

**UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE**  
**FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS**  
**INSTITUTO DE MEDICINA PREVENTIVA VETERINARIA**

**EVALUACIÓN DE LA CALIDAD MICROBIOLÓGICA DE LAS AGUAS DEL RÍO  
CRUCES, DESDE LONCOCHE HASTA SAN JOSÉ DE LA MARIQUINA**

Memoria de Título presentada como parte  
de los requisitos para optar al TÍTULO DE  
MÉDICO VETERINARIO

**MARÍA JOSÉ GONZÁLEZ FERNÁNDEZ**

**VALDIVIA – CHILE**

**2008**

## 2. CONTRAPORTADA

**PROFESOR PATROCINANTE** \_\_\_\_\_  
**Dr. Rafael Tamayo C** **FIRMA**

**PROFESOR COLABORADOR** \_\_\_\_\_  
**T.M Mónica Sáez L** **FIRMA**

**PROFESORES CALIFICADORES** \_\_\_\_\_  
**Dr. Ricardo Enríquez** **FIRMA**

\_\_\_\_\_  
**Sra. María Luisa Keim** **FIRMA**

**FECHA APROBACIÓN:** 27 de Octubre del 2008

## ÍNDICE

Capítulo	Página
1. RESUMEN.....	1
2. SUMMARY.....	2
3. INTRODUCCIÓN.....	3
4. MATERIAL Y MÉTODOS.....	13
5. RESULTADOS.....	19
6. DISCUSIÓN.....	29
7. BIBLIOGRAFÍA.....	33
8. ANEXOS.....	37

## 1. RESUMEN

Los objetivos de este estudio fueron determinar la calidad microbiológica de las aguas del río Cruces, desde Loncoche hasta San José de la Mariquina y verificar si cumplen con la normativa vigente e identificar las actividades que producen un mayor grado de contaminación microbiológica.

Se identificaron 10 puntos de muestreo a lo largo del recorrido del río Cruces (42 km aproximados). Un total de 60 muestras de agua superficial fueron tomadas en tres muestreos: el 30 de septiembre 2005, 31 de marzo 2006 y 23 de octubre 2006. Las muestras de agua fueron trasladadas al Laboratorio de Microbiología del Instituto de Medicina Preventiva Veterinaria para su análisis. Para la cuantificación de coliformes totales y fecales se utilizó la técnica de NMP (Número Más Probable) de acuerdo a lo descrito en “Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater” y la NCh 2313/22 (Chile 1995, Clesceri y col 2005). Los resultados obtenidos se registraron en una planilla, usando el programa Microsoft Office Excel 2003. Para determinar la ubicación espacial de los puntos de muestreo y las actividades productivas presentes en el tramo Loncoche- San José de la Mariquina se confeccionaron mapas con el programa ArcView 9.1.

En cuanto a los niveles máximos de coliformes fecales en el primer muestreo llegan a los 3.500 NMP/ 100 ml en el punto puente Cruces, en el segundo muestreo 5.000 NMP/ 100 ml en el punto Puente Leufucade N° 2 y en el tercer muestreo 9.000 NMP/ 100 ml en el punto antes mencionado. Los niveles más bajos de coliformes fecales en el primer muestreo son 50 NMP/ 100 ml en el punto Subestación CGE Loncoche y punto puente Reyes. En el segundo muestreo el mínimo es de 130 NMP/ 100 ml en el punto puente Reyes y en el tercer muestreo el punto Subestación CGE Loncoche. Los resultados indican que la contaminación fecal es menor en el primer y tercer muestreo, debido a las altas precipitaciones y aumento en el caudal del río. En el primer y tercer muestreo el 70% de los puntos cumplen con la NCh 1333, en tanto el punto puente Leufucade N° 2 en ningún muestreo realizado cumple con ella, debido a que en ese punto confluye el río Cruces con el río Leufucade que eleva la carga microbiana principalmente por la actividad lechera.

Las actividades que tienen mayor impacto son las plantas de tratamiento de aguas servidas y lecherías, observándose en puntos cercanos recuentos de coliformes fecales que llegan a 9.000 NMP/ 100 ml.

Palabras clave: Contaminación microbiológica, Río Cruces, Coliformes Totales y Fecales.

## 2. SUMMARY

### **MICROBIOLOGICAL QUALITY EVALUATION OF CRUCES RIVER'S WATER IN TEN SAMPLING POINTS**

The objectives of this study were to determine the microbiological quality of Cruces river's water, from Loncoche to San José de la Mariquina and verifying if they fulfill the Chilean standard and to identify the activities that produce a bigger grade of microbiological contamination.

Ten sampling points were identified along the stretch of the Cruces river (42 km ). They were a total of 60 samples of superficial water were taken in three samplings: September 30, 2005, March 31, 2006 and October 23 2006. Samples were transferred to Laboratory of Microbiology of Institute of Veterinary Preventive Medicine, for their analysis. For quantification of total and fecal coliforms were utilized NMP's technique (Most Probably Number) according to "Standard Methods for The Examination of Water and Wastewater" and NCh 2313/22 (Chile 1995, Clesceri et al 2005). The obtained results were registered in a payroll using the program Microsoft Office Excel 2003. In order to determine the space position of the sampling points and the present productive activities at the stretch Loncoche-San Jose of the Mariquina were made maps with the program ArcView 9.1.

The higher levels of fecal coliforms in the first sampling catch up 3.500 NMP/ 100 ml in the point bridge Cruces, in the second sampling 5.000 NMP/ 100 ml in the point bridge Leufucade N° 2 and in the third sampling 9.000 NMP/ 100 ml in the above-mentioned point. The lower levels of fecal coliforms in the first sampling are 50 NMP/ 100 ml in the point Subestación CGE Loncoche and point bridge Reyes. In second sampling the lower levels comes from 130 NMP/100 ml in the point bridge Reyes and in the third sampling the point Subestación CGE Loncoche. The results suggest that the fecal contamination is lower in the first and third sampling, due to the loud precipitations and increase in the flow intensity of the river. Seventy percent of the points meet the NCh 1333 in the first and third sampling, in the meantime the point Leufucade N° 2 never fulfilled with her, owed to than at that point converges the river Cruces with the river Leufucade that the diary increase the microbial load.

The activities that have bigger impact are the wastewater treatment plants and dairies, being observed in close points count of fecal coliforms of 9.000 NMP/ 100 ml.

Key words: Microbiological contamination, river Cruces, Total and Fecal Coliform

### 3. INTRODUCCIÓN

#### 3.1 ANTECEDENTES GENERALES: Situación del agua a nivel mundial

El agua dulce es el bien máspreciado para la vida en nuestro planeta. Es un recurso natural, único, finito e indispensable para todo organismo viviente y para gran parte de las actividades económicas y productivas del hombre. Es fundamental para satisfacer las necesidades humanas, la salud, la producción de alimentos, la energía y el mantenimiento de los ecosistemas regionales y mundiales. A pesar de su aparente abundancia, reflejada en que más de dos tercios de la superficie terrestre está cubierta por agua, solo una fracción, el 2,5%, es agua dulce, de la cual el 70% se encuentra congelada en los casquetes polares. Apenas un 0,74% del agua dulce se halla en lagos, ríos, pantanos, depósitos subterráneos, la atmósfera y los sistemas biológicos, lo que significa que menos del 1% de los recursos mundiales de agua dulce sean accesibles para el consumo humano. De este 1% de agua dulce disponible, un 69% está destinado en su mayor parte al sector agropecuario; un 23% es de uso industrial y el 8% restante para uso doméstico (UNESCO 2003, Matus y col 2004).

Según datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS), para uso humano directo sólo se puede tener acceso aproximadamente al 0,007% del total de los recursos hídricos de la tierra. Disponer de agua limpia es tal vez uno de los más grandes desafíos que enfrenta hoy gran parte de la humanidad, siendo éste uno de los aspectos más críticos de todos aquellos relacionados con la seguridad humana (Matus y col 2004). Tan importante como la cantidad disponible de agua es su calidad. Globalmente, entre 1.085.000 y 2.187.000 muertes provocadas por enfermedades diarreicas se pueden atribuir al factor de riesgo "agua, saneamiento e higiene". El 90% de estos casos ocurre en niños menores de cinco años (UNESCO 2008)

El agua se está convirtiendo en un recurso cada vez más escaso, especialmente en lugares donde la degradación del ambiente ha interrumpido su natural almacenamiento. Las principales causas que afectan a este recurso, es el aumento de la población humana y la contaminación de las aguas por la incorporación de microorganismos, productos químicos y residuos industriales; estas materias deterioran la calidad del agua y disminuyen su disponibilidad (Matus 1998).

La contaminación en forma cuantitativa y/o cualitativa de este recurso constituye un importante problema sanitario para el hombre. A pesar de que la frecuencia de enfermedades transmitidas por el agua es notablemente más baja respecto a siglos anteriores, aún existen diferencias importantes en la incidencia de estas patologías entre los países desarrollados y los que están en vías de desarrollo (Brock y col 2000).

Los graves déficits existentes en el abastecimiento del agua a la población, la relevancia de las enfermedades de transmisión hídrica, el generalizado deterioro ambiental y la creciente escasez de recursos hídricos para distintos propósitos entre otras causas, han ido consolidando la conciencia mundial de la importancia que tiene el agua para el desarrollo sustentable del planeta (Peña 2001).

### **3.2 Situación del agua en Chile**

Una cuenca hidrográfica es el territorio definido por los límites de la zona del escurrimiento de aguas superficiales, que convergen hacia un mismo cauce. Del mismo modo, una cuenca, sus recursos y sus habitantes, poseen determinadas condiciones físicas, biológicas, económicas, sociales y culturales, que les confieren características comunes (Chile 1998<sup>a</sup>).

Los sistemas fluviales proveen de numerosos servicios ecosistémicos, tales como aprovisionamiento de agua potable, agua de riego, generación hidroeléctrica, recreación, pesca deportiva, navegación y otros. La degradación de su calidad puede conducir a la pérdida de tales servicios o a un aumento de los costos asociados a ellos, generando problemas ambientales complejos. Los sistemas fluviales altamente antropizados han sido paulatinamente degradados debido a su uso como simples cuerpos receptores de desechos, conduciendo a la pérdida de su valor paisajístico, recreacional y en algunos casos convirtiéndose en sistemas de mayor riesgo para la salud (Parra 1996).

En Chile, la mayor parte del crecimiento demográfico se presenta en las cuencas del Elqui, Aconcagua, Maipo, Mapocho, Rapel, Maule, Bío Bío, Valdivia, entre otras y por ello son los ríos que presentan mayor grado de contaminación (Chile 2005<sup>a</sup>).

En nuestro país los cauces de agua superficiales están siendo sometidos a una carga cada vez mayor de residuos y desechos de todo tipo, muchos de éstos altamente tóxicos, con la consiguiente situación de riesgo permanente para la salud humana y con un alto costo de recuperación de las aguas y los ecosistemas, cuando esto es posible. Por cada metro cúbico de aguas residuales contaminadas que se descargan en acuíferos y cursos de agua superficiales, entre 8 y 10 metros cúbicos de agua pura se vuelven no aptas para el consumo (Matus y col 2004).

Las aguas servidas son una de las principales fuentes de contaminación de ríos y aguas marinas. A comienzos del presente siglo, el 7,9% de las aguas servidas iban a dar directamente a los ríos y 21% al mar. Actualmente, el servicio de alcantarillado alcanza al 82,7% de la población y, a través de él, los vertidos de más de once millones de personas se descargan directamente sobre el medio ambiente. Casi 85% de estas descargas no recibe ningún tipo de tratamiento, 8,3% sí lo recibe y 6,9% se evacua a través de emisores submarinos (Matus y col 2004).

