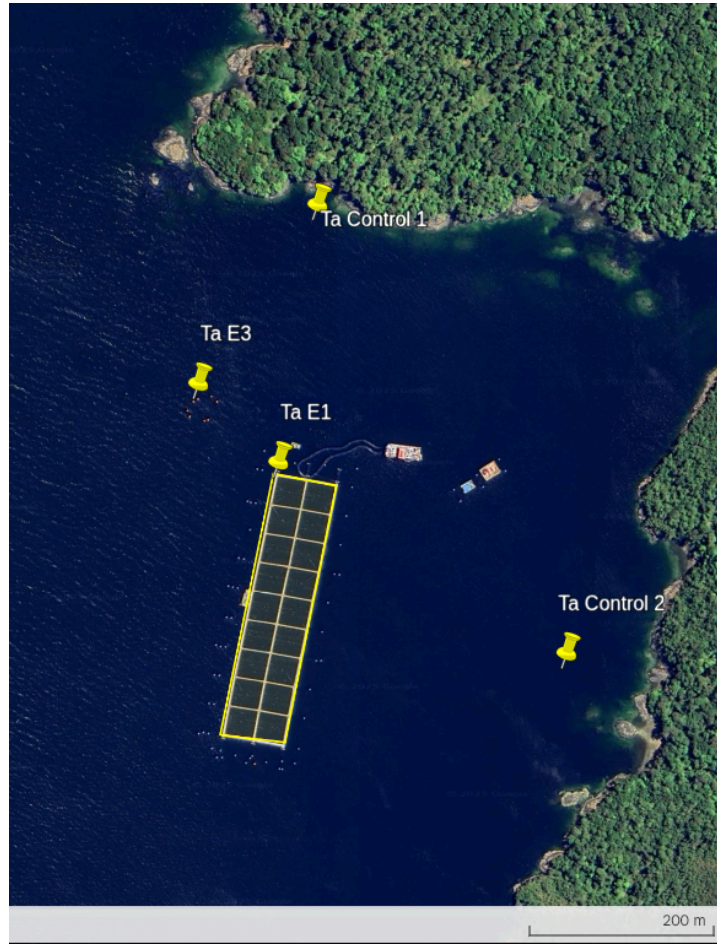


Figura 9. Muestreo centro Tangbac.

Módulo de cultivo y puntos de muestreo. Datos WGS84 UTM Zona 18S, proyectados en Google Earth. Archivo klm disponible como Anexo 4.

5.3.2. Videos submarinos durante la toma de muestras

El sitio E1 se encontraba cubierto por restos de conchas de bivalvos, principalmente mitílidos, lo que dificultó la colecta y solo permitió obtener una pequeña cantidad de sedimento mezclado con fragmentos de concha. El primer registro de video de Ta_E1 correspondió a la búsqueda de un punto adecuado de muestreo y el segundo documentó la captura efectiva de la muestra. En E2 se presentaron dificultades técnicas, ya que el ROV debió ser recuperado sin muestra debido a la pérdida de comunicación con el controlador. No se obtuvo registro de video para E3 ni para el Control 2. No obstante, se confirma la operatividad y la utilidad del ROV modelo DTG3 equipado con graben y muestreador de doble valva, cuyos registros audiovisuales se presentan en la siguiente tabla.

Tabla 8. Videos de toma de muestras en centro Tangbac.

Disponibles en Anexos.

Pto.	Descripción
Ta Ctrl. 1	2024-10-05_10-39-28.mp4
Ta_E1	2024-10-05_14-48-25_M_118_HD.mp4; 2024-10-05_15-27-53_M_118_HD.mp4
E2	2024-10-05_16-35-20_T_2_HD.mp4
Ta_E3	Sin registro
Ta Ctrl. 2	Sin registro.

5.3.3. Detalles de protocolo

El protocolo de muestreo aplicado corresponde al protocolo consolidado propuesto en el OE1 de este proyecto. La obtención de muestras siguió lo descrito en la parte 1 de dicho protocolo, con una modificación clave para su validación, que es la transferencia del material recolectado por el ROV a tubos Falcon de 50 ml por triplicado, utilizando espátulas y pipetas Pasteur desechables, para su posterior traslado en contenedor refrigerado al laboratorio de campaña en el pontón. Esta variación permitió evaluar en qué medida una estrategia de enriquecimiento selectivo mejora la detección de filamentos migratorios de Beggiatoaceae, aspecto central en la evaluación del protocolo.

Las muestras de sedimento recolectadas en tubos Falcon de 50 ml se procesaron de inmediato en el pontón. En cada réplica se aplicaron dos procedimientos: (1) muestreo inicial con tórula sintética, preservada en un tubo Falcon de 15 ml con 2 ml de solución estabilizadora Micro-Safe (protocolo consolidado OE1), y (2) muestreo secundario de remanente de muestra mediante enriquecimiento selectivo a través de la

adición de 5 ml de agua de mar local aireada y esterilizada (filtración 0,45 μm y 0,22 μm), seguida de homogeneización suave por inversión e incubación durante 24 h en contenedor refrigerado, con el fin de generar un gradiente redox y estimular la migración de filamentos Beggiatoaceae hacia la interfaz agua-sedimento. A partir de las muestras enriquecidas se obtuvo un composito tomando material desde dicha interfaz con pipeta Pasteur estéril. Este composito, normalmente enriquecido en GSOB filamentosas migratorias, se muestreó por triplicado con tórula sintética y se preservó en tubos con solución estabilizadora de ADN.

El análisis de metabarcoding V3-V4 del gen ARNr 16S fue plenamente consistente con la parte 2 del protocolo consolidado. La extracción de ADN se realizó en las instalaciones de Codebreaker Bioscience en Puerto Varas, utilizando el kit Zymo BIOMICS 96 MagBead DNA Kit, y cada extracto se cuantificó por fluorometría con Qubit y se evaluó mediante gel o electroforesis capilar. La secuenciación masiva del gen 16S de ARN ribosomal se llevó a cabo de manera idéntica a la aplicada previamente a las muestras Córdova 4 y Córdova 5 (Aranda y col. 2026).

La empresa Codebreaker Bioscience contó con el equipamiento y la especialización requeridos para el desarrollo del estudio, sin que ello implique una recomendación o preferencia particular dentro del protocolo consolidado. En futuros estudios, los usuarios podrán considerar este u otros proveedores de servicios, de acuerdo con la disponibilidad y las condiciones del mercado.

El procesamiento bioinformático también fue 100% congruente con la parte 3 del protocolo consolidado. Los detalles específicos dentro de las opciones del protocolo consolidado fueron los mismos que los ejecutados para las muestras Córdova 4 y Córdova 5. Con la excepción de la actualización de la base de datos de referencia para la asignación taxonómica de los ASVs a la versión GTDB r09 rs220, en enero de 2025. Las curvas de rarefacción también alcanzaron todas las mesetas mucho antes del valor de corte de 15 mil lecturas (no mostrado).

5.3.4. Registro de microscopía óptica

Se observó presencia de organismos formadores de CMV correspondientes a GSOB típicos de la familia Beggiatoaceae de tipo filamentosos y globular en las muestras E1 y E3 pero no en las muestras control. Las imágenes de GSOB filamentosas dan cuenta de más de un tipo de tricomas. Mientras que las imágenes de GSOB globulares en división y en cadena podrían ser indicativas del género *Thiomargarita*.

Los registros mostrados en Anexos (Carpeta 6) están mayormente duplicados, con una imagen en campo claro (siglas CC indicadas en nombre de archivo) y en campo oscuro con luz reflejada que permite ver brillar los gránulos de azufre (siglas CO en archivos).

5.3.5. Abundancia relativa y taxonomía de ASVs familia Beggiatoaceae

En forma análoga a lo observado en los centros Córdoba 4 y Córdoba 5, la asignación de ASVs a la familia Beggiatoaceae fue extremadamente baja, con abundancias relativas que alcanzaron el 0,17% en un réplica de Ta_E1 (Tabla 9) (26 lecturas de 15 mil en la librería). Con detección muy inferior en Ta_E3 y Ta_Control_1 y sin detección de Ta_Control_2. Las muestras sometidas a enriquecimiento selectivo no incrementaron las lecturas. En Ta_Control_2 sometida a enriquecimiento no se obtuvo ADN suficiente presumiblemente debido a la naturaleza de la muestra (conchillas) y a la escasez de material floculento o de microorganismos móviles asociados.

Tabla 9. Abundancia relativa (%) ASVs familia Beggiatoaceae centro Tangbac. Asignación realizada qiime2, utilizando GTDB r09 rs220. Se presentan valores promedio y desviación estándar (DE) para n=3, salvo indicación contraria (*).

Punto	Descripción	Muestra directa Prom (DE)	Muestra enriquecida Prom (DE)
Ta_E1	CMV tipo G3* debajo de jaula en vértice nor-oeste del módulo	0,173 *(n=1)	0,133 (0,042)
Ta_E3	CMV tipo G2* cercano a T2i	0,029 (0,017)	0,024 (0,019)
Ta_Control_1	Sin CMV, sector norte	0,027 (0,012)	0,009 (0,008)
Ta_Control_2	Sin CMV, sector oriente	0 (0)	ND (muestra con conchilla)

* Grado aproximado según escala DVS (Fig. 5).

La asignación JAUXCJ01 sp026993485 fue la más común en la familia, resultando con 100% de identidad en V3-V4 con *Ca. Isobeggiatoa*, reportadas previamente en sitios de Calbuco y Pichicolo, Región de Los Lagos (Aranda y col., 2010, 2015), específicamente las secuencias FJ875195, KP994500. Se detecta principalmente en Ta_E1, con muestras que no incrementaron lecturas con el enriquecimiento selectivo (Tabla 10). También aparecen en menor medida en Ta_E3 y Ta_Control_1.

Tabla 10. Abundancia relativa (%) ASVs *Ca. Isobeggiatoa* centro Tangbac.

Punto	Descripción	Muestra directa Prom (DE)	Muestra enriquecida Prom (DE)
Ta_E1	CMV tipo G3 debajo de jaula en vértice nor-oeste del módulo	0,173 (n=1)	0,131 (0,045)
Ta_E3	CMV tipo G2 cercano a T2i	0,011 (0,008)	0,016 (0,015)
Ta_Control_1	Sin CMV, sector norte	0,007 (0,007)	0,004 (0,008)
Ta_Control_2	Sin CMV, sector oriente	0 (0)	ND (muestra con conchilla)

La asignación a *Thiomargarita* sp. correspondió a la segunda fracción más abundante dentro de la familia, con un 13,5% de las lecturas. La mayoría de las secuencias V3-V4 presentó más de 99% de identidad con *Candidatus* *Thiomargarita nelsonii* y una fracción menor mostró 100% de identidad con *Thiomargarita namibiensis* (Salman y col. 2011). Estas bacterias exhiben un dimorfismo característico, con grandes filamentos adheridos al sustrato, frecuentemente restos de moluscos, y apéndices en cadena que culminan en la liberación de esferas, lo que facilita su propagación espacial (Flood y col. 2016). En Ta_E3 se detectó *Thiomargarita* sp. con baja abundancia relativa, con un promedio de 2,7 asignaciones en librerías 15k y sin un aumento apreciable tras el procedimiento de enriquecimiento. Además, se detectó también en Ta_Control_1 (Tabla 11), lo que sugiere una distribución más extendida dentro y fuera de la concesión, no necesariamente asociada a un enriquecimiento orgánico por fecas y alimento no consumido.

Tabla 11. Abundancia relativa (%) ASVs *Thiomargarita* sp. centro Tangbac.

Punto	Descripción	Muestra directa Prom (DE)	Muestra enriquecida Prom (DE)
Ta_E1	CMV tipo G3 debajo de jaula en vértice nor-oeste del módulo	0 (n=1)	0 (0)
Ta_E3	CMV tipo G2 cercano a T2i	0,018 (0,019)	0,007 (0,007)
Ta_Control_1	Sin CMV, sector norte	0,013 (0,013)	0 (0)
Ta_Control_2	Sin CMV, sector oriente	0 (0)	ND (muestra con conchilla)

Un 4,0% de los asignamientos de la familia Beggiatoaceae correspondieron a la especie *Candidatus Venteria ishoeyi*, propuesta por Fonseca y col. (2017) en muestras de la Bahía de Concepción. Estas asignaciones se detectaron en Ta_Control_1 (Tabla 12).

Tabla 12. Abundancia relativa (%) ASVs *Ca. Venteria ishoeyi* centro Tangbac.

Punto	Descripción	Muestra directa Prom (DE)	Muestra enriquecida Prom (DE)
Ta_E1	CMV tipo G3 debajo de jaula en vértice nor-oeste del módulo	0 (n=1)	0 (0)
Ta_E3	CMV tipo G2 cercano a T2i	0 (0)	0 (0)
Ta_Control_1	Sin CMV, sector norte	1,0 (1,7)	0,7 (1,2)
Ta_Control_2	Sin CMV, sector oriente	0 (0)	ND (muestra con conchilla)

Finalmente, la muestra enriquecida de Ta_E1 presentó además una asignación mínima a la especie BB20 sp025800385 dentro de la familia Beggiatoaceae (Tabla 13). La referencia correspondiente en la base de datos Silva no fue concluyente, por lo que el detalle de su identidad taxonómica a la fecha de este informe aún se considera incierto.

Tabla 13. Abundancia relativa (%) ASVs BB20 sp025800385 centro Tangbac.

Punto	Descripción	Muestra directa Prom (DE)	Muestra enriquecida Prom (DE)
Ta_E1	CMV tipo G3 debajo de jaula en vértice nor-oeste del módulo	0 (n=1)	0,002 (0,004)
Ta_E3	CMV tipo G2 cercano a T2i	0 (0)	0 (0)
Ta_Control_1	Sin CMV, sector norte	0 (0)	0 (0)
Ta_Control_2	Sin CMV, sector oriente	0 (0)	ND (muestra con conchilla)

5.4. Evaluación en centro Isla Guzmán, Región de Magallanes

5.4.1. Sitios de muestreo

Con fecha 14 de julio de 2025, Sernapesca notificó oficialmente la condición anaeróbica del Centro Isla Guzmán, por lo cual no se autorizó el ingreso de nuevos ejemplares hasta el restablecimiento de condiciones aeróbicas.

La variable que incumplió el límite de aceptabilidad en la INFA fue la presencia de bacterias en todas las transectas (T1 a T8) correspondientes a las zonas de categoría 4 (plano INFA en Anexo 5). El oxígeno a 1 m de fondo mostró valores entre 4,3 y 9,5 mg/L, valores por sobre el límite de aceptabilidad que es 2,5 mg/L a 1 m del fondo.

Los registros oficiales de transectas incluidos en la INFA evidenciaron presencia de CMV en todas las transectas, especialmente entre T1 y T6, con máxima concentración en T4 y menor intensidad en T7 y T8. A partir de esta información, y coordinando cuidadosamente con las labores de desarme del centro, la toma de muestras se realizó desde los pasillos flotantes del módulo, en sectores representativos próximos a T2, T4 y T6, con el fin de abarcar diferentes grados de cobertura por CMV. Además, se seleccionaron dos puntos de control para muestreo hacia el oriente y el poniente del módulo de cultivo. La Tabla 14 y la Figura 10 resumen la ubicación de los sitios de muestreo seleccionados.

Tabla 14. Coordenadas sitios de muestreo Isla Guzmán. WGS 84 UTM 18S.

Punto	Descripción	UTM (E)	UTM (N)
Gu_E1	CMV tipo G3*, cercanía a T2i	694720	4164114
Gu_E2	CMV tipo G3*, cercanía a T4i	694663 ‡	4164136 ‡
Gu_E3	CMV tipo G4*, cercanía a T6i	694604	4163996
Gu_Control_1	Sin CMV, sector nororiente	695118	4164250
Gu_Control_2	Sin CMV, sector surponiente	693957	4163951

* Grado aproximado según escala DVS.

‡ En el registro de video respectivo se mostró erróneamente coordenada No 8 guardada en GPS durante el trayecto de ingresos al Centro Isla Guzmán. La coordenada indicada en tabla se obtuvo del registro No 9 efectuado durante el muestreo (verificado por track).



Figura 10. Muestreo centro Isla Guzmán.

Módulo de cultivo y puntos de muestreo. Datos WGS84 UTM Zona 18S, proyectados en Google Earth. Archivo klm disponible como Anexo 6.

5.4.2. Videos submarinos durante la toma de muestras

En el sitio Gu_E1 se realizaron varias prácticas de la técnica de muestreo, seleccionando finalmente muestras provenientes de una zona con CMV correspondiente aproximadamente a la categoría G3 de escala DVS. En el sitio Gu_E2, ubicado en las cercanías de la transecta T4, se detectó menos CMV en la inspección inicial, pero posteriormente se identificó una depresión enriquecida en CMV (tipo G3 en escala DVS), flanqueada por rocas de mayor tamaño. De forma análoga, en el sitio Gu_E3 se muestreó una zona de sedimento adyacente a una roca prominente, la cual se caracterizó por exhibir una cobertura más densa de CMV, aproximándose a la tipología G4 según la escala DVS.

Se vuelve a ratificar la operatividad y utilidad del sistema ROV de muestreo. Los vídeos de registro se exponen en la siguiente tabla.

Tabla 15. Videos de toma de muestras en Centro Isla Guzmán.
Disponibles en Anexos.

Punto	Descripción
Gu_E1	Transecta 2.mp4
Gu_E2	Transecta 4.mp4 *
Gu_E3	Transecta 6.mp4
Gu_Control_1	C1.mp4
Gu_Control_2	C2.mp4

* Se recalca que en ese registro de video se mostró erróneamente coordenada No 8 guardada en GPS durante el trayecto de ingresos al Centro Isla Guzmán. La coordenada respectiva indicada en tabla anterior se obtuvo del registro No 9 efectuado durante el muestreo (verificado por track).

