PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DE VALPARAÍSO FACULTAD DE RECURSOS NATURALES ESCUELA DE CIENCIAS DEL MAR

Variabilidad ambiental y su influencia moduladora en la diversidad y composición taxonómica de las comunidades microbianas presentes en el agua y sedimentos de dos fiordos de la Patagonia Norte

Trabajo de Titulación para optar al Título de Oceanógrafo

por

Karen Cortés Hernández

Valparaíso 2017

Comisión de Titulación:

Profesor Guía	: Dra. Klaudia Hernández Rondón	
Profesor Co-Guía	: Dra. Verónica Molina Trincado	
Profesor Patrocinante	: Dr. Eduardo Quiroga Jamett	
Profesor Revisor	: Dra. Marcela Cornejo D'Ottone	

AUTORIZACIÓN DE USO

Al presentar este Trabajo de Titulación como último requisito para la obtención del título de Oceanógrafo, autorizo a la biblioteca de la Escuela de Ciencias del Mar de la Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, para que disponga libremente de ella. Autorizo además reproducciones parciales o totales de este documento sólo con fines académicos.

Karen Cortés Hernández

DEDICATORIA

Quiero dedicar este trabajo a mis padres Mariella y Moisés, y a mi hermana Yurima, por su amor y apoyo incondicional en todos los proyectos que he emprendido. A Matilda, mi sobrina, que llegó a iluminar mi vida, y a Iván por ser mi compañero y mi apoyo moral en los tiempos difíciles.

AGRADECIMIENTOS

A la Pontificia Universidad Católica de Valparaíso por mi formación, al proyecto FONDECYT 11110190 "Assessing the impact of solar radiation on microbial communities in a stratified Patagonian fjord: reviewing the role of photoinhibition in the carbon cycle" por proporcionar las muestras, información ambiental, biológica y química, descrita en este trabajo, así como financiar la implementación necesaria para la realización de los T-RFLPs. Al Dr. Lasse Olsen y su proyecto WAFOW "Can waste emission from fish farms change the structure of marine food webs? A comparative study of coastal ecosystems in Norway and Chile" proyecto #193661 del Norwegian Research Council, por el financiamiento de los T-RFLPs y secuenciación de muestras para los dos fiordos estudiados. Al Dr. Eduardo Quiroga y su proyecto Nº 4872-11034-LP08 de la Subsecretaría de Pesca "Evaluación Ambiental de la Condición de Fondo de las Áreas Geográficas de Uso Intensivo de la Salmonicultura en la Región de Aysén, Zonas Puyuhuapi y Jacaf" por la facilitación de muestras e información ambiental. A la Dra. Verónica Molina por la facilitación de equipamientos y materiales del Laboratorio de Biología Marina de la Universidad Andrés Bello para el desarrollo práctico del análisis molecular de las muestras. A mis profesoras guías Dra. Klaudia Hernández y Dra. Verónica Molina por su apoyo incondicional en lo académico y personal, quienes confiaron y me dieron la oportunidad de trabajar en este proyecto. A mis compañeros del Laboratorio de Biología Marina de la Universidad Andrés Bello por su apoyo moral y académico durante el desarrollo de la tesis (María Jesús, Claudia y Hermann). A mis pilares fundamentales, mis padres Mariella y Moisés, y mi hermana Yurima que estuvieron apoyándome durante el transcurso de mi carrera. A mi pareja Iván que siempre estuvo conmigo no sólo durante mi tesis, sino durante el transcurso de mi carrera, gracias por tu paciencia y dedicación. Agradezco a todos que de alguna u otra forma hayan contribuido a que este estudio se realizara con éxito.

CONTENIDO DE TRABAJO DE TITULACIÓN

RE	SUN	IEN	i
AB	STR	ACT	ii
1.	INT	FRODUCCIÓN	_1
	Des	arrollo de la acuicultura en chile y sus potenciales efectos sobre la comunida	ad
	mic	robiana	_1
	Res	spuesta de las comunidades microbianas al enriquecimiento de nutrientes	
	aso	ciado a las actividades salmoneras	2
	Est	uarios y fiordos, ambientes para el desarrollo de la comunidad microbiana _	_5
2	нп	PÁTESIS	0
2. 2			
5.	UD	JE 11V 05	_10
4.	MA	ATERIALES Y MÉTODOS	_11
	4.1	Área de estudio	_11
	4.2	Técnicas moleculares	_13
		4.2.1 Extracción de ADN	14
		4.2.2 Polimorfismo de Longitud de Fragmentos de Restricción Terminal (T-RFLP)	15
		4.2.3 Pirosecuenciación Roche 454 del gen 16S ARNr	17
	4.3	Variables oceanográficas	_17
	4.4	Análisis bio – estadístico	_18
		4.4.1 Análisis de la diversidad de la comunidad microbiana	20
		4.4.2 Análisis de la estructura y composición de la comunidad microbiana	20
		4.4.2.1 Análisis de grupos abundantes y raros	_ 21
		4.4.3 Análisis de las variables oceanográficas	_ 22

5. KESULIADUS	5.	RESULTADOS
---------------	----	------------

RE	SULTADOS	23						
5.1	Fiordo Comau	23						
	5.1.1 Caracterización físico-química de las capas de agua salobre y marina							
	5.1.2 Diversidad alfa de la comunidad bacterioplanctónica (bacterias y arqueas)	26						
	5.1.2.1 Resultados obtenidos del análisis de la data del T-RFLP	26						
	5.1.2.2 Resultados obtenidos del análisis de la data de pirosecuenciación	26						
	5.1.3 Estructura comunitaria del bacterioplancton (bacterias y arqueas)	29						
	5.1.3.1 Resultados obtenidos del análisis de la data del T-RFLP	29						
	5.1.3.2 Resultados obtenidos del análisis de la data de pirosecuenciación	29						
	5.1.4 Composición de la comunidad bacterioplanctónica (bacterias y arqueas) obten	ida						
	con el método de pirosecuenciación Roche 454 del gen 16S ARNr	31						
	5.1.4.1 OTUs (especies) abundantes y raras	36						
	5.1.5 Efecto de las variables físico-químicas del agua sobre la estructura de la comu	nidad						
	bacterioplanctónica	40						
5.2	Fiordo Puyuhuapi	46						
	5.2.1 Caracterización geoquímica del sedimento superficial (0-2cm)	46						
	5.2.2 Diversidad alfa de la comunidad bacteriana bentónica	48						
	5.2.2.1 Resultados obtenidos del análisis de la data del T-RFLP	48						
	5.2.2.2 Resultados obtenidos del análisis de la data de pirosecuenciación	48						
	5.2.3 Estructura de la comunidad bacteriana bentónica	50						
	5.2.3.1 Resultados obtenidos del análisis de la data del T-RFLP	50						
	5.2.3.2 Resultados obtenidos del análisis de la data de pirosecuenciación	50						
	5.2.4 Composición de la comunidad bacteriana bentónica	52						
	5.2.4.1 Resultados obtenidos del análisis de la data del T-RFLP	52						
	5.2.4.2 Resultados obtenidos del análisis de la data de pirosecuenciación	54						
	5.2.4.3 OTUs (especies) abundantes y raras	56						
	5.2.5 Efecto de las variables físico-químicas sobre la estructura de la comunidad							
	bacteriana bentónica	58						
5.3	5.3 Comparación de los patrones en la estructura de la comunidad microbiana							
me	liante T-RFLP y pirosecuenciación Roche 454 para ambos fiordos	64						

6.	DISCUSIÓN							
	6.1	6.1 Fiordo Comau						
		6.1.1 Caracterización físico-química de las capas de agua salobre y marina	_ 66					
		6.1.2 Diversidad alfa de la comunidad bacterioplanctónica (bacterias y arqueas) y su						
		asociación con las condiciones ambientales en las capas de agua analizadas	_ 68					
		6.1.3 Estructura de la comunidad bacterioplanctónica (bacterias y arqueas) y su						
		asociación con las condiciones ambientales en las capas de agua analizadas	_ 69					
		6.1.4 Composición de la comunidad bacterioplanctónica (bacterias y arqueas) y su						
		asociación con las condiciones ambientales en las capas de agua analizadas	71					
		6.1.4.1 OTUs (especies) abundantes y raras	73					
	6.2	Fiordo Puyuhuapi	_75					
		6.2.1 Caracterización geoquímica del sedimento superficial (0-2cm)	_ 75					
		6.2.2 Diversidad alfa de comunidad bacteriana bentónica y su asociación con las						
		condiciones geoquímicas del sedimento	_ 77					
		6.2.3 Estructura de la comunidad bacteriana bentónica y su asociación con las						
		condiciones geoquímicas del sedimento	_ 78					
		6.2.4 Composición de la comunidad bacteriana bentónica y su asociación con las						
		condiciones geoquímicas del sedimento	_ 78					
		6.2.4.1 OTUs (especies) abundantes y raras	82					
		6.2.4.2 Presencia de patógenos en sedimentos con impacto de salmonicultura	83					
	6.3	Comparación de los patrones en la estructura de la comunidad microbiana	1					
	me	diante T-RFLP y pirosecuenciación Roche 454 para ambos fiordos	_84					
7.	CO	Inclusiones	86					
8.	RE	FERENCIAS	- 88					

9. ANEXOS ______109

RESUMEN

La acuicultura en la Patagonia Norte de Chile es una actividad económica con reconocida importancia económica e impacto sobre el ecosistema marino, no obstante, existen escasos estudios en esta región sobre el efecto de las variables ambientales en la estructura comunitaria microbiana. En este trabajo se evaluó el efecto de las características físico-químicas sobre la diversidad y composición microbiana de dos ecosistemas diferentes, por un lado la capa superficial y subsuperficial de la columna de agua del Fiordo Comau y por otro, el sedimento superficial del Fiordo Puyuhuapi. Las variables ambientales del agua incluyeron temperatura, salinidad, clorofila-a, concentración de nitrito, nitrato, fosfato, silicato y POC total; mientras que para el sedimento incluyeron tipo de fondo, oxígeno disuelto, materia orgánica total, pH, sulfuro de hidrógeno y potencial redox. La comunidad microbiana se analizó mediante el gen 16S ribosomal con dos técnicas moleculares de diferente resolución: T-RFLP y pirosecuenciación Roche 454. Para esto, se extrajo ADN de la columna de agua en dos profundidades: superficial ($\sim 0.5m$) y subsuperficial (20m) en tres épocas diferentes (último tercio del verano 2012, invierno 2012 y primer tercio del verano 2013). Para el Fiordo Puyuhuapi, el ADN se extrajo del sedimento superficial (0-2cm) desde seis concesiones salmoneras ubicadas en la cabecera, zona intermedia y boca durante los meses de julio y agosto del 2009.