La influencia social sobre los sistemas hídricos se ejerce directa o indirectamente. En forma directa, lo hace a través de la extracción hídrica intensiva, el bombeo o desvío de las

aguas a canales o receptáculos artificiales, la perforación y operación de pozos, la excavación de canteras y galerías de minas, la construcción de embalses y los vertidos de aguas residuales y otras acciones análogas. Indirectamente, su acción se efectúa a través de la alteración de la cobertura vegetal, la deforestación, las plantaciones y cultivos, la modificación climática y microclimática, etc. Debido a este impacto social crítico, las cuencas hidrográficas deben ser estudiadas, no sólo teniendo en cuenta los componentes naturales del sistema, sino también los diferentes modos de ocupación territorial humana (Antón y Díaz 2000).

Factores como el crecimiento demográfico, la industrialización y la concentración urbana han contribuido al deterioro de masas de agua y su medio ambiente (Chile 2005<sup>a</sup>). Por lo tanto, la mayor responsabilidad de la contaminación es atribuida al hombre y se conoce como “efecto antrópico”. Este tipo de contaminación es generalmente continua y no siempre se realizan acciones que la atenúen o la eliminen (Crovetto 2004).

### **3.2.1 Fuentes de contaminación en aguas superficiales**

Las principales fuentes de contaminación acuática pueden clasificarse como urbanas, industriales y agrícolas (Matus 1998).

Son posibles varios escenarios de exposición. Dichos escenarios varían en cuanto al modo de emisión. Los tipos de emisiones pueden agruparse en dos categorías principales: fuente difusa y fuente puntual. A su vez, éstas pueden subdividirse en otras dos categorías: dispersas y no dispersas (Ongley 1997).

Las emisiones de fuente puntual se caracterizan por un número reducido de puntos de emisión en una zona geográfica pequeña. Es posible que haya una sola zona de emisión de ese tipo, por ejemplo, el efluente de una fábrica. O también puede suceder que las zonas de emisión estén ampliamente distribuidas en todo el país, por ejemplo, los efluentes de las plantas de tratamiento de aguas residuales. Estos dos ejemplos podrían clasificarse, respectivamente, como emisión de fuente puntual no dispersa y de fuente puntual dispersa (Ongley 1997).

La contaminación de las aguas procedentes de fuentes no localizadas, conocida con el nombre de contaminación difusa o no puntual, es resultado de un amplio grupo de actividades humanas en las que los contaminantes no tienen un punto claro de ingreso en los cursos de agua que los reciben. Por el contrario, la contaminación procedente de fuentes localizadas está asociada a las actividades en que el agua residual va a parar directamente a las masas de agua receptoras, por ejemplo, mediante cañerías de descarga, en las que se pueden fácilmente cuantificar y controlar. Obviamente, la contaminación de fuentes no localizadas es mucho más difícil de identificar, medir y controlar (Prescott y col 2004).

El cuadro 1 resume las principales fuentes de contaminación de aguas superficiales, puntuales y no puntuales, según el tipo de actividad y contaminante asociado.

**Cuadro 1. Principales fuentes de contaminación de aguas superficiales**

<b>CONTAMINACIÓN DE ORIGEN PUNTUAL</b>		<b>CONTAMINACIÓN DE ORIGEN NO PUNTUAL</b>	
<b>ACTIVIDAD</b>	<b>CONTAMINANTES</b>	<b>ACTIVIDAD</b>	<b>CONTAMINANTES</b>
Municipales Agua residual urbana	Microorganismos Color y espuma Nutrientes (N y P) Materia orgánica Sólidos en suspensión Sales disueltas	Agricultura	Limos y arcilla Nutrientes Plaguicidas Materia orgánica Microorganismos Sales disueltas
Industria (dependiendo del tipo)	Materia orgánica Productos químicos Color Detergentes Sales disueltas Tóxicos Agua caliente	Minería y movimientos de tierra	Sólidos en suspensión Limos y arcillas Agua ácida
Ganadería	Microorganismos Nutrientes (N y P) Materia orgánica Sólidos en suspensión	Lluvias en zonas urbanas	Polvos Compuestos orgánicos (con metales pesados de los combustibles) Sólidos en suspensión

Fuente: Fernández 2002.

### 3.3 Contaminación microbiológica del agua

El agua presenta una serie de características físicas, químicas y bacteriológicas que determinan lo que se denomina “calidad del agua” (Ceruti 1983). Estas últimas tienen la mayor importancia para el tipo de uso que se le pueda dar al agua (Chile 2005<sup>b</sup>). Históricamente la “calidad microbiológica” se ha usado como indicador de seguridad respecto a la posible transmisión de enfermedades infecciosas en aguas destinadas a usos específicos (Pipes 1982).

Según la clase de agua varía la composición de la flora bacteriana, dependiendo principalmente de la concentración de sales, sustancias orgánicas, enturbiamiento y temperatura. En la mayoría de las aguas predominan las bacterias gram negativas y de ellas es de gran interés el reconocimiento de bacterias indicadoras de contaminación fecal, por el riesgo de que las aguas contengan otras bacterias intestinales patógenas para el hombre. Las bacterias que se encuentran con mayor frecuencia en el agua, son las bacterias entéricas que colonizan el tracto gastrointestinal del hombre y animales de sangre caliente (Rheinheimer 1987, Campos 2003).

En Chile, a fines del año 1999 se regaban aproximadamente 600 mil hectáreas con aguas servidas o contaminadas por fecas, con serias repercusiones para la salud de las personas. Sólo después de la emergencia del cólera, en 1992, medidas especiales de control contribuyeron a una disminución del tifus y la hepatitis, ambas enfermedades que se transmiten a través del agua y los alimentos contaminados con heces humanas (Matus y col 2004). Otra fuente importante de contaminación microbiológica son los Residuos Industriales Líquidos (Riles). A diciembre de 2007 la Superintendencia de Servicios Sanitarios (SISS) estimaba que existían más de 3 mil establecimientos industriales generadores de riles que los descargaban a cursos de agua superficiales continentales. A esa fecha el 88, 3% de dichos establecimientos, dieron pleno cumplimiento a la normativa vigente (Chile 2008<sup>b</sup>).

Los requisitos de calidad bacteriológica del agua para los distintos usos según la norma chilena vigente son:

- Agua para consumo humano: debe estar exenta de microorganismos de origen fecal, cuya presencia se establece en base a la determinación de gérmenes del grupo coliforme (Chile 2005<sup>b</sup>).
- Agua para riego: el contenido de coliformes fecales en aguas de riego destinadas al cultivo de verduras y frutas que se desarrolla a ras de suelo y que habitualmente se consumen en estado crudo, debe ser menor o igual a 1000 NMP/ 100 ml (Chile 1999).
- Agua destinada a recreación con contacto directo (natación, buceo, esquí acuático) debe cumplir con una cantidad de coliformes fecales de 1000 NMP/ 100 ml como máximo (Chile 1999).

### **3.4 Indicadores biológicos de contaminación fecal**

#### **3.4.1 Microorganismos patógenos**

Los microorganismos patógenos pueden proceder de residuos humanos o pueden estar presentes en el suelo y/o el agua. Las bacterias fecales, tanto patógenas como simplemente indicadoras de contaminación, no se desarrollan bien en estos nuevos ambientes como suelo o agua, ya que el hábitat natural de muchos de estos microorganismos es el tracto intestinal de animales de sangre caliente (Campos 2003).

Estos microorganismos alóctonos o introducidos, se incorporan constantemente a los ambientes naturales como parte de los residuos humanos y animales a través de los materiales de las aguas residuales. Se ha observado que a temperaturas extremadamente bajas, incluso las de congelación, el tiempo de supervivencia de estas bacterias aumenta considerablemente (Prescott y col 2000).

La contaminación del agua con residuos fecales humanos es fuente de una amplia variedad de enfermedades bacterianas, víricas y protozoarias. Aunque muchos de estos agentes patógenos pueden detectarse directamente, en microbiología ambiental se emplean generalmente los organismos indicadores como un marcador de contaminación posible del agua por agentes patógenos (Prescott y col 2004).

Los microorganismos indicadores son aquellos que tienen un comportamiento similar a los patógenos (concentración y reacción frente a factores ambientales y barreras artificiales), pero tienen un crecimiento más rápido, son más económicos y fáciles de identificar. Una vez que se ha evidenciado la presencia de grupos indicadores, se puede inferir que los microorganismos patógenos se encuentran en la misma concentración y que su comportamiento frente a distintos factores como pH, temperatura, presencia de nutrientes o sistemas de desinfección es similar a la del indicador (Campos 2003).

#### **3.4.2 Grupo coliforme**

El grupo coliforme está formado por varios géneros de bacterias que pertenecen a la familia *Enterobacteriaceae*. Estas bacterias constituyen aproximadamente el 10% de los microorganismos intestinales de los seres humanos y otros animales y se utilizan ampliamente como indicadores. Pierden viabilidad en agua dulce a una velocidad inferior a la mayoría de las bacterias patógenas. Cuando esta bacteria indicadora no se detecta en un volumen específico (100 ml) de agua, ésta se considera potable, lo que implica que sea adecuada para beber o adecuada para el consumo humano (Prescott y col 2004).

La definición histórica de este grupo se ha basado en el método de detección de fermentación de la lactosa. De esta forma el grupo es definido como bacterias anaerobias

facultativas, gram negativas, no esporuladas, con forma de bastón y que fermentan lactosa con formación de gas en 48 h a 35°C. Tradicionalmente, se han utilizado ensayos para la determinación de microorganismos indicadores más que para la determinación de patógenos. El grupo de bacterias coliformes es el principal indicador de calidad de los distintos tipos de agua y este índice se utiliza como criterio de contaminación y para determinar calidad sanitaria de la misma (Clesceri y col 2005).

### 3.4.3 Coliformes fecales

Los coliformes fecales y *E. coli* en particular, se han seleccionado como indicadores de contaminación fecal debido a su relación con el grupo tifoide- paratifoide y a su alta concentración en diferentes tipos de muestras. Los coliformes fecales se denominan termotolerantes por su capacidad de soportar temperaturas más elevadas, la cual es una forma apropiada de definir a este subgrupo que se diferencia de los coliformes totales por la característica de crecer y fermentar la lactosa a 44,5°C (Madigan y col 1997, Campos 2003).

Un método muy utilizado para el recuento de coliformes en agua es la técnica de fermentación en tubos múltiples, con la que se obtiene una estimación del Número Más Probable (NMP) de coliformes en dicha muestra (Clesceri y col 2005, Prescott y col 2004). Otros métodos que se describen son la técnica de filtración por membrana, la prueba de presencia-ausencia (P-A) para coliformes y la prueba de sustrato definido para detectar coliformes como *E. coli* (Prescott y col 2004, Chile 2007<sup>a</sup>).

### 3.4.4 Técnica de fermentación en tubos múltiples

Es una prueba estándar para el grupo coliforme que se aplica especialmente sobre aguas residuales y sedimentos no tratados y clorados; puede utilizarse también en aguas dulces y marinas. Esta técnica se realiza a través de las fases supuestas y confirmatorias (o prueba completa), los resultados del estudio de los tubos y diluciones replicadas se informan en términos de Número Más Probable (NMP) de microorganismos existentes. Este número, basado en determinadas fórmulas de probabilidad, es un cálculo de la densidad media de coliformes en la muestra.

La densidad bacteriana puede calcularse mediante la fórmula facilitada o por medio de la tabla que utiliza el número de tubos positivos en las diluciones múltiples. Las tablas de NMP se basan en la hipótesis de una distribución de Poisson (dispersión aleatoria). No obstante, si la muestra no se ha agitado adecuadamente o si existe agrupamiento de bacterias, el valor del NMP puede resultar menor que el número real de densidad bacteriana. No se debe considerar este método como un ejercicio estadístico, sino como un medio de valorar la densidad de coliformes en una muestra de agua y su calidad sanitaria (Clesceri y col 2005).