5.4.3. Detalles de protocolo

El protocolo de muestreo aplicado corresponde al protocolo consolidado propuesto en el OE1 de este proyecto. La obtención de muestras siguió lo descrito en la Parte 1 de dicho protocolo e incorporó una modificación clave para su validación. Esta modificación consistió en transferir el material recolectado por el ROV a tubos Falcon de 50 ml por triplicado, utilizando espátulas y pipetas Pasteur desechables, para su posterior traslado en un contenedor refrigerado al laboratorio de campaña en el pontón. Esta variación, al igual que la implementada en el muestreo del Centro Tangbac, permitió aplicar las etapas siguientes y evaluar en qué medida una estrategia de enriquecimiento selectivo mejora la detección de filamentos migratorios de Beggiatoaceae, aspecto central en la evaluación del protocolo.

Las muestras recolectadas en tubos Falcon de 50 ml se transportaron en frío hasta el pontón para su procesamiento inmediato. De cada réplica se realizaron dos procedimientos: (1) muestreo con tórula sintética, depositada en un tubo Falcon de 15 ml con 2 ml de solución estabilizadora Micro-Safe, y (2) incubación de los tubos Falcon ya muestreados con la adición de 5 ml de agua de mar local, previamente aireada y esterilizada mediante microfiltración (0,45 μm y 0,22 μm), homogeneizando por inversión (3-5 veces) y posterior incubación en frío por 24 h para favorecer la migración de filamentos Beggiatoaceae. Finalmente, desde la interfaz agua-sedimento se recolectó un composito enriquecido mediante pipeta Pasteur estéril, muestreado por triplicado con tórula sintética y preservado en tubos con solución estabilizadora de ADN.

El análisis por metabarcoding V3-V4 del gen ARNr 16S y el procesamiento bioinformático fueron 100% congruentes con las partes 2 y 3 del protocolo consolidado, con los mismos detalles de protocolo y uso de base de datos de referencia para asignación taxonómica que los utilizados en las muestras del Centro Tangbac.

5.4.4. Registro de microscopía óptica

Se dispone de registros *in vivo* de todas las muestras colectadas. En las 3 muestras con cubierta se observó presencia de organismos formadores de CMV correspondientes a GSOB típicos de la familia Beggiatoaceae de tipo filamentosos de distinto diámetro. Las imágenes muestran una diversidad con más de un tipo de filamento y una relativa uniformidad en sus abundancias.

Los registros mostrados en Anexos (Carpeta 8) están mayormente duplicados, con una imagen en campo claro (siglas CC indicadas en nombre de archivo) y en campo oscuro con luz reflejada que permite ver brillar los gránulos de azufre (siglas CO en archivos).

5.4.5. Abundancia relativa y taxonomía de ASVs familia Beggiatoaceae

En concordancia con lo observado en los centros Córdova 4, Córdova 5 y Tangbac, la asignación de ASVs a la familia Beggiatoaceae en muestras con CMV en el centro Isla Guzmán fue extremadamente baja. La mayor abundancia relativa se registró en Gu_E2, con un promedio de 0,21% en las tres librerías sin enriquecimiento, seguida de 0,14% en Gu_E1 y 0,12% en Gu_E3, mientras que las muestras de control, ubicadas aproximadamente a 400 y 600 m de distancia, mostraron valores todavía más bajos (0,004% y 0,013%, respectivamente) (Tabla 16). En dos de los tres puntos con CMV se obtuvo un incremento significativo de Beggiatoaceae al aplicar la técnica de enriquecimiento selectivo (Gu_E2 alcanzando 1,2% y Gu_E3 alcanzando un 0,62%).

Tabla 16. Abund. relativa (%) ASVs familia Beggiatoaceae centro Isla Guzmán.

Asignación realizada qiime2, utilizando GTDB r09 rs220. Se presentan valores promedio y desviación estándar (DE) para n=3.

Punto	Descripción	Muestra directa Prom (DE)	Muestra enriquecida Prom (DE)
Gu_E1	CMV tipo G3, cercanía a T2i	0,144 (0,080)	0,176 (0,014)
Gu_E2	CMV tipo G3, cercanía a T4i	0,209 (0,021)	1,224 (0,169)
Gu_E3	CMV tipo G4, cercanía a T6i	0,116 (0,067)	0,620 (0,201)
Gu_Control_1	Sin CMV, sector nororiente	0,004 (0,008)	0,004 (0,008)
Gu_Control_2	Sin CMV, sector surponiente	0,013 (0,018)	0,011 (0,010)

Similar al centro Tangbac, en el centro Isla Guzmán la asignación AUXCJ01 sp026993485 correspondiente a *Ca. Isobeggiatoa* fue la más frecuente dentro de la familia Beggiatoaceae. Su distribución fue heterogénea entre los sitios con CMV, representando el 97% de las asignaciones de la familia en Gu_E2, el 68% en Gu_E1 y solo el 17% en Gu_E3, y dominó también en las muestras con CMV sometidas a enriquecimiento (Tabla 17). En contraste, esta asignación prácticamente no apareció en las muestras directas de sitios control, aunque sí explicó la mayor parte de las asignaciones de la familia en las muestras enriquecidas en estos sitios.

Se destaca que esta asignación corresponde a secuencias V3-V4 completamente idénticas a las detectadas en Córdova 4, Córdova 5 y Tangbac, lo que indica una señal genética homogénea entre centros. Esto respalda la amplia distribución de *Ca. Isobeggiatoa* como principal formadora de CMV en sitios de cultivo de salmónidos en la Patagonia chilena.

Tabla 17. Abund. relativa (%) ASVs *Ca. Isobeggiatoa* centro Isla Guzmán.

Punto	Descripción	Muestra directa Prom (DE)	Muestra enriquecida Prom (DE)
Gu_E1	CMV tipo G3, cercanía a T2i	0,098 (0,047)	0,131 (0,021)
Gu_E2	CMV tipo G3, cercanía a T4i	0,202 (0,015)	1,209 (0,178)
Gu_E3	CMV tipo G4, cercanía a T6i	0,002 (0,004)	0,036 (0,014)
Gu_Control_1	Sin CMV, sector nororiente	0 (0)	0,004 (0,008)
Gu_Control_2	Sin CMV, sector surponiente	0,002 (0,004)	0,007 (0,007)

La segunda especie de la familia Beggiatoaceae correspondió a BB20 sp025800385. Su patrón de abundancias relativas en los sitios Gu_E1, Gu_E2 y Gu_E3 (Tabla 18) fue prácticamente inverso al observado para *Ca. Isobeggiatoa* y también fue escasa en las muestras de los sitios control. En la muestra Gu_E3, donde fue la especie dominante, explicó de manera consistente el aumento de la abundancia relativa de Beggiatoaceae en las muestras enriquecidas. La secuencia mayoritaria V3-V4 mostró 99% de identidad con la secuencia más abundante de las muestras del Centro Tangbac, con 279 de 280 pares de bases coincidentes. También presentó 100% de identidad con detecciones de Beggiatoaceae asociadas a surgencias frías del mar de Barents, situado al norte de Noruega (Grünke y col. 2012). Nuevamente, la referencia correspondiente en la base de datos Silva no fue concluyente, por lo que su identidad taxonómica como posible especie candidata aún se considera incierta a la fecha de este informe.

Tabla 18. Abund. relativa (%) ASVs BB20 sp025800385 centro Isla Guzmán.

Punto	Descripción	Muestra directa Prom (DE)	Muestra enriquecida Prom (DE)
Gu_E1	CMV tipo G3, cercanía a T2i	0,047 (0,035)	0,044 (0,032)
Gu_E2	CMV tipo G3, cercanía a T4i	0,007 (0,007)	0,013 (0,007)
Gu_E3	CMV tipo G4, cercanía a T6i	0,113 (0,064)	0,584 (0,193)
Gu_Control_1	Sin CMV, sector nororiente	0,004 (0,008)	0 (0)
Gu_Control_2	Sin CMV, sector surponiente	0 (0)	0 (0)

Finalmente, dentro de las detecciones minoritarias para la familia Beggiatoaceae se identificó UBA10656 sp030378085 en la muestra Gu_Control_2 (Tabla 19) y *Ca. Venteria ishoeyi*, representada por un único ASV en una muestra enriquecida de Gu_E2 (Tabla 20).

Tabla 19. Abund. relativa (%) ASVs UBA10656 sp030378085 centro Isla Guzmán.

Se excluyen de la tabla las estaciones que no presentaron detección de esta especie.

Punto	Descripción	Muestra directa Prom (DE)	Muestra enriquecida Prom (DE)
Gu_Control_2	Sin CMV, sector surponiente	0,011 (0,014)	0,004 (0,008)

Tabla 20. Idem. Ca. Venteria ishoeyi.

Se excluyen de la tabla las estaciones que no presentaron detección de esta especie.

Punto	Descripción	Muestra directa Prom (DE)	Muestra enriquecida Prom (DE)
Gu_E2	CMV tipo G3*, cercanía a T4i	0 (0)	0,002 (0,004)

5.5. Evaluación en centro Williams, Región de Aysén

5.5.1. Sitios de muestreo y videos submarinos durante la toma de muestras

Con fecha 04 de julio del 2025, Sernapesca notificó oficialmente la condición anaeróbica del Centro Williamns, por lo cual no se autorizó el ingreso de nuevos ejemplares hasta el restablecimiento de condiciones aeróbicas.

La variable que incumplió el límite de aceptabilidad fue la presencia de bacterias en todas las transectas (T1 a T8) correspondientes a las zonas de categoría 4 (plano de muestreo INFA en Anexo 7). El oxígeno a 1 m de fondo mostró valores entre 7,6 y 7,7 mg/L, valores por sobre el límite de aceptabilidad que es 2,5 mg/L a 1 m del fondo.

Durante el muestreo se constató que la empresa ya estaba efectuando servicio de recuperación de fondo autorizado mediante oxigenación facilitada por ROV. Las condiciones de altas corrientes de marea y algunas ventanas de viento explicaron que este servicio se efectuó en varias semanas, ofreciendo la oportunidad de muestro en transectas que ya había sido inicialmente tratadas con pasadas preliminares de oxigenación del fondo.

Se inició el trabajo amarrando la embarcación a boyas en la esquina suroeste del módulo, cercana al punto T8f, definida como estación Wi_E1. El sedimento se clasificó aproximadamente como Grado 2 en la escala DVS, aunque las corrientes dificultaron la operación del ROV y el muestreo terminó realizándose sobre zonas con cubierta visible asignada como tipo Grado 1. Luego se obtuvo una segunda muestra en el mismo lugar, registrada como Wi_E1b, con condiciones similares a Wi_E1a. En una tercera visita se muestreó un sector más próximo a T8i, marcado como Wi_E1c, donde inicialmente se observó una cubierta tipo Grado 3, pero durante la toma de muestra el ROV se desplazó levemente y la muestra se consideró finalmente como tipo Grado 2.

Posteriormente, se obtuvo otro punto de muestreo en las cercanías de T5i, identificado como Wi_E3, después de varios intentos. Se resalta para este sitio la combinación de dificultades operativas del ROV y de las fuertes corrientes de marea, las cuales restringieron significativamente las ventanas efectivas de muestreo.

También se definieron dos puntos de control alejados del centro, uno hacia el sector suroeste y otro hacia el noreste. La Figura 11 y la Tabla 21 presentan los sitios de muestreo seleccionados, mientras que la Tabla 22 resume los registros de video asociados a cada toma de muestra.

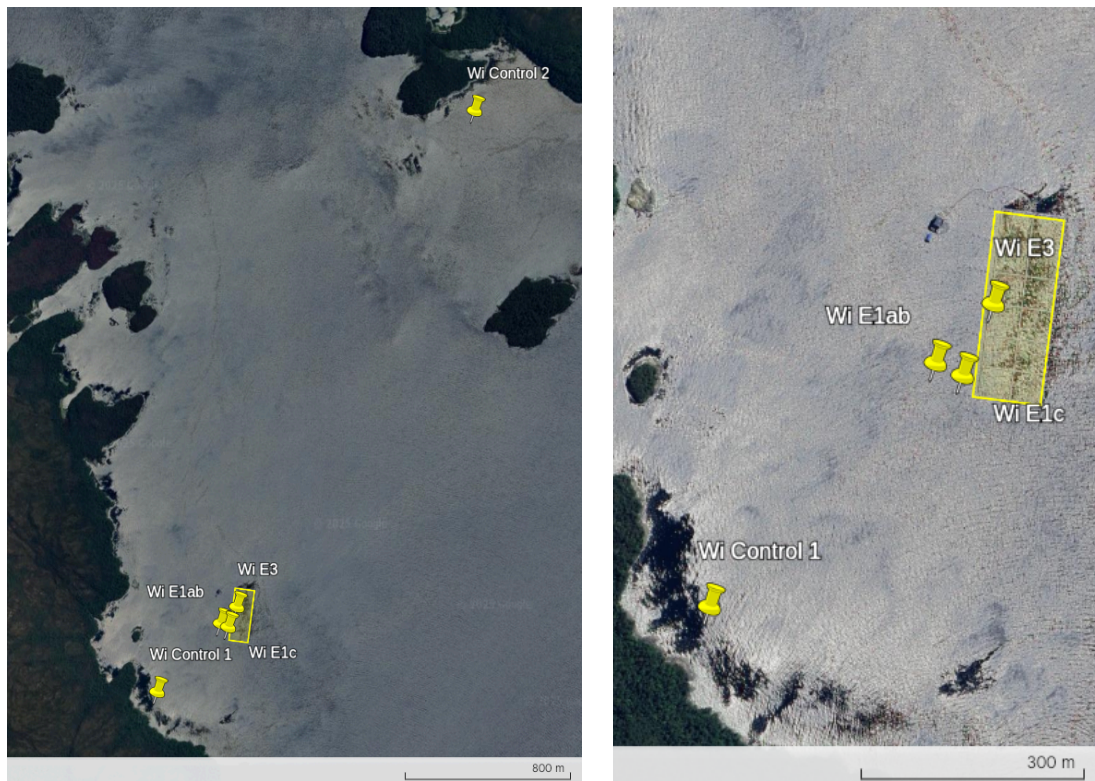


Figura 11. Muestreo centro Williams.

Módulo de cultivo y puntos de muestreo. Datos WGS84 UTM Zona 18S, proyectados en Google Earth. Archivo klm disponible como Anexo 8.

Tabla 21. Coordenadas sitios de muestreo en centro Williams. WGS 84 UTM 18S.

Punto	Descripción	UTM (E)	UTM (N)
Wi_E1a	CMV tipo G1*, cercanía a T8f	558581	5029181
Wi_E1b	CMV tipo G1*, cercanía a T8f	558581	5029181
Wi_E1c	CMV tipo G2*, cercanía a T8f	558617	5029164
Wi_E3	CMV tipo G2*; cercanía a T5i	558659	5029259
Wi_Control_1	Sin CMV, sector suroeste	558276	5028860
Wi_Control_2	Sin CMV, sector noreste	559811	5031599

* Grado aproximado según escala DVS (Fig. 5).

Tabla 22. Videos de toma de muestras en centro Williams.

Disponibles en Anexos.

Punto	Descripción
Wi_E1a	2025-11-04_19-01-21_T8f(E1a).mp4
Wi_E1b	2025-11-04_19-21-08_T8f(E1b).mp4
Wi_E1c	2025-11-05_13-51-26_t8f(i)(E1c).mp4
Wi_Control_1	2025-11-05_14-14-51_Control1(C1).mp4
Wi_Control_2	2025-11-06_08-41-42_Control2(C2).mp4
Wi_E3	2025-11-06_14-45-08_t5i(E3)primer_intento.mp4; 2025-11-06_20-23-51_t5i(E3)tercer_intento.mp4; 2025-11-07_09-04-16_t5i(E3)efectiva.mp4

5.5.2. Detalles de protocolo

El protocolo de muestreo aplicado corresponde al protocolo consolidado propuesto en el OE1 de este proyecto. La obtención de muestras siguió lo descrito en la parte 1 de dicho protocolo, manteniendo la modificación clave para su validación, que es la transferencia del material recolectado por el ROV a tubos Falcon de 50 ml por triplicado, utilizando espátulas y pipetas Pasteur desechables, para su posterior traslado en contenedor refrigerado al laboratorio de campaña en el pontón. Esta variación, al igual que la implementada en el muestreo de los centros Tangbac e Isla Guzmán, permitió evaluar en qué medida una estrategia de enriquecimiento selectivo mejora la

detección de filamentos migratorios de Beggiatoaceae, aspecto central en la evaluación del protocolo.

Las muestras recolectadas en tubos Falcon de 50 ml se transportaron en frío hasta el pontón para su procesamiento inmediato. De cada réplica se realizaron dos procedimientos: (1) muestreo con tórula sintética, depositada en un tubo Falcon de 15 ml con 2 ml de solución estabilizadora Micro-Safe, y (2) incubación de los tubos Falcon ya muestreados con la adición de 5 ml de agua de mar local, previamente aireada y esterilizada mediante microfiltración (0,45 μm y 0,22 μm), homogeneizando por inversión (3-5 veces) y posterior incubación en frío por 24 h para favorecer la migración de filamentos Beggiatoaceae. Finalmente, desde la interfaz agua-sedimento se recolectó un composito enriquecido mediante pipeta Pasteur estéril, muestreado por triplicado con tórula sintética y preservado en tubos con solución estabilizadora de ADN

El análisis por metabarcoding V3-V4 del gen ARNr 16S y el procesamiento bioinformáticos fueron 100% congruentes con las partes 2 y 3 del protocolo consolidado, con los mismos detalles de protocolo y uso de base de datos de referencia para asignación taxonómica que los utilizados en las muestras de los centros Tangbac e Isla Guzmán.

5.5.3. Registro de microscopía óptica.

Se dispone de registros *in vivo* de todas las muestras colectadas. Las muestras con CMV mostraron presencia de distintos GSOB filamentosos de la familia Beggiatoaceae. Se incluyen también algunos videos de muestras no enriquecidas. En ningún registro se observa morfologías esferoidales tipo *Thiomargarita* sp.

Los registros mostrados en Anexos (Carpeta 10) y en campo oscuro con luz reflejada que permite ver brillar los gránulos de azufre (siglas CO en archivos).

5.5.4. Abundancia relativa y taxonomía de ASVs familia Beggiatoaceae

En concordancia con lo observado en los demás centros, la asignación de ASVs a la familia Beggiatoaceae en la mayoría de las muestras con CMV del centro Williams fue extremadamente baja. El valor más alto se registró en Wi_E3, con una abundancia relativa de 0,6%.