La diversidad de la comunidad bacterioplanctónica en la capa subsuperficial de la columna de agua fue menos diversa que en la capa superficial, mediante la secuenciación (al nivel taxonómico de especies). La comunidad menos diversa se localizó en la capa marina durante el primer tercio del verano 2013, cuando la clorofila-*a* alcanzó máximas concentraciones. La capa superficial estuvo caracterizada por una alta abundancia de *Alphaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria* y *Actinobacteria*, asociada con las bajas concentraciones de nitrito y nitrato, y altas temperaturas durante el primer tercio del verano 2013. La capa marina, estuvo representada por las clases *Cytophagia* y *Flavobacteriia*, con abundancias mayores durante el verano (2012 y 2013), mientras que, las arqueas *Thaumarchaeota (unclassified)* fueron características de las muestras de invierno (año 2012), cuando las concentraciones de nitrito fueron altas.

La diversidad de la comunidad bacteriana del sedimento, a través de ambas técnicas moleculares, varió de acuerdo al estado operacional del centro. La comunidad de los centros no operativos (centros C1-cabecera y C8-boca) fue más rica y diversa que en los centros operativos (centros C2-cabecera y C7-boca). La cabecera (centro C1) estuvo representada por las clases *Flavobacteriia* y *Deltaproteobacteria*, cuyas abundancias relativas aumentaron, asociadas con una mayor disponibilidad de materia orgánica total (p>0,05) y un mayor nivel de pH (p<0,05). La zona intermedia (centro C5) estuvo caracterizada por las *Clostridia* y *Bacteroidia*, con altas abundancias relacionadas con bajas concentraciones de oxígeno disuelto de fondo y altas de H₂S (p>0,05). En la boca (centro C8) fueron más abundantes las *Clostridia* y *Epsilonproteobacteria*, asociadas con altas concentraciones de H2S y un entorno reducido (p>0,05).

Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que la estructura microbiana y su composición estarían asociadas con la salinidad y disponibilidad de nutrientes (nitrito y nitrato) en la columna de agua, y con la disponibilidad de materia orgánica total en el sedimento. Además, en los sedimentos del Fiordo Puyuhuapi, el estado operacional de los centros salmoneros parece tener un rol en los cambios de la diversidad microbiana (mayor diversidad en centros no operativos).

ABSTRACT

Aquaculture in north chilean Patagonia is an economic activity with recognized economic importance and impact on the marine ecosystem. However, there are few studies in this region about the effect of environmental variables on microbial community structure. In this work we evaluated the effect of the physicochemical characteristics over the diversity and composition of microbial community from two different ecosystems, the surface and subsurface layer of the water column of the Comau Fjord, and the surface sediments of the Puyuhuapi Fjord. Environmental variables of the water included temperature, salinity, chlorophyll-a, concentration of nitrite, nitrate, phosphate, silicate, and total POC; while in sediment this included mud percentage, bottom dissolved oxygen, total organic matter, pH, hydrogen sulfide, and redox potential. The microbial community was analyzed using 16S ribosomal gene by two different resolution molecular techniques: T-RFLP and Roche 454 pyrosequencing. Following procedures, the DNA was extracted from filters collected from the water column at two depths: surface (~0,5m) and subsurface (20m) during three different seasons (late-summer 2012, winter 2012, and early-summer 2013). For the Puyuhuapi Fjord, DNA was extracted from six surface sediments samples (0-2cm) of salmon farming concessions located in the head, middle and mouth area during the months of July and August 2009.

The diversity of the bacterioplankton community in the subsurface layer of the water column was less diverse than the surface layer, by sequencing (species taxonomic level). The less diverse community was located in the marine layer during the early-summer 2013, when chlorophyll-*a* reached maximum concentrations. The surface layer was characterized by a high abundance of *Alphaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria* and *Actinobacteria*, associated to the low concentrations of nitrite and nitrate, and high temperatures during the early-summer 2013. The marine layer was represented by the *Cytophagia* and *Flavobacteriia* classes, with higher abundances during the summer (2012 and 2013), while *Thaumarchaeota (unclassified)* archaeas were characteristic of winter samples (2012), when nitrite concentrations were high.

The diversity of the bacterial community of the sediment, through both molecular techniques, varied according to the operational state of the salmon farming center. The bacterial community of the sediment was little diverse through both molecular techniques, varying according to the operational state of the salmon farming center. The community of non-operational centers (C1-head and C8-mouth centers) was richer and more diverse than in the operational centers (C2-head and C7-mouth centers). The head of the fjord (C1 center) was represented by the *Flavobacteriia* and *Deltaproteobacteria* classes, whose relative abundances increased, associated with greater availability of total organic matter (p > 0.05) and higher pH (p < 0.05). The intermediate zone (C5 center) was characterized by *Clostridia* and *Bacteroidia*, with high abundances related to low dissolved oxygen levels and high H₂S concentrations (p > 0.05). In the mouth (C8 center) *Clostridia* and *Epsilonproteobacteria* were more abundant, associated with high concentrations of H₂S and a reduced environment (p > 0.05).

The results obtained in this work suggest that the microbial structure and its composition are associated with the salinity and availability of nutrients (nitrite and nitrate) in the water column, and with the availability of total organic matter in the sediment. Also, in the Puyuhuapi Fjord sediments the operational status of salmon farming centers seems to have a role in changes the microbial diversity (greater diversity in non-operative centers).

1. INTRODUCCIÓN

DESARROLLO DE LA ACUICULTURA EN CHILE Y SUS POTENCIALES EFECTOS SOBRE LA COMUNIDAD MICROBIANA

En los últimos años, la acuicultura ha tenido un crecimiento acelerado, representando en la actualidad casi el 50% de los productos pesqueros mundiales destinados a la alimentación (FAO, 2016). En la década de 1970 se produjeron alrededor de 3 millones de ton. de pescado y para el año 2014 la producción acuícola mundial alcanzó los 73,8 millones de ton. (FAO, 2016). En Chile, la industria de salmones se ha convertido en una actividad económica importante y el principal desarrollo en las regiones del sur (Ibieta et al., 2011). Durante los últimos 20 años ha tenido un rápido desarrollo (Ibieta et al., 2011), donde Chile se ha consolidado como el segundo país de mayor producción y exportación de salmón después de Noruega y seguido por Escocia (Buschmann et al., 2009; Ibieta et al., 2011; FAO, 2016). En el año 2001 la producción fue de 504.422 ton., aportando el 5,5% de las exportaciones del país, equivalente a 971,2 mill. de dólares (FIP, 2005). En el año 2006 las exportaciones de salmón fueron de 12,94% (1.043,5 mill. de dólares), las cuales disminuyeron a 9,94% (1.014,4 mill. de dólares) debido a la crisis sanitaria en el año 2010 (Ibieta et al., 2011), conocida como la gran crisis del virus ISA (Anemia Infecciosa del Salmón), que comenzó en el año 2007 y duró hasta mediados del 2010 afectando a más de 600 centros (Sommer, 2009; FAO, 2010).

En términos generales, los cultivos de salmones están restringidos a regiones protegidas tanto de agua dulce como marinas (Ibieta *et al.*, 2011). En Chile, la mayor producción de agua dulce está localizada en la región de La Araucanía (IX), Los Ríos (XIV) y Los Lagos (X) (Ibieta *et al.*, 2011), mientras que, la producción de agua marina se ha llevado a cabo principalmente en la región de Los Lagos, con una producción estimada de 499.512 ton. de salmones en el año 2006 (desde Puerto Montt a Quellón) (Ibieta *et al.*, 2011). Después del virus ISA, la industria se expandió a la región de Aysén (XI) y de Magallanes (XII) con una producción de 208.961 y 6.053 ton., respectivamente (Ibieta *et al.*, 2011).

Desafortunadamente, el rápido crecimiento de la industria salmonera ha estado acompañada de algunas prácticas potencialmente dañinas para la salud humana y animal (Naylor et al., 2003; Naylor & Burke, 2005), que incluye el uso de antibióticos (Chelossi et al., 2003; Cabello, 2006). En Chile, sólo seis antibióticos están aprobados para utilizar en la acuicultura, reduciendo la opción al momento del tratamiento (Ibieta et al., 2011). Es conocido que la rotación de antibióticos en la industria salmonera chilena, es una práctica poco frecuente que con el paso de los años ha llevado a la aparición de organismos resistentes (San Martin et al., 2010), entre ellas las bacterias del género Bacillus (Chelossi et al., 2003) y Aeromonas (Cabello, 2006). Los residuos de antibióticos junto con las heces, son liberados a la columna de agua y fondo marino (Naylor et al., 2003; Soto & Norambuena, 2004; Naylor & Burke, 2005; Cabello, 2006; Tironi et al., 2010), alterando las propiedades geoquímicas del sedimento y la composición de la microflora bentónica (La Rosa et al., 2001; Vezzulli et al., 2002; Cabello, 2006). Entre las alteraciones que sufre el fondo marino, se encuentra la disminución del potencial redox hacia valores negativos, asociado a una columna de agua con características anóxicas (Findlay et al., 1995; Karakassis et al., 2002; Soto & Norambuena 2004; Buschmann et al., 2006).

RESPUESTA DE LAS COMUNIDADES MICROBIANAS AL ENRIQUECIMIENTO DE NUTRIENTES ASOCIADO A LAS ACTIVIDADES SALMONERAS

La comunidad bacteriana tiene un papel clave en la degradación de la materia orgánica en ambientes marinos (Deming & Baross, 1993). Se ha descrito que la estructura microbiana es sensible a los cambios en las condiciones ambientales (Cottrell & Kirchman, 2000; 2003), especialmente cuando está sujeta a suministros orgánicos relacionados con las actividades antropogénicas (Vezzulli *et al.*, 2002). Diversos estudios en diferentes partes del mundo, han abordado el impacto que tienen los centros de cultivo sobre la geoquímica del sedimento y la ecología de la comunidad microbiana bentónica (e.g., Holmer & Kristensen, 1992; Findlay *et al.*, 1995; La Rosa *et al.*, 2001; Vezzulli *et al.*, 2002; Chelossi *et al.*, 2003; Bissett *et al.*, 2006). En contraste, existen pocos estudios que han abordado los efectos de los centros de cultivo sobre el ambiente pelágico y la estructura de la comunidad microbiana

planctónica. Algunos de ellos, han registrado un aumento en la abundancia del bacterioplancton cerca de los centros de cultivo en el Mar Mediterráneo (La Rosa *et al.*, 2002; Pitta *et al.*, 2006), en la bahía Gokasho en Japón (Sakami *et al.*, 2003) y frente a la costa oeste de Escocia (Navarro *et al.*, 2008). Verticalmente, se ha observado que la abundancia bacterioplanctónica tiende a aumentar en superficie (> $6,0 \times 10^9$ cell L⁻¹) y a disminuir bajo los 10 m de profundidad (< $2,0 \times 10^9$ cell L⁻¹) cerca de los centros de cultivo en Japón (Sakami *et al.*, 2003), en el Mar Mediterráneo (Pitta *et al.*, 2006) y frente a la costa oeste de Escocia (Navarro *et al.*, 2008). La principal causa por la cual los aportes de los centros de cultivo pueden influenciar los ecosistemas planctónicos, es la alteración en la concentración natural de nutrientes orgánicos e inorgánicos (Navarro *et al.*, 2008). Estos son liberados por los centros de cultivo a la columna de agua, ya sea directamente como productos de excreción de peces (amonio y urea) o indirectamente como resultado de la remineralización de desechos orgánicos particulados, los cuales pueden representar una fuente de materia orgánica y nutrientes para las bacterias heterótrofas, aumentando su actividad metabólica (Navarro *et al.*, 2008; Sakami *et al.*, 2003).