### 3.5 Aspectos relativos a la salud pública

La contaminación del agua de origen fecal puede venir acompañada de microorganismos patógenos dañinos para la salud humana. Las enfermedades asociadas a este tipo de contaminación son las llamadas entéricas: Cólera, Hepatitis A, Fiebre Tifoidea, Paratifoidea, Leptospirosis (Salazar 2003). Las personas que presentan mayor riesgo de contraer enfermedades transmitidas por el agua son los lactantes y los niños de corta edad, las personas debilitadas o que viven en condiciones antihigiénicas y los ancianos (OMS 2004).

El riesgo, tanto a nivel humano como ambiental, hace necesario un control de la presencia de microorganismos en el agua. Determinar el tipo de microorganismos presentes y su concentración, proporciona herramientas indispensables para conocer la calidad del agua y para la toma de decisiones en relación al control de vertidos, tratamientos de aguas y conservación de ecosistemas (Campos 2003).

#### **Cuadro 2. Situación Nacional de algunas Enfermedades de Notificación Obligatoria (ENO) relacionadas a la transmisión hídrica, casos y tasas de incidencia, Chile 2005-2007.**

Enfermedad	N° de casos notificados					
	2005		2006		2007	
	Casos	TIC	Casos	TIC	Casos	TIC
Cólera	0	0,0	0	0,0	0	0,0
Fiebre tifoidea y paratifoidea	488	3,0	357	2,2	233	1,4
Hepatitis A	2302	14,2	972	5,9	807	4,9
Leptospirosis	26	0,2	28	0,2	15	0,09

TIC: Tasa de incidencia acumulada por 100.000 habitantes

Fuente: Ministerio de Salud (Chile 2007<sup>b</sup>).

### 3.6 Área de estudio

#### 3.6.1 Río Cruces

El río Cruces junto al Calle Calle, corresponden a los ríos más grandes que componen la cuenca del río Valdivia. El río Cruces nace en la precordillera andina, en la vertiente occidental de los cerros situados entre los lagos Villarrica y Calafquén, drena la depresión de San José en la parte norte de la provincia de Valdivia, avanzando de Este a Oeste, hasta confluir con el río Calle Calle. En sus casi 125 km de recorrido, pasa por las ciudades de Loncoche, Lanco y San José de la Mariquina. Drena una superficie de 3.233 km<sup>2</sup>, lo cual corresponde al 30% de la cuenca del Río Valdivia (Chile 2004, Chile 2006<sup>a</sup>).

La subcuenca del río Cruces presenta un marcado régimen pluvial, ya que los mayores caudales se observan durante el período de lluvias invernales y los menores escurrimientos durante el período estival. En años húmedos los mayores caudales ocurren entre junio y agosto, producto de importantes aportes pluviales. En años normales y secos también se observa este claro régimen pluvial, con los mayores entre julio y septiembre. El período de menores caudales se observa en el trimestre dado por los meses de enero, febrero y marzo (Chile 2004).

**Cuadro 3: Valores de caudal medio en río Cruces, estación Rucaco en los días 30 de septiembre 2005, 31 de marzo 2006 y 31 de octubre 2006.**

	30 de septiembre 2005	31 de marzo 2006	23 de octubre 2006
Media caudal río Cruces Rucaco (m <sup>3</sup> /seg)	72.809	13.278	67.017

Fuente: Dirección General de Aguas (Chile 2008<sup>a</sup>).

De acuerdo a las estadísticas fluviométricas de la Dirección General de Aguas (DGA), medidas en la estación fluviométrica río Cruces en Rucaco, éste tiene un caudal medio anual del orden de 92 m<sup>3</sup>/s. Sus principales afluentes son los ríos Purulón, Naninhue, San Antonio, Cudico, Pichoy, Cayumapu, Chorocamayo y otros esteros menores (Chile 2004, Chile 2006). En cuanto a la temperatura del agua, ésta presenta escasa variabilidad temporal (con promedios cercanos a 10.8° C) (UACH 2008).

En la cuenca del río Cruces existe una serie de actividades que ejercen presión sobre la calidad de sus aguas. Se puede mencionar como ejemplo de éstas: la ganadería, el uso de embarcaciones motorizadas, la extracción de áridos y las descargas de diferentes efluentes líquidos (Chile 2006<sup>a</sup>).

### **Hipótesis:**

La contaminación fecal de las aguas superficiales del río Cruces, presenta variabilidad en el tramo Loncoche- San José de la Mariquina, siendo más alta en los lugares con mayor desarrollo de actividades.

### **Objetivos**

#### **Objetivo general:**

Evaluar la calidad microbiológica de las aguas del río Cruces, desde Loncoche hasta San José de la Mariquina.

#### **Objetivos Específicos:**

- Cuantificar coliformes totales y coliformes fecales en muestras de agua obtenidas en diez puntos del río Cruces, en el tramo Loncoche- San José de la Mariquina.
- Identificar los puntos de muestreo que presentan mayor grado de contaminación fecal y relacionarlos con las actividades productivas presentes en la zona.
- Analizar los resultados obtenidos, de acuerdo a la normativa vigente y actividades de borde de río asociadas al tramo de muestreo.

## 4. MATERIAL Y MÉTODOS

### 4.1 MATERIALES

- GPS sistema de posicionamiento global
- 25 frascos de vidrio estériles, de capacidad 1000 ml
- Muestreador manual
- Marcador indeleble
- Planilla de registro
- Nevera Coleman
- Gel pack
- Tubos de ensayo
- Campanas de Durham
- Caldo Lauryl Sulfato Triptosa L.S.T (concentración doble)
- Caldo Lauryl Sulfato Triptosa L.S.T (concentración simple)
- Caldo E.C
- Pipetas de 1 y 10 ml
- Gradillas
- Asas de micrón
- Mechero a gas
- Pistola auxiliar de pipeteado
- Alcohol 70° C
- Incubadora ( $35 \pm 0,5^\circ \text{C}$ )
- Baño termoregulado ( $44,5 \pm 0,2^\circ \text{C}$ )
- Autoclave
- Hornos de esterilización
- Tampón fosfato estéril para dilución

### 4.2 METODOLOGÍA

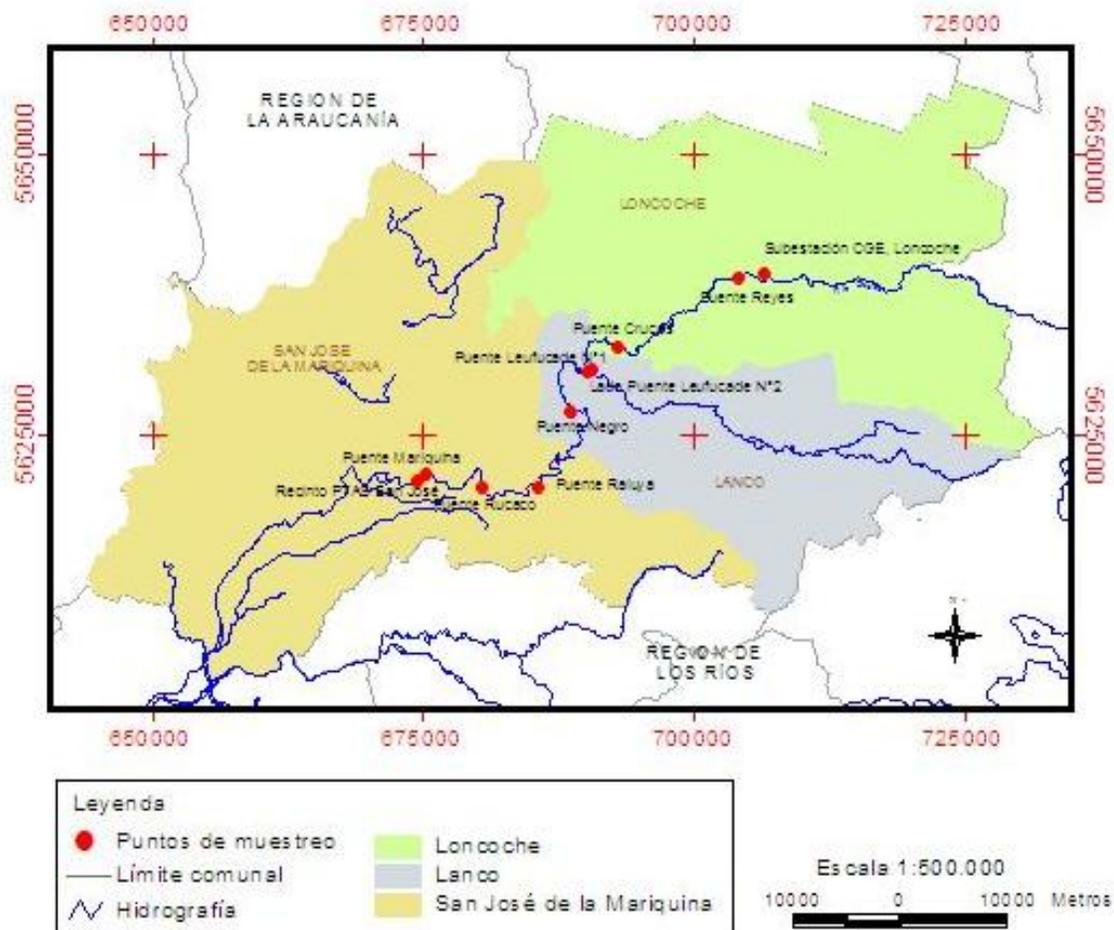
#### 4.2.1 Lugar de muestreo

El presente estudio se realizó en el río Cruces, en el tramo comprendido entre las localidades de Loncoche y San José de la Mariquina. En función a datos referenciales entregados por la autoridad sanitaria competente, CONAMA y visitas a la zona se establecieron 10 puntos de muestreo a lo largo del río, en dirección norte-sur. Dichos puntos fueron georreferenciados mediante el Sistema de Posicionamiento Global (GPS). Datum 84 y uso 18(Cuadro 4 y figura 1).

**Cuadro 4. Registro e identificación de los puntos de muestreo en el río Cruces, desde Loncoche hasta San José de la Mariquina.**

N° Punto	Nombre punto	Ubicación	Coordenadas
1	Subestación CGE, Loncoche	Ribera del río, aramo N° 1120.	18H:0706682 UTM:5639385
2	puente Reyes	Dentro de Loncoche, al lado de planta Loncoleche. Orilla del río	18H:0704273 UTM:5638934
3	puente Cruces	A 15 km de Loncoche, en ruta 5 antes de llegar a Lanco.	18H:0693004 UTM:5632733
4	puente Leufucade N° 1	Lanco, cerca de planta elevadora.	18H:0690740 UTM:5630845
5	puente Leufucade N° 2	Lanco, local de venta de tortillas, orilla del río.	18H:0690291 UTM:5630535
6	puente Negro	Ruta 5 sur. Al lado de un recinto para acampar.	18H:0688668 UTM:5626959
7	puente Raluya	Ciruelos, 2 km al interior.	18H:0685706 UTM:5620287
8	puente Rucaco	Ruta 5 sur. Después de celulosa Arauco.	18H:0680538 UTM:5620134
9	puente Mariquina	En la entrada a San José de la Mariquina.	18H:0675306 UTM:5621379
10	Recinto Planta de tratamiento de aguas servidas San José de la Mariquina	En San José de la Mariquina, 300 m al sur de la descarga de la planta.	18H:0674546 UTM:5620762

**Figura 1: Ubicación espacial de puntos de muestreo de agua superficial del río Cruces desde Loncoche hasta San José de la Mariquina.**



Se definió la frecuencia de toma de muestras, llevándose a cabo tres muestreos: el primero el día 30 de septiembre 2005, el segundo el 23 marzo 2006 y el tercero el 31 de octubre 2006, respectivamente. Las condiciones climáticas imperantes el día del primer muestreo correspondían a abundantes precipitaciones, el día del segundo muestreo estaba nublado variando a parcial y el tercer muestreo nublado con precipitaciones.