En general, el procedimiento de enriquecimiento selectivo incrementó la detección de ASVs de la familia, con la única excepción de las muestras enriquecidas de Wi_E3 sin una explicación evidente, con datos que incluso mostraron una menor dispersión en las abundancias relativas. En las muestras de control se observaron los valores más bajos de abundancia relativa para la familia, los cuales no aumentaron en las fracciones enriquecidas.

Tabla 23. Abund. relativa (%) ASVs familia Beggiatoaceae centro Williams.

Asignación realizada qiime2, utilizando GTDB r09 rs220. Se presentan valores promedio y desviación estándar (DE) para n=3. Detalle de datos incluidos en anexos (Carpeta 11).

Punto	Descripción	Muestra directa Prom (DE)	Muestra enriquecida Prom (DE)
Wi_E1a	CMV tipo G1*, cercanía a T8f	0 (0)	0,082 (0,034)
Wi_E1b	CMV tipo G1*, cercanía a T8f	0,096 (0,073)	0,529 (0,307)
Wi_E1c	CMV tipo G2*, cercanía a T8f	0,084 (0,071)	0,624 (0,206)
Wi_E3	CMV tipo G2*; cercanía a T5i	0,600 (0,173)	0,302 (0,083)
Wi_Control_1	Sin CMV, sector suroeste	0,027 (0,018)	0,007 (0,012)
Wi_Control_2	Sin CMV, sector noreste	0,024 (0,021)	0,007 (0,012)

* Grado aproximado según escala DVS (Fig. 5).

Al igual que en todos los centros muestreados, la asignación JAUXCJ01 sp026993485 fue la más frecuente dentro de la familia Beggiatoaceae (Tabla 24), con una distribución relativamente homogénea que alcanzó frecuencias de 92% y 90% en Wi_E1c y Wi_E3, y de 76% y 81% en Wi_E1a y Wi_E1b. La secuencia V3-V4 mayoritaria mostró 100% de identidad con *Ca. Isobeggiatoa*, detectada en todos los centros analizados en este estudio, incluidos Córdova 3 y 4 (Aranda y col. 2026) y Calbuco y Pichicolo en la Región de Los Lagos (Aranda y col. 2010, 2015), lo que refuerza su amplia distribución en sedimentos bajo centros de cultivo de salmónidos en la Patagonia chilena.

Tabla 24. Abundancia relativa (%) ASVs *Ca. Isobeggiatoa* centro Williams.

Punto	Descripción	Muestra directa Prom (DE)	Muestra enriquecida Prom (DE)
Wi_E1a	CMV tipo G1, cercanía a T8f	0 (0)	0,069 (0,030)
Wi_E1b	CMV tipo G1, cercanía a T8f	0,073 (0,064)	0,376 (0,237)
Wi_E1c	CMV tipo G2, cercanía a T8f	0,078 (0,067)	0,613 (0,210)
Wi_E3	CMV tipo G2; cercanía a T5i	0,542 (0,194)	0,251 (0,068)
Wi_Control_1	Sin CMV, sector suroeste	0,011 (0,010)	0 (0)
Wi_Control_2	Sin CMV, sector noreste	0,004 (0,008)	0 (0)

Como se esperaba, esta asignación mostró un incremento marcado en la mayoría de las muestras con CMV enriquecidas. Sin embargo, no presentó aumento en la muestra Wi_E3, lo que coincide con el patrón ya descrito para toda la familia y probablemente refleja una anomalía experimental no registrada durante este muestreo y procesamiento.

Dentro de las asignaciones minoritarias para la familia, aparece JADGDF01 p016745055 (Tabla 25). El resultado de las muestras enriquecidas fue heterogéneo, lo que sugiere la presencia de variables no controladas durante el proceso. La única secuencia V3-V4 de ASV detectada no pudo afiliarse a ninguna secuencia conocida, siendo las más cercanas las registradas con un 93% de identidad (NCBI Blast).

Tabla 25. Abund. relativa (%) ASVs JADGDF01 sp016745055 centro Williams.

Se excluyen de la tabla las estaciones que no presentaron detección de esta especie.

Punto	Descripción	Muestra directa Prom (DE)	Muestra enriquecida Prom (DE)
Wi_E1b	CMV tipo G1, cercanía a T8f	0,004 (0,004)	0,091 (0,049)
Wi_E1c	CMV tipo G2, cercanía a T8f	0,004 (0,008)	0,004 (0,008)
Wi_E3	CMV tipo G2; cercanía a T5i	0,004 (0,008)	0,007 (0,007)

Aparece también Beggiatoaceae DRQV01 sp030378105, principalmente en sitio Wi_E3 y sin incrementar en la respectiva muestra enriquecida. Las 4 ASVs contienen secuencias V3-V4 con más de 98% de identidad respecto a diversas secuencias de *Candidatus Halobeggiatoa* (Grunke y col. 2012).

Tabla 26. Abund. relativa (%) ASVs Ca. Holobeggiatoa centro Williams.

Se excluyen de la tabla las estaciones que no presentaron detección de esta especie.

Punto	Descripción	Muestra directa Prom (DE)	Muestra enriquecida Prom (DE)
Wi_E1a	CMV tipo G1, cercanía a T8f	0 (0)	0,004 (0,008)
Wi_E1b	CMV tipo G1, cercanía a T8f	0,007 (0,012)	0,018 (0,014)
Wi_E3	CMV tipo G2; cercanía a T5i	0,053 (0,020)	0,044 (0,010)
Wi_Control_1	Sin CMV, sector suroeste	0,007 (0,007)	0 (0)

Se detectó también la posible presencia de *Thiomargarita* sp. (Tabla 27), aunque no fue posible visualizarla mediante el examen microscópico. El análisis de las secuencias mostró solo un 96% de identidad con la secuencia del ASV mayoritario detectado en el centro Tangbac, y las secuencias nucleotídicas más cercanas se corresponden mejor con formas filamentosas de Beggiatoaceae. En consecuencia, la detección de *Thiomargarita* sp. en el centro Williams se considera probablemente un artefacto del protocolo, el cual, de hecho, arrojó un bajo nivel de confianza para esta asignación (0,53 - 0,60).

Tabla 27. Abund. relativa (%) ASVs *Thiomargarita* sp. (dudoso) centro Williams.

Se excluyen de la tabla las estaciones que no presentaron esta detección.

Punto	Descripción	Muestra directa Prom (DE)	Muestra enriquecida Prom (DE)
Wi_E1b	CMV tipo G1, cercanía a T8f	0,007 (0,007)	0,036 (0,037)
Wi_Control_1	Sin CMV, sector suroeste	0,004 (0,008)	0 (0)
Wi_Control_2	Sin CMV, sector noreste	0,020 (0,018)	0,002 (0,004)

Finalmente, de forma minoritaria se detectó *Ca. Venteria ishoei*, principalmente en las muestras con CMV enriquecidas (Tabla 28).

Tabla 28. Abund. relativa (%) ASVs *Ca. Venteria ishoei* centro Williams.

Se excluyen de la tabla las estaciones que no presentaron esta detección.

Punto	Descripción	Muestra directa Prom (DE)	Muestra enriquecida Prom (DE)
Wi_E1a	CMV tipo G1, cercanía a T8f	0 (0)	0,009 (0,010)
Wi_E1b	CMV tipo G1, cercanía a T8f	0 (0)	0,004 (0,004)
Wi_E1c	CMV tipo G2, cercanía a T8f	0,002 (0,004)	0,007 (0,007)
Wi_Control_1	Sin CMV, sector suroeste	0,004 (0,008)	0 (0)

5.6. Eficacia del procedimiento de metabarcoding

Las pruebas de terreno se orientaron a evaluar el protocolo consolidado desarrollado en el OE1, considerando la eficacia del muestreo con ROV, la estrategia de procesamiento en terreno y la capacidad de detección de ASVs de bacterias GSOB. Esta evaluación se complementó con la observación microscópica de las muestras y con el análisis de los registros de video del ROV para detección de cubierta de microorganismos visibles (CMV).

Se comparó el protocolo estándar del OE1 con una variante que incorporó etapas de enriquecimiento selectivo de GSOB con capacidades migratorias por quimiotactismo (sensibilidad a oxígeno y sulfuro), evaluadas en paralelo mediante microscopía óptica y revisión de videos de inspección asociados a la toma de muestras. Estas comparaciones permitieron evaluar el desempeño del protocolo consolidado e identificar la necesidad de ajustes orientados a maximizar la detección de Beggiatoaceae en la caracterización de CMV en sedimentos de sitios categoría 4 bajo influencia de acuicultura intensiva.

Al integrar los resultados del metabarcoding, basados en abundancias relativas de Beggiatoaceae, con la información de INFA según la normativa vigente, se identificaron varias tendencias relevantes que se exponen a continuación.

En los tres centros estudiados (Tangbac, Isla Guzmán y Williams) se indicó condición anaeróbica para zonas categoría 4, evidenciadas por la presencia de CMV en todas las transectas. En ninguno de estos centros se registraron valores de oxígeno disuelto a un metro del fondo inferiores al umbral normativo de 2,5 mg/L.

El ROV DTG3 Deep Trekker, equipado con cámara HD y un grabber acoplado a un muestreador de sedimentos de doble valva, se desempeñó adecuadamente como herramienta de apoyo para la toma de muestras y el registro visual en fondos con CMV en centros salmonicultores de categoría 4. Su uso permitió dirigir el muestreo de sedimentos con videos submarinos parcialmente georreferenciados y de buena calidad, útiles para evaluar la cobertura de CMV y las características del sustrato en torno a las jaulas. El ROV operó de manera satisfactoria bajo las condiciones de profundidad y corrientes de los centros, facilitando el acceso a puntos cercanos a las estructuras y a las transectas definidas para INFA, con maniobrabilidad suficiente para mantener la estabilidad de la cámara y la posición. Su utilidad como plataforma de observación remota radicó en mejorar la trazabilidad entre los puntos de muestreo para análisis genético y los registros visuales empleados en la evaluación ambiental tradicional.

Las observaciones microscópicas confirmaron la presencia de tapetes bacterianos densos asociados a Beggiatoaceae en los sedimentos con CMV, con predominio de formas filamentosas y globulares compatibles con bacterias gigantes oxidantes de azufre. Este patrón resulta coherente con una CMV adaptada a condiciones reductoras y enriquecidas en sulfuro.

Para la conservación de las muestras se utilizó la solución estabilizadora de ADN Micro-Safe de Codebreaker Bioscience, que permitió mantenerlas a temperatura ambiente, idealmente bajo 18 °C, sin requerir congelamiento durante el transporte al laboratorio de análisis. Las etapas de metabarcoding se realizaron en las instalaciones de Codebreaker Bioscience, inicialmente en Puerto Varas y posteriormente en Llanquihue, seleccionada por ser la única empresa de la zona que cumplía con los requisitos de capacidad técnica y rapidez de respuesta necesarios para los objetivos del proyecto.

La aplicación del protocolo desarrollado en el OE1 demostró su eficacia para detectar secuencias de la familia Beggiatoaceae en sedimentos de categoría 4 de los distintos centros (Tabla 29). Las abundancias relativas de Beggiatoaceae fueron bajas incluso en sitios con alta cobertura de CMV, lo que sugiere interpretar con cautela los datos de abundancia relativa y resalta la importancia de combinar la información molecular con la observación directa de los tapetes.

El protocolo también entregó una visión detallada de la diversidad de bacterias gigantes oxidantes de azufre (GSOB), cuyas abundancias relativas se mantuvieron bajas incluso en áreas con alta cobertura de CMV. Se ratificó la presencia y predominancia de una misma señal genética correspondiente a *Candidatus* Isobeggiatoa en todos los centros, lo que respalda su amplia distribución como principal formadora de CMV en sitios de cultivo de salmónidos en la Patagonia chilena. Además, se identificaron nuevos linajes dentro de Beggiatoaceae, abarcando tanto formas filamentosas como globulares de bacterias oxidantes de azufre, coherentes con la diversidad descrita para esta familia en otros ambientes marinos ricos en sulfuro.

La estandarización del esfuerzo de secuenciación mediante rarefacción a 15 mil lecturas por muestra permitió homogenizar las comparaciones entre centros y campañas, aunque implicó la pérdida de parte de la profundidad de secuenciación disponible en algunas muestras. Esto podría haber limitado la detección de linajes de muy baja abundancia dentro de Beggiatoaceae, lo que refuerza la necesidad de considerar este sesgo en la interpretación de los resultados.

Por otro lado, los resultados moleculares y los registros microscópicos confirman que las CMV observadas por ROV corresponden consistentemente a mantos de bacterias gigantes oxidadoras de azufre de la familia Beggiatoaceae, lo que otorga alta fiabilidad al método visual como indicador de condición anaeróbica.

La evaluación preliminar del enfoque de metabarcoding V3-V4, basada en la metodología definida en el OE1, evidencia una buena eficacia *in situ* y lo posiciona como un método aplicable y prometedor para detectar, comparar y, en cierta medida, caracterizar la diversidad de Beggiatoaceae en sedimentos con CMV de centros de categoría 4. Se reafirma también la preferencia por el uso de metabarcoding frente a la metagenómica, que en promedio resultaría unas cuatro veces más costosa cuando se busca alcanzar una cobertura equivalente, especialmente debido a la alta proporción de ADN de metazoos en los sedimentos (como oligoquetos, anélidos u ostrácodos) que

puede diluir la señal de bacterias con baja abundancia relativa de ADN (GSOB de la familia Beggiatoaceae) dificultando su detección como indicadores específicos. No obstante, se recomienda que futuros muestreos de investigación complementen el metabarcoding con análisis metagenómicos, permitiendo profundizar en la comprensión de la ecología y las funciones de las bacterias formadoras de CMV y de otras bacterias clave presentes en estos ambientes.

Tabla 29. Consolidado de abund. rel. (%) ASV familia Beggiatoaceae.

Datos de los centros Tangbac, Isla Guzmán y Williams, tomados de las tablas 9, 16 y 23. El grado de CMV es aproximado y se asignó por estimación visual durante la toma de muestras, procurando ajustar lo más posible al criterio cuali-cuantitativo utilizado por la empresa DVS Tecnologías (Fig. 5).

Punto	Grado aprox. CMV. Escala DVS	Muestra directa Prom (DE)	Muestra enriquecida Prom (DE)
Ta_E1	G2	0,173 *(n=1)	0,133 (0,042)
Ta_E3	G2	0,029 (0,017)	0,024 (0,019)
Ta_Control_1	G0	0,027 (0,012)	0,009 (0,008)
Ta_Control_2	G0	0 (0)	ND
Gu_E1	G3	0,144 (0,080)	0,176 (0,014)
Gu_E2	G3	0,209 (0,021)	1,224 (0,169)
Gu_E3	G4	0,116 (0,067)	0,620 (0,201)
Gu_Control_1	G0	0,004 (0,008)	0,004 (0,008)
Gu_Control_2	G0	0,013 (0,018)	0,011 (0,010)
Wi_E1a	G1	0 (0)	0,082 (0,034)
Wi_E1b	G1	0,096 (0,073)	0,529 (0,307)
Wi_E1c	G2	0,084 (0,071)	0,624 (0,206)
Wi_E3	G2	0,600 (0,173)	0,302 (0,083)
Wi_Control_1	G0	0,027 (0,018)	0,007 (0,012)
Wi_Control_2	G0	0,024 (0,021)	0,007 (0,012)

5.7. Análisis de sensibilidad y aproximación para un umbral de aceptabilidad

5.7.1. INFA actual

Según la normativa vigente (R.E. 3612-2009 y sus modificaciones), en sitios categoría 4 (sustrato duro o semiduro, ≤ 60 m) la INFA debe incluir plano batimétrico, correntimetría, registro visual de transectas y mediciones de oxígeno disuelto a 1 m del fondo en las estaciones definidas. En esta categoría, las variables que se consideran para el límite de aceptabilidad son el registro visual de transectas (ausencia de cubiertas de microorganismos visibles y/o burbujas de gas) y el oxígeno disuelto a 1 m del fondo, con valores iguales o superiores a 2,5 mg/L.

Según el artículo 31 de la Resolución Exenta N.º 3612, en la evaluación INFA se considera que existe condición anaeróbica cuando se incumple el límite de aceptabilidad de cualquiera de las variables en tres de las ocho estaciones de muestreo (equivalente al 30% de las estaciones, según la misma normativa). En los sitios categoría 4, la detección de CMV en tres de las ocho transectas definidas ya determina una condición anaeróbica. Este criterio se aplica junto con el de oxígeno disuelto, y, en la práctica, si en un $\geq 30\%$ de las estaciones bajo los módulos se observa CMV y/o el oxígeno a 1 m del fondo está por debajo del límite de aceptabilidad, el centro se clasifica como anaeróbico para efectos de la INFA.

En los sitios categoría 4, la variable CMV se reconoce como un indicador visual simple y robusto de sedimentos marinos impactados bajo centros de cultivo intensivo de salmónidos. Su uso se fundamenta en la biología de las bacterias oxidantes de azufre y en la experiencia acumulada en los monitoreos realizados en los fiordos del sur de Chile. Cabe señalar que, según la legislación vigente, no se distinguen grados de cobertura o densidad de CMV, sino que se la considera una señal binaria de presencia o ausencia, equivalente a la etapa final del modelo de sucesión bentónica asociado al enriquecimiento orgánico y a la consecuente anaerobiosis descrito por Pearson y Rosenberg en 1978.

Los tres sitios categoría 4 analizados en este estudio (Tangbac, Isla Guzmán y Williams) presentaron CMV en las ocho transectas registradas en sus INFAs, mientras que los dos centros analizados previamente (Córdova 4 y Córdova 5) mostraron CMV en tres o más transectas. En ningún caso se registraron valores de oxígeno disuelto a 1 m del fondo por debajo del límite normativo.

5.7.2. Metabarcoding

La CMV medida por metabarcoding se expresa como la abundancia relativa de ASVs correspondientes a bacterias de la familia Beggiatoaceae, constituyendo una variable continua que debe correlacionarse con el criterio binario tradicional basado en la presencia o ausencia de CMV en las transectas. Para establecer esta correspondencia,

es necesario definir un valor umbral de discriminación del metabarcoding que minimice la probabilidad de asignar condición anaeróbica a un sitio que no lo es (falso positivo) o de asignar la condición aeróbica a un sitio que, según la normativa vigente, ha sido indicado como anaeróbico (falso negativo).