El proceso heterotrófico de sulfato-reducción es considerado el más importante para la descomposición anaeróbica de materia orgánica en sedimentos costeros (Jørgensen, 1982; Canfield et al., 1993), cuando el contenido de sulfato es suficiente y existe un alto enriquecimiento orgánico (Holmer & Kristensen, 1992; Taketani et al., 2010). Bajo las balsas jaulas de los centros salmoneros, se ha observado que las tasas de sulfato-reducción tienden a aumentar en la Península Tasman en Tasmania (Bissett *et al.*, 2006) y que esta se mantiene aún después del cese de un período de cultivo en las aguas danesas (Fiordo Kolding), indicando que el impacto de este en la mineralización anaeróbica, es prolongado (Holmer & Kristensen, 1992). Principalmente, este proceso lo llevan a cabo las bacterias sulfatoreductoras, las cuales pueden conducir a la liberación de gases de sulfuro de hidrógeno (H₂S) en los sedimentos (Olsen et al., 2008). Las bacterias más comunes se encuentran asociadas a las Desulfobacterales (Orphan et al., 2001; Dexter-Dyer, 2003; Leloup et al., 2009), Desulfovibrionales y Syntrophobacterales de la clase Deltaproteobacteria, las Peptococcaceae (clase Clostridia), Nitrospiraceae (clase Nitrospira), *Thermodesulfobacteria* (Dexter-Dyer, 2003), y las *Beggiatoa* (clase *Gammaproteobacteria*) (Holmer & Kristensen, 1992; Jørgensen, 1977a).

En sedimentos bajo las balsas jaulas, se ha observado que la diversidad tiende a disminuir en la Península Tasman en Tasmania (Bissett et al., 2006), el metabolismo parece cambiar de aeróbico a anaeróbico en las aguas danesas (Holmer & Kristensen, 1992) y mediterráneas (Vezzulli et al., 2002), y la abundancia total tiende a aumentar junto con la dominancia de algunos filotipos específicos en el Mar Mediterráneo (Vezzulli et al., 2002), como las bacterias del tipo Cytophaga/Flexibacter, y la aparición de bacterias patógenas como el Vibrio (Vezzulli et al., 2002). De la misma forma, en la Península Tasman en Tasmania, Bissett et al. (2006) registraron altas abundancias de bacterias del grupo Cytophaga-Flavobacteria-Bacteroides en sedimentos marinos enriquecidos orgánicamente por centros de cultivo, así como algunos miembros de las Proteobacteria, entre ellas las Alphaproteobacteria, Deltaproteobacteria, Gammaproteobacteria y Epsilonproteobacteria. Altas abundancias de Deltaproteobacteria y Gammaproteobacteria también han sido registradas bajo condiciones hipóxicas en ambientes altamente impactados por actividades agrícolas e industriales en el Mar Caspio (Mahmoudi et al., 2015). Las Gammaproteobacteria tienen un rol importante en la degradación de materia orgánica de alto y bajo peso molecular, particularmente en sedimentos del fondo marino donde existen bajos niveles de oxígeno (Mahmoudi et al., 2015). Las Epsilonproteobacteria también han sido abundantes en el Mar Negro y en la Cuenca de Cariaco (al sur del Mar Caribe), dos de las mayores cuencas anóxicas del planeta, donde fueron más abundantes en la interfase óxicaanóxica, zona de encuentro entre el H₂S producido desde el sedimento y el agua de mar oxigenada (Madrid et al., 2001; Vetriani et al., 2003).

La caracterización de las comunidades microbianas en el medio ambiente es compleja, pues aparte de las limitaciones de colecta de muestras, se suma la baja resolución de los métodos de cultivo tradicionales *in vitro* con medios selectivos, que no capturan la extrema riqueza de especies en una muestra y, aún más, la elevada variabilidad de la distribución de la comunidad a muy pequeña escala (Rosch & Bothe, 2005). En la actualidad,

las nuevas técnicas de biología molecular permiten el acceso a poblaciones microbianas incluso en muestras frescas de sedimento, revolucionado la capacidad para enlazar los fenómenos biogeoquímicos con la ecología microbiana. Dentro de las técnicas moleculares más utilizadas, las de fingerprinting como el T-RFLP (Polimorfismo de Longitud de Fragmentos de Restricción Terminal) y DGGE (Electroforesis en Gel con Gradiente de Desnaturalización), permiten analizar la dinámica de la estructura general de las comunidades en muestras ambientales (Hewson & Fuhrman, 2004). En los últimos años las tecnologías de secuenciación de alto rendimiento y las aproximaciones computacionales, se han combinado en métodos metagenómicos shotgun que han transformado la microbiología (Quince et al., 2017). Esto permitió la oportunidad de estudiar el contenido taxonómico y funcional de las comunidades bacterianas de manera integral (Venter et al., 2004; Bengtsson-Palme et al., 2014; Quince et al., 2017). Dependiendo del protocolo de secuenciación utilizado, las técnicas de secuenciación metagenómica shotgun permiten identificar y cuantificar tanto los miembros más abundantes de la comunidad como aquellos minoritarios (0,01 - 1% de las secuencias totales) (Fuhrman, 2009; Shah et al., 2011), que son escasamente recuperados por cultivos tradicionales o clonación (Fuhrman, 2009). Estos grupos minoritarios constituyen la "biósfera rara" (Sogin et al., 2006) y pueden tener un rol importante en el ambiente acuático al constituir un banco de reserva, con el potencial de volverse abundantes en respuesta a cambios en las condiciones ambientales (Pedrós-Alió, 2006; Galand et al., 2009).

ESTUARIOS Y FIORDOS, AMBIENTES PARA EL DESARROLLO DE LA COMUNIDAD MICROBIANA

Los fiordos son considerados una de las zonas más activas desde el punto de vista biogeoquímico, debido al gran intercambio de materia orgánica y energía entre los sistemas terrestres y oceánicos (González *et al.*, 2010; 2011). El sur de Chile contiene una de las regiones estuarinas más extensas del mundo, que van desde los 41,51°S hasta los 55,91°S, i.e. desde el Fiordo Reloncaví hasta el Cabo de Hornos, respectivamente (Silva *et al.*, 2011; Pantoja *et al.*, 2011). Esta extensa zona de fiordos y canales de la región austral de Chile

puede ser dividida en tres grandes áreas, separadas por sus características topográficas (Pickard, 1971; Silva & Ortiz, 2002): (i) La Patagonia Norte, que comprende el área ubicada entre Puerto Montt y la Península de Taitao (41°30'S – 46°50'S), (ii) Patagonia Central, desde el Golfo de Penas hasta el Estrecho de Magallanes (46°50'S - 52°30'S), y (iii) Patagonia Sur, desde el Estrecho de Magallanes hasta el Cabo de Hornos (52°30'S – 55°58'S) (Pickard, 1971; Silva & Ortiz, 2002). En términos de características físico-químicas, los fiordos de la Patagonia Norte presentan una alta variabilidad estacional (González et al., 2010; 2011). En los meses de primavera-verano la columna de agua presenta mayores temperaturas, concentraciones de oxígeno disuelto y nutrientes, mientras que en invierno son menores y la salinidad alcanza un mayor rango de variación (González et al., 2010; Montero et al., 2011). Los fiordos de la Patagonia Norte, como el Fiordo Comau y Puyuhuapi, presentan altas concentraciones superficiales (<5m) de amonio (2,56 y 1,39 µM, respectivamente) (Prado-Fiedler, 2000) y silicato (20-100 µM) en condiciones naturales, donde los aportes de agua dulce son significativos (Silva, 2006). Mientras que, la capa más profunda (>75m) presenta menores concentraciones de oxígeno disuelto (4,0 mL L^{-1} y < 60% de saturación) y pH de 7,6, a diferencia de los fiordos más australes (5 mL L^{-1} y pH=8; Silva, 2006). De todos los canales y fiordos chilenos, la literatura se refiere a la zona profunda del Fiordo Puyuhuapi como la menos oxigenada (< 2,0 mL L⁻¹) y más ácida (pH < 7,4) (Silva, 2006).

La estructura hidrográfica de los fiordos de la Patagonia y canales del sur de Chile, está caracterizada por dos o más capas originadas por una alta descarga de agua dulce proveniente de los ríos, precipitaciones y derretimiento de hielo, y una capa más profunda de aguas Subantárticas del Océano Pacífico adyacente (Silva *et al.*, 1998; Dávila *et al.*, 2002; Silva, 2006; Silva *et al.*, 2012). El flujo de agua dulce suministra materia orgánica e inorgánica alóctona a estos fiordos (Sepúlveda *et al.*, 2011; Silva *et al.*, 2011; Vargas *et al.*, 2011; González *et al.*, 2013), la cual puede influenciar en la red trófica planctónica (Vargas *et al.*, 2011) y la actividad microbiana autotrófica y heterotrófica (Montero *et al.*, 2011). Se ha registrado que la diversidad bacteriana tiende a ser mayor en las capas de agua más profundas, representativas de condiciones marinas (mayor salinidad), que en las capas

superficiales originadas por el derretimiento glacial (menor salinidad) en el fiordo Jorge Montt en la Patagonia Sur de Chile (Gutiérrez *et al.*, 2015). Estacionalmente, la riqueza bacteriana es mayor durante otoño que en invierno en la capa superficial, como resultado del derretimiento glacial que favorece el desarrollo de diferentes taxas bacterianas (Gutiérrez *et al.*, 2015). Por otra parte, se han observado diferencias en la composición bacteriana asociadas a la variación en el flujo del agua de deshielo (Piquet *et al.*, 2010) y entre aguas estuarinas y el océano adyacente (Zeng *et al.*, 2009). Entre los microorganismos fotosintéticos, se ha observado que el flujo de agua de deshielo favorece la ocurrencia de pico y nanofitoplancton de tamaño pequeño (Piquet *et al.*, 2014).