**Cuadro 5: Precipitaciones medidas en estación Valdivia (mm) en septiembre 2005, marzo 2006 y octubre 2006.**

Estación	Precipitaciones (mm) mensuales		
	septiembre 2005	marzo 2006	octubre 2006
Valdivia	135.6	73	159.9

Fuente: Dirección General de Aguas (Chile 2005, Chile 2006<sup>b</sup>, Chile 2006<sup>c</sup>).

#### 4.2.2 Obtención de las muestras:

La toma de muestras se realizó en frascos de vidrio de 1000 ml de capacidad limpios y esterilizados. De acuerdo a la accesibilidad, las muestras fueron tomadas desde los puentes o en lugares del río cuya profundidad fuera mayor a 30 cm, Al extraer las muestras el frasco se sumergió a 30cm, con la boca en sentido contra la corriente. Los frascos no fueron llenados hasta el tope y se cerraron herméticamente, de acuerdo a lo descrito en la Norma Chilena 411/6. Las muestras fueron tomadas en duplicado, cada muestra y contra muestra se identificó con el número del punto de muestreo con lápiz permanente.

Las muestras de agua se mantuvieron a una temperatura inferior a 10° C y el transporte hacia el Instituto de Medicina Preventiva Veterinaria se llevó a cabo en neveras y en un plazo de tiempo menor a 6 horas, según lo estipulado en “Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater” (Clesceri y col 2005).

#### 4.2.3 Recepción de las muestras y análisis de laboratorio:

Las muestras fueron recibidas en el Laboratorio de Microbiología del Instituto de Medicina Preventiva Veterinaria y luego se sometieron a la técnica de fermentación en tubos múltiple, para la realización del ensayo presuntivo en caldo Lauril Sulfato Triptosa y ensayo confirmativo para la cuantificación de coliformes fecales en caldo EC.

##### 4.2.3.1 Ensayo presuntivo en caldo Lauril Sulfato Triptosa (LST)

Se llevaron a cabo diluciones de la muestra:

Dilución 1:10 ( $10^{-1}$ ). Se tomó 1 ml de la muestra, previamente agitada y se depositó en un tubo de ensayo con 9 ml de agua de dilución estéril.

Dilución 1: 100 ( $10^{-2}$ ). De la dilución 1:10, se tomó 1 ml y fue depositado en un tubo de ensayo, con 9 ml de agua de dilución estéril. Luego:

- Se inocularon 5 tubos de fermentación con caldo L.S.T doble concentración con campana de Durham invertida, con 10 ml de la muestra.

- Se inocularon 5 tubos de fermentación con caldo L.S.T concentración simple con campana de Durham invertida, con 1 ml de la muestra.

- Se inocularon 5 tubos de fermentación con caldo L.S.T concentración simple con campana de Durham invertida, con 1 ml de la dilución 1:10 ( $10^{-1}$ ) de la muestra.

- y finalmente se inocularon 5 tubos de fermentación con caldo L.S.T concentración simple con campana de Durham invertida, con 1 ml de la dilución 1:100 ( $10^{-2}$ ) de la muestra.

Después los tubos fueron incubados a  $35^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$  por 24 a 48 h.

Lectura e interpretación: se examinaron los tubos a las 24 h, registrándose como positivo, el número de tubos por dilución que presentaron formación de gas y enturbiamiento. Se incubaron los tubos negativos hasta completar las 48 h. La ausencia de formación de gas a las 48 h de incubación, constituyó un ensayo negativo para los organismos del grupo coliforme.

Luego de la lectura de los tubos positivos se formó la clave y se procedió a la determinación del Número Más Probable (NMP) de coliformes totales/ 100 ml, empleando la tabla para el cálculo de NMP, los resultados obtenidos se registraron en una planilla, usando el programa Microsoft Excel 2003 (Anexo 1).

#### **4.2.3.2 Cuantificación de coliformes fecales, mediante técnica del número más probable (NMP)**

Los tubos que resultaron positivos al ensayo presuntivo, o sea que mostraron formación de gas y enturbiamiento del medio a las 24 y 48 de incubación a  $35^{\circ}\text{C}$  fueron sometidos al ensayo confirmativo.

Los tubos positivos del ensayo presuntivo se homogeneizaron por agitación. Se transfirió una asada completa del cultivo viable desde los tubos positivos del ensayo presuntivo, a un tubo de fermentación con campana de Durham invertida y con caldo EC. Luego estos tubos fueron incubados en el baño termorregulado a  $44,5^{\circ}\text{C} \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ .

Lectura e interpretación: Se registró la presencia o ausencia de formación de gas y enturbiamiento en los tubos de caldo EC, después de  $24 \pm 2$  h de incubación a  $44,5^{\circ} \text{C} \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ . Se consideraron como positivos a coliformes fecales aquellos tubos en que hubo producción de gas y enturbiamiento del medio dentro de dicho período de tiempo. Se registraron los tubos positivos a la prueba confirmativa y a partir de ellos se formó la clave para determinar el NMP de Coliformes Fecales /100 ml, según lo descrito en la Norma Chilena Oficial NCh 2313/22. Luego, los resultados obtenidos se registraron en una planilla, usando el programa Microsoft Excel 2003 (Anexo 2). Se eligió el valor máximo obtenido de cada muestra en duplicado, para situarse en el escenario más desfavorable posible desde el punto de vista de la contaminación microbiológica (Anexo 3 y 4).

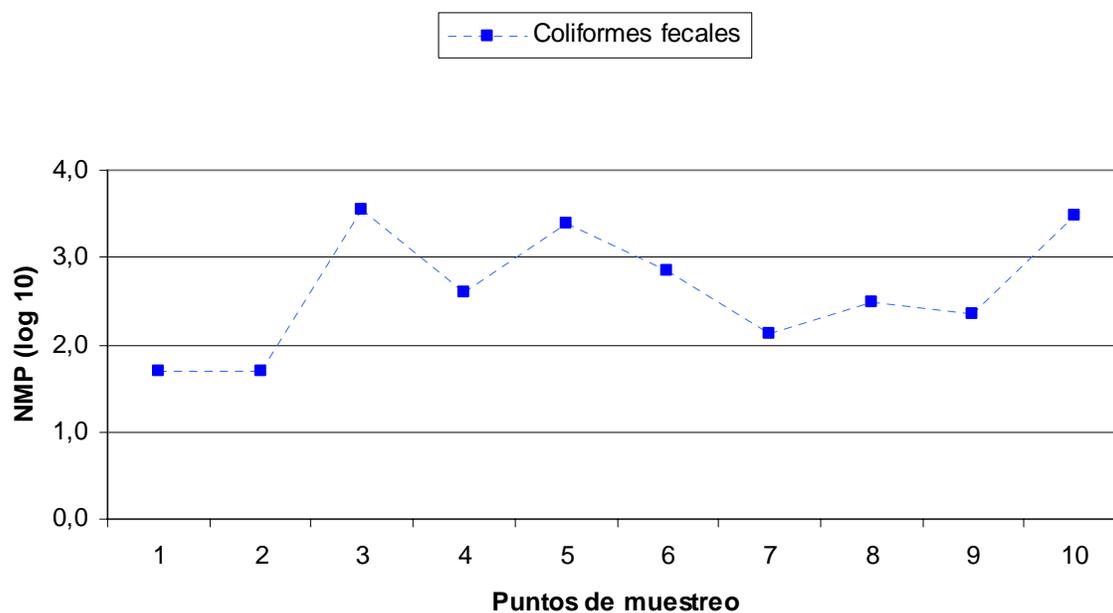
#### **4.2.3.3 Manejo de la información**

De cada una de las muestras de agua que fueron extraídas, se obtuvieron resultados de NMP de coliformes totales y fecales. Debido a los altos valores absolutos y a la amplia variedad numérica encontrada en los datos obtenidos, es que los valores fueron transformados a logaritmos de base 10 (Log10) para su normalización, facilitando su manejo y análisis. Además, para efectos de gráficos, aquellos datos cuantificados mayores a 16000 ( $>16.000$ ) fueron utilizados como valores absolutos.

Con los datos acerca de la ubicación espacial de los puntos de muestreo y los resultados obtenidos en cada punto se confeccionaron mapas con el programa ArcView 9.1.

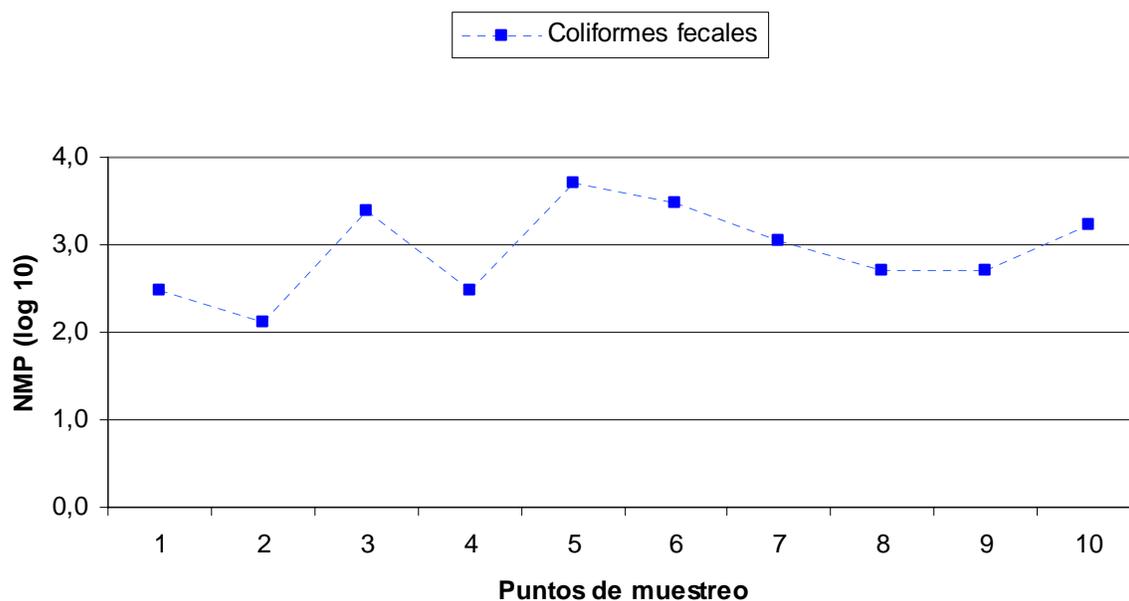
## 5. RESULTADOS

Las figuras 2, 3 y 4 presentan los resultados microbiológicos de muestras de agua superficial obtenida en 10 puntos del río Cruces en tres muestreos efectuados el 30 de septiembre 2005, 31 de marzo 2006 y 23 de octubre 2006, respectivamente.