Este umbral debe permitir detectar correctamente todas las muestras anaeróbicas (criterio de sensibilidad) y todas las muestras aeróbicas (criterio de especificidad). Dado que todos los centros analizados mostraron condición anaeróbica en sus respectivas INFAs, evidenciada por la presencia de CMV en todas las transectas, y que las muestras se agrupan claramente entre aquellas con CMV y las muestras control sin CMV, se espera que el umbral definido discrimine adecuadamente entre ambos grupos.

Como se ha indicado reiteradamente, los datos de abundancia relativa de ASVs de bacterias de la familia Beggiatoaceae utilizados en este estudio proceden tanto de sitios donde se constató CMV (sitios anaeróbicos según la normativa) como de sitios control aledaños sin CMV visible. En cada sitio se obtuvieron valores por triplicado a partir de muestras directas (protocolo consolidado desarrollado en OE1) y de una variante que incorporó un enriquecimiento selectivo de bacterias móviles formadoras de CMV. Adicionalmente, en cada muestra se registró el grado aproximado de cobertura de CMV (Aranda y col. 2026), asignado mediante estimación visual a partir de registros de video con ROV durante la toma de muestra, con categorías desde G1 hasta G4, y G0 para los puntos control sin CMV (Tabla 29).

Al segregar los valores de abundancia relativa de ASVs de Beggiatoaceae en las muestras directas según el grado de cobertura de CMV en cada sitio, se observa un aumento progresivo desde valores de mediana cercanos a 0% en G0 (sitios control) hasta una mediana aproximada de 0,2% en G3 (Fig. 12). Este patrón coincide estrechamente con el descrito previamente para *Ca. Isobeggiatoa* en Estero Córdova, con la única diferencia de que en este caso no se registran señales anómalas en las muestras de control observadas anteriormente (Fig. 8), lo que refuerza la consistencia de este indicador.

La matriz experimental evaluó la sensibilidad del protocolo de metabarcoding Illumina V3-V4, con rarefacción a 15 mil lecturas por muestra, para detectar ASVs de GSOB en sedimentos de categoría 4 y determinar si el enriquecimiento selectivo de filamentos migratorios de Beggiatoaceae mejora la señal molecular asociada a CMV. Los resultados muestran que dicho enriquecimiento, aplicado en Tangbac, Isla Guzmán y Williams para aumentar la señal relativa de GSOB en el gradiente redox, es poco útil e innecesario en el contexto de indicadores de gestión ambiental, ya que solo generó diferencias significativas en los grados 3 y 4 de CMV, mientras que en G0, G1 y G2 no hubo variaciones significativas, configurando un patrón heterogéneo (Fig. 12), además de introducir fuentes adicionales de error y variabilidad que limitan su aplicación rutinaria.

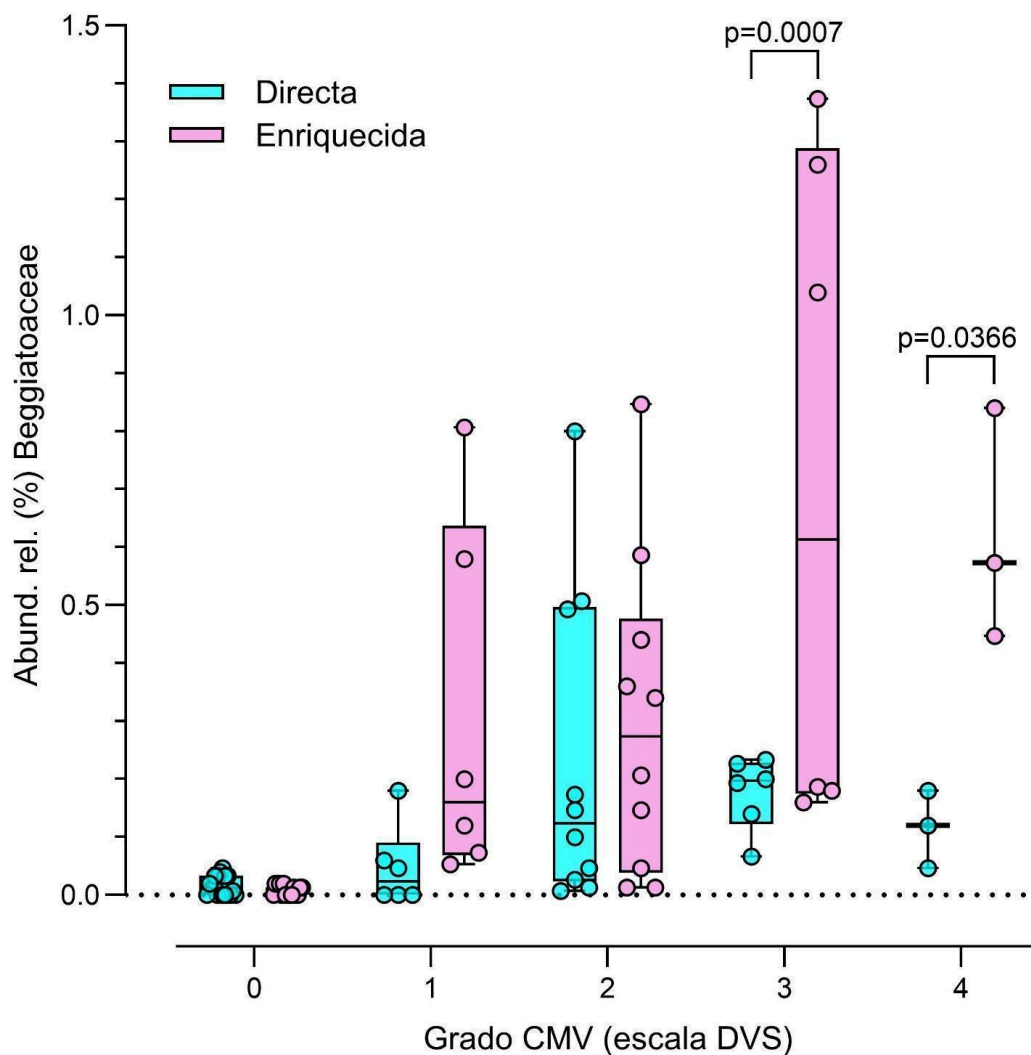


Figura 12. Gráfico de cajas de abundancia relativa para Beggiatoaceae.

Datos consolidados de los centros Tangbac, Isla Guzmán y Williams, segregados según el grado aproximado de CMV (desde G0 o control, hasta G4, correspondiente a parches más consolidados pero aún dispersos). Cada caja muestra el valor mínimo, el primer cuartil (Q1), la mediana (Q2), el tercer cuartil (Q3) y el valor máximo. Los datos utilizados se incluyen en los anexos (Carpeta 11). Las diferencias entre muestras directas y muestras enriquecidas se evaluaron mediante un ANOVA de dos vías, seguido de comparaciones múltiples con corrección de Sidak (GraphPad Prism v10.6.1), considerándose estadísticamente significativas cuando $p < 0.05$.

A diferencia de lo asumido preliminarmente a partir de trabajos previos, el metabarcoding V3-V4 con rarefacción a 15 mil lecturas sí permitió detectar ASVs de Beggiatoaceae, aunque con abundancias relativas bajas, generalmente inferiores a 0,5%, en muestras con CMV evidente. Esto sugiere de manera preliminar una buena aptitud como indicador de presencia o ausencia, sin requerir un enriquecimiento previo. Por otra parte, no se considera recomendable aumentar la rarefacción a 30 mil o 50 mil lecturas por librería, ya que ello elevaría el riesgo de excluir librerías con menor profundidad de lectura, la cual a su vez se encuentra limitada por la homogeneidad de carga de ADN en plataformas Illumina NextSeq 1000 o superiores.

En contraste, las muestras sin CMV utilizadas como controles también presentaron detecciones de ASVs de Beggiatoaceae, pero con abundancias relativas muy cercanas a cero y sistemáticamente inferiores a las de las muestras con CMV. En los centros Tangbac, Isla Guzmán y Williams no se repitió la detección molecular anómala descrita previamente en zonas sin CMV del Estero Córdova, ilustrada en la Figura 8, aunque las señales observadas en los controles se mantuvieron en niveles bajos pero detectables, es decir, distintos de cero. Esta situación refuerza la necesidad de definir un umbral de abundancia relativa distinto de cero para la familia Beggiatoaceae, con el fin de reducir la probabilidad de falsos positivos que puedan interpretarse erróneamente como evidencia de condiciones anaeróbicas en el lecho marino.

Establecer un umbral de discriminación distinto de cero para las detecciones de ASVs de la familia Beggiatoaceae es esencial para evitar falsos positivos que puedan interpretarse como evidencia de condición anaeróbica en el lecho marino.

Basándose en la prueba de D'Agostino y Pearson, se determinó que los datos de abundancia relativa de ASVs de Beggiatoaceae en las muestras sin CMV presentan una distribución normal ($p = 0,12$). A partir de este resultado, se calculó el promedio y la desviación estándar (σ), y luego el puntaje z correspondiente a dos desviaciones estándar (2σ), que indica cuán lejos del promedio se sitúa un valor dentro de una distribución normal. En términos prácticos, alrededor del 95% de los valores esperados en muestras sin CMV se encuentran por debajo del promedio más 2σ . En este caso, ese valor corresponde a un 0.05% de abundancia relativa de ASVs de Beggiatoaceae (Fig. 13), que se propone como umbral de discriminación, valor por sobre el cual las muestras se considerarían como indicadores de condición anaeróbica del lecho marino.

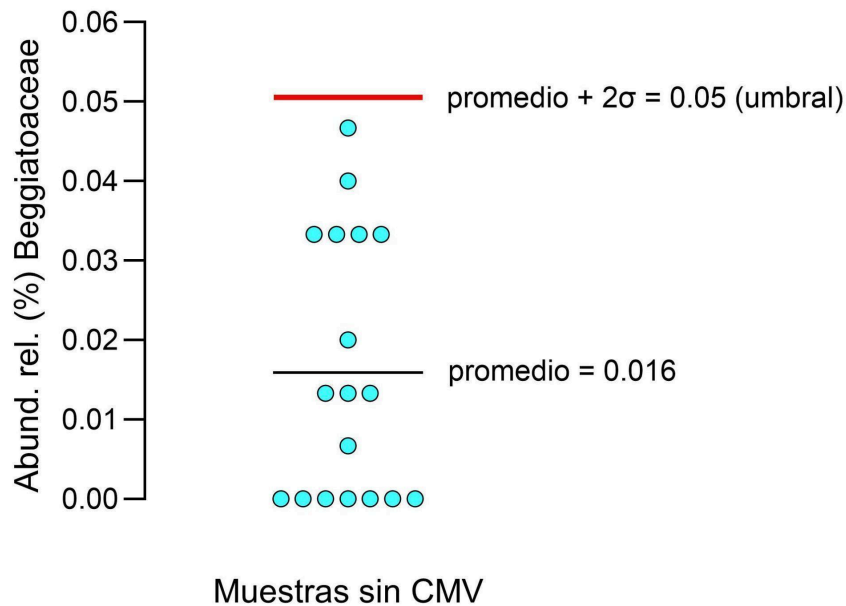


Figura 13. Cálculo de umbral de discriminación de anaerobiosis por metabarcoding.

Datos de abundancia relativa de Beggiatoaceae en muestras control sin CMV, obtenidas de los centros Tangbac, Isla Guzmán y Williams, todas sin enriquecimiento (muestras directas). Se presenta el valor promedio y el valor obtenido al sumar dos desviaciones estándar, que corresponde al umbral de discriminación propuesto.

La Tabla 30 presenta los resultados de los criterios de aerobiosis y anaerobiosis obtenidos mediante la inspección visual de CMV (videos) y el análisis de metabarcoding, utilizando un umbral de discriminación de 0,05% de abundancia relativa para las ASVs de Beggiatoaceae. El método de metabarcoding alcanzó una sensibilidad del 78% respecto de la inspección visual, ya que dos de las nueve muestras (Ta_E3 y Wi_E1a) presentaron un valor promedio (n=3 por muestra) inferior al umbral establecido. La especificidad fue del 100%, dado que las seis muestras control sin CMV según la inspección visual fueron clasificadas como aeróbicas por el metabarcoding. Este resultado se considera desfavorable para una eventual recomendación del método de metabarcoding dirigido a bacterias formadoras de CMV, ya que el método basado en ADN mostró una sensibilidad menor que la inspección visual. No obstante, se estima necesario validar estos resultados mediante una línea de base más amplia en zonas no impactadas.

Tabla 30. Comparación del criterio de inspección visual vs. el criterio metabarcoding.

Datos mostrados en Tabla 19, con adición de criterio de aerobiosis o anaerobiosis según criterios de inspección visual y metabarcoding con umbral de 0,05% de abundancia relativa para ASV familia Beggiatoaceae.

Muestra directa	Grado aprox. CMV. Escala DVS	Criterio según inspección visual	Prom. abund. rel. Beggiatoaceae.	Criterio según metabarcoding (umbral 0,05%)
Ta_E1	G2	Anaeróbica	0,17%	Anaeróbica
Ta_E3	G2	Anaeróbica	0,029%	Aeróbica
Ta_Control_1	G0	Aeróbica	0,027%	Aeróbica
Ta_Control_2	G0	Aeróbica	0%	Aeróbica
Gu_E1	G3	Anaeróbica	0,14%	Anaeróbica
Gu_E2	G3	Anaeróbica	0,21%	Anaeróbica
Gu_E3	G4	Anaeróbica	0,12%	Anaeróbica
Gu_Control_1	G0	Aeróbica	0,004%	Aeróbica
Gu_Control_2	G0	Aeróbica	0,013%	Aeróbica
Wi_E1a	G1	Anaeróbica	0%	Aeróbica
Wi_E1b	G1	Anaeróbica	0,096%	Anaeróbica
Wi_E1c	G2	Anaeróbica	0,084%	Anaeróbica
Wi_E3	G2	Anaeróbica	0,60%	Anaeróbica
Wi_Control_1	G0	Aeróbica	0,027%	Aeróbica
Wi_Control_2	G0	Aeróbica	0,024%	Aeróbica

Si se considera un umbral de discriminación más bajo con el fin de incrementar la sensibilidad, por ejemplo aplicando una desviación estándar por sobre el promedio de las abundancias relativas de ASVs de Beggiatoaceae en muestras sin CMV ($\approx 0,03\%$), el resultado final no cambia, ya que los valores promedio de Ta_E3 y Wi_E1a se mantienen por debajo de este nuevo umbral de discriminación. Tampoco se modifica la especificidad observada a nivel de promedios por muestra, debido a que las seis muestras control continúan ubicándose por debajo del nuevo umbral de discriminación. Sin embargo, al analizar los datos individuales de las réplicas de las muestras control, 12 valores quedarían bajo el nuevo umbral de discriminación y otros 6 lo superarían (Fig. 13), lo que sugiere un mayor riesgo de indicar anaerobiosis por metabarcoding en muestras sin impacto.

Se propone para el metabarcoding un umbral de 0,05% de abundancia relativa para Beggiatoaceae (equivalente a un promedio de 7,5 lecturas en 15 mil, con $n = 3$), sujeto a revisión continua y a validación con una línea de base más amplia en áreas sin impacto detectable.

Con este umbral se obtiene una sensibilidad inferior a la técnica de inspección visual, pero con una alta especificidad.

Un factor limitante del metabarcoding es la alta dispersión de los datos, que vuelve crítica la definición y aplicación de un umbral de discriminación, ya que la pérdida de una librería en una muestra recolectada por ROV puede generar desviaciones importantes en los promedios. Además, como se desprende del análisis que considera el grado de cobertura aparente de CMV (Fig. 12), la selección de una muestra representativa de la condición observada en una transecta requiere conocer el estado de presencia de CMV a lo largo de todo el recorrido y no solo en un punto aislado.

Por esta razón, se recomienda que la aplicación operativa de un eventual umbral de metabarcoding se realice en muestras representativas de la condición de la transecta y que dicho umbral se supere en al menos 3 de las 8 transectas de INFA. Considerar más de un punto de muestreo por transecta incrementaría de forma marcada los requerimientos analíticos. En consecuencia, para definir molecularmente la condición anaeróbica del lecho marino, se estima necesario seleccionar al menos un punto de muestreo representativo por transecta, mantener el análisis en todas las transectas definidas para INFA y procesar cada muestra por triplicado.

De manera consistente con el criterio visual normativo, se recomienda indicar condición anaeróbica cuando el valor del umbral de discriminación por metabarcoding sea superado al menos en tres transectas por concesión, lo que asegura compatibilidad con el enfoque binario de presencia o ausencia actualmente utilizado para la CMV.

Los resultados obtenidos permiten avanzar hacia la definición de un umbral molecular de discriminación de aceptabilidad para Beggiatoaceae, consistente con el criterio visual normativo, aunque todavía de carácter preliminar. En esta etapa se exploraron rangos de abundancia relativa en centros clasificados como anaeróbicos y en muestras no anaeróbicas según la normativa, se evaluó su coherencia con los grados de cobertura de CMV y se propuso un umbral de discriminación a partir de estos patrones. Este umbral debe entenderse como una aproximación operativa basada en la evidencia disponible, que requiere ser refinada y validada mediante análisis cuantitativos

adicionales y la incorporación de series de datos más extensas en distintos centros de cultivo y ambientes no impactados.

5.8. Requerimientos logísticos y factibilidad del metabarcoding

En esta sección se comparan los requerimientos y factibilidad entre el sistema actual de INFA en categoría 4 y el metabarcoding V3-V4, con énfasis en la selección y toma de muestras, el manejo de las muestras, el soporte de laboratorio requerido y la redistribución de tiempos y riesgos entre la campaña en terreno y las etapas de procesamiento molecular y análisis de datos.