La comunidad microbiana en ambientes acuáticos fríos incluye miembros representativos de los dominios de Bacterias, Arqueas y Eukarya (Margesin and Miteva, 2011). Entre las bacterias, las *Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria*, *Cyanobacteria*, *Bacteriodetes* y *Actinobacteria* frecuentemente predominan en agujeros de crioconita (Edwards *et al.*, 2011; Cameron *et al.*, 2012), nieve y agua de deshielo glacial (Møller *et al.*, 2013), arroyos alimentados por glaciares (Wilhelm *et al.*, 2013), glaciares de alta montaña (Liu *et al.*, 2011) y fiordos glaciares (Zeng *et al.*, 2009; Gutiérrez *et al.*, 2015). Entre las Arqueas, las *Thaumarchaeota* se han detectado en agujeros de crioconita antárticos (Cameron *et al.*, 2012) y hielo marino (Cowie *et al.*, 2011). En fiordos y aguas de altas latitudes influenciadas por derretimiento glacial, los miembros de las clases *Gammaproteobacteria* y *Alphaproteobacteria* y el phyla *Cytophaga–Flavobacterium–Bacteroides*, frecuentemente dominan en abundancia en las comunidades bacterianas (Zeng *et al.*, 2009; 2013; Piquet *et al.*, 2010; 2011).

En el presente estudio se evaluó el efecto de las variables ambientales (i.e., parámetros físico-químicos) sobre la estructura de las comunidades microbianas planctónicas y bentónicas de dos fiordos chilenos ubicados en la Patagonia Norte, zona que ha sufrido un uso intensivo y un gran crecimiento en la acuicultura en los últimos años. Los dos ecosistemas seleccionados, el Fiordo Comau y Puyuhuapi, proveen de dos ambientes protegidos y sujetos a los aportes orgánicos e inorgánicos de la actividad antropogénica, y

debido al intercambio restringido que poseen, pueden ser sensibles a los aportes de las actividades salmoneras (Levings *et al.*, 1995). En particular, la estación de estudio del Fiordo Comau provee condiciones ambientales promedio del fiordo, donde existe actividad de acuicultura, mientras que, las estaciones de muestreo del Fiordo Puyuhuapi representan una fuente específica y directa de nutrientes inorgánicos, antibióticos, parásitos y materia orgánica provenientes de los centros salmoneros, y como tal, provee un ambiente ideal para estudiar la respuesta microbiana frente a una perturbación orgánica (Bissett *et al.*, 2006; 2007).

2. HIPÓTESIS

H1: La variabilidad ambiental (i.e., parámetros físico-químicos) afecta diferencialmente la estructura y composición comunitaria del bacterioplancton (bacterias y arqueas) en los estratos salobres (o aguas superficiales) y marinos (o subsuperficiales), ocasionando que la comunidad sea menos diversa hacia la superficie.

H2: La materia orgánica regula la estructura y composición de las comunidades bacterianas bentónicas en ecosistemas de fiordos con influencia salmonera, ocasionando que la comunidad sea más diversa en sitios con mayor influencia marina (hacia la boca del fiordo) y menor influencia de la salmonicultura.

3. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de las variables ambientales (i.e., características físico – químicas del agua y sedimentos) y el efecto estacional y espacial sobre la estructura de las comunidades microbianas en los fiordos Comau ($42^{\circ}25$ 'S – $72^{\circ}30$ 'W) y Puyuhuapi ($44^{\circ}49$ 'S, $72^{\circ}56$ 'W), Patagonia Norte – Chile.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar patrones estacionales y espaciales en la estructura microbiana del bacterioplancton (bacterias y arqueas) y sus índices ecológicos (riqueza, abundancia, equidad y diversidad) presentes en las capas superficial (o estrato salobre) y subsuperficial (o marino) del Fiordo Comau, mediante técnicas moleculares de T-RFLP y pirosecuenciación Roche 454.
- Determinar patrones espaciales en la estructura microbiana de bacterias bentónicas y sus índices ecológicos (riqueza, abundancia, equidad y diversidad) en zonas con alta y baja influencia salmonera a lo largo del Fiordo Puyuhuapi, mediante técnicas moleculares de T-RFLP y pirosecuenciación Roche 454.
- iii) Relacionar la diversidad de la comunidad microbiana bacterioplanctónica con las variables físico-químicas superficiales y subsuperficiales de la columna de agua del Fiordo Comau en diferentes épocas del año.
- Relacionar la diversidad de la comunidad bacteriana bentónica con las variables físico-químicas del sedimento del Fiordo Puyuhuapi.
- v) Comparar patrones en la estructura de la comunidad microbiana entre las diferentes aproximaciones moleculares (T-RFLP y pirosecuenciación Roche 454).

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 ÁREA DE ESTUDIO

En este trabajo se analizó el componente microbiano de dos ecosistemas diferentes de la Patagonia Norte (41° - 46°S); (1) las capas de agua superficial (o salobre) y subsuperficial (o marina) del Fiordo Comau (42°25'S, 72°30'W) y (2) el sedimento superficial (0-2 cm) del Fiordo Puyuhuapi (44°49'S, 72°56'W). Las muestras del Fiordo Comau provienen del muelle de Huinay donde existen condiciones promedio del fiordo, mientras que, las muestras del Fiordo Puyuhuapi provienen de estaciones donde existen concesiones de acuicultura. Para cada zona se empleó una estrategia de muestreo independiente.

Para la zona del Fiordo Comau, el muestreo se llevó a cabo en diferentes períodos del año: fin del verano (marzo 2012), invierno (julio 2012) y comienzos de verano (enero 2013). Para cada período se extrajeron dos muestras de agua desde el muelle de la Fundación Huinay (Figura 1), correspondientes a la capa salobre (~ 0,5 m) y marina (20 m), para las cuales se empleó una botella Niskin (horizontal) y una bomba de agua de mar ubicada a 20 m de profundidad desde la orilla del muelle, respectivamente. Las muestras (1 L) fueron filtradas a través de filtros de membrana de ésteres de celulosa (0,22 µm GSWP04700; Millipore[®]) utilizando una bomba peristáltica y luego fueron preservadas a -20°C hasta el momento de sus análisis en laboratorio (año 2014). Estas muestras fueron obtenidas dentro del proyecto FONDECYT 11110190.

Para el caso del Fiordo Puyuhuapi se extrajeron 6 muestras de sedimento superficial (primeros 2 cm) provenientes de diferentes estaciones a lo largo del fiordo (Figura 2), y proporcionadas por el proyecto N° 4872-11034-LP08 de la Subsecretaría de Pesca (Quiroga *et al.*, 2009). La colecta se realizó entre los meses de julio y agosto del año 2009 con un testigo de fondo (o *gravity corer*) de 50 mm de diámetro interno y 90 cm de largo. Las muestras fueron preservadas hasta su posterior análisis (año 2014) a -20°C.



Figura 1. Localización de la zona de estudio y estación de muestreo (en rojo) del Fiordo Comau. Las muestras de agua se tomaron a \sim 0,5 y 20 metros de profundidad durante el fin del verano (marzo 2012), invierno (julio 2012) y comienzos de verano (enero 2013).



Figura 2. Ubicación y distribución de las estaciones de muestreo (en rojo) a lo largo del Fiordo Puyuhuapi. Las muestras de sedimento superficial (0-2cm) se tomaron durante los meses de julio y agosto del año 2009.

4.2 TÉCNICAS MOLECULARES

Para analizar la estructura de las comunidades microbianas, las muestras de ambos fiordos se estudiaron empleando dos aproximaciones moleculares de diferente resolución: T-RFLP y secuenciación masiva a través de la pirosecuenciación Roche 454 (Tabla 1). Para el caso del Fiordo Puyuhuapi, a través de la secuenciación se analizaron sólo tres muestras, abarcando todas las zonas dentro del fiordo (cabecera, zona intermedia y boca).

Tabla 1. Resumen del número de muestras empleadas por fiordo, sus respectivas profundidades de colecta, fecha, estado de las concesiones salmoneras y el tipo de aproximación molecular utilizada para cada una.

Muestra Prof. c (m)		Fecha de muestreo	Estado de las concesiones salmoneras	T-RFLP	Pirosecuenciación Roche 454 (bacterias y/o arqueas)			
Fiordo Comau (muestras de agua)								
Marzo 2012 [S]	0,5	marzo - 2012	Operativo	_*	√ (Bact. y Arq.)			
Julio 2012 [S]	0,5	julio - 2012	En descanso	√ (Bact.)	√ (Bact. y Arq.)			
Enero 2013 [S]	0,5	enero - 2013	Operativo	√ (Bact.)	√ (Bact. y Arq.)			
Marzo 2012 [M]	20	marzo - 2012	Operativo	_*	√ (Bact. y Arq.)			
Julio 2012 [M]	20	julio - 2012	En descanso	√ (Bact.)	√ (Bact. y Arq.)			
Enero 2013 [M]	20	enero - 2013	Operativo	√ (Bact.)	√ (Bact. y Arq.)			
Fiordo Puyuhuapi (sedimento superficial: 0-2 cm)								
C1 (Cabecera)	40	julio - 2009	No Operativo	√ (Bact.)	√ (Bact.)			
C2 (Cabecera)	27	julio - 2009	Operativo	√ (Bact.)	_*			
C5 (Z. intermedia)	59	julio - 2009	Operativo	√ (Bact.)	√ (Bact.)			
C6 (Z. intermedia)	42	julio - 2009	No Operativo	√ (Bact.)	_*			
C7 (Boca)	48	agosto - 2009	Operativo	√ (Bact.)	*			
C8 (Boca)	62	agosto - 2009	No Operativo (abandonado)	√ (Bact.)	√ (Bact.)			

[S]: Capa Salobre

[M]: Capa Marina

* Muestras no consideradas para este trabajo

4.2.1 Extracción de ADN

El ADN microbiano de las muestras de agua del Fiordo Comau, fue aislado utilizando el procedimiento de extracción fenol:cloroformo propuesto por Madrid *et al.* (2001) con algunas modificaciones. El filtro se cortó en varias piezas y fue incubado en tampón de lisis (1 h a 37°C), luego se añadió SDS y proteinasa K. Para separar la fase acuosa que contenía el ácido nucleico, se utilizó el tubo MaXtract High Density (Qiagen) siguiendo el protocolo del fabricante y posteriormente los ácidos nucleicos fueron precipitados utilizando un volumen de alcohol isoamílico frío (40 min a -20°C). El ADN fue re-suspendido en 50 µL de nucleasa libre de agua. La concentración y calidad (razón A260/A280) del ADN eluído, fueron determinadas por espectroscopía de absorción utilizando el Synger Mx Microplate Reader (Bio Tek Instruments).