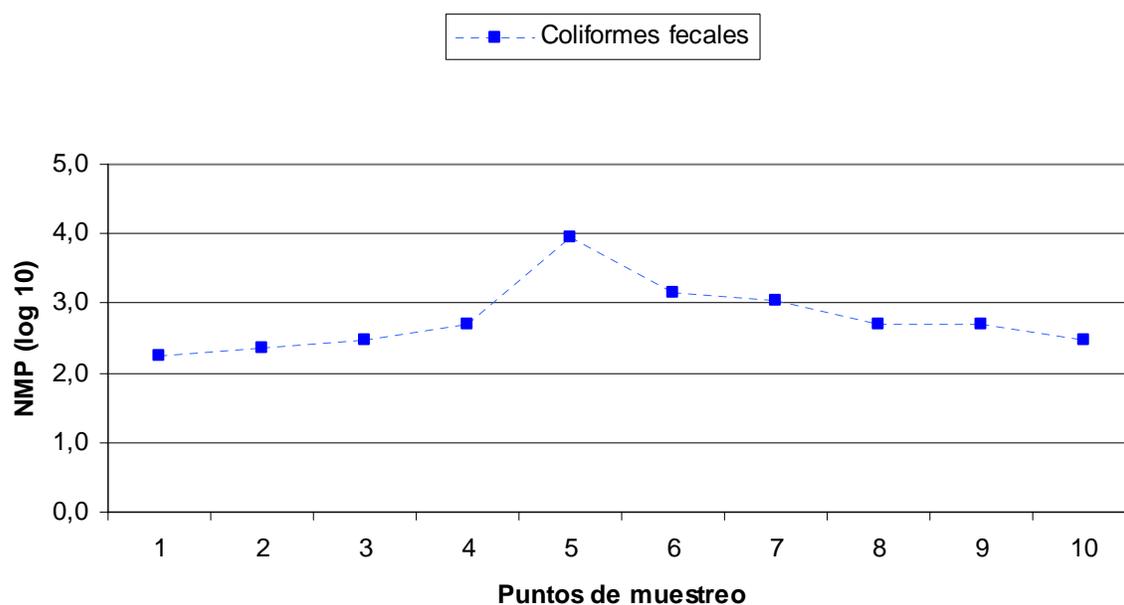
**Figura 2: Resultados microbiológicos correspondientes a muestras de agua superficial obtenidas en 10 puntos de muestreo el 30 de septiembre 2005 en el río Cruces, desde Loncoche hasta San José de la Mariquina.**

Los coliformes fecales alcanzan sus valores máximos en los puntos 3, 5 y 10, que corresponden a puente Cruces, puente Leufucade N° 2 y Recinto Planta de tratamiento de aguas servidas San José de la Mariquina, respectivamente. El punto 1 y 2 (Subestación CGE Loncoche y Puente Reyes) son los con menor NMP de coliformes fecales/ 100 ml.



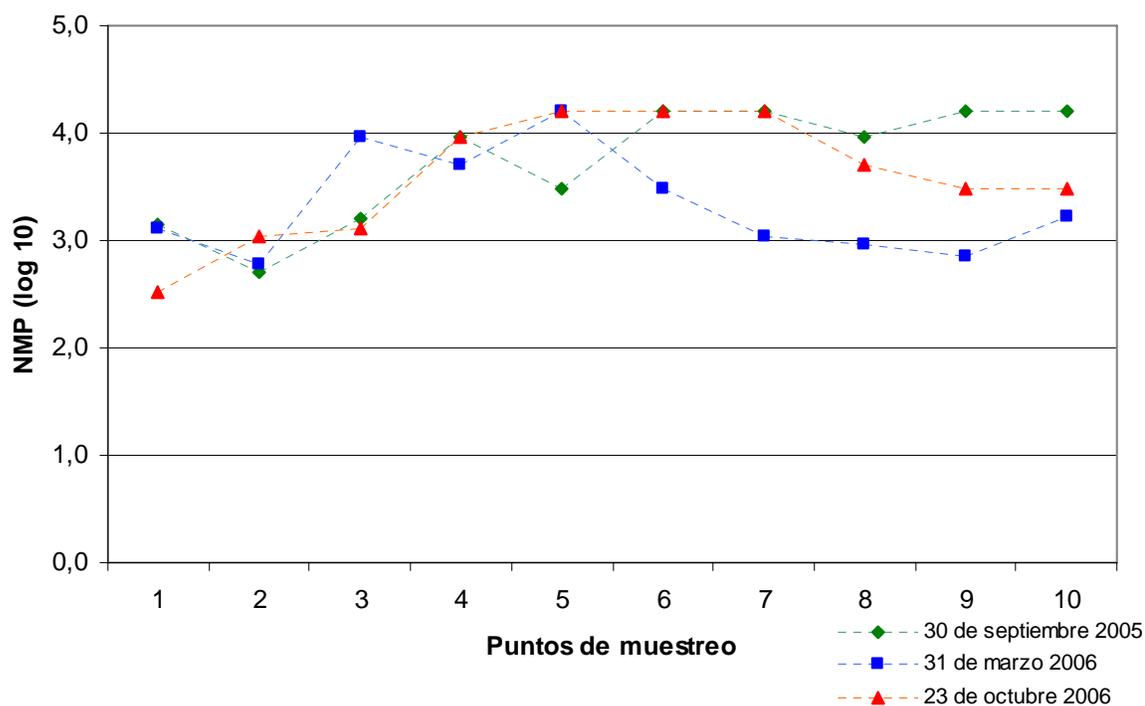
**Figura 3: Resultados microbiológicos correspondientes a muestras de agua superficial obtenidas en 10 puntos de muestreo el 31 de marzo 2006 en el río Cruces, desde Loncoche hasta San José de la Mariquina.**

En el segundo muestreo, el 31 de marzo 2006 los coliformes fecales alcanzan su valor máximo en el punto 5 (puente Leufucade N° 2), al igual que en el muestreo anterior. Luego del punto 5 tienden a disminuir hasta el punto 9 (puente Mariquina), para aumentar nuevamente en el punto 10 (Recinto Planta de tratamiento de aguas servidas San José de la Mariquina).



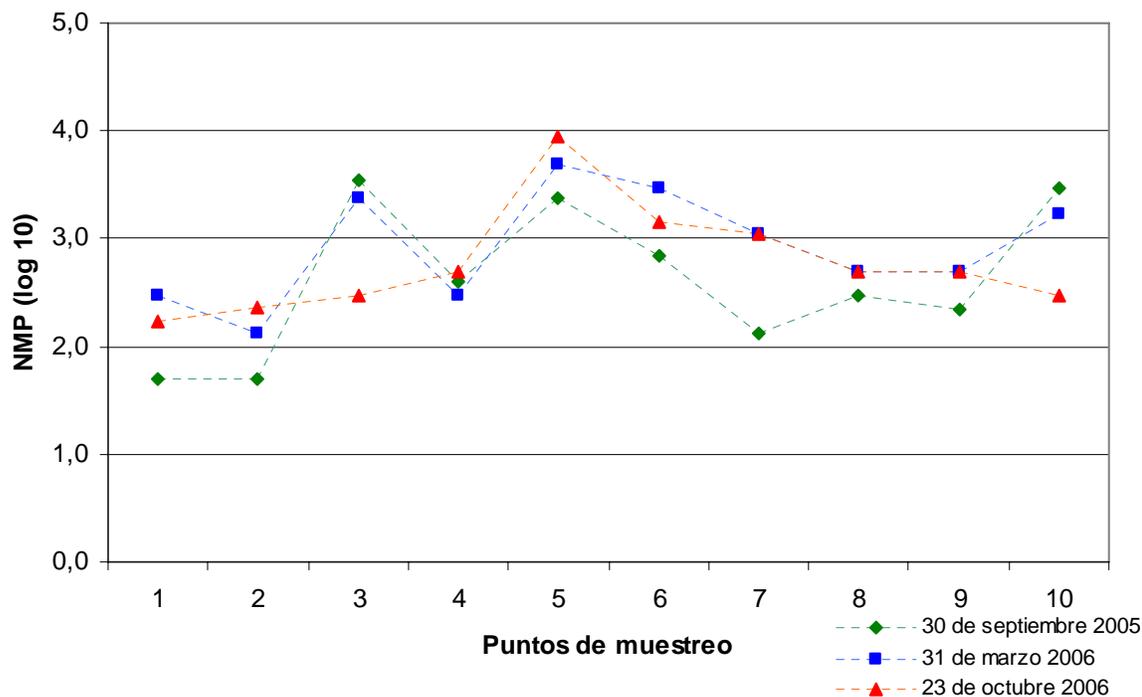
**Figura 4: Resultados microbiológicos correspondientes a muestras de agua superficial obtenidas en 10 puntos de muestreo el 23 de octubre 2006 en el río Cruces, desde Loncoche hasta San José de la Mariquina.**

En el tercer muestreo los coliformes fecales tienen valores bajos (menores a 3,0 Log 10) hasta el punto 4 (puente Leufucade N° 1) y en el punto siguiente (puente Leufucade N° 2) presentan su valor más alto, para mantener la tendencia a disminuir en los puntos posteriores.



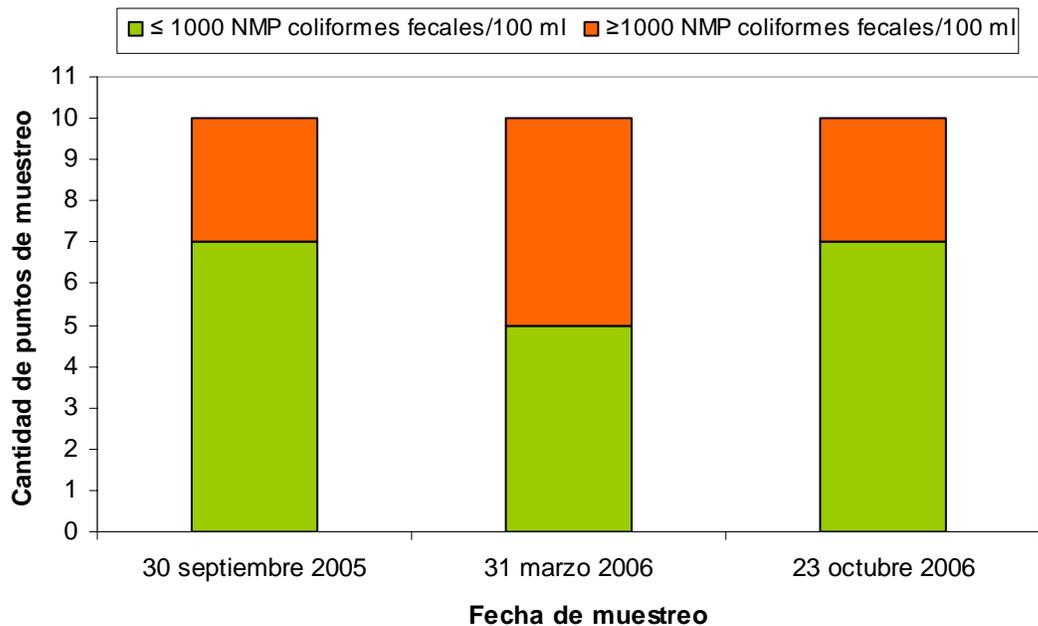
**Figura 5: Comportamiento de coliformes totales determinados en muestras de agua superficial en 10 puntos de muestreo en el río Cruces en los días 30 de septiembre 2005, 31 de marzo 2006 y 23 de octubre 2006.**

En la figura 5 se observa que los recuentos más bajos se presentan en los puntos 1 y 2 (Subestación CGE Loncoche y puente Reyes). El valor máximo en el segundo y tercer muestreo coincide en el punto 5 (puente Cruces), en la segunda campaña luego de este punto el NMP de coliformes totales presenta tendencia a disminuir. En el tercer muestreo, luego del punto 5 (puente Cruces) los recuentos se mantienen estables, sobre 4,2 Log 10 (16.000 NMP/100 ml) hasta el punto 7 (puente Raluya), en los puntos siguientes se observa que los valores disminuyen.



**Figura 6: Comportamiento de coliformes fecales determinados en muestras de agua superficial en 10 puntos de muestreo en el río Cruces obtenidas en los días 30 de septiembre 2005, 31 de marzo 2006 y 23 de octubre 2006.**

En la figura 6 se observa que los valores más bajos en los coliformes fecales coinciden en los tres muestreos en el punto 1 y 2 (Subestación CGE Loncoche y puente Reyes). Así como el punto 4 (puente Leufucade N° 1) presenta valores de coliformes fecales menores a 3 Log 10 (<1000 NMP/ 100 ml) en los tres muestreos. En el segundo muestreo el 31 de marzo 2006, el valor máximo se observa en el punto 5 (puente Leufucade N° 2), lo cual es coincidente con lo que ocurre en el tercer muestreo, el 23 de octubre 2006. En el punto 10 (Recinto Planta de tratamiento de aguas servidas San José de la Mariquina) se observa un aumento abrupto en los recuentos en el primer y segundo muestreo, lo cual no se presenta en el tercer muestreo.