Como se desprende de la sección previa (ítem 5.7), la selección de una muestra representativa por transecta es crítica para asegurar la fiabilidad del análisis por metabarcoding, por lo que se debe mantener el uso de ROV al menos como método exploratorio que registre adecuadamente la selección del punto de muestreo, requisito análogo al de la inspección visual actual, en la que el ROV recorre transectas predefinidas y registra videos de alta resolución.

La toma de muestras con ROV en fondos categoría 4 introduce sin embargo requisitos y complejidades adicionales. El ROV debe posicionarse con alta precisión para operar un dispositivo de muestreo de sedimento, lo que exige maniobras más finas, un control más estricto de la posición y tiempos adicionales para la toma y recuperación de muestras, que pueden entrar en conflicto con ventanas operativas restringidas por las corrientes de marea. El muestreo en sustrato rocoso queda así condicionado por el régimen local de corrientes y por las condiciones hidrodinámicas y logísticas de cada centro (disponibilidad y tipo de embarcación, posibilidad real de alejarse de los módulos, condiciones ambientales dominantes y opciones de fondeo), lo que dificulta establecer procedimientos específicos completamente estandarizados. Estas restricciones se observaron en el presente estudio, donde la operación del ROV se vio limitada incluso durante los periodos de estoa y por la disponibilidad de embarcaciones, reduciendo las ventanas de operación y el tiempo útil de colecta.

El ROV debe estar equipado con un dispositivo de recolección operativo, cuyas valvas requieren un cierre hermético, y cuya funcionalidad se verifique en cada actividad de muestreo. Esto es importante porque el cierre del muestreador se puede descalibrar durante las manipulaciones y las operaciones de limpieza destinadas a reducir el riesgo de contaminación cruzada.

Por otra parte, los muestreos de este estudio se realizaron en zonas aledañas a módulos sin mallas de cultivo ni loberas, lo que en algunos casos permitió trabajar directamente desde los pasillos de los módulos. Sin embargo, en un escenario de muestreo rutinario bajo la normativa vigente, que exige muestrear en condición de máximo impacto (generalmente previo a la cosecha), la operación del ROV sería más dependiente del uso de embarcaciones para evitar interferir con mallas de peces y

loberas, incrementando la complejidad logística de la toma de muestras para el metabarcoding.

Como control negativo se considera recomendable incluir muestras alejadas de la influencia del centro, de forma similar a los sitios control de este estudio, aun cuando ello puede afectar la factibilidad cuando las condiciones operacionales del centro son limitantes.

En relación con el procesamiento de muestras, por cada muestra ROV se requiere la recolección de tres réplicas de sedimento para análisis de ADN, el uso de insumos estériles, la estabilización inmediata del ADN y su transporte al laboratorio, lo que aumenta la complejidad logística y las exigencias de trazabilidad entre campo y laboratorio. El metabarcoding demanda laboratorios equipados para la extracción de ADN desde sedimentos, la amplificación de la región V3-V4, la secuenciación masiva y el análisis bioinformático, además de infraestructura computacional y procedimientos sistemáticos de control de calidad. El esquema actual de inspección visual de CMV demanda principalmente capacidades para la gestión y análisis de datos de video (clasificación, anotación y almacenamiento), junto con el análisis de las series CTDO, y no requiere infraestructura de laboratorio molecular. En contraste, el esquema con metabarcoding implica recurso humano especializado para la toma y procesamiento de muestras adicional al operador de ROV, así como personal dedicado al manejo de grandes volúmenes de datos genéticos y a la interpretación de resultados moleculares, dependiente de bases de datos taxonómicas en constante actualización, cuyos cambios pueden modificar la clasificación de géneros y especies de interés. Mantener la trazabilidad y la coherencia de los análisis históricos exige personal capacitado en bioinformática, infraestructura computacional adecuada, documentación técnica actualizada y procedimientos sistemáticos para revisar y ajustar los resultados cuando se produzcan revisiones taxonómicas relevantes.

En cuanto a la distribución de tiempos y riesgos, en el esquema basado en video-ROV para sitios categoría 4 la mayor proporción del esfuerzo se concentra en la campaña de terreno, especialmente en la navegación, el registro de video y la posterior revisión e interpretación experta, con riesgos operativos dominados por las condiciones meteorológicas y oceanográficas, la visibilidad submarina y el correcto funcionamiento del equipo. En el enfoque que incorpora metabarcoding, el tiempo operativo por estación aumenta debido a las maniobras de muestreo y preservación de sedimento, y una fracción relevante del esfuerzo se traslada al laboratorio, donde se concentran las etapas críticas de procesamiento y análisis. Este esquema añade riesgos adicionales asociados a la integridad de las muestras, la posibilidad de contaminación, los errores de rotulación y el manejo a lo largo de la cadena de custodia, así como la necesidad de asegurar la calidad de réplicas y controles para garantizar robustez estadística y confiabilidad en la clasificación de la condición bentónica.

En conjunto, el metabarcoding se reconoce como una alternativa viable al esquema actual, pero su adopción requiere reconocer y gestionar explícitamente sus complejidades logísticas, operacionales y analíticas. Estas incluyen un uso más

demandante del ROV para muestreos representativos, mayores exigencias de trazabilidad y control de calidad de las muestras, y la necesidad de contar con capacidades de laboratorio molecular y bioinformática robustas que considere los lineamientos definidos en el protocolo consolidado propuesto.

El metabarcoding en sitios categoría 4 es técnicamente viable, pero exige mayores requerimientos que el esquema visual actual. Requiere un uso más complejo del ROV para muestreo en fondos rocosos, mayor trazabilidad de muestras y capacidades de laboratorio molecular y bioinformática especializadas.

Además, redistribuye el esfuerzo y los riesgos desde la campaña en terreno hacia el laboratorio, aumentando el tiempo por estación y la exposición a fallas en cadena de custodia y contaminación.

5.9. Conclusión de la evaluación de propuesta metodológica (OE2)

El metabarcoding V3-V4 orientado a Beggiatoaceae se perfila como una herramienta técnicamente viable para detectar y caracterizar la cubierta de microorganismos visibles en sitios categoría 4 y permite definir un umbral molecular preliminar coherente con el criterio visual binario actualmente utilizado en la INFA. La aplicación del protocolo consolidado en Estero Córdova y posteriormente en los centros Tangbac, Isla Guzmán y Williams mostró una buena eficacia *in situ* para recuperar señal de Beggiatoaceae en sedimentos con CMV, con resultados consistentes entre campañas y centros. La concordancia entre la señal molecular, las observaciones microscópicas y los registros de video de ROV refuerzan la interpretación de las CMV como mantos de bacterias gigantes oxidantes de azufre y respalda tanto la utilidad del metabarcoding como la alta fiabilidad del indicador visual actualmente normado.

El metabarcoding V3-V4 aporta además información complementaria sobre la diversidad de bacterias gigantes oxidantes de azufre, dejando la certeza, hasta donde los resultados lo confirman, de que su presencia se debe al aporte orgánico de los centros de cultivo.

No obstante, como herramienta de monitoreo dirigida a bacterias formadoras de CMV se evidencian limitaciones relevantes, entre ellas una sensibilidad inferior a la de la inspección visual, una alta dispersión en las abundancias relativas de Beggiatoaceae y una fuerte dependencia de una logística más exigente de muestreo con ROV, de una trazabilidad estricta de las muestras y de capacidades robustas de laboratorio molecular y bioinformática, incluida la gestión de sesgos asociados a rarefacción y a bases de

datos taxonómicas en actualización. En este contexto, se considera que su eventual incorporación a la normativa sea de carácter inicialmente complementario, apoyada en líneas de base más amplias en sitios impactados y de referencia, en la comparación sistemática con series previas como las obtenidas en Estero Córdova y en los lineamientos técnicos definidos en el protocolo consolidado, de modo de gestionar adecuadamente sus complejidades operacionales, analíticas y de interpretación y asegurar un uso consistente y confiable en la gestión ambiental.

6. Objetivo específico 3: Análisis comparativo con INFA actual

En esta sección se presenta el análisis económico comparado de una eventual implementación del metabarcoding V3-V4, orientado a Beggiaatoaceae como procedimiento normado dentro de la INFA en sitios categoría 4, en relación con el esquema vigente basado en video-ROV. No se analiza ni compara el costo asociado al uso del CTDO incorporado en el procedimiento actual para categoría 4, ya que en este estudio ninguno de los centros presentó INFA anaeróbica determinada por el parámetro de oxígeno disuelto a 1 m del fondo y el enfoque de metabarcoding propuesto en el OE1, y la evaluación efectuada en el OE2, no modifican ni cuestionan su utilización, por lo que, para efectos de evaluación económica, su contribución se considera neutra y se excluye del análisis.

En el esquema actualmente normado para sitios categoría 4, basado en inspección visual mediante video-ROV, la mayor parte del esfuerzo y de los costos se concentra en la campaña de terreno. Esto incluye la planificación y ejecución de la navegación, el uso de embarcaciones, la operación y mantención del ROV y las horas profesionales destinadas a la revisión, clasificación e interpretación experta de los registros de video, además del análisis de las series de oxígeno disuelto y otras variables oceanográficas asociadas. Se trata de un modelo intensivo en terreno, con requerimientos técnicos bien conocidos, procedimientos relativamente estandarizados y una oferta de servicios ya consolidada en el sur de Chile, lo que se traduce en costos moderados y relativamente predecibles por campaña, apoyados en un indicador visual de CMV que ha demostrado alta robustez y trazabilidad en el tiempo.

Según estimaciones reportadas hacia 2020, los costos de un estudio INFA se consideraban muy reducidos, en un rango aproximado entre M\$ 0,8 y M\$ 3,2 según la categoría, valor calificado como escaso o insuficiente frente a la complejidad real del estudio³. Una actualización conservadora de esos montos, usando variaciones de IPC del orden de 4 % anual acumulado hasta enero de 2026, sitúa hoy ese rango en torno a M\$ 1,2 a M\$ 4,5 por INFA, cifra coherente con antecedentes recabados mediante

³ Fuente: Informe Final FIPA 2017-75.

consultas directas a usuarios, que señalan valores de mercado actuales del orden de 4.400 a 6.700 US\$ por INFA categoría 4.

La incorporación de metabarcoding V3-V4 orientado a Beggiatoaceae no reemplaza este esquema ni la estructura de costo para INFA categoría 4, sino que lo complementa añadiendo la capa adicional de costo debido al muestreo. Por una parte, se mantiene la necesidad de operar el ROV para recorrer transectas y registrar video, pero se agregan requisitos adicionales para la toma de sedimento en fondos rocosos, que exigen mayor precisión en el posicionamiento, maniobras más finas y tiempos adicionales de operación, condicionados por ventanas de trabajo restringidas por las corrientes y por la disponibilidad de embarcaciones. Desde el punto de vista de equipamiento, ambos enfoques requieren un ROV con cable de 100 m, carrete, maleta y luces adicionales, con un costo de adquisición en torno a 15 mil US\$ más IVA o bien la opción de arriendo, mientras que el metabarcoding demanda además un sistema de muestreo de sedimentos (grabber y valvas), con un costo adicional cercano a 1.500 US\$ más IVA y mayores exigencias de mantención para asegurar un cierre hermético y minimizar el riesgo de contaminación cruzada, implicando incrementos para su respectivo arriendo. Por este solo concepto se estima un incremento de 500 US\$ en el valor de la INFA categoría 4.

En relación con el procesamiento de muestras, cada punto de muestreo requiere tres réplicas de sedimento, insumos estériles, estabilización inmediata del ADN y transporte al laboratorio bajo condiciones controladas, lo que incrementa la complejidad logística y las exigencias de trazabilidad entre campo y laboratorio. El metabarcoding demanda laboratorios equipados para extracción de ADN, amplificación de la región V3-V4, secuenciación masiva y análisis bioinformático, además de infraestructura computacional y controles sistemáticos de calidad. A diferencia del esquema visual, que se centra en gestión y análisis de video sin requerir laboratorio molecular, el metabarcoding incorpora costos adicionales por personal especializado, insumos, procesamiento de grandes volúmenes de datos genéticos y actualización de bases de datos taxonómicas.

Asumiendo 8 muestras representativas (una por transecta) más 2 muestras control alejadas de los módulos, y 3 réplicas de metabarcoding por muestra, se requiere un mínimo de 30 muestras por centro de cultivo. Con un costo aproximado de 120 US\$ + IVA por muestra⁴. Implicando que el análisis metabarcoding V3-V4 en plataforma Illumina NextSeq 1000 (o superior) suma unos 4.200 US\$ adicionales según el protocolo consolidado propuesto, generando tablas de abundancia relativa de arqueas y bacterias sometidas a rarefacción de 15 mil lecturas por muestra, que permiten reportar las abundancias específicas de GSOB de la familia Beggiatoaceae. A ello se suma un costo adicional por recursos humanos técnicos (aprox. 1 UF/hora), estimado en un mínimo de 60 horas para muestreo y reporte específico según protocolo consolidado propuesto, equivalente a unos 1.200 US\$ en forma muy conservadora.

⁴ Valor de procesamiento en Codebreaker Bioscience.

Respecto de costos indirectos derivados de posibles riesgos, el esquema actual concentra la mayor parte de la incertidumbre en las condiciones meteorológicas y oceanográficas, en la visibilidad submarina y en la confiabilidad del equipamiento, mientras que el principal insumo analítico es la interpretación experta de las imágenes de CMV. El enfoque con metabarcoding introduce, además de estos factores, una serie de puntos críticos asociados a la integridad de las muestras, la correcta rotulación, el transporte y almacenamiento bajo condiciones controladas, la eficiencia de las etapas de extracción y amplificación de ADN y la estabilidad de las capacidades de laboratorio y bioinformática. Fallas en cualquiera de estos eslabones pueden traducirse en pérdida de muestras o en datos no utilizables, con el consiguiente impacto en los costos de reposición, retrasos de campañas o necesidad de repetir muestreos.

En términos conservadores, la implementación del metabarcoding V3-V4 orientado a Beggiaatoaceae implicaría un costo incremental del orden de 5.900 a 6.500 US\$ por INFA categoría 4, sumando equipamiento de muestreo, análisis de laboratorio y recursos humanos especializados. Este rango integra aproximadamente 500 US\$ adicionales por equipamiento y operación de muestreo en fondos duros, cerca de 4.200 US\$ por el procesamiento de unas 30 muestras en plataforma Illumina y en torno de 1.200 a 1.800 US\$ asociados a al menos 60 horas de trabajo técnico y profesional para muestreo, trazabilidad, análisis bioinformático y elaboración de reportes específicos, lo que implica una estimación de incremento entre 1,5 a 2 veces respecto del costo de una INFA tradicional basada en inspección visual.

La incorporación de metabarcoding V3-V4 orientado a Beggiaatoaceae en INFA categoría 4 agrega, según una evaluación conservadora, del orden de 5.900 a 6.500 US\$ por INFA. Esto significa aumentar en aproximadamente 1,5 a 2 veces el costo de una INFA tradicional basada en inspección visual de la CMV.

Sin embargo, este incremento no debe entenderse únicamente como un mayor gasto, sino también como una ganancia en valor informativo. El metabarcoding entrega una señal cuantitativa de Beggiaatoaceae asociable a umbrales moleculares de aceptabilidad y permite caracterizar tanto la composición de Beggiaatoaceae como la totalidad de la comunidad procariota, generando una base de datos disponible para futuros estudios y comparaciones más robustas entre centros, campañas y contextos ambientales, especialmente útil en evaluaciones de desempeño de largo plazo, certificaciones y zonas de alta sensibilidad.

7. Ejecución de taller de expertos

El 16 de diciembre de 2025 se realizó el Taller de Expertas(os) del Proyecto FIPA 2023-15 “Uso de tecnología de detección de material genético (ADN) de microorganismos visibles o mantos blanquecinos en fondos acuáticos categoría 4”.

El taller se desarrolló en modalidad mixta, con participación presencial en las oficinas de la Subsecretaría de Pesca y Acuicultura en Valparaíso y asistencia telemática para quienes no pudieron concurrir de manera presencial. Entre las personas asistentes presenciales se contó, en orden alfabético, con Cristian Acevedo (Jefe de la Unidad Ambiental de la Subsecretaría de Pesca y Acuicultura), Carlos Aranda (ULagos), Daniela Bolbarán (Subpesca, Directora del FIPA), Derie Fuentes (consultor independiente), Carolina Molina (Subpesca), Jorge Valdés (UNAB), Malu Zabando (Subpesca/FIPA) y Gastón Zapata (Robótica Skyring). En modalidad remota participaron Alejandro Barrientos (Subpesca), Kevin Coloma Díaz, Elizabeth Andrea, Alex González (ULagos), Marcelo Gutiérrez (UdeC), Roland Hager (Subpesca), Laura Henríquez Carrera, Juan Ugalde (UNAB), Gastón Vidal (IFOP) y Felipe Tucca (consultor independiente, quien durante la ejecución del proyecto se desempeñó como contraparte en Intesal).

El programa del taller (Anexo 9) se estructuró como una jornada de presentación, discusión técnica y reflexión conjunta en torno al uso de metabarcoding para la detección de CMV en sitios categoría 4. La apertura contempló palabras de bienvenida de la Directora del FIPA, seguidas de una breve ronda de presentación de las y los participantes, con el fin de contextualizar el encuentro y reconocer a los actores clave involucrados.

En la primera parte se desarrolló el marco conceptual del proyecto FIPA 2023-15. Se presentó el historial regulatorio asociado a la mayor incidencia de anaerobiosis en sitios categoría 4, las brechas e incertidumbres ligadas a la detección de CMV mediante inspección visual y los objetivos del estudio. Posteriormente se introdujo la tecnología de detección de ADN, diferenciando metagenómica y metabarcoding, y se expuso con mayor detalle la propuesta metodológica a evaluar para CMV. Esta sección culminó con la presentación de los resultados obtenidos mediante metabarcoding V3-V4 y su respaldo por microscopía en centros de la Patagonia.

Tras una pausa, la segunda parte amplió la mirada hacia otras iniciativas e insumos técnicos asociados al desarrollo de una herramienta de monitoreo ambiental basada en metagenomas bentónicos, en particular el proyecto Fondef IDeA ID23I10402 “*Implementación de tecnología de secuenciación masiva para la caracterización de metagenomas bentónicos como nueva herramienta de monitoreo ambiental en centros de cultivo de salmones*”. Esta instancia permitió establecer paralelos entre los resultados ya publicados por Aranda y col. (2026), los hallazgos de este proyecto FIPA y los del proyecto Fondef expuesto por el Dr. Derie Fuentes, consultor independiente.