El ADN de las muestras de sedimento congelado (primeros 2 cm) del Fiordo Puyuhuapi, fue extraído de acuerdo a lo descrito por Román (2010) utilizando el kit comercial "Power SoiL" ® de MoBio Laboratories Inc. (California, Estados Unidos). Se siguieron las instrucciones del fabricante (MoBio Laboratories Inc., 2010) con algunas modificaciones. Para la preparación de la muestra, se agregaron 0,25 g de sedimento en tubos PowerBead, seguido de 60 µL de una solución de SDS y otros agentes de disrupción requeridos para la lisis celular. Los tubos fueron asegurados en Bead Beater modelo Mini-Beadbeater-8 (BioSpec Products, Bartlesville, USA) dos veces durante 30 s y luego fueron centrifugados por 30 s a 80.000 RPM. Para separar el ácido nucleico del material orgánico (no ADN) e inorgánico, se utilizó dos veces una solución de reactivos que favorecen la precipitación de estos materiales (250 y 200 µL), descartando el sobrenadante e incubando los tubos a 4°C por 5 min en cada ocasión. Posteriormente, los tubos fueron centrifugados por 1 min a 80.000 RPM, se descartó el sobrenadante y se agregó una solución con alta concentración de sal (1.200 µL). Para el ligamiento del ADN se empleó un filtro de membrana de sílica (Spin Filter) añadiendo 675 µL de muestra, que fue centrifugado durante 1 min a 80.000 RPM y luego se removió el sobrenadante. Este paso se repitió hasta utilizar toda la muestra. En seguida, se agregaron 500 µL de una solución de lavado a base de etanol y se centrifugó por 30 s a 80.000 RPM. El líquido fue removido y nuevamente centrifugado (80.000 RPM por 1 min). Finalmente el ADN fue re-suspendido en 50 µL de H₂O y verificado por electroforesis en gel de 1,0% de agarosa en 40 mL de buffer TAE. La concentración de ADN eluído fue determinado con un Espectrofotómetro para Microplacas modelo PowerWave HT (BioTek Instruments) y el software para análisis de datos Gen5 versión 1.11.5 (BioTek Instruments).

4.2.2 Polimorfismo de Longitud de Fragmentos de Restricción Terminal (T-RFLP)

El T-RFLP se llevó a cabo utilizando la región V1-V3 del gen 16S ARNr. Para las muestras de agua del Fiordo Comau se emplearon los partidores 8F (5' AGA GTT TGA TCC

TGG CTC AG 3') y 519R (5' GTN TTA CNG CGG CKG CTG 3') (Lane *et al.*, 1985), mientras que para el sedimento del Fiordo Puyuhuapi se utilizaron el 8F y 1392R (5' ACG GGC GGT GTG TAC 3') (Morán *et al.*, 2008; Hengst *et al.*, 2010). Brevemente, las muestras de ADN de ambos ecosistemas, fueron amplificadas en PCRs independientes con los marcadores FAM y NED en el partidor 8F, utilizando la mezcla pre-formulada y pre-diseñada en formato de grano PureTaq Ready-To-Go PCR Beads (BSA, 200 μ M de cada dNTP, ~2,5 unidades de ADN polimerasa puReTaq, buffer de reacción, 50 mM de KCl y 1,5 mM de MgCl₂) (GE Healthcare, Estados Unidos), partidores a una concentración de 10 μ M cada uno y 1 μ L de templado (ADN de cada muestra previamente diluído a 10 ng μ L⁻¹) en un volumen final de 25 μ L. El programa para la PCR (termociclador modelo GeneQ; BIOER Technology, Hangzhou, P.R. China) consistió en un arranque de alta temperatura (95°C) por 5 min, seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 95°C por 45 s, alineamiento a 57°C por 45 s, extensión a 72°C por 1 min 30 s, y una extensión final a 72°C por 7 min. Los productos de PCR fueron verificados por electroforesis.

Los productos de PCR fueron digeridos por separado con las enzimas de restricción HhaI (que reconoce la secuencia: GCG[^]C) y MspI (que reconoce la secuencia: C[^]CGG) en 20 μ L a 37°C durante toda la noche. Los productos digeridos fueron verificados por electroforesis de alícuotas (5 μ L) en gel de 2,5% de agarosa en 250 mL de buffer TAE. Posteriormente, estos productos, fueron combinados y precipitados con acetato de sodio 3M (3 μ L) y etanol 100% (75 μ L), incubados a -80°C por 1 h en oscuridad y centrifugados por 30 min a 13.000 RPM. El sobrenadante fue removido y el precipitado se lavó con etanol 70% frío (75 μ L) y se centrifugó nuevamente por 30 min a 13.000 RPM. El sobrenadante fue removido y el ADN se secó a 37°C por un par de horas. Luego, fue re-suspendido en 30 μ L de agua HPLC a 40°C durante 30 min y a 4°C por dos horas. El ADN fue cuantificado utilizando el kit Quant-iTTM dsDNA High-Sensitivity Assay con el fluorómetro QubitTM (Invitrogen; California, Estados Unidos). Finalmente, los productos de T-RFLP fueron separados por electroforesis capilar ejecutado por Macrogen Inc. (Seoul, Korea) para el caso de las muestras del Fiordo Comau, y por el laboratorio de Análisis de Fragmentos de ADN del Departamento de Ecología (Facultad de Ciencias Biológicas de la Pontificia Universidad Católica de Chile; Santiago, Chile) para el caso de las muestras del Fiordo Puyuhuapi. En ambos casos se utilizó como estándar interno el GS500LIZ.

4.2.3 Pirosecuenciación Roche 454 del gen 16S ARNr

Para identificar taxonómicamente las comunidades microbianas de las muestras de agua (Fiordo Comau) y sedimento (Fiordo Puyuhuapi), se utilizó el análisis de pirosecuenciación Roche 454 del gen 16S ARNr. La secuenciación fue llevada a cabo por el Laboratorio Research and Testing Laboratory (Lubbock, Texas, Estados Unidos) utilizando como primer *forward* el 28F (5' GAG TTT GAT CNT GGC TCA G 3'), y como *reverse* el 519R.

4.3 VARIABLES OCEANOGRÁFICAS

Los parámetros ambientales medidos en la capa salobre y marina del Fiordo Comau fueron la temperatura, salinidad, concentración de clorofila-*a*, nitrito, nitrato, fosfato, silicato y carbono orgánico particulado total (POC total = POC+PON). La temperatura y salinidad se caracterizaron utilizando un CTD AML Oceanographic modelo MINOS-X. La concentración de clorofila-*a* se determinó a partir del prefiltrado de aproximadamente 2 L de agua a través de filtros Whatman[®] GF/F de 0,7 µm. Su concentración fue estimada utilizando el método descrito por Parsons *et al.* (1984) mediante un fluorómetro Turner TD-700. Para los nutrientes (nitrito, nitrato, fosfato y silicato), las muestras de cada profundidad (tomadas en bidones) fueron prefiltradas con jeringas estériles en Whatman[®] GF/F de 0,7 µm y guardadas en frasco estériles de 15 mL. Posteriormente fueron analizadas en la Universidad de Concepción por medio de un autoanalizador Technicon® II. Para el POC se filtraron 2 L de muestra en GFF de 0,7 µm premuflados por 5 horas a 450°C y luego fueron enviados a la Universidad de California Davies para la obtención de POC y PON.

Los parámetros bioquímicos medidos del sedimento del Fiordo Puyuhuapi, fueron el tipo de sustrato, contenido de oxígeno disuelto de fondo (ODF), materia orgánica total, pH,

potencial de óxido-reducción y contenido de sulfuro de hidrógeno (H₂S). El sustrato fue expresado como porcentaje de fango (< 63 µm) de la fracción sedimentaria de acuerdo a Folk (1974). El ODF fue medido en la interfaz agua-sedimento (10 cm adyacentes al fondo) utilizando el método de Winkler (Parsons *et al.*, 1984). Las muestras de agua fueron sifoneadas mediante una manguera de silicona insertada en la sección superior del testigo. El contenido de materia orgánica fue determinado por el método de calcinación de acuerdo a Luczak *et al.* (1997) y los resultados fueron presentados como promedios de porcentaje en peso (%) de materia orgánica. El pH y potencial de óxido-reducción se midieron de acuerdo al método descrito por Hargrave *et al.* (1997) y modificado por Wildish *et al.* (2001). Se utilizó un equipo Mettler Toledo con un electrodo de pH con compensador de temperatura, y para la medición de potencial de óxido-reducción se utilizó un electrodo Mettler Toledo a con un electrodo de H₂S fue determinado de acuerdo a lo descrito por Hargrave *et al.* (1997) y modificado por Wildish *et al.* (2001). Las muestras de agua intersticial se extrajeron con jeringas de 60 mL que contenían 5 mL de una solución SAOB y se midieron con un electrodo ión-específico en un vaso precipitado.

4.4 ANÁLISIS BIO – ESTADÍSTICO

Los cromatogramas del T-RFLP fueron extraídos utilizando el procedimiento de Carballa *et al.* (2011) a través del software Peak Scanner versión 1.0 (Applied Biosystems, Halle, Bélgica), separando una mezcla de fragmentos de ADN de acuerdo a sus tamaños. La data fue filtrada utilizando un p=0,05, obteniéndose una matriz de tamaños o Unidades Taxonómicas Operacionales (OTUs, por sus siglas del inglés *Operational Taxonomic Units*) e intensidad de fluorescencia (abundancia relativa). Se ha demostrado que las OTUs podrían estar al nivel taxonómico de clase o género (Hewson & Fuhrman, 2004; van Dorst *et al.,* 2014) donde un taxón dado estaría representado por más de una OTU (Gillevet *et al.,* 2009). En el presente trabajo, las OTUs se consideraron equivalentes al nivel de clase de la secuenciación (Ver Capítulo "COMPARACIÓN DE LOS PATRONES EN LA ESTRUCTURA DE LA COMUNIDAD MICROBIANA MEDIANTE T-RFLP Y PIROSECUENCIACIÓN ROCHE 454 PARA AMBOS FIORDOS"). Las matrices obtenidas con las endonucleasas de restricción (MspI y HhaI) fueron comparadas, utilizando para los análisis de este trabajo las procedentes de la enzima MspI, con la que se obtuvo una mayor recuperación de OTUs (entre un 20 y 50% más; ver Figura en Anexo 1).

Los datos de secuenciación fueron clasificados taxonómicamente utilizando la base general de datos M5RNA (que incluye SILVA, Greengenes y RDP) del año 2014, disponible en el servidor metagenomic RAST (MG-Rast, v3.3.6; http://metagenomics.anl.gov) (Meyer *et al.*, 2008). Como umbral de análisis se utilizó un valor e- máximo de corte de 1e-20, una identidad mínima del 70% y una alineación de longitud mínima de 50%. Se identificaron todas las taxas en siete niveles taxonómicos (desde especie a dominio), sin embargo, para este estudio se trabajó al nivel de clase, orden y especie, utilizando como filtro una abundancia mínima de 2 individuos. La selección de niveles taxonómicos inferiores, como clase y orden, se basó en la necesidad de estudiar los patrones generales de distribución de la comunidad microbiana y sus cambios en composición (e.g., Bowman & McCuaig 2003; Bissett *et al.*, 2006). Una mayor resolución (i.e. especies) fue requerida para analizar los índices ecológicos y abundancias relativas de los grupos raros (e.g., Pedrós-Alió, 2006; Sogin *et al.*, 2006; Fuhrman, 2009; Galand *et al.*, 2009) de la comunidad, descritos más adelante.