**Figura 7: Frecuencia de puntos de muestreo de agua superficial del río Cruces que cumplen con la Norma Chilena 1333 de muestras obtenidas en los días 30 de septiembre 2005, 31 de marzo y 23 de octubre 2006.**

Para cumplir con la norma chilena 1333 la cantidad de coliformes fecales debe ser  $\leq 1000$  NMP/ 100 ml de agua. En septiembre de 2005 y octubre de 2006 se aprecia que 7 de los 10 puntos muestreados cumplen con la normativa vigente, lo que contrasta con los valores obtenidos en marzo 2006 en que la mitad de los puntos muestreados presentan valores conforme a lo exigido en la norma.

**Cuadro 6: Identificación de los puntos de muestreo, resultados microbiológicos y cumplimiento de la NCh 1333 (Chile 1999).**

	<b>30 de septiembre 2005</b>	<b>31 de marzo 2006</b>	<b>23 de octubre 2006</b>
<b>Punto de muestreo</b>	Máximo coliformes fecales NMP/ 100 ml	Máximo coliformes fecales NMP/ 100 ml	Máximo coliformes fecales NMP/ 100 ml
Subestación CGE, Loncoche	50	300	170
punto Reyes	50	130	230
punto Cruces	3500 *	2400 *	300
punto Leufucade N°1	400	300	500
punto Leufucade N°2	2400 *	5000 *	9000 *
punto Negro	700	3000 *	1400 *
punto Raluya	130	1100 *	1100 *
punto Rucaco	300	500	500
punto Mariquina (Pre PTAS)	220	500	500
Recinto PTAS San José	3000 *	1700 *	300

**\*Valores sobre lo permitido en la NCh 1333 (Chile 1999)**

En el primer muestreo llevado a cabo el 30 de septiembre 2005, el valor más alto corresponde al punto Cruces con 3500 NMP de coliformes fecales/ 100ml de agua y el valor mínimo es de 50 NMP de coliformes fecales/ 100 ml de agua en los puntos Subestación CGE Loncoche y punto Reyes. En el segundo muestreo del día 31 de marzo 2006 el máximo valor es de 5000 NMP de coliformes fecales/ 100 ml de agua en el punto punto Leufucade N° 2 y el mínimo es de 130 NMP de coliformes fecales/ 100 ml de agua en el punto punto Reyes. En el tercer muestreo realizado el 23 de octubre 2006, el valor máximo se observa en el punto punto Leufucade N° 2 con 9000 NMP de coliformes fecales/ 100 ml de agua, siendo éste el valor más alto de los tres muestreos. El mínimo en este muestreo es de 170 NMP de coliformes fecales /100 ml de agua en el punto Subestación CGE Loncoche. En cuanto a los caudales el máximo se presentó el mes de septiembre 2006 con un promedio de 72.809 m<sup>3</sup>/seg y el mínimo el mes de marzo 2006 con un promedio de 13.278 m<sup>3</sup>/seg.

**Cuadro 7: Listado de algunas actividades productivas relacionadas al río Cruces en Loncoche, Lanco y San José de la Mariquina.**

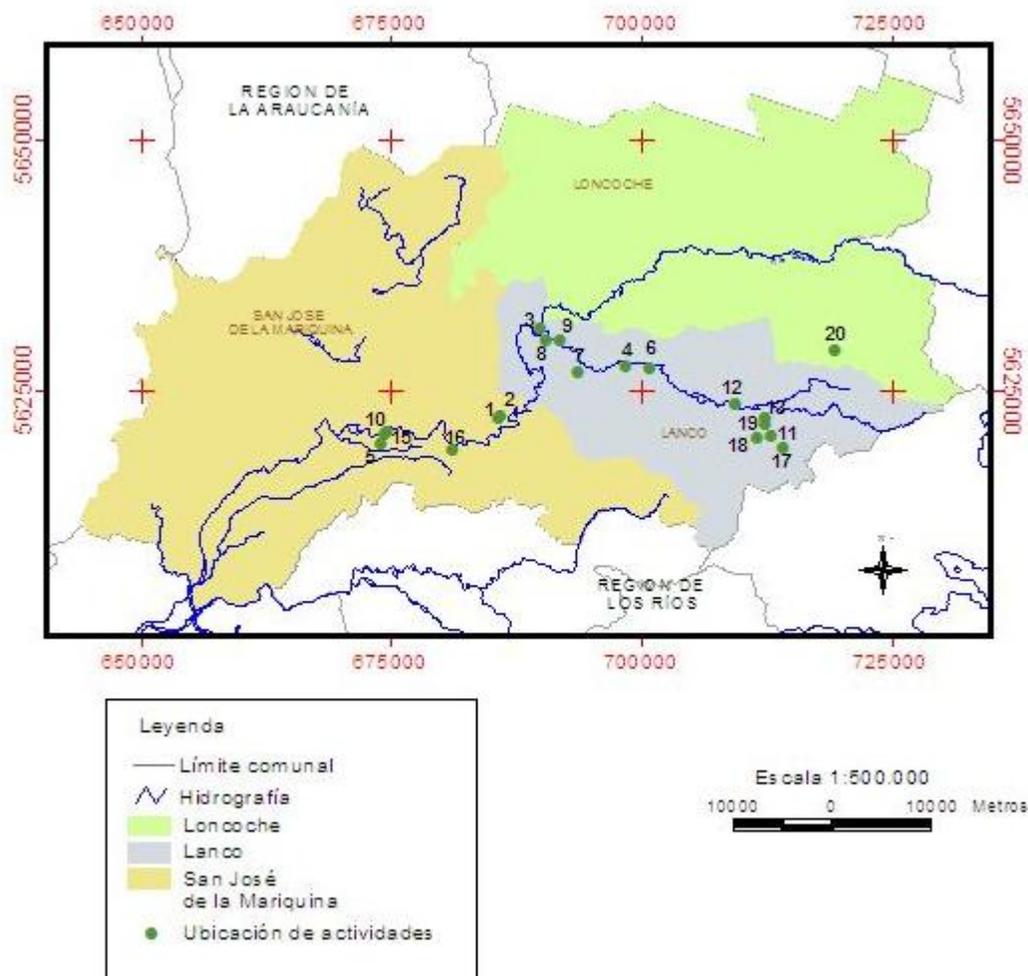
	<b>ACTIVIDAD PRODUCTIVA</b>	<b>UTM</b>		<b>COMUNA</b>
<b>1</b>	Aserradero Los Coihues y Manufactura Tres pinos	685636	5622305	San José de la Mariquina
<b>2</b>	Cancha de acopio de madera	685921	5622420	Lanco
<b>3</b>	Desagüe de planta de Riles Cran Chile	689921	5631237	Lanco
<b>4</b>	Esc Básica, Santa Elisa y Liceo Agrícola Purulón	698340	5627278	Lanco
<b>5</b>	Extracción de aridos Pirineo	673955	5619547	San José de la Mariquina
<b>6</b>	Lechería Fundo Carmencita	700807	5627257	Lanco
<b>7</b>	Lechería Fundo Santa Margarita	693645	5626765	Lanco
<b>8</b>	Lechería Fundo Santa María	690443	5629945	Lanco
<b>9</b>	Lechería Los Copihues	691967	5630057	Lanco
<b>10</b>	Matadero San José de la Mariquina	674493	5620841	San José de la Mariquina
<b>11</b>	Planta de Tratamiento de Aguas Servidas Malalhue	712968	5620335	Lanco
<b>12</b>	Producción Ganadera Estabulada Fundo Quilche	709434	5623622	Lanco
<b>13</b>	Vertedero comuna Lanco	712418	5622123	Lanco
<b>14</b>	Planta de tratamiento de Aguas Servidas Loncoche	702585	5683893	Loncoche
<b>15</b>	Planta de tratamiento de Aguas Servidas San José de la Mariquina	674333	5620524	San José de la Mariquina
<b>16</b>	Planta de celulosa Arauco S.A CELCO	681099	5618999	San José de la Mariquina
<b>17</b>	Pozo áridos predio Chaignal	714088	5619304	Lanco
<b>18</b>	Pozo áridos Nalalhue	711511	5620267	Lanco
<b>19</b>	Pozo áridos Lllancapicún	712379	5621611	Lanco
<b>20</b>	Planta de tratamiento de Aguas Servidas Lanco	719396	5628996	Lanco

Fuente: Chile, 2005-2006.

La comuna de Lanco es la que presenta el mayor número de actividades relacionadas al río Cruces, siendo predominante el uso extractivo (pozos de áridos). Dos plantas de tratamiento de aguas servidas se registran en este tramo del río.

Las lecherías se encuentran principalmente en la comuna de San José de la Mariquina y en ésta además se observa la presencia de un matadero.

**Figura 8: Ubicación de actividades productivas asociadas al río Cruces en el tramo Loncoche- San José de la Mariquina.**



Se observa que las actividades se concentran en la localidad de Lanco, pese a ser la localidad de menor área. El río Cruces confluye con el río Leufucade, el cual presenta numerosas actividades de borde de río. Además se aprecia claramente el recorrido del río Cruces con dirección de norte a sur.

## 6. DISCUSIÓN

En el presente estudio se analizaron un total de 60 muestras de aguas superficiales del río Cruces correspondientes a 10 puntos de muestreo desde Loncoche hasta San José de la Mariquina.

En general en los tres muestreos realizados, los coliformes totales tienden a ser mayores que los fecales, lo que lleva a pensar que siempre se presenta esa tendencia. A excepción del punto 3 (puente Cruces) en el primer muestreo en que los coliformes fecales superan a los totales. Esto se debe a la variabilidad de la técnica, ya que se basa en la probabilidad de transferir células bacterianas en una asada de muestra, por lo que al no haber una adecuada agitación de la muestra podría no ocurrir dicha transferencia (Prescott y col 2004). Además, las curvas tanto de los coliformes totales como fecales no presentan una tendencia definida en el tramo Loncoche- San José de la Mariquina del río Cruces, relacionándose directamente los aumentos de tales bacterias con el mayor número de actividades productivas de borde de río asociadas a dicho tramo.

En estudios similares realizados en el río Aconcagua, provincia de San Felipe, Región de Valparaíso, se encontraron niveles de coliformes totales y fecales que superan en algunos puntos los 160.000 NMP/100 ml, tanto en verano como invierno, lo que no ocurre en las muestras del río Cruces, cuyos valores máximos llegan a  $\geq 16.000$  NMP/ 100 ml en coliformes totales y 9.000 NMP/100 ml en coliformes fecales. Lo anterior puede atribuirse a que la cuenca del Aconcagua presenta mayor intervención antrópica, asentamientos humanos con mayor número de habitantes, superior número de plantas de tratamiento de aguas servidas y algunas de ellas en mal funcionamiento (Lara 2003, Levi 2003).

El río Aconcagua presenta sus mayores caudales en octubre, noviembre y diciembre, ya que comienzan los deshielos. Por este efecto de dilución los niveles de contaminación microbiológica son menores en esos meses. Situación opuesta al río Cruces que según antecedentes aportados por la DGA, presenta sus mayores caudales en invierno. Independiente del régimen del río, el Aconcagua presentó mayores niveles de contaminación microbiológica a lo largo de todo el año (Levi 2003). El caudal del río Cruces sufre variaciones, alcanzando el máximo de 72.809 mm<sup>3</sup>/ seg el 30 de septiembre 2005, 67.017 mm<sup>3</sup>/ seg el 23 de octubre 2006 y el mínimo de 13.278 mm<sup>3</sup>/ seg el 31 de marzo 2006 en el periodo de este estudio. Relacionado a lo anterior están las precipitaciones que fueron mayores en el primer y tercer muestreo (135,6 mm y 159,9 mm, respectivamente) y sólo 73 mm en el segundo muestreo. Por lo anterior el efecto de dilución de microorganismos fecales es mayor en el primer y tercer muestreo (Lara 2003, Alfaro y Salazar 2005).