Posteriormente se revisaron los desafíos y experiencias en el uso de ROV como plataforma de muestreo de sedimento en la Patagonia, actividad que contó con la

colaboración del empresario Gastón Zapata, de Robótica Skyring, y se presentó luego un análisis comparativo entre el metabarcoding V3-V4 y los métodos actuales de INFA.

La jornada continuó con una ronda de discusión abierta destinada a recoger observaciones y recomendaciones de las y los asistentes, en la cual se destacó el consenso respecto de la complejidad de incorporar técnicas moleculares en la calificación ambiental rutinaria, especialmente cuando su aplicación se orienta a evaluar CMV, un componente que ya se encuentra cubierto por la inspección visual según los resultados presentados. Se consideró entonces que el uso de métodos moleculares resulta más consistente con el desarrollo de otros indicadores microbianos en contextos de evaluación más amplios y/o con fines de investigación.

Finalmente, la jornada culminó con las palabras de cierre del Sr. Cristian Acevedo, Jefe de la Unidad Ambiental de la Subsecretaría de Pesca y Acuicultura, quien resaltó la importancia del estudio, en particular el hecho de que los resultados moleculares y los registros microscópicos confirmaron que las cubiertas de microorganismos visibles observadas por ROV corresponden de manera consistente a mantos de bacterias gigantes oxidadoras de azufre de la familia Beggiatoaceae, lo que respalda la fiabilidad del método visual como indicador de condición anaeróbica. Asimismo, se valoró la oportunidad que ofreció el proyecto para reunir a profesionales y expertos de distintas instituciones, favoreciendo la generación de vínculos que podrían sostener futuros trabajos colaborativos.

8. Taller con empresas participantes

El 30 de abril de 2026 se realizó una jornada de revisión de resultados del estudio con representantes de **Australis Mar, Salmones Blumar, Cermaq Chile e Intesal**. La actividad se desarrolló en modalidad mixta, con participación presencial en las oficinas de SalmonChile-Intesal en Puerto Varas y asistencia telemática de una de las empresas.

Los asistentes manifestaron interés por los resultados y valoraron la oportunidad de contribuir, a través de sus centros, en la evaluación de una propuesta de análisis molecular como indicador de mantos blanquecinos en centros de categoría 4.

La discusión permitió relevar la pertinencia de esta línea de trabajo para el sector acuícola, en particular por su potencial para fortalecer las herramientas de monitoreo ambiental mediante enfoques más objetivos, sensibles y estandarizables. En esta línea, se destacó que la generación de conocimiento aplicado aporta valor estratégico al ajuste del marco regulatorio ambiental, favoreciendo su alineación con los desafíos actuales del sector y apoyando una toma de decisiones más informada.

Finalmente, Intesal asumió el compromiso de incluir presentaciones ampliadas de los resultados del estudio en futuras convocatorias masivas de su Plan de Ciencias, con el fin de fortalecer su difusión y discusión a nivel sectorial.

9. Conclusión general

El proyecto FIPA 2023-15 confirma que, mientras las cubiertas de microorganismos visibles se utilicen como bioindicador binario de presencia o ausencia, la inspección visual mediante video-ROV sigue siendo la herramienta más efectiva, costo-eficiente y estandarizada para evaluar la condición anaeróbica en fondos marinos categoría 4 bajo centros de cultivo de salmónidos en Chile. La experiencia acumulada en Estero Córdova y en los centros Tangbac, Isla Guzmán y Williams muestra que la detección de CMV en transectas definidas entrega una señal robusta y operacionalmente confiable para la clasificación INFA, especialmente cuando se integra con mediciones de oxígeno disuelto y con el criterio normativo vigente.

El desarrollo y aplicación del protocolo de metabarcoding 16S V3-V4 orientado a Beggiatoaceae demostró que la herramienta molecular es técnicamente viable para detectar y caracterizar la diversidad de bacterias gigantes oxidadoras de azufre asociadas a CMV en sitios categoría 4. Los resultados muestran abundancias relativas bajas pero consistentes, con un aumento claro de la señal de Beggiatoaceae desde sitios sin CMV hacia sitios con alta cobertura, y una correspondencia estable entre los datos moleculares, la microscopía y los registros de ROV, lo que refuerza la interpretación de las CMV como mantos de Beggiatoaceae y afines. Esta convergencia entre líneas de evidencia valida la utilidad del metabarcoding como herramienta de apoyo y, al mismo tiempo, respalda la alta fiabilidad del indicador visual.

La evaluación de sensibilidad y especificidad permitió proponer un umbral molecular preliminar de abundancia relativa para ASVs de Beggiatoaceae, coherente con el criterio visual binario, pero también puso de manifiesto limitaciones relevantes, como la menor sensibilidad del método molecular respecto de la inspección visual, la alta dispersión de los datos, la necesidad de controlar sesgos propios del metabarcoding y la importancia crítica de la selección de muestras representativas y de la cadena de custodia. Estos resultados indican que el uso de metabarcoding para decisiones regulatorias requiere validaciones adicionales en líneas de base ampliadas, tanto en áreas impactadas como en sitios de referencia, y un afinamiento continuo de umbrales y procedimientos.

Desde la perspectiva logística y económica, el proyecto muestra que el enfoque visual con video-ROV concentra la mayor parte del esfuerzo en la campaña de terreno, con requerimientos técnicos bien establecidos, costos moderados y predecibles y un perfil de riesgo operacional principalmente asociado a condiciones meteorológicas, oceanográficas y de equipo. El metabarcoding, en cambio, no sustituye estos requerimientos, sino que añade una capa adicional de complejidad, tiempo y costos, asociada a maniobras de muestreo más exigentes con ROV, al manejo y trazabilidad de muestras y a la necesidad de contar con capacidades estables de laboratorio molecular y bioinformática. En la práctica, esto hace que el uso rutinario del metabarcoding en la INFA actual resulte menos costo-eficiente que la inspección visual para el solo fin de decidir sobre la presencia o ausencia de CMV.

Desde la perspectiva técnico-científica, este proyecto contribuye a caracterizar la microbiota asociada a CMV en distintos grados y tipos de fondos marinos de categoría 4 y entrega una base empírica para mejorar la correlación entre este indicador visual, el modelo de sucesión bentónica y los factores que definen el continuo aerobiosis-anaerobiosis. Cobran especial importancia los estudios de línea de base en áreas libres de impacto y la evaluación de la sensibilidad del indicador en diferentes rangos de temperatura y sustrato, con el objetivo de normalizar y robustecer el uso del indicador y avanzar hacia ajustes normativos sustentados en evidencia local, en paralelo con una integración gradual de herramientas de metabarcoding y metagenómica que permitan comprender mejor los procesos ecológicos, microbiológicos y biogeoquímicos que controlan la respuesta del ecosistema patagónico a la acuicultura intensiva.

En conjunto, el proyecto concluye que el metabarcoding V3-V4 orientado a Beggiatoaceae es una herramienta madura y técnicamente sólida para la caracterización microbiana y la investigación aplicada, y que tiene un alto potencial como complemento de la INFA en sitios categoría 4, pero que aún no presenta ventajas suficientes para reemplazar al método visual en su rol central de bioindicador normativo. Su incorporación futura a la regulación debiera plantearse de manera gradual y complementaria, focalizada en contextos donde el valor agregado de la información molecular sea significativo, y siempre apoyada en lineamientos técnicos claros que garanticen trazabilidad, comparabilidad y una adecuada interpretación ecológica de los resultados.

10. Proyecciones y desafíos futuros

Los resultados del proyecto permiten proyectar varias líneas de acción para fortalecer el monitoreo ambiental en sitios categoría 4. En el corto plazo, se recomienda mantener la inspección visual con video-ROV como método estándar para la clasificación binaria de CMV, pero avanzar hacia esquemas de señal graduada con umbrales de alerta temprana (por ejemplo, escalas tipo “verde-amarillo-rojo” basadas en grados de cobertura y tendencias temporales), a fin de anticipar estados críticos y fomentar decisiones de gestión más preventivas. El aumento observado en la proporción de INFAs anaeróbicas en la Región de Aysén y, especialmente, en Magallanes, asociado al uso de CMV como único parámetro de evaluación en sitios categoría 4, pone de relieve la necesidad de revisar la sensibilidad del indicador visual que no distingue tipos de bacterias, no incorpora gradientes de sensibilidad y no está calibrado frente a factores ambientales (como la temperatura), que pueden alterar la geoquímica vinculada a la aparición de CMV. En este contexto, sería conveniente una revisión normativa que considere grados de cobertura, extensión espacial y contexto ambiental, junto con la eventual incorporación de observaciones de fauna bentónica y bento-pelágica.

Un desafío central identificado es la necesidad de contar con líneas de base ampliadas que incorporen un mayor número de centros y estaciones de referencia no impactadas. Ello permitiría refinar el umbral molecular propuesto, evaluar su estabilidad

entre regiones y condiciones oceanográficas distintas, y cuantificar con mayor precisión la sensibilidad y especificidad tanto de la inspección visual como del enfoque molecular. La implementación de programas piloto colaborativos entre la autoridad, la industria y centros de investigación se perfila como una vía adecuada para explorar combinaciones de monitoreo visual, metabarcoding y, en etapas posteriores, metagenómica funcional. En paralelo, se propone consolidar el uso del metabarcoding V3-V4 complementado con metagenómica, como herramienta de apoyo en investigación, calibración de indicadores y revisión normativa, especialmente en campañas orientadas a comprender la dinámica de Beggiatoaceae y otros grupos microbianos a lo largo de gradientes de impacto, periodos de reposo y fases de recuperación. Para ello será fundamental fortalecer capacidades regionales en laboratorio molecular y bioinformática, armonizar protocolos entre instituciones y asegurar bases de datos taxonómicas actualizadas y trazables.

Finalmente, se puede destacar la oportunidad de integrar avances en automatización del análisis de video, aprendizaje automático aplicado a la detección de CMV y análisis de datos moleculares, con el propósito de construir sistemas de monitoreo más eficientes, reproducibles y transparentes. A mediano plazo, el fortalecimiento de estas sinergias podría habilitar una transición gradual hacia esquemas de gestión que combinen indicadores visuales y moleculares, conservando la simplicidad operativa del método actual, pero respaldando con información de mayor resolución ecológica para decisiones estratégicas y revisiones periódicas de la normativa.

11. Agradecimientos

El equipo del proyecto y la Universidad de Los Lagos agradecen sinceramente a la **Subsecretaría de Pesca y Acuicultura** por la oportunidad brindada y por el apoyo y financiamiento otorgado a través del **Fondo de Investigación Pesquera y de Acuicultura (FIPA)**.

Se extiende un especial reconocimiento a **Intesal** por la confianza depositada desde la etapa de formulación del proyecto y por su constante apoyo en la coordinación de acciones con las empresas participantes. Asimismo, se expresa un agradecimiento a **Australis Mar, Salmones Blumar y Cermaq Chile** por el respaldo entregado durante la ejecución del presente trabajo. Su compromiso activo con la investigación orientada a la actualización, modernización y armonización del marco regulatorio ambiental de la actividad acuícola ha sido fundamental para el éxito de esta iniciativa.

Se agradece la valiosa colaboración de las empresas **DVS Tecnologías, Codebreaker Bioscience y Robótica Skyring**, que aportaron con su experiencia y servicios especializados en distintas etapas del desarrollo del proyecto.

Se agradece también a todos los participantes en el Taller de Expertas(os), incluyendo representantes de la Subsecretaría de Pesca y Acuicultura y FIPA, el Servicio Nacional de Pesca y Acuicultura, el Instituto de Fomento Pesquero, la Universidad Andrés Bello y la Universidad de Concepción, así como también la participación y aporte de expertos independientes.

Finalmente, se agradece el apoyo administrativo de Jovita Flores Grau, profesional clave en coordinación con las distintas unidades de gestión de RRHH, presupuesto y adquisiciones en la Universidad de Los Lagos.



12. Bibliografía

Amir, A., McDonald, D., Navas-Molina, J. A., Kopylova, E., Morton, J. T., Zech Xu, Z., Kightley, E. P., Thompson, L. R., Hyde, E. R., Gonzalez, A., & Knight, R. (2017). Deblur rapidly resolves single-nucleotide community sequence patterns. *mSystems*, 2(2), e00191-16. <https://doi.org/10.1128/mSystems.00191-16>

Aranda, C., Paredes, J., Valenzuela, C., Lam, P., & Guillou, L. (2010). 16S rRNA gene-based molecular analysis of mat-forming and accompanying bacteria covering organically-enriched marine sediments underlying a salmon farm in Southern Chile (Calbuco island). *Gayana (Concepción)*, 74(2), 125-1235. <https://doi.org/10.4067/S0717-65382010000200006>

Baricevic, A., Chardon, C., Kahlert, M., Karjalainen Satu, M., Maric Pfannkuchen, D., Pfannkuchen, M., Rimet, F., Smodlaka Tankovic, M., Trobajo, R., Vasselon, V., Zimmermann, J., & Bouchez, A. (2022). Best practice recommendations for sample preservation in metabarcoding studies: A case study on diatom environmental samples. <https://doi.org/10.1101/2022.05.04.490577>

Beccati, A., Gerken, J., Quast, C., Yilmaz, P., & Glöckner, F. O. (2017). SILVA tree viewer: Interactive web browsing of the SILVA phylogenetic guide trees. *BMC Bioinformatics*, 18(1), 433. <https://doi.org/10.1186/s12859-017-1841-3>

Bergsten, E., Mestivier, D., & Sobhani, I. (2020). The limits and avoidance of biases in metagenomic analyses of human fecal microbiota. *Microorganisms*, 8(12), 1954. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8121954>

Bokulich, N. A., Kaehler, B. D., Rideout, J. R., Dillon, M., Bolyen, E., Knight, R., Huttley, G. A., & Gregory Caporaso, J. (2018). Optimizing taxonomic classification of marker-gene amplicon sequences with QIIME 2's q2-feature-classifier plugin. *Microbiome*, 6(1), 90. <https://doi.org/10.1186/s40168-018-0470-z>

Bolyen, E., Rideout, J. R., Dillon, M. R., Bokulich, N. A., Abnet, C. C., Al-Ghalith, G. A., Alexander, H., Alm, E. J., Arumugam, M., Asnicar, F., Bai, Y., Bisanz, J. E., Bittinger, K., Brejnrod, A., Brislawn, C. J., Brown, C. T., Callahan, B. J., Caraballo-Rodríguez, A. M., Chase, J., ... Caporaso, J. G. (2019). Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nature Biotechnology*, 37(8), 852-857. <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0209-9>

Brooks, J. P., Edwards, D. J., Harwich, M. D., Rivera, M. C., Fettweis, J. M., Serrano, M. G., Reris, R. A., Sheth, N. U., Huang, B., Girerd, P., Strauss, J. F., Jefferson, K. K., Buck, G. A., & Vaginal Microbiome Consortium (additional members). (2015). The truth about metagenomics: Quantifying and counteracting bias in 16S rRNA studies. *BMC Microbiology*, 15(1), 66. <https://doi.org/10.1186/s12866-015-0351-6>

Callahan, B. J., McMurdie, P. J., Rosen, M. J., Han, A. W., Johnson, A. J. A., & Holmes, S. P. (2016). DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature Methods*, 13(7), 581-583. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3869>

Callahan, B. J., Wong, J., Heiner, C., Oh, S., Theriot, C. M., Gulati, A. S., McGill, S. K., & Dougherty, M. K. (2019). High-throughput amplicon sequencing of the full-length 16S rRNA gene with single-nucleotide resolution. *Nucleic Acids Research*, 47(18), e103-e103. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz569>

Camacho, C., Coulouris, G., Avagyan, V., Ma, N., Papadopoulos, J., Bealer, K., & Madden, T. L. (2009). BLAST+: Architecture and applications. *BMC Bioinformatics*, 10(1), 421. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-10-421>

Caporaso, J. G., Lauber, C. L., Walters, W. A., Berg-Lyons, D., Lozupone, C. A., Turnbaugh, P. J., Fierer, N., & Knight, R. (2011). Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(supplement_1), 4516-4522. <https://doi.org/10.1073/pnas.1000080107>

Chen, S. (2023). Ultrafast one-pass FASTQ data preprocessing, quality control, and deduplication using fastp. *iMeta*, 2(2), e107. <https://doi.org/10.1002/imt2.107>

Chen, S., Zhou, Y., Chen, Y., & Gu, J. (2018). Fastp: An ultra-fast all-in-one fastq preprocessor. *Bioinformatics*, 34(17), i884-i890. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty560>

Clasen, L. A., Detheridge, A. P., Scullion, J., & Griffith, G. W. (2020). Soil stabilisation for DNA metabarcoding of plants and fungi. Implications for sampling at remote locations or via third-parties. *Metabarcoding and Metagenomics*, 4, e58365. <https://doi.org/10.3897/mbmg.4.58365>

Clooney, A. G., Fouhy, F., Sleator, R. D., O' Driscoll, A., Stanton, C., Cotter, P. D., & Claesson, M. J. (2016). Comparing apples and oranges? : Next generation sequencing and its impact on microbiome analysis. *PLOS ONE*, 11(2), e0148028. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0148028>

Demkina, A., Slonova, D., Mamontov, V., Konovalova, O., Yurikova, D., Rogozhin, V., Belova, V., Korostin, D., Sutormin, D., Severinov, K., & Isaev, A. (2023). Benchmarking DNA isolation methods for marine metagenomics. *Scientific Reports*, 13(1), 22138. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-48804-z>

Dowle, E., Pochon, X., Keeley, N., & Wood, S. A. (2015). Assessing the effects of salmon farming seabed enrichment using bacterial community diversity and high-throughput sequencing. *FEMS Microbiology Ecology*, 91(8), fiv089. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiv089>

Elie, C., Perret, M., Hage, H., Sentausa, E., Hesketh, A., Louis, K., Fritah-Lafont, A., Leissner, P., Vachon, C., Rostaing, H., Reynier, F., Gervasi, G., & Saliou, A. (2023). Comparison of DNA extraction methods for 16S rRNA gene sequencing in the analysis of the human gut microbiome. *Scientific Reports*, 13(1), 10279.