Para determinar si el número de secuencias obtenidas representaron una fracción significativa o no de una muestra (Acinas, 2007), se construyeron curvas de rarefacción para cada fiordo. Para esto se trabajó con el software R v3.1.1 (http://www.R-project.org) y la función *rarefaction* del paquete "*vegan*", y como variable biológica se utilizaron las OTUs al mayor nivel taxonómico obtenido (i.e. especies). En los análisis de rarefacción cuando el estimador alcanza una asíntota, la secuencia puede ser considerada representativa para una estimación de la riqueza de OTUs (Kemp & Aller 2004).

4.4.1 Análisis de la diversidad de la comunidad microbiana

La biodiversidad microbiana de cada muestra y para ambos sistemas de fiordos se caracterizó mediante el cálculo del índice de riqueza de Margalef (d), de equidad de Pielou (J') y de diversidad de Shannon (H') y de Simpson (λ '), como se muestra a continuación.

1.- Índice de riqueza de especies de Margalef (d):

S-1	S: número de especies
$a = \frac{1}{\ln(N)}$	N: número total de individuos

2.- Índice de Equidad de Pielou (J'):

	H'max: índice de Shannon máximo;
$J' = \frac{H'}{H'}$	H'max = ln(S)
11 max	S: número de especies

3.- Shannon-Weaver (H') (Shannon & Weaver, 1949):

 $p_i = \frac{n_i}{N}$ es la abundancia relativa $H' = -\sum p_i \ln p_i$ $n_i:$ Número de individuos de cada especie N: Número total de individuos

4.- Índice de Simpson (λ') :

$$1 - \lambda' = 1 - \sum \frac{N_i(N_i - 1)}{N(N - 1)}$$
 n_i : número de individuos de cada especie
N: número total de individuos

4.4.2 Análisis de la estructura y composición de la comunidad microbiana

En ambos fiordos la estructura microbiana, en términos de abundancia, se examinó a través de un análisis de cluster utilizando el software R v3.1.1 (http://www.R-project.org) y el paquete y función "*pvclust*". Como variable biológica se utilizaron las abundancias de

OTUs del T-RFLP y secuenciación (al nivel de clase y orden), las cuales fueron transformadas (raíz cuarta) eliminando el efecto de distintas escalas de medida y reduciendo la influencia de los valores grandes. La incertidumbre del cluster fue estimado a través del análisis *bootstrap* de las muestras (columnas), donde la distancia se calculó mediante la función "*method.dist*" usando el método "*manhattan*" y el número de remuestreos fue designado de 10.000 ("*nboot*"). Este método calcula los valores de probabilidad (*p-values;* en este caso probabilidad *bootstrap*) para cada cluster utilizando la técnica de remuestreo (Suzuki & Shimodaira, 2006). El valor de probabilidad *bootstrap* de un cluster se refiere a la frecuencia (o porcentaje) en que este aparece dentro de las réplicas del análisis o remuestreos (Suzuki & Shimodaira, 2006), siendo considerado como una medida de similitud entre los clusters.

La composición de la comunidad se representó mediante gráficos de columnas apiladas de abundancia relativa, tanto para las OTUs obtenidas del T-RFLP como de la secuenciación (al nivel de clase y orden). Adicionalmente, se realizó un análisis comparativo SIMPER para determinar la contribución de cada OTU (tanto del T-RFLP como secuenciación) a la similitud observada entre las muestras. Para esto, se utilizó el software PRIMER-E (v.6, Clarke y Warwick, 2001). La data biológica fue transformada (raíz cuarta) y como método de medida se utilizó el de Bray-Curtis (Ludwig & Reynolds, 1988). Los grupos de muestras fueron considerados de acuerdo a su localización (por capas para el Fiordo Comau y por zona para el Fiordo Puyuhuapi), por época (Fiordo Comau) y por el estado operacional de los centros salmoneros (Fiordo Puyuhuapi).

4.4.2.1 Análisis de grupos abundantes y raros

A un mayor nivel de resolución, se analizaron las OTUs microbianas al nivel taxonómico de especie de los datos obtenidos de la secuenciación, clasificándolas como abundantes y raras. Para esto se consideró a los grupos abundantes como aquellos que comprendieron más del 1% de las secuencias en una muestra (Galand *et al.*, 2009; Campbell *et al.*, 2011; Hugoni *et al.*, 2013), mientras que las OTUs raras fueron definidas como OTUs

que representaron $\leq 0,2\%$ de las secuencias en una muestra (Hugoni *et al.*, 2013). Esta definición se encuentra dentro del rango entre el 0,1 – 1% que se considera normalmente (Fuhrman, 2009) y es más estricta que el 1% que habitualmente se utiliza (Campbell *et al.*, 2011). Se definieron las OTUs como semi-raras a aquellas que se encontraron entre el 0,2 – 1% restante de las secuencias y como siempre raras (o abundantes) cuando estas lo fueron en todas las muestras. A partir de estas clasificaciones, se generaron histogramas de riqueza y abundancia respecto a la frecuencia de ocurrencia de las OTUs. Al mismo tiempo se construyeron dendogramas independientes para ambos grupos (abundantes y raros) con el software R v3.1.1 a través del análisis *bootstrap* de las muestras (columnas) para estimar la incertidumbre del cluster, utilizando el paquete "*pvclust*" donde la distancia se calculó mediante la función "*method.dist*" usando el método "*manhattan*", y el número de remuestreos fue de 10.000 ("*nboot*").

4.4.3 Análisis de las variables oceanográficas

Con el objetivo de caracterizar los patrones de distribución de la comunidad microbiana en el agua y sedimento, se calculó el coeficiente de correlación de Pearson (r) entre los factores abióticos (i.e., características físico – químicas del agua y sedimentos) y algunos índices ecológicos (riqueza, abundancia y diversidad), así como con las abundancias relativas obtenidas de la secuenciación (a nivel de clase) de los grupos más abundantes (>1% de la abundancia total).

Adicionalmente, se llevó a cabo un Análisis de Correspondencia Canónica (ACC) para determinar la relación entre las OTUs y los factores abióticos. El triplot de ACC se construyó con el software R v3.1.1 utilizando la función "*cca*" del paquete "*vegan*". Se trabajó con los logaritmos (ln x + 1) de las variables ambientales y la raíz cuarta de las variables biológicas, eliminando el efecto de distintas escalas de medida y reduciendo la influencia de los valores grandes.

5. RESULTADOS

5.1 FIORDO COMAU

5.1.1 Caracterización físico-química de las capas de agua salobre (~0,5m) y marina (20m)

La data ambiental proporcionada por el proyecto Fondecyt 1110190, muestra que el Fiordo Comau estuvo caracterizado por una capa superficial de baja salinidad (< 24,10 psu) con temperaturas mayores a 8,82°C y una capa subsuperficial más salina (> 29,35 psu) con temperaturas menores a 11,80°C (Figura 3). Estacionalmente, en marzo 2012 y enero 2013, la capa salobre presentó menor salinidad (<20,00 psu) y mayor temperatura (>16,53), mientras que, en julio 2012 esta capa fue más salina (24,10 psu) y fría (9,84°C), observándose también una estratificación permanente a lo largo del fiordo (Hernández com.pers).



Figura 3. Distribución vertical (capa salobre y marina) y estacional de la (a) salinidad y (b) temperatura presentes en el agua del Fiordo Comau (Ver Tabla en Anexo 2). Las barras de error corresponden a la desviación estándar (n=3).

La capa marina se caracterizó por presentar máximas concentraciones de clorofila-*a* durante enero 2013 (7,28 mg m⁻³) y mínimas de nitrito (0,14 μ M), nitrato (0,53 μ M), fosfato

 $(0,47 \ \mu\text{M})$, silicato $(0,49 \ \mu\text{M})$ y POC total $(2,19 \ \text{mg L}^{-1})$ (Figura 4). La capa salobre presentó altas concentraciones de nitrito $(0,38 \ \mu\text{M})$, nitrato $(12,81 \ \mu\text{M})$ y silicato $(20,69 \ \mu\text{M})$ en julio 2012.



Figura 4. Distribución vertical (capa salobre y marina) y estacional de las concentraciones de (a) Clorofila-*a*, (b) Nitrito, (c) Nitrato, (d) Fosfato, (e) Silicato y (f) Carbono Orgánico Particulado Total (POC total) presentes en el agua del Fiordo Comau (Ver Tabla en Anexo 2). Las barras de error corresponden a la desviación estándar (n=3).

El análisis de Pearson (Tabla 2) en la capa salobre, mostró que a medida que aumentó la temperatura, la salinidad (r = -1,00; p<0,10) y el silicato (r = -1,00; p<0,05) tendieron a disminuir. En la capa marina el NO₃⁻ tendió a aumentar junto con la concentración de silicato (r = 1,00; p<0,10) y a disminuir con el aumento de la clo-*a* (r = -0,99; p<0,10).

Tabla 2. Correlación de Pearson (r) entre las variables ambientales del Fiordo Comau medidas durante los años 2012 (marzo y julio) y 2013 (enero). En gris se destacan las correlaciones significativas (p<0,05). Para la capa marina no se calcularon correlaciones con el POC Total por insuficiencia de datos (n=2).

	Temperatura	Salinidad	Clorofila-a	Nitrito	Nitrato	Fosfato	Silicato	POC Total	
Capa salobre (~0,5m)									
Temperatura									
Salinidad	-1,00*								
Clorofila-a	-0,81	0,84							
Nitrito	-0,93	0,95	0,97						
Nitrato	-0,94	0,96	0,96	1,00					
Fosfato	-0,53	0,49	-0,07	0,19	0,22				
Silicato	-1,00	1,00	0,83	0,94	0,95	0,50			
POC Total	-0,02	-0,03	-0,57	-0,34	-0,32	0,86	-0,01		
Capa marina (20m)									
Temperatura									
Salinidad	0,28								
Clorofila-a	0,64	0,92							
Nitrito	-0,34	-1,00	-0,94						
Nitrato	-0,73	-0,86	-0,99*	0,89					
Fosfato	-0,90	-0,67	-0,91	0,72	0,95				
Silicato	-0,79	-0,81	-0,98	0,85	1,00*	0,98			
* p<0,10									

5.1.2 Diversidad alfa de la comunidad bacterioplanctónica (bacterias y arqueas)

5.1.2.1 Resultados obtenidos del análisis de la data del T-RFLP del gen 16S ARNr

A través del T-RFLP se detectaron 69 OTUs con un rango de 17-40 OTUs de riqueza (Tabla 3). Las mayores riquezas se registraron en el mes de julio 2012, tanto en la capa salobre (40 OTUs; d=3,09) como marina (37 OTUs; d=2,91), donde también se registraron 10 y 8 OTUs únicas (i.e., no registradas en ninguna otra muestra), respectivamente. En julio 2012 (capa salobre y marina) también se registró la mayor equidad (o índice de Pielou; J'=0,90) y diversidad de Shannon (H'= 3,32 y 3,24) y de Simpson (1- λ '= 0,95 y 0,94).