Según la Dirección General de Aguas y el Servicio de Salud los usos del agua de este río son: recreacional, riego, actividad industrial y biodiversidad, por lo que la concentración de

coliformes fecales debe ser menor o igual a 1.000 NMP/ 100 ml de agua (Chile 1999). Según los resultados de este estudio, se evidencia que en el primer y tercer muestreo, (efectuados el 30 de septiembre 2005 y 23 de octubre de 2006, respectivamente) siete puntos de un total de 10 cumplen con la norma, situación que no ocurre de la misma forma en el segundo muestreo, en que el 50 % de los puntos no cumplen con la misma. Lo que implica que en marzo la población tuvo mayor riesgo de contraer alguna enfermedad de origen hídrico. Lo anterior puede atribuirse a que en invierno aumentan las precipitaciones y el río presenta su mayor caudal (Clesceri y col 2005, Chile 2004).

En cuanto a las actividades productivas relacionadas con el río, la clase de los principales efluentes son: derivados de la industria del papel, derivados de la remoción de áridos, derivados de la actividad láctea y derivados de las redes cloacales municipales (Di Marzio y McInnes 2005). Lo anterior concuerda con el catastro de CONAMA y el seguimiento y fiscalización de los proyectos que efectúa el departamento de medio ambiente del Servicio de Salud de Valdivia. Cabe destacar que no se tiene registro de las coordenadas geográficas de todas las actividades productivas asociadas al río Cruces, lo que es fundamental para la confección de mapas.

Al relacionar espacialmente dichas actividades con los puntos de muestreo de agua superficial del río Cruces se observó que los puntos 1 y 2, Subestación CGE Loncoche y puente Reyes son los que presentan los valores mínimos en los tres muestreos, aumentando entre una y otra. Asociado a estos puntos está la planta de Loncoleche, lo que evidencia el buen manejo de Riles en dicha empresa y el cumplimiento con la norma, sobretodo en el primer muestreo.

El punto 3, puente Cruces, presenta valores sobre lo que estipula la norma, lo que puede explicarse por la presencia de una lechería. En este mismo punto en la tercera campaña, los coliformes fecales alcanzan un valor 10 veces más bajo que en el primer muestreo. La muestra del puente Leufucade N°1 en todas las campañas cumple con lo exigido, pero presenta tendencia al alza. En el siguiente punto, puente Leufucade N°2, los valores son los más altos observados en toda la investigación, siempre sobre lo permitido y con una fuerte tendencia al alza, que se refleja en los 9.000 NMP/100 ml de coliformes fecales en el último muestreo. Lo anterior se debe a que en ese punto confluyen el río Cruces y el río Leufucade. Éste último contribuye a elevar la carga microbiológica debido a que presenta un fuerte impacto antrópico, registrándose actividades de distintos rubros, predominando la actividad lechera.

Los puntos 7 y 8, son pre y post planta de celulosa respectivamente, (puente Raluya y Rucaco) observándose valores sobre lo permitido en el puente Raluya en las dos últimas campañas, los cuales descienden en un 50% en el puente Rucaco. Las actividades productivas relacionadas a estos puntos de muestreo son aserradero, cancha de acopio de madera y planta de celulosa, las cuales desde el punto de vista microbiológico no generan un impacto negativo. Los puntos 9 y 10 (puente Mariquina y Recinto Planta de Tratamiento de Aguas Servidas San José de la Mariquina) se encuentran pre y post PTAS de San José de la Mariquina. En el primer muestreo los coliformes fecales alcanzan los 3.000 NMP/ 100 ml, lo que además de no cumplir con la norma es inaceptable para una PTAS, cuyo objetivo es reducir al mínimo el

impacto ambiental que genera la descarga de aguas tratadas. Tal situación fue verificada en terreno y además, en el Informe de Gestión del Sector Sanitario 2006 de la Superintendencia de Servicios Sanitarios consta que la empresa sanitaria a cargo fue sancionada en ese año por incumplimiento a los límites máximos de emisión de la calidad del efluente de la PTAS de San José de la Mariquina en los parámetros coliformes fecales y pH. Además, en este tramo se ubica el matadero de San José de la Mariquina, que descarga sus riles con abundante materia orgánica y microorganismos fecales al río. En el tercer muestreo los niveles descienden notablemente, alcanzando los 300 NMP/100 ml, conforme a lo impuesto por la norma (Chile 2007<sup>c</sup>).

La localidad de Lanco, es la que registra el mayor número de actividades productivas relacionadas al río Cruces, siendo predominante el uso extractivo (pozos de áridos) y el rubro lechero. Las PTAS de San José de la Mariquina y Lanco vierten sus efluentes en este tramo del río, actividad que afecta la calidad microbiológica del cuerpo receptor, lo que concuerda con estudios llevados a cabo en la cuenca del río Sena, Francia, en que constataron que el deterioro de ese curso de debía fundamentalmente a los efluentes de tales plantas. Asociado a tales descargas está la densidad de población de las ciudades o localidades vinculadas al curso de agua, ya que a mayor población, mayor volumen de descarga de aguas servidas. En áreas urbanas la fuente principal de bacterias fecales consiste en los efluentes de las PTAS y en el área rural la agricultura (Booth y col 2003, Servais y col 2007).

Las fuentes de contaminación del río en estudio corresponden a fuentes puntuales (PTAS, lecherías, matadero, etc), las que están plenamente identificadas, registradas y son monitoreadas y fiscalizadas por la entidad competente, lo que no ocurre con las fuentes no puntuales, tales como: la lixiviación de materia fecal principalmente desde predios agrícolas y lecheros y el arrastre debido a las precipitaciones. La cuantificación de la contaminación fecal de ríos por fuentes no puntuales es relativamente difícil y por lo tanto, son escasas las publicaciones al respecto (Alfaro y Salazar 2005, Servais y col 2007). En la zona de estudio las precipitaciones son abundantes, lo que favorece la escorrentía superficial y la filtración por la tierra de estiércol y purines provenientes de la actividad ganadera y lechera lo que genera un fuerte impacto negativo en la calidad microbiológica río Cruces. Debido a esto es fundamental investigar este tipo de contaminación, sobretodo en la Región de los Ríos, en que se concentra parte importante de la población bovina del país.

### **Conclusiones:**

La contaminación por coliformes fecales en el río Cruces varía de un punto a otro, de acuerdo a las actividades productivas que estén asociadas a dicho tramo, siendo mayor en los puntos relacionados a PTAS y lecherías.

En el segundo muestreo llevado a cabo el 31 de marzo 2006, los niveles de coliformes fecales en el tramo Loncoche- San José de la Mariquina son mayores que en primer muestreo

el 30 de septiembre 2005 y que en el tercer muestreo el 23 de octubre 2006, debido a que las precipitaciones son menores y el caudal es menor.

Independiente de las fechas de muestreo, hay puntos en el tramo muestreado que permanentemente presentan niveles de coliformes fecales sobre 1.000 NMP/100 ml, lo que implica el no cumplimiento de la norma y por ende se incrementa el riesgo de contraer enfermedades de origen hídrico en la población expuesta.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

- Alfaro M, F Salazar. 2005. Ganadería y contaminación difusa, implicancias para el sur de Chile. *Agricultura Técnica* 3, 330-340.
- Antón D, C Díaz. 2000. Sequía en un mundo de agua. Ed. Piriguazú. Toluca, México. Pp166-168.
- Booth A, C Hagerdorn, A Graves, S Hagedorn, K Mentz. 2003. Sources of Fecal Pollution in Virginia's Blackwater River. *J Environ Eng* 129, 547- 552.
- Brock T, J Martinko, J Parker. 2000. Brock biology of microorganism. 9<sup>th</sup> ed. Prentice Hall Upper Saddle River. New Jersey, United States.
- Campos C. 2003. Agua potable para comunidades rurales, reuso y tratamientos avanzados de aguas residuales domésticas. Cap 20. Ed Red Iberoamericana de Potabilización y depuración del agua (RIPDA- CYTED) y Centro Interamericano de Recursos del Agua, Facultad de Ciencias de la Ingeniería de la Universidad Autónoma del Estado de México. México.
- Ceruti L. 1983. Calidad del agua. Importancia del establecimiento de normas para prevenir la contaminación. 3º Simposio sobre contaminación ambiental orientado al recurso agua. Santiago, Chile.
- Chile. 1995. Instituto Nacional de Normalización (INN). Norma Chilena de Aguas Residuales- Métodos de análisis- Parte 22: Determinación de coliformes fecales en medio EC. NCh. 2313/22. Of. 1995. Santiago, Chile.
- Chile. 1997. Ministerio de Obras Públicas. Superintendencia de Servicios Sanitarios (SISS). Actualización del catastro nacional de descargas de residuos industriales líquidos. Santiago, Chile.
- Chile. 1998<sup>a</sup>. Ministerio de Planificación (MIDEPLAN). Cuencas hidrográficas en Chile: diagnóstico y proyectos. Santiago, Chile.
- Chile. 1998<sup>b</sup>. Instituto Nacional de Normalización (INN). Norma Chilena de Calidad de agua- Muestreo- Parte 6: Guía para el muestreo de ríos y cursos de agua. NCh. 411/6. Of. 1998. Santiago, Chile.
- Chile. 1999. Instituto Nacional de Normalización (INN). Norma Chilena: Requisitos de calidad del agua para diferentes usos. NCh 1333. Of. 1999. Santiago, Chile

- Chile. 2004. Ministerio de Obras Públicas. Dirección General de Aguas. Gobierno de Chile (DGA). Diagnóstico y clasificación de los cuerpos de agua, según objetivos de calidad, Cuenca Río Valdivia. Santiago, Chile.
- Chile. 2005- 2006. Comisión Nacional del Medio Ambiente (CONAMA). Catastro de actividades relacionadas al río Cruces, Región de los Ríos. Valdivia, Chile.
- Chile. 2005<sup>a</sup>. Comisión Nacional de Medio Ambiente (CONAMA). Recursos Hídricos. Disponible en: <http://www.conama.cl/portal/1255/article-26359.html>
- Chile. 2005<sup>b</sup>. Instituto Nacional de Normalización (INN). Norma Chilena para Agua Potable. NCh. 409.Of. 2005. Santiago, Chile.
- Chile. 2005<sup>c</sup>. Gobierno de Chile. Ministerio de Obras Públicas. Dirección General de Aguas (DGA). Información pluviométrica, fluviométrica, estado de embalses y aguas subterráneas. Informe pluviométrico nacional, Boletín n° 329. Pp 1-3.
- Chile. 2006<sup>a</sup>. Comisión Nacional del Medio Ambiente. Anteproyecto de Normas Secundarias de Calidad Ambiental para la Protección de las Aguas del Río Cruces. Santiago, Chile.
- Chile. 2006<sup>b</sup>. Gobierno de Chile. Ministerio de Obras Públicas. Dirección General de Aguas (DGA). Información pluviométrica, fluviométrica, estado de embalses y aguas subterráneas. Informe pluviométrico nacional, Boletín n° 335. Pp 1-2.
- Chile. 2006<sup>c</sup>. Gobierno de Chile. Ministerio de Obras Públicas. Dirección General de Aguas (DGA). Información pluviométrica, fluviométrica, estado de embalses y aguas subterráneas. Informe pluviométrico nacional, Boletín n° 342. Pp 1-2.
- Chile. 2007<sup>a</sup>. Gobierno de Chile. Superintendencia de Servicios Sanitarios (SIIS). Manual de métodos de ensayo para agua potable. 2<sup>a</sup> ed. Santiago, Chile
- Chile. 2007<sup>b</sup>. Ministerio de Salud. Boletín Epidemiológico Mensual de Vigilancia Epidemiológica El Vigía n° 59. Santiago, Chile.
- Chile. 2007<sup>c</sup>. Gobierno de Chile. Superintendencia de Servicios Sanitarios (SISS). Unidad de Gestión y Desarrollo. Informe de Gestión del Sector Sanitario año 2006. Pp 98-99.
- Chile. 2008<sup>a</sup>. Gobierno de Chile Ministerio de Obras Públicas. Dirección General de Aguas. (DGA). Departamento de Hidrología. Servicios satelitales en tiempo real. Valores de caudal medio río Cruces, estación Rucaco.
- Chile. 2008<sup>b</sup>. Gobierno de Chile. Superintendencia de Servicios Sanitarios (SISS). Unidad de Gestión y Desarrollo. Informe de Gestión del Sector Sanitario año 2007. Pp 114-115.