<https://doi.org/10.1038/s41598-023-33959-6>

Fadeev, E., Cardozo-Mino, M. G., Rapp, J. Z., Bienhold, C., Salter, I., Salman-Carvalho, V., Molari, M., Tegetmeyer, H. E., Buttigieg, P. L., & Boetius, A. (2021). Comparison of two 16s rRNA primers (V3-v4 and v4-v5) for studies of arctic microbial communities. *Frontiers in Microbiology*, 12, 637526. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.637526>

Fang, G., Yu, H., Sheng, H., Tang, Y., & Liang, Z. (2022). Comparison of 16s rRNA gene primers on studying microbial community composition in bottom water and sediment of artificial reefs in Laoshan Bay, China. *Journal of Ocean University of China*, 21(5), 1313-1322. <https://doi.org/10.1007/s11802-022-4966-6>

Flood, B. E., Fliss, P., Jones, D. S., Dick, G. J., Jain, S., Kaster, A.-K., Winkel, M., Mußmann, M., & Bailey, J. (2016). Single-cell (Meta-)genomics of a dimorphic *Candidatus Thiomargarita nelsonii* reveals genomic plasticity. *Frontiers in Microbiology*, 7.

<https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00603>

Fonseca, A., Ishoey, T., Espinoza, C., Pérez-Pantoja, D., Manghisi, A., Morabito, M., Salas-Burgos, A., & Gallardo, V. A. (2017). Genomic features of “*Candidatus Venteria ishoyi*”, a new sulfur-oxidizing macrobacterium from the Humboldt Sulfuretum off Chile. *PLOS ONE*, 12(12), e0188371. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0188371>

Frühe, L., Dully, V., Forster, D., Keeley, N. B., Laroche, O., Pochon, X., Robinson, S., Wilding, T. A., & Stoeck, T. (2021). Global trends of benthic bacterial diversity and community composition along organic enrichment gradients of salmon farms. *Frontiers in Microbiology*, 12, 637811. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.637811>

Grünke, S., Lichtschlag, A., De Beer, D., Felden, J., Salman, V., Ramette, A., Schulz-Vogt, H. N., & Boetius, A. (2012). Mats of psychrophilic thiotrophic bacteria associated with cold seeps of the Barents Sea. *Biogeosciences*, 9(8), 2947-2960.

<https://doi.org/10.5194/bg-9-2947-2012>

Guerrero, A., Licea, A. F., & Lizárraga-Partida, M. L. (2022). Metagenomic analysis among water masses and sediments from the Southern Gulf of Mexico. *Frontiers in Marine Science*, 9, 1020136. <https://doi.org/10.3389/fmars.2022.1020136>

Hakimzadeh, A., Abdala Asbun, A., Albanese, D., Bernard, M., Buchner, D., Callahan, B., Caporaso, J. G., Curd, E., Djemiel, C., Brandström Durling, M., Elbrecht, V., Gold, Z., Gweon, H. S., Hajibabaei, M., Hildebrand, F., Mikryukov, V., Normandeau, E., Özkurt, E., M. Palmer, J., ... Anslan, S. (2024). A pile of pipelines: An overview of the bioinformatics software for metabarcoding data analyses. *Molecular Ecology Resources*, 24(5), e13847. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.13847>

Hamoutene D, Mabrouk G, Sheppard L, Macsween C, Coughlan E, Grant C. (2013) Validating the use of *Beggiatoa* sp. and opportunistic polychaete worm complex (OPC) as indicators of benthic habitat condition at finfish aquaculture sites in Newfoundland. *Can. Tech. Rep. Fish. Aquat. Sci.* 3028, 18.

Hornick, K. M., & Buschmann, A. H. (2018). Insights into the diversity and metabolic function of bacterial communities in sediments from Chilean salmon aquaculture sites. *Annals of Microbiology*, 68(2), 63-77. <https://doi.org/10.1007/s13213-017-1317-8>

Hsieh, Y.-P., Hung, Y.-M., Tsai, M.-H., Lai, L.-C., & Chuang, E. Y. (2022). 16s-itgdb: An integrated database for improving species classification of prokaryotic 16s ribosomal rna sequences. *Frontiers in Bioinformatics*, 2, 905489. <https://doi.org/10.3389/fbinf.2022.905489>

Johansen, B. O., Mikalsen, S.-O., Magnussen, E., Patursson, E. J., Á Norði, G., & Djurhuus, A. (2024). Impacts on microbial communities in sediments by aquaculture farming during one salmon cycle. *Frontiers in Marine Science*, 11, 1266410. <https://doi.org/10.3389/fmars.2024.1266410>

Jørgensen, B. B. (1982). Ecology of the bacteria of the sulphur cycle with special reference to anoxic—Oxic interface environments. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. B, Biological Sciences*, 298(1093), 543-561. <https://doi.org/10.1098/rstb.1982.0096>

Kato, S., Nakamura, R., Kai, F., Watanabe, K., & Hashimoto, K. (2010). Respiratory interactions of soil bacteria with (Semi)conductive iron-oxide minerals. *Environmental Microbiology*, 12(12), 3114-3123. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2010.02284.x>

Klindworth, A., Pruesse, E., Schweer, T., Peplies, J., Quast, C., Horn, M., & Glöckner, F. O. (2013). Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Research*, 41(1), e1-e1. <https://doi.org/10.1093/nar/gks808>

Liem, M., Regensburg-Tuïnk, T., Henkel, C., Jansen, H., & Spaink, H. (2021). Microbial diversity characterization of seawater in a pilot study using Oxford Nanopore Technologies long-read sequencing. *BMC Research Notes*, 14(1), 42. <https://doi.org/10.1186/s13104-021-05457-3>

Liu, C., Feng, S., Wu, Q., Huang, H., Chen, Z., Li, S., & Xu, Y. (2019). Raw material regulates flavor formation via driving microbiota in chinese liquor fermentation. *Frontiers in Microbiology*, 10, 1520. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01520>

Liu, L., Yang, Y., Deng, Y., & Zhang, T. (2022). Nanopore long-read-only metagenomics enables complete and high-quality genome reconstruction from mock and complex metagenomes. *Microbiome*, 10(1), 209. <https://doi.org/10.1186/s40168-022-01415-8>

- Lozupone, C. A., & Knight, R. (2008). Species divergence and the measurement of microbial diversity. *FEMS Microbiology Reviews*, 32(4), 557-578.
<https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2008.00111.x>
- Mahmoud, M. A. A., & Magdy, M. (2021). Metabarcoding profiling of microbial diversity associated with trout fish farming. *Scientific Reports*, 11(1), 421.
<https://doi.org/10.1038/s41598-020-80236-x>
- Martijn, J., Lind, A. E., Schön, M. E., Spiertz, I., Juzokaite, L., Bunikis, I., Pettersson, O. V., & Ettema, T. J. G. (2019). Confident phylogenetic identification of uncultured prokaryotes through long read amplicon sequencing of the 16S-ITS-23S rRNA operon. *Environmental Microbiology*, 21(7), 2485-2498. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14636>
- McMurdie, P. J., & Holmes, S. (2013). Phyloseq: An R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. *PLoS ONE*, 8(4), e61217.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061217>
- Miranda, R. M., Aguila-Torres, P., Aranda, C. P., Maldonado, J., & Casado, A. (2021). Taxonomy and diversity of bacterial communities associated with marine sediments from Chilean salmonid farms. *Aquaculture Research*, 52(4), 1605-1620.
<https://doi.org/10.1111/are.15014>
- Molano, L.-A. G., Vega-Abellaneda, S., & Manichanh, C. (2024). GSR-DB: A manually curated and optimized taxonomical database for 16S rRNA amplicon analysis. *mSystems*, 9(2), e00950-23. <https://doi.org/10.1128/msystems.00950-23>
- Motulsky, H. (2014). *Intuitive biostatistics: A nonmathematical guide to statistical thinking* (3. ed). Oxford Univ. Press.
- Ortiz-Severín, J., Hodar, C., Stuardo, C., Aguado-Norese, C., Maza, F., González, M., & Cambiazo, V. (2024). Impact of salmon farming in the antibiotic resistance and structure of marine bacterial communities from surface seawater of a northern Patagonian area of Chile. *Biological Research*, 57(1), 84. <https://doi.org/10.1186/s40659-024-00556-4>
- Padilla-García, C. Y., Camacho-Sánchez, F. Y., & Reyes-López, M. Á. (2021). Metabarcoding de DNA ambiental: Un enfoque para el seguimiento de la biodiversidad. *CienciaUAT*, 136-149. <https://doi.org/10.29059/cienciauat.v16i1.1509>
- Pagano, M., & Gauvreau, K. (2000). *Principles of biostatistics* (2. ed). Duxbury.
- Parada, A. E., Needham, D. M., & Fuhrman, J. A. (2016). Every base matters: Assessing small subunit rRNA primers for marine microbiomes with mock communities, time series and global field samples. *Environmental Microbiology*, 18(5), 1403-1414.
<https://doi.org/10.1111/1462-2920.13023>
- Pearson TH, Rosenberg R (1978) Macrobenthic succession in relation to organic enrichment and pollution of the marine environment. *Oceanography and Marine Biology: An Annual Review* 16, 229-311.

Prodan, A., Tremaroli, V., Brolin, H., Zwinderman, A. H., Nieuwdorp, M., & Levin, E. (2020). Comparing bioinformatic pipelines for microbial 16S rRNA amplicon sequencing. *PLOS ONE*, 15(1), e0227434. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0227434>

Quero, G. M., Ape, F., Manini, E., Mirto, S., & Luna, G. M. (2020). Temporal changes in microbial communities beneath fish farm sediments are related to organic enrichment and fish biomass over a production cycle. *Frontiers in Marine Science*, 7, 524. <https://doi.org/10.3389/fmars.2020.00524>

Quince, C., Walker, A. W., Simpson, J. T., Loman, N. J., & Segata, N. (2017). Shotgun metagenomics, from sampling to analysis. *Nature Biotechnology*, 35(9), 833-844. <https://doi.org/10.1038/nbt.3935>

Rieder, J., Kapopoulou, A., Bank, C., & Adrian-Kalchhauser, I. (2023). Metagenomics and metabarcoding experimental choices and their impact on microbial community characterization in freshwater recirculating aquaculture systems. *Environmental Microbiome*, 18(1), 8. <https://doi.org/10.1186/s40793-023-00459-z>

Romero, I. C., Schwing, P. T., Brooks, G. R., Larson, R. A., Hastings, D. W., Ellis, G., Goddard, E. A., & Hollander, D. J. (2015). Hydrocarbons in deep-sea sediments following the 2010 deepwater horizon blowout in the northeast gulf of Mexico. *PLOS ONE*, 10(5), e0128371. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0128371>

Roslin, T., Traugott, M., Jonsson, M., Stone, G. N., Creer, S., & Symondson, W. O. C. (2019). Introduction: Special issue on species interactions, ecological networks and community dynamics - Untangling the entangled bank using molecular techniques. *Molecular Ecology*, 28(2), 157-164. <https://doi.org/10.1111/mec.14974>

Sahu, A., Singh, M., Amin, A., Malik, M. M., Qadri, S. N., Abubakr, A., Teja, S. S., Dar, S. A., & Ahmad, I. (2025). A systematic review on environmental DNA (Edna) Science: An eco-friendly survey method for conservation and restoration of fragile ecosystems. *Ecological Indicators*, 173, 113441. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2025.113441>

Salipante, S. J., Kawashima, T., Rosenthal, C., Hoogestraat, D. R., Cummings, L. A., Sengupta, D. J., Harkins, T. T., Cookson, B. T., & Hoffman, N. G. (2014). Performance comparison of illumina and ion torrent next-generation sequencing platforms for 16s rRNA-based bacterial community profiling. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(24), 7583-7591. <https://doi.org/10.1128/AEM.02206-14>

Salman, V., Amann, R., Girth, A.-C., Polerecky, L., Bailey, J. V., Høglund, S., Jessen, G., Pantoja, S., & Schulz-Vogt, H. N. (2011). A single-cell sequencing approach to the classification of large, vacuolated sulfur bacteria. *Systematic and Applied Microbiology*, 34(4), 243-259. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2011.02.001>

Salman, V., Bailey, J. V., & Teske, A. (2013). Phylogenetic and morphologic complexity of giant sulphur bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, 104(2), 169-186. <https://doi.org/10.1007/s10482-013-9952-y>

Salter, S. J., Cox, M. J., Turek, E. M., Calus, S. T., Cookson, W. O., Moffatt, M. F., Turner, P., Parkhill, J., Loman, N. J., & Walker, A. W. (2014). Reagent and laboratory contamination can critically impact sequence-based microbiome analyses. *BMC Biology*, 12(1), 87. <https://doi.org/10.1186/s12915-014-0087-z>

Schloss, P. D. (2020). Reintroducing mothur: 10 Years Later. *Applied and Environmental Microbiology*, 86(2), e02343-19. <https://doi.org/10.1128/AEM.02343-19>

Semenov, M. V. (2021). Metabarcoding and metagenomics in soil ecology research: Achievements, challenges, and prospects. *Biology Bulletin Reviews*, 11(1), 40-53. <https://doi.org/10.1134/S2079086421010084>

Sereika, M., Kirkegaard, R. H., Karst, S. M., Michaelsen, T. Y., Sørensen, E. A., Wollenberg, R. D., & Albertsen, M. (2022). Oxford Nanopore R10.4 long-read sequencing enables the generation of near-finished bacterial genomes from pure cultures and metagenomes without short-read or reference polishing. *Nature Methods*, 19(7), 823-826. <https://doi.org/10.1038/s41592-022-01539-7>

Shi, Y., Zhang, L., Do, K.-A., Peterson, C. B., & Jenq, R. R. (2020). Apcoa: Covariate adjusted principal coordinates analysis. *Bioinformatics*, 36(13), 4099-4101. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btaa276>

Srinivas, M., Walsh, C. J., Crispie, F., O'Sullivan, O., Cotter, P. D., Van Sinderen, D., & Kenny, J. G. (2025). Evaluating the efficiency of 16S-ITS-23S operon sequencing for species level resolution in microbial communities. *Scientific Reports*, 15(1), 2822. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-83410-7>

Teske, A., & Salman, V. (2014). The family beggiatoaceae. En E. Rosenberg, E. F. DeLong, S. Lory, E. Stackebrandt, & F. Thompson (Eds.), *The Prokaryotes* (pp. 93-134). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-38922-1_290

Thukral, A. K. (2017). A review on measurement of Alpha diversity in biology. *Agricultural Research Journal*, 54(1), 1. <https://doi.org/10.5958/2395-146X.2017.00001.1>

Valenzuela, C., Matamala, Y., Godoy, F. A., & Aranda, N. (2015). Sulphur-cycling bacteria and ciliated protozoans in a Beggiatoaceae mat covering organically enriched sediments beneath a salmon farm in a southern Chilean fjord. *Marine Pollution Bulletin*, 100(1), 270-278. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2015.08.040>

Van Der Loos, L. M., D'hondt, S., Willems, A., & De Clerck, O. (2021). Characterizing algal microbiomes using long-read nanopore sequencing. *Algal Research*, 59, 102456. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2021.102456>

Vasileiadis, S., Puglisi, E., Arena, M., Cappa, F., Cocconcelli, P. S., & Trevisan, M. (2012). Soil bacterial diversity screening using single 16s rRNA gene v regions coupled with multi-million read generating sequencing technologies. *PLOS ONE*, 7(8), e42671. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0042671>

Von Hoyningen-Huene, A. J. E., Schneider, D., Fussmann, D., Reimer, A., Arp, G., & Daniel, R. (2022). DNA- and RNA-based bacterial communities and geochemical zonation under changing sediment porewater dynamics on the Aldabra Atoll. *Scientific Reports*, 12(1), 4257. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-07980-0>

Wang, Q., Garrity, G. M., Tiedje, J. M., & Cole, J. R. (2007). Naïve bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(16), 5261-5267. <https://doi.org/10.1128/AEM.00062-07>

Wang, X., Lim, H. J., & Son, A. (2014). Characterization of denaturation and renaturation of DNA for DNA hybridization. *Environmental Health and Toxicology*, 29, e2014007. <https://doi.org/10.5620/eht.2014.29.e2014007>

Webb, S., Ruffell, H., Marsden, I., Pantos, O., & Gaw, S. (2019). Microplastics in the New Zealand green lipped mussel *Perna canaliculus*. *Marine Pollution Bulletin*, 149, 110641. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2019.110641>

Yang, B., Wang, Y., & Qian, P.-Y. (2016). Sensitivity and correlation of hypervariable regions in 16S rRNA genes in phylogenetic analysis. *BMC Bioinformatics*, 17(1), 135. <https://doi.org/10.1186/s12859-016-0992-y>

Zhang, X., & Chen, J. (2021). *Microbiomestat: Statistical methods for microbiome compositional data [Dataset]*. <https://doi.org/10.32614/CRAN.package.MicrobiomeStat>

13. Glosario de términos

16S-ITS-23S: Regiones del gen ribosomal usados para identificar bacterias y arqueas a nivel de especie o cepa, mediante la combinación de 16S, espaciador interno (ITS) y 23S.

ACE (Abundance-based Coverage Estimator): Índice de diversidad alfa que estima la riqueza de especies dando mayor peso a las especies raras o poco abundantes.

ADN: Ácido desoxirribonucleico, material genético presente en todos los seres vivos y en virus de ADN, usado como base para la mayoría de los análisis moleculares de comunidades microbianas.

Amplicón: Fragmento de ADN obtenido mediante amplificación por PCR a partir de una región blanco específica.

Anaerobiosis: Condición ambiental caracterizada por la ausencia de oxígeno en el sedimento marino, evaluada principalmente mediante el potencial redox en la interfaz agua-sedimento (habitualmente hasta 3 cm de profundidad). Un lecho marino se considera anaeróbico cuando este potencial indica ausencia de oxígeno, aunque la columna de agua sobre el sedimento pueda presentar niveles normales de oxígeno. En Chile, la caracterización de la anaerobiosis utiliza adicionalmente indicadores complementarios como el oxígeno a 1 m sobre el fondo, la presencia de cubiertas de microorganismos visibles, el exceso de materia orgánica en el sedimento y parámetros combinados de redox y pH, todos estos con valores umbral definidos para establecer el estado anaeróbico del fondo marino.