Tabla 3. Índices de diversidad (riqueza, abundancia, índice de Margalef, de Pielou, de Shannon y de Simpson) obtenidos para las capas (salobre y marina) y meses (julio 2012 y enero 2013) analizados con la técnica de T-RFLP (OTUs que aducen a clases) del Fiordo Comau. En gris se destacan los valores máximos.

	Capa Salo	bre (~0,5m)	Capa Marina (20m)		
	Julio 2012	Enero 2013	Julio 2012	Enero 2013	
Riqueza (S)	40	17	37	34	
N° de OTUs únicas	10	2	8	13	
Abundancia (N)	299.998	153.756	237.159	284.977	
Índice de Margalef (d)	3,09	1,34	2,91	2,63	
Equidad de Pielou (J')	0,90	0,72	0,90	0,79	
Índice de Shannon (H')	3,32	2,04	3,24	2,80	
Índice de Simpson $(1-\lambda')$	0,95	0,81	0,94	0,90	

5.1.2.2 Resultados obtenidos del análisis de la data de pirosecuenciación del gen 16S ARNr

A través de la secuenciación, se observó que para todas las muestras de agua de ambas capas (salobre y marina), las curvas de rarefacción se aproximaron a una asíntota indicando que la recuperación de secuencias fue satisfactoria (Figura 5). Un total de 50.317 secuencias fueron recuperadas con un rango de 3.255 - 12.418 secuencias, de las cuales entre un 64,24 y 83,94% fueron clasificadas (Tabla 4). De estas, se registraron 399 OTUs diferentes (que
aducen al nivel taxonómico de especies) con un rango de 109 - 218 OTUs contenidas en un total de 28 clases y 62 órdenes.



Figura 5. Curva de rarefacción de las OTUs (referidas a especies) clasificadas del bacterioplancton (bacterias y arqueas) obtenidas a partir de la secuenciación de las muestras del Fiordo Comau.

La mayor riqueza se registró en la capa salobre durante el mes de marzo 2012 con 218 OTUs (que aducen a especies), de las cuales 93 OTUs fueron únicas. En la capa marina durante el mismo período, se encontró la mayor equidad (o índice de Pielou; J'=0,76) y diversidad de Shannon (H'=3,80) y de Simpson (1- λ '=0,96).

Tabla 4. Número de secuencias totales recuperadas y clasificadas, e índices de diversidad (riqueza, abundancia, índice de Margalef, de Pielou, de Shannon y de Simpson) obtenidos para las muestras de agua analizadas con la técnica de pirosecuenciación Roche 454 del Fiordo Comau durante los años 2012 (marzo y julio) y 2013 (enero). En gris se destacan los valores máximos.

	Capa Salobre (~0,5m)		Capa Marina (20m)		20m)	
	Marzo 2012	Julio 2012	Enero 2013	Marzo 2012	Julio 2012	Enero 2013
Secuencias totales recuperadas	10.797	8.179	3.255	6.096	12.418	9.572
Secuencias clasificadas	9.063	6.675	2.091	4.902	9.649	7.314
Fracción secuencias clasificadas	0,839	0,816	0,642	0,804	0,777	0,764
OTUs (Clase)						
Riqueza (S)	22	21	18	19	19	18
N° de OTUs únicos	2	1	0	0	0	0
Abundancia (N)	9.154	6.722	2.150	4.975	9.723	7.354
OTUs (Orden)						
Riqueza (S)	40	36	33	32	39	29
N° de OTUs únicos	6	4	2	1	3	1
Abundancia (N)	9.150	6.717	2.143	4.970	9.716	7.350
OTUs (Especies)						
Riqueza (S)	218	126	109	150	150	123
N° de OTUs únicos	93	20	28	44	27	16
Abundancia (N)	9.063	6.675	2.091	4.902	9.649	7.314
Índice de Margalef (d)	23,81	14,19	14,13	17,53	16,24	13,71
Equidad de Pielou (J')	0,68	0,59	0,74	0,76	0,51	0,54
Índice de Shannon (H')	3,65	2,86	3,45	3,80	2,56	2,58
Índice de Simpson $(1-\lambda')$	0,94	0,88	0,94	0,96	0,80	0,82

5.1.3 Estructura comunitaria del bacterioplancton (bacterias y arqueas)

5.1.3.1 Resultados obtenidos del análisis de la data del T-RFLP del gen 16S ARNr

La Figura 6 muestra el análisis de agrupamiento de las OTUs de las muestras de agua (capa salobre y marina) en los meses de julio 2012 y enero 2013 obtenido a través del T-RFLP. En términos de abundancia, este análisis permitió reconocer dos grupos con altos valores de *bootstrap*, el primero conformado por la capa salobre y marina en el mes de julio 2012, cuyas estructuras comunitarias se agruparon el 100% de las veces en los 10.000 remuestreos que se realizaron con este análisis. El segundo grupo estuvo conformado por la capa salobre y marina del mes de enero 2013 con un valor de *bootstrap* o probabilidad de 99%.



Figura 6. Análisis de agrupamiento de las OTUs (que aducen a clases) de bacterias del Fiordo Comau analizadas a través del T-RFLP. En azul se muestra el valor de *bootstrap* obtenido del análisis *pvclust* en R. La altura denota la disimilitud entre los clusters; a mayor altura, mayor es la disimilitud entre ellos.

5.1.3.2 Resultados obtenidos del análisis de la data de pirosecuenciación del gen 16S ARNr

La Figura 7 muestra el análisis de agrupamiento de las OTUs de bacterias y arqueas, referidas a las clases y órdenes de las muestras de agua (capa salobre y marina) en los meses de marzo y julio 2012, y enero 2013 examinadas a través de la secuenciación. Con estos

análisis se observaron dos principales agrupaciones, el primero de ellos conformado por las muestras del mes de julio 2012 (capa salobre y marina) y enero 2013 (capa marina) con un alto valor de *bootstrap* (>88%). El segundo grupo mostró un menor valor *bootstrap* y varió entre los diferentes niveles taxonómicos, conformándose por las muestras del mes de marzo 2012 (capa salobre y marina) al nivel de clase (*bootstrap*=44%) y por las muestras del mes de mes de enero 2013 (capa salobre) y marzo 2012 (capa marina) al nivel de orden (*bootstrap*=39%).



Figura 7. Análisis de agrupamiento de las OTUs de bacterioplancton del Fiordo Comau al nivel taxonómico de (a) clase y (b) orden analizadas a través de la pirosecuenciación Roche 454. En azul se muestra el valor de *bootstrap* obtenido del análisis *pvclust* en R. La altura denota la disimilitud entre los clusters; a mayor altura, mayor es la disimilitud entre ellos.

5.1.4 Composición de la comunidad bacterioplanctónica (bacterias y arqueas) obtenida con el método de pirosecuenciación Roche 454 del gen 16S ARNr

La composición de las OTUs referidas a las clases y órdenes bacterioplanctónicas de la secuenciación se muestran en las Figuras 8 y 9. De un total de 39.694 secuencias de bacterioplancton detectados, el 67,32% correspondió a bacterias con un rango de 36,94 - 100% de la abundancia total, mientras que el 32,68% correspondió a arqueas con un rango de 0,51 - 63,06%. Las arqueas no se detectaron en la capa salobre durante el mes de marzo 2012.

Se observó que las muestras del Fiordo Comau, estuvieron representadas principalmente por las clases *Cyanobacteria (unclassified)* y *Thaumarchaeota (unclassified)* con abundancias entre 14,56 – 64,85% y 0,50 – 62,58%, respectivamente (Figura 8). Las primeras dominaron las capas salobres (>34,74%) mientras que las segundas lo hicieron en la capa marina (>54,92%). Otras de las clases más abundantes fueron las *Cytophagia, Flavobacteriia y Alphaproteobacteria,* donde las dos primeras fueron más abundantes en el mes de marzo 2012 (capa marina) con valores de 10,45 y 31,70%, respectivamente, mientras que la *Alphaproteobacteria* obtuvo sus máximos en enero 2013 (capa salobre; 27,44%).

Dentro de las comunidades arqueanas, los órdenes más abundantes fueron las *Cenarchaeales* y *Nitrosopumilales*, pertenecientes a la clase *Thaumarchaeota (unclassified)*, alcanzando entre ambos órdenes más del 96% de la abundancia total de arqueas (Figura 9). Menores abundancias se registraron en las *Methanosarcinales* (de la clase *Methanomicrobia*) y *Nitrosophaerales* (de la clase *Thaumarchaeota unclassified*) con valores menores al 2,65% de la abundancia total de arqueas.

El análisis comparativo SIMPER realizado por capas (Tabla 5), no reveló grandes discrepancias en la composición entre la capa salobre y marina (disimilitud promedio entre salobre-marino: 24,10%). No obstante, se observó que la clase *Thaumarchaeota* (*unclassified*) contribuyó más a las muestras de la capa marina (10,37%) que salobre (4,45%),

mientras que las *Cyanobacteria (unclassified)* y *Clostridia* contribuyeron más a las muestras de la capa salobre (16,43 y 5,76%, respectivamente) que marina (14,32 y 3,97%, respectivamente).

De la misma forma, el análisis comparativo SIMPER realizado por épocas (Tabla 6), no reveló grandes discrepancias en la composición entre las muestras de verano e invierno (disimilitud promedio entre verano-invierno: 22,62%). Se observó que las clases *Thaumarchaeota (unclassified)* y *Bacteroidetes (unclassified)* contribuyeron más a las muestras de invierno (14,74 y 3,39%, respectivamente) que de verano (4,43 y 2,13%, respectivamente), mientras que las *Cyanobacteria unclassified, Flavobacteriia* y *Cytophagia* contribuyeron más a las muestras de verano que de invierno en más de un 2,4%.



Figura 8. Composición de las comunidades del bacterioplancton (bacterias y arqueas) y distribución vertical y temporal de las OTUs (referidas a clases) clasificadas del Fiordo Comau analizadas con la técnica de pirosecuenciación Roche 454.



Figura 9. Composición de las comunidades del bacterioplancton (bacterias y arqueas) y distribución vertical y temporal de las OTUs (referidas a órdenes) clasificadas del Fiordo Comau analizadas con la técnica de pirosecuenciación Roche 454.

Tabla 5. Análisis comparativo (SIMPER) entre las muestras asociadas a la capa salobre y marina del Fiordo Comau. Como variable biológica se utilizaron las OTUs (referidas a clase) de la secuenciación.