- Clesceri L, A Greenberg, A Eaton. 2005. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 21<sup>th</sup> ed. Washington D.C. United States.
- Crovetto N. 2004. Instituto de Medio Ambiente. Universidad de la Frontera. Sistema de Información Ambiental de la IX región de Chile. Temuco, Chile.
- Fernández A. 2002. Calidad de agua-calidad de vida. X Conferencia Científica CYTED. Santo Domingo, República Dominicana.
- Lara M. 2003. Evaluación ecotoxicológica de las aguas superficiales de la cuenca del río Aconcagua en las localidades de El Melón, la Calera y Quillota. *Tesis de Grado*. Escuela de Medicina Veterinaria, Universidad Mayor, Santiago, Chile.
- Levi J. 2003. Contribución al establecimiento de una situación diagnóstica del grado de contaminación fecal de las aguas superficiales en la cuenca del río Aconcagua, Provincia de San Felipe. *Tesis de Grado*. Escuela de Medicina Veterinaria, Universidad Mayor, Santiago, Chile.
- Madigan M, J Martinku, J Parker. 1997. Biología de los microorganismos. 8<sup>a</sup> ed. Ed Prentice Hall. Madrid, España. Pp 986- 990.
- Matus N. 1998. Crisis y Sustentabilidad en la Gestión de las Aguas en Chile, realizado para el Programa Chile Sustentable. Ed. LOM. Santiago, Chile.
- Matus N, B Fernández, M Aedo, S Larraín. 2004. Recursos hídricos en Chile: Desafíos para la sustentabilidad. Ed. LOM. Santiago, Chile. Pp 11- 13.
- OMS, Organización Mundial de la Salud. 2004. Guías para la calidad del agua potable. 3<sup>a</sup> ed. Volumen I. Ginebra, Suiza. Pp 14- 16.
- ONGLEY, E. 1997. Lucha Contra La Contaminación Agrícola de los Recursos Hídricos. Estudios FAO: Riego y drenaje - 55. Ed: Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Roma, Italia. Pp 5-19.
- Parra O .1996. El río Bío-Bío “Elemento base del desarrollo de la Región”. Cuadernos del Bío- Bío. n° 5. Ediciones Universidad de Concepción, Chile. Pp 1-83.
- Peña H. 2001. Construyendo alianzas estratégicas en Sudamérica. *Confluencias: Noticias de la Asociación Mundial del agua (GWP)* 1, 1-3.
- Pipes W.1982. Bacterials indicators of pollution. CRC Press. Florida, Estados Unidos.
- Prescott L, J Harley, D Klein. 2004. Microorganismos en ambientes acuáticos en: Microbiología. Ed. Mc Graw Hill. 5<sup>a</sup> ed. Madrid, España. Pp 683-713.

- Prescott L, J Harley, D Klein. 2000. Microbiología. 4ª ed. Mc Graw Hill Madrid, España. Pp 742-814.
- Rheinheimer G. 1987. Microbiología de las aguas. Ed. Acribia. Zaragoza, España. Pp 137-149.
- Salazar C. 2003. Situación de los Recursos Hídricos en Chile. Reporte de Investigación. Centro del Tercer Mundo para el Manejo del Agua, A.C. Santiago, Chile.
- Servais P, T García-Armisen , I George, G Billen. 2007. Fecal bacteria in the rivers of the Seine drainage network (France): Sources, fate and modelling. *Sci Total Environ* 375, 152- 167.
- UACh, Universidad Austral de Chile. 2008. Estudio “Variabilidad de factores ambientales en el humedal del río Cruces y tolerancia del luchecillo (*Egeria densa*) a temperaturas extremas”. Pp 39-79.
- UNESCO, Organización de las Naciones Unidas para la Educación, la Ciencia y la Cultura. 2003. ¡SPLASH! el boletín informativo del Año Internacional del Agua Dulce 2003. N° 4.
- UNESCO. 2008. Organización de las Naciones Unidas para la Educación, la Ciencia y la Cultura. Boletín de noticias bimensual del Portal del Agua: El agua, saneamiento e higiene. N° 207.

## 8. ANEXOS

**ANEXO 1. Resultados ensayo presuntivo, clave y NMP para coliformes totales en 100 ml de muestra de agua superficial del río Cruces, el 30 de septiembre 2005, 31 de marzo 2006 y 23 de octubre 2006.**

N°Muestra	30 de septiembre 2005		31 de marzo 2006		23 de octubre 2006	
	Clave	NMP/100 ml	Clave	NMP/100 ml	Clave	NMP/100 ml
1	5-3-2	1400	5-4-0	1300	4-3-1	330
1'	5-3-0	800	5-3-1	1100	4-2-0	220
2	5-2-0	500	5-2-0	500	5-1-0	300
2'	5-2-0	500	5-1-2	600	5-3-1	1100
3	5-5-5	≥ 1600	5-5-1	3000	5-3-0	800
3'	5-4-1	1700	5-5-3	9000	5-4-0	1300
4	5-5-4	1600	5-5-2	5000	5-5-3	9000
4'	5-5-3	9000	5-4-3	2800	5-4-1	1700
5	5-5-1	3000	5-5-5	≥ 16000	5-5-5	≥ 16000
5'	5-5-5	≥ 1600	5-5-5	≥ 16000	5-5-5	≥ 16000
6	5-5-4	1600	5-5-1	3000	5-5-5	≥ 16000
6'	5-5-4	16000	5-5-1	3000	5-5-4	16000
7	5-5-4	16000	5-3-1	1100	5-5-2	5000
7'	5-5-4	16000	5-3-1	1100	5-5-4	16000
8	5-5-3	9000	5-2-2	900	5-5-2	5000
8'	5-5-3	9000	5-2-0	500	5-5-0	2400
9	5-5-4	16000	5-2-1	700	5-5-1	3000
9'	5-5-1	3000	5-2-0	500	5-5-1	3000
10	5-5-4	16000	5-4-1	1700	5-5-1	3000
10'	5-5-5	≥ 16000	5-3-1	1100	5-5-0	2400

**ANEXO 2. Resultados ensayo confirmativo, clave y NMP para coliformes fecales en 100 ml de muestra de agua superficial del río Cruces, el 30 de septiembre 2005, 31 de marzo 2006 y 23 de octubre 2006.**

N° Muestra	Primera campaña, Septiembre 2005		Segunda campaña, Marzo 2006		Tercera Campaña, Octubre 2006	
	Clave	NMP/100 ml	Clave	NMP/100 ml	Clave	NMP/100 ml
1	5-2-0	50	5-3-1	110	4-1-0	170
1´	4-2-1	26	5-5-1	300	5-4-0	130
2	4-2-0	22	5-4-0	130	5-4-0	130
2´	5-2-0	50	4-0-2	130	5-0-0	230
3	5-4-4	3500	5-5-0	2400	5-5-1	300
3´	5-3-1	1100	5-5-0	2400	5-5-1	300
4	5-0-2	400	5-0-0	230	5-2-0	500
4´	4-1-0	170	5-1-0	300	5-1-0	300
5	5-5-0	2400	5-5-1	3000	5-5-3	9000
5´	5-4-2	2200	5-5-2	5000	5-5-3	9000
6	5-2-1	700	5-5-0	2400	5-3-2	1400
6´	5-2-1	700	5-5-1	3000	5-3-0	800
7	4-0-0	130	5-3-1	1100	5-3-0	800
7´	5-3-0	80	5-3-1	1100	5-3-1	1100
8	5-1-0	300	3-1-2	110	5-2-0	500
8´	5-1-1	50	5-5-2	500	5-5-2	500
9	5-4-2	220	5-2-0	500	5-2-0	500
9´	4-3-0	27	4-2-0	220	2-1-0	70
10	5-5-1	3000	5-4-1	1700	4-3-0	270
10´	5-5-0	2400	5-2-1	700	5-5-1	300

**ANEXO 3. Resultado NMP máximo de coliformes totales expresado en valor absoluto y  $\log_{10}$  en 100 ml de muestra de agua superficial del río Cruces, el 30 de septiembre 2005, 31 de marzo 2006 y 23 de octubre 2006.**

Puntos de muestreo	Máximo coliformes totales					
	30 de septiembre 2005		31 de marzo 2006		23 de octubre 2006	
	NMP/ 100ml	log 10	NMP/ 100 ml	log 10	NMP/ 100 ml	log 10
1	1400	3,1	1300	3,1	330	2,5
2	500	2,7	600	2,8	1100	3,0
3	1600	3,2	9000	4,0	1300	3,1
4	9000	4,0	5000	3,7	9000	4,0
5	3000	3,5	16000	4,2	16000	4,2
6	16000	4,2	3000	3,5	16000	4,2
7	16000	4,2	1100	3,0	16000	4,2
8	9000	4,0	900	3,0	5000	3,7
9	16000	4,2	700	2,8	3000	3,5
10	16000	4,2	1700	3,2	3000	3,5

**ANEXO 4. Resultado NMP máximo de coliformes fecales expresado en valor absoluto y  $\log_{10}$  en 100 ml de muestra de agua superficial del río Cruces, el 30 de septiembre 2005, 31 de marzo 2006 y 23 de octubre 2006.**

Puntos de muestreo	Máximo coliformes fecales					
	30 de septiembre 2005		31 de marzo 2006		23 de octubre 2006	
	NMP/ 100ml	log 10	NMP/ 100 ml	log 10	NMP/ 100 ml	log 10
1	50	1,7	300	2,5	170	2,2
2	50	1,7	130	2,1	230	2,4
3	3500	3,5	2400	3,4	300	2,5
4	400	2,6	300	2,5	500	2,7
5	2400	3,4	5000	3,7	9000	4,0
6	700	2,8	3000	3,5	1400	3,1
7	130	2,1	1100	3,0	1100	3,0
8	300	2,5	500	2,7	500	2,7
9	220	2,3	500	2,7	500	2,7
10	3000	3,5	1700	3,2	300	2,5

## 9. AGRADECIMIENTOS

A mi Mamá y Papá por la confianza, el apoyo, por darme la mejor herencia que es la educación y por ser mis auspiciadores en estos años de carrera universitaria.

A mi hermano Patricio, por su incondicionalidad, por incentivar me a seguir siempre adelante, por enseñarme que con fuerza y ganas todo se puede.

A mi gran amiga, Tamara Rodríguez K, porque juntas vivimos esta preciosa etapa de nuestras vidas, por todo su cariño y paciencia. Gracias también a Cota Rodríguez K por su alegría y amistad. Nunca olvidaré nuestro hogar, las quiero mucho.

A Rodrigo Gatica, mi amigo y novio, gracias por su inmenso amor, por siempre creer en mí, motivarme cuando más lo necesité, por entenderme y estar conmigo aunque sea desde lejos.

A mi profesor patrocinante Dr. Rafael Tamayo y copatrocinante Sra. Mónica Sáez, por su ayuda y excelente disposición en el laboratorio.

A la Sra. Viviana Morales, Sra. Bernarda Contreras, Dra. Carla Rosenfeld y Claudia Campillo por ser mis segundas madres y amigas en mi paso por el Instituto, por el cariño, apoyo y por los gratos momentos vividos.

Gracias también a Reydoret, Carina, Sra. Lucía y Sra. Irma, por su gentil ayuda en la parte práctica de mi tesis.

Al Dr. Guillermo Ramírez y Dr. Kate Hood, Médicos Veterinarios del Servicio de Salud Valdivia por su colaboración en este trabajo.

Gracias Dios por acompañarme y ayudarme a cerrar esta etapa de mi vida, gracias también a todos los que estuvieron y ya no están, siempre los recordaré.