Análisis de rarefacción: Método estadístico que estandariza la profundidad de secuenciación entre muestras para comparar riqueza de especies o ASVs con el mismo esfuerzo de muestreo.

ASV (Amplicon Sequence Variant): Variante única de una secuencia de amplicón, considerada como la unidad mínima distinguible por secuenciación y utilizada como reemplazo de las OTUs clásicas.

Bacteria filamentosa: Bacteria con morfología en forma de filamentos, principal morfología de bacterias pertenecientes a la familia Beggiatoaceae.

Bacterias cable: Bacterias que pueden transportar electrones a lo largo de distancias relativamente grandes dentro del sedimento, por ejemplo miembros de la familia Desulfobulbaceae.

Barcode/Metabarcoding: Técnica que permite identificar taxonómicamente organismos presentes en muestras ambientales mediante secuenciación masiva de un fragmento genético estándar, como el gen ARNr 16S.

Batimetría: Medida de la profundidad del fondo marino respecto de la superficie del mar, utilizada para describir el relieve submarino.

Beggiatoaceae: Familia de bacterias gigantes oxidantes de azufre, formadoras de mantos blanquecinos sobre el sedimento y consideradas como bioindicadores de condición de anaerobiosis en el sedimento.

Bioinformática: Conjunto de métodos computacionales para el análisis de datos genómicos y microbiológicos.

Biofilm: Conjunto de microorganismos adheridos a una superficie y embebidos en una matriz polimérica producida por ellos mismos.

Box core: Dispositivo para recolectar muestras de sedimentos marinos.

Bray-Curtis: Índice de disimilitud utilizado para comparar composiciones de comunidades biológicas en base a abundancias relativas.

Candidatus (Ca.): Término taxonómico empleado para designar bacterias no cultivadas que han sido caracterizadas principalmente por métodos moleculares.

Categoría 4: Clasificación chilena que define fondos marinos bajo centros de cultivo de salmónidos con sustratos rocosos o duros a profundidades menores a 60 m, donde no es posible aplicar muestreos estándar de sedimento blando.

Chao1: Estimador de riqueza de especies para diversidad alfa, basado en la frecuencia de especies raras en la muestra.

CMV: Cubierta de microorganismos visibles, observada como mantos blancos sobre el lecho marino y generada principalmente por bacterias gigantes oxidantes de azufre de la familia Beggiatoaceae.

Covariables: Variables adicionales que pueden influir en los resultados de los análisis estadísticos y que se incorporan en los modelos para mejorar la interpretación.

Curva de rarefacción: Gráfico que muestra cómo aumenta el número de especies o ASVs detectadas en función del número de lecturas o individuos muestreados, utilizado para evaluar si la profundidad de muestreo es suficiente.

CTDO: Equipo que mide simultáneamente conductividad, temperatura, profundidad y oxígeno, variables físicas de monitoreo ambiental marino.

DADA2: Software bioinformático especializado en el procesamiento de datos de NGS para generar ASVs a partir de secuencias de amplicones, corregir errores y remover quimeras.

Deblur: Algoritmo bioinformático que infiere variantes exactas de secuencias de amplicones (ASVs) a partir de datos de NGS, mediante modelos de error.

Deep Trekker DTG3: Modelo de ROV compacto utilizado para inspecciones submarinas y muestreo de sedimentos en fondos de categoría 4 en este proyecto.

Diversidad alfa: Medida de la diversidad de especies dentro de una muestra o comunidad específica, que puede expresarse mediante índices como riqueza, Shannon, Simpson o Pielou.

Diversidad beta: Medida de la diferencia en la composición de especies entre dos o más muestras o comunidades, que suele expresarse mediante índices de disimilitud como Bray-Curtis o Jaccard.

DNA/RNA Shield: Solución comercial para la estabilización de ADN y ARN ambientales, que preserva los ácidos nucleicos a temperatura ambiente y desactiva nucleasas.

DNAsa: Enzima que degrada el ADN, relevante para descontaminación en muestreos moleculares.

Draga: Equipo de muestreo de fondo marino por arrastre, adecuado principalmente para sedimentos blandos y fondos no rocosos.

EDTA: Agente quelante que se une a cationes divalentes y se utiliza para inhibir nucleasas en procesos de extracción y preservación de ADN.

Electroforesis capilar: Método analítico que permite evaluar la calidad, integridad y tamaño de fragmentos de ADN o ARN mediante separación en capilares.

Enriquecimiento selectivo: Procedimiento de pre-incubación diseñado para favorecer la migración y concentración de bacterias específicas, como Beggiatoaceae, antes del análisis molecular.

Especificidad: Probabilidad de que un criterio o prueba clasifique correctamente como negativos los casos que realmente no presentan la condición de interés, es decir, proporción de verdaderos negativos entre todos los casos negativos reales.

Estación de muestreo: Sitio georreferenciado donde se realiza una toma de muestra ambiental siguiendo un protocolo definido.

Estoa: Intervalo dentro del ciclo de marea en que la corriente tiene velocidad cercana a cero antes de invertir su dirección, con una duración de pocos minutos a cerca de media hora.

Eukarya/Eucariotas: Organismos con núcleo celular definido, tales como animales, plantas, hongos y protistas, que en general son excluidos cuando se utilizan partidores específicos para bacterias y arqueas 16S.

FastDNA Spin Kit: Kit comercial para extracción de ADN a partir de matrices complejas, como suelos y sedimentos, que integra lisis, estabilización y purificación.

Fastp: Software para el preprocesamiento y control de calidad de archivos FASTQ, que realiza filtrado, recorte y evaluación de calidad de lecturas.

G0, G1, ... G6: Grados de gradiente de severidad y cobertura de CMV en el fondo marino, definidos mediante conteo de puntos sobre imágenes obtenidas por ROV, donde G0 representa ausencia de mantos y G6 una cobertura máxima.

Gel de agarosa: Soporte sólido utilizado en electroforesis para verificar la presencia, integridad y tamaño aproximado de fragmentos de ADN.

GeIRED: Tinte fluorescente utilizado para visualizar ácidos nucleicos en geles de agarosa bajo luz ultravioleta o azul.

Gen ARNr 16S (ó 16S): Gen marcador universal para bacterias y arqueas, ampliamente utilizado en estudios de diversidad microbiana mediante metabarcoding.

Glutaraldehído: Agente fijador empleado para la preservación de muestras biológicas destinadas a microscopía óptica y microscopía electrónica de barrido.

GSOB (Giant sulfur- oxidizing bacteria): Bacterias gigantes oxidantes de azufre, pertenecientes principalmente a la familia Beggiatoaceae, que forman mantos visibles en sedimentos enriquecidos en sulfuros.

GSR-DB, ITGDB: Bases de datos integradas y curadas para la clasificación taxonómica basada en secuencias del gen 16S, diseñadas para mejorar la resolución y consistencia en la anotación.

Illumina MiSeq/NextSeq 1000: Plataformas comerciales de secuenciación masiva de lectura corta, ampliamente utilizadas en estudios de metabarcoding y metagenómica.

INFA: Informe Ambiental para Acuicultura requerido por normativa acuícola chilena.

Jaccard: Índice de similitud que compara comunidades biológicas en función de la presencia o ausencia de especies.

Kitoma: ADN contaminante presente en reactivos y kits de laboratorio que puede introducir sesgos en estudios de comunidades microbianas de baja biomasa.

Metabarcoding: Técnica de identificación taxonómica masiva basada en secuenciación de regiones específicas, como el 16S rRNA, que permite describir la composición de comunidades microbianas en muestras ambientales.

Metagenómica: Estrategia que secuencia y analiza el ADN total presente en una muestra ambiental, lo que permite evaluar simultáneamente composición taxonómica y potencial funcional.

Micro-Safe: Solución comercial chilena para estabilización de ADN ambiental en terreno, que permite transportar muestras a temperatura ambiente. Producida y comercializada por Codebreaker Bioscience.

mothur: Software especializado para análisis de comunidades microbianas que incluye herramientas para procesar datos de secuenciación y calcular métricas ecológicas.

Multiplexar: Procesar simultáneamente varias muestras en un mismo análisis o corrida de secuenciación mediante el uso de índices o códigos de barras moleculares.

Nanopore (MinION, GridION, PromethION): Tecnologías comerciales de secuenciación de ADN de lectura larga y en tiempo real, basadas en el paso de moléculas a través de nanoporos.

NaOH 0,1 N: Solución de hidróxido de sodio utilizada para descontaminar material de muestreo y degradar ADN residual en superficies.

Next Generation Sequencing (NGS): Tecnologías de secuenciación masiva paralela que permiten obtener grandes volúmenes de datos de ADN o ARN en una sola corrida, incluyendo plataformas como Illumina, Ion PGM, PacBio y Nanopore.

OTU (Operational Taxonomic Unit): Agrupación de secuencias basada en un umbral de similitud, tradicionalmente 97%, utilizada como unidad taxonómica operacional antes de la generalización del uso de ASV.

Paired-end (NGS): Modalidad de secuenciación en la que se leen ambos extremos de un fragmento de ADN, lo que mejora la precisión y el ensamblaje de las secuencias

PCR (Polimerase Chain Reaction): Técnica de laboratorio que amplifica fragmentos específicos de ADN mediante ciclos de desnaturalización, apareamiento y extensión.

PhiX: ADN de control estándar suministrado por Illumina que se mezcla con las muestras en corridas de secuenciación para calibrar el rendimiento y la calidad

Phyloseq: Paquete del lenguaje R para el análisis estadístico y gráfico de datos de comunidades microbianas, integrando matrices de abundancia, taxonomía y metadatos.

Plataforma QIIME/QIIME2: Plataformas bioinformáticas modulares para el análisis de secuencias microbianas que permiten construir flujos de trabajo reproducibles desde el archivo FASTQ hasta las métricas ecológicas.

PowerSoil (QIAamp): Kit ampliamente validado para la extracción de ADN en matrices de suelos y sedimentos, que incluye etapas de lisis mecánica y química.

Qubit: Instrumento basado en fluorimetría para la cuantificación precisa de concentraciones bajas de ADN o ARN.

Qsep1: Aparato de cuantificación/separación de ADN usado en preparación de librerías.

Quick-16S™ NGS Library Preparation Kit: Kit comercial utilizado para la preparación de librerías de amplicones 16S aptas para secuenciación masiva.

R, R Core Team: Lenguaje y entorno de programación estadística utilizado para análisis avanzados de datos genómicos, ecológicos y ambientales.

Réplica: Muestra o análisis adicional realizado de manera independiente para estimar la variabilidad y aumentar la robustez de las inferencias estadísticas.

ROV (Remotely Operated Vehicle): Vehículo submarino operado a distancia, utilizado en este estudio para inspección visual y muestreo de sedimentos en fondos de difícil acceso.

Sensibilidad: Probabilidad de que un criterio o prueba clasifique correctamente como positivos los casos que realmente presentan la condición de interés, es decir, proporción de verdaderos positivos entre todos los casos positivos reales.

SEM (Scanning Electron Microscope): Microscopio electrónico de barrido que genera imágenes de alta resolución de la superficie de las muestras.

Shannon, Simpson, Pielou: Índices de diversidad alfa que cuantifican, respectivamente, la diversidad combinando riqueza y equidad, la dominancia y la uniformidad de la comunidad.

Shotgun: En metagenómica, modalidad de secuenciación que analiza el ADN total de una muestra sin amplificación dirigida previa, permitiendo una visión amplia del potencial genético.

SILVA: Base de datos curada de secuencias ribosomales utilizada habitualmente para asignación taxonómica de secuencias 16S y 18S.

Tórula sintética: Bastoncillo sintético y estéril utilizado para muestreos finos y transferencia controlada de sedimento o biomasa.

Transecta: Línea o recorrido definido a lo largo del cual se registra información ambiental o biológica en el medio subacuático.

Tricoma: Estructura filamentosa compuesta por una cadena de células, observada en bacterias gigantes como las Beggiatoaceae.

Umbral: Valor límite de un indicador a partir del cual se clasifica un caso en una u otra categoría (por ejemplo, anaeróbico o no anaeróbico), de modo que valores por encima o por debajo de ese punto desencadenan decisiones o interpretaciones diferentes.

UTM (Universal Transverse Mercator): Sistema de coordenadas cartográficas que proyecta la superficie terrestre en zonas, empleado para ubicar geográficamente puntos de muestreo.

V1-V9: Regiones hipervariables del gen 16S empleadas como dianas en estudios de microbioma bacteriano, cuya elección influye en la resolución taxonómica.

V3-V4, V4-V5: Regiones específicas del gen 16S frecuentemente utilizadas para generar amplicones en proyectos de microbioma ambiental, incluyendo estudios asociados a acuicultura.

vsearch, UCHIME: Software y algoritmos utilizados para detectar y eliminar secuencias químéricas en conjuntos de datos de amplicones.

Weibel (método de): Técnica estereológica que emplea conteo de puntos sobre imágenes para cuantificar coberturas superficiales, como la de CMV en el fondo marino

Zymo BIOMICS 96 MagBead: Kit de extracción de ADN de alto rendimiento basado en perlas magnéticas, diseñado para procesar múltiples muestras ambientales complejas en paralelo.

14. Índice de anexos

Todos los anexos están incluidos sin restricción mediante Google Drive en el siguiente link: [Anexos](#)

14.1. Archivos individuales

- **Anexo 1: Personal participante del equipo de trabajo por actividad.** Nombres de las personas participantes y las actividades desarrolladas.
- **Anexo 2: Aranda y col. (2026) Shifts in prokaryotic communities and giant sulphur-oxidising bacteria in response to salmon aquaculture.pdf.** Publicación que incluye resultados de centros Córdova 3 y Córdova 4 en Magallanes.
- **Anexo 3: Tangbac_Plano INFA.pdf.** Plano de concesión Centro Tangbac que muestra vértices de concesión, ubicación de módulo de cultivo y recorrido de transectas INFA.
- **Anexo 4: Tangbac.klm.** Archivo ejecutable en GoogleEarth que abre sitios de muestreo y ubicación relativa de modulo en Centro Tangbac.
- **Anexo 5: Isla_Guzman_Plano INFA.pdf.** Plano de concesión Centro Isla Guzmán que muestra vértices de concesión, ubicación de módulo de cultivo y recorrido de transectas INFA.
- **Anexo 6: Isla_Guzman.klm.** Archivo ejecutable en GoogleEarth que abre sitios de muestreo y ubicación relativa de modulo en Centro Isla Guzman.

- **Anexo 7: Williams_Plano INFA.pdf.** Plano de concesión Centro Williams, que muestra vértices de concesión, ubicación de módulo de cultivo y recorrido de transectas INFA.
- **Anexo 8: Williams.klm.** Archivo ejecutable en GoogleEarth que abre sitios de muestreo y ubicación relativa de modulo en Centro Williams.
- **Anexo 9: Programa_Taller_de_Expertas(os).pdf.** Programa utilizado para las invitaciones a asistencia al taller.
- **Bibliografía:** Copia de bibliografía en formatos RIS y RTF.

14.2. Carpetas con grupos de anexos.

- **1_VIDEOS SUBMARINOS CÓRDOVA 4:** Contiene archivos de videos originales obtenidos durante la campaña de muestreo.
- **2_VIDEOS SUBMARINOS CÓRDOVA 5:** Ídem.
- **3_METABARCODING CORDOVA 4 Y CORDOVA 5:**

Contiene archivo Tabla S1.fasta, con las secuencias V3-V4 en formato fasta para todos los ASVs detectados para muestras de Córdova 4 (Farm 1) y Córdova 5 (Farm 2). Para fines de transparencia se trata de la misma tabla compartida como información suplementaria en Aranda y col. (2026).

Contiene archivo Tabla_S2.scv, con datos de taxonomía y conteos crudos (aún no sometidos a rarefacción) para cada muestra y réplica de centros Córdova 4 (Farm 1) y Córdova 5 (Farm 2). Igualmente, se trata de la misma tabla compartida en Aranda y col. (2026).
- **4_VIDEOS SUBMARINOS EXPLORATORIOS TANGBAC:**

Contiene registros originales de exploración de transectas.
- **5_VIDEOS SUBMARINOS MUESTREO TANGBAC:**

Contiene registros durante los muestreos en estaciones con CMV y estaciones control.

- **6_REGISTROS MICROSCÓPICOS EN CENTRO TANGBAC:**

Contiene imágenes a campo claro (CC) y campo oscuro (CO) de GSOB filamentosas y globulares, incluyendo registros de GSOB globulares en división y en cadena, así como GSOB filamentosas en proceso de división de tricoma. Los nombres de archivos son autoexplicativos.

- **7_VIDEOS SUBMARINOS MUESTREO ISLA GUZMAN:**

Contiene registros durante los muestreos en estaciones con CMV y estaciones control.

- **8_REGISTROS MICROSCÓPICOS EN CENTRO ISLA GUZMAN:**

Contiene imágenes a campo claro (CC) y campo oscuro (CO) de GSOB filamentosas y globulares, incluyendo registros de GSOB globulares en división y en cadena, así como GSOB filamentosas en proceso de división de tricoma. Los nombres de archivos son autoexplicativos.

- **9_VIDEOS SUBMARINOS MUESTREO WILLIAMS:**

Contiene registros durante los muestreos en estaciones con CMV y estaciones control.

- **10_REGISTROS MICROSCÓPICOS EN CENTRO WILLIAMS:**

Contiene imágenes y videos a campo claro (CC) y campo oscuro (CO) de GSOB filamentosas. Los nombres de archivos son autoexplicativos.

- **11_METABARCODING BEGGIATOACEAE TANGBAC, ISLA GUZMAN Y WILLIAMS**

Contiene en 3 tablas en formato csv para las asignaciones por secuencias V3-V4 de Beggiatoaceae en centro Tangbac (ARA1), Isla Guzmán (ARA2) y Williams (ARA3).