OTUs (clases)	% Contribución	% Acumulativo
Capa salobre (~0,5m; similitud promedio: 73,9%)*		
Cyanobacteria unclassified	16,43	16,43
Flavobacteriia	10,41	26,84
Alphaproteobacteria	10,41	37,24
Gammaproteobacteria	7,78	45,02
Actinobacteria	7,30	52,32
Cytophagia	7,14	59,46
Clostridia	5,76	65,21
Bacteroidia	4,60	69,81
Proteobacteria unclassified	4,47	74,29
Thaumarchaeota unclassified	4,45	78,73
Epsilonproteobacteria	3,89	82,63
Betaproteobacteria	3,62	86,25
Bacilli	3,53	89,78
Sphingobacteriia	3,09	92,87
Capa marina (20m; similitud promedio: 75,98%)*		
Cyanobacteria unclassified	14,32	14,32
Alphaproteobacteria	10,64	24,96
Flavobacteriia	10,38	35,33
Thaumarchaeota unclassified	10,37	45,70
Gammaproteobacteria	7,72	53,42
Cytophagia	7,46	60,88
Actinobacteria	6,47	67,35
Planctomycetia	4,85	72,19
Bacteroidetes unclassified	4,22	76,42
Clostridia	3,97	80,38
Bacteroidia	3,71	84,10
Betaproteobacteria	3,59	87,69
Verrucomicrobiae	3,38	91,07

* Disimilitud promedio entre salobre-marino: 24,10%

Tabla 6. Análisis comparativo (SIMPER) entre las muestras asociadas a la temporada de verano (Marzo 2012 y Enero 2013) e invierno (Julio 2012) del Fiordo Comau. Como variable biológica se utilizaron las OTUs (referidas a clase) de la secuenciación.

OTUs (clases)	% Contribución	% Acumulativo
Verano (similitud promedio: 71,14%)*		
Cyanobacteria unclassified	16,64	16,64
Flavobacteriia	11,44	28,08
Alphaproteobacteria	10,94	39,02
Cytophagia	8,51	47,53
Gammaproteobacteria	8,15	55,68
Actinobacteria	7,17	62,85
Clostridia	4,91	67,76
Thaumarchaeota unclassified	4,43	72,18
Bacteroidia	4,12	76,31
Epsilonproteobacteria	3,58	79,89
Betaproteobacteria	3,49	83,37
Planctomycetia	2,75	86,13
Bacilli	2,45	88,58
Bacteroidetes unclassified	2,13	90,71
Invierno (similitud promedio: 86,86%)*		
Thaumarchaeota unclassified	14,74	14,74
Cyanobacteria unclassified	11,69	26,43
Alphaproteobacteria	9,31	35,74
Flavobacteriia	8,73	44,46
Gammaproteobacteria	6,70	51,17
Actinobacteria	6,34	57,51
Cytophagia	6,10	63,61
Proteobacteria unclassified	4,38	67,99
Betaproteobacteria	4,04	72,03
Clostridia	3,97	76,00
Bacteroidia	3,87	79,87
Planctomycetia	3,40	83,26
Bacteroidetes unclassified	3,39	86,65
Epsilonproteobacteria	3,12	89,78
Deltaproteobacteria	2,75	92,52

* Disimilitud promedio entre verano-invierno: 22,62%

5.1.4.1 OTUs (especies) abundantes y raras

De un total de 399 OTUs (referidas a especies) detectadas en la secuenciación, se encontraron 38 OTUs abundantes, de las cuales el 21,05% (8 OTUs) fueron sólo abundantes

(i.e. no variaron a rara o semi-rara) y el 78,95% restante (30 OTUs) variaron a rara y/o semirara (Tabla 7). Estas últimas pertenecieron a 9 clases, donde las más frecuentes fueron las *Flavobacteriia* (8 especies), *Cyanobacteria* (6 especies) y *Alphaproteobacteria* (4 especies). Dentro del grupo de las arqueas, sólo 3 de ellas variaron entre raras y abundantes, la *Cenarchaeum symbiosum* del orden *Cenarchaeales*, y las *Candidatus Nitrosopumilus sp. NM25* y *Nitrosopumilus maritimus* del orden *Nitrosopumilales*.

Del total de OTUs registradas, 355 OTUs fueron raras, de las cuales sólo el 20,85% (74 OTUs) varió a semi-rara y/o abundante, mientras que el 79,15% restante (281 OTUs) fueron sólo raras (i.e. no variaron a semi-rara o abundante) (Tabla 7). Tres OTUs fueron raras en todas las muestras, las cuales pertenecieron a las clases *Actinobacteria (Microbacterium sp. ORS 1417 y Mycobacterium sp. 2333) y Flavobacteriia (Salegentibacter salegens)*.

Tabla 7. Resumen del total de OTUs raras (i.e., OTUs que contribuyen $\leq 0,2\%$ a la abundancia total), semi-raras (i.e., OTUs que contribuyen entre el 0,2 - 1% de la abundancia total) y abundantes (i.e., OTUs que contribuyen $\geq 1\%$ a la abundancia total) de la comunidad bacterioplanctónica (bacterias y arqueas) del Fiordo Comau.

Total OTUs raras ($\leq 0,2\%$)	355
N° OTUs sólo raras	281 (79,15%)
Total OTUs semi-raras $(0, 2 - 1\%)$	102
N° OTUs sólo semi-raras	23 (22,55%)
Total OTUs abundantes ($\geq 1\%$)	38
N° OTUs sólo abundantes	8 (21,05%)
Total OTUs que varía	87
N° OTUs raras / semi-raras	57 (65,52%)
N° OTUs raras / abundantes	8 (9,20%)
N° OTUs semi-raras / abundantes	13 (14,94%)
N° OTUs raras / semi-raras / abundantes	9 (10,34%)

A partir del análisis de distribución de las OTUs raras y abundantes (Figura 10), se observaron riquezas similares de OTUs raras entre la capa salobre (300 OTUs en total) y

marina (289 OTUs). En ambas capas las mayores riquezas se encontraron en frecuencias \leq 0,2% (i.e., OTUs raras) y disminuyeron en frecuencias >0,2%. En el rango de 0,601 y 0,999% se encontraron las menores riquezas (1 a 10 OTUs). En la capa salobre el mayor número de OTUs raras (\leq 0,2%) se encontraron en marzo 2012 (157 OTUs), mientras que, el menor número de OTUs raras se encontraron en enero 2013 (56 OTUs). En contraste, en la capa marina el mayor número de OTUs raras se encontraron en julio 2012 (114 OTUs) y los menores en marzo 2012 (86 OTUs) y enero 2013 (89 OTUs).



Figura 10. Distribución de riqueza de OTUs (referidas a especies) raras (i.e., OTUs que contribuyen $\leq 0,2\%$ a la abundancia total), semi-raras (i.e., OTUs que contribuyen entre el 0,2 - 1% de la abundancia total) y abundantes (i.e., OTUs que contribuyen $\geq 1\%$ a la abundancia total) del bacterioplancton (bacterias y arqueas) en las capas (a) salobre y (b) marina del Fiordo Comau obtenidas a través de la pirosecuenciación Roche 454.

Las Figuras 11 y 12 muestran la transición de las OTUs raras entre capas (Figura 11) y estacionalmente (Figura 12), y si estas cambian a semi-raras, abundantes o bien no son detectadas (i.e. abundancia = 0). A través de este análisis se observó que las OTUs raras permanecieron raras en la capa salobre y marina entre el 19,75 y 50,57%, mientras que, entre el 42,53 y 73,89% de las OTUs raras no fueron detectadas en la capa marina, al comparar ambas capas durante un mismo mes (Figura 11). Estacionalmente, entre el 17,24 y 36,84% de las OTUs raras no fueron detectadas (Figura 12). Sólo entre el 54,39 y 79,62% de las OTUs raras no fueron detectadas (Figura 12). Sólo entre el 0,88 y 11,49% de las OTUs raras variaron a semi-raras o abundantes.



Figura 11. Transición de las OTUs raras y sus variaciones en abundancia a semi-raras, abundantes o si desaparecen (i.e. abundancia = 0) entre las capas analizadas a través de la pirosecuenciación Roche 454 del Fiordo Comau (Ver Figura en Anexo 3).



Figura 12. Transición de las OTUs raras entre los diferentes meses analizados a través de la pirosecuenciación Roche 454 del Fiordo Comau (Ver Figura en Anexo 3).

5.1.5 Efecto de las variables físico-químicas del agua sobre la estructura de la comunidad bacterioplanctónica

Se determinó la relación entre las variables ambientales y algunos índices de diversidad para la técnica de secuenciación (con el T-RFLP el número de muestras fue insuficiente para este análisis; sólo 2 muestras por capa), a través del coeficiente de correlación de Pearson (r, Tabla 8). El análisis reveló algunas correlaciones significativas (p<0,05), tanto positiva para el caso de la relación entre el contenido de fosfato y la abundancia en la capa salobre (r = 0,998), como negativa entre la clo-*a* y la diversidad de Shannon en la capa salobre (r = -0,998) y también con la riqueza en la capa marina (r = -1,000).

El análisis del coeficiente de Pearson (r) entre las abundancias relativas de las clases más abundantes del bacterioplancton (>1% de la abundancia total) y las variables ambientales

se muestra en la Tabla 9. No se observaron correlaciones significativas (p<0,05), a excepción de las *Actinobacteria*, las cuales se correlacionaron negativamente con la salinidad (r = -0,999).

Tabla 8. Correlación de Pearson (r) entre algunos índices de diversidad (S: riqueza, N: abundancia y H': diversidad de Shannon) obtenidos de la secuenciación (OTUs que aducen a especies), y las variables ambientales del Fiordo Comau. En gris se destacan las correlaciones significativas (p<0,05). Ref.: Temp.: Temperatura, Sal.: Salinidad; Clo: Clorofila-*a*, NO₂⁻: concentración de nitrito, NO₃⁻: concentración de nitrato, Fosf.: concentración de fosfato, Silic.: concentración de silicato, POC Total: Carbono Orgánico Particulado Total.

	Temp.	Sal.	Clo	NO ₂ -	NO ₃ -	Fosf.	Silic.	POC Total	
Capa Salobre $(0,5m; n=3)$									
Riqueza (S)	0,063	-0,114	-0,637	-0,417	-0,396	0,811	-0,096	0,991	
Abundancia (N)	-0,475	0,429	-0,132	0,128	0,150	0,998	0,446	0,911	
Índice de Shannon (H')	0,844	-0,870	-0,998	-0,980	-0,975	0,006	-0,861	0,476	
Capa Marina (20m; n=	3)								
Riqueza (S)	-0,720	-0,927	-1,000	0,950	0,989	0,900	0,971	-0,649	
Abundancia (N)	-0,687	0,383	-0,020	-0,322	0,137	0,428	0,229	-0,755	
Índice de Shannon (H')	0,254	-0,779	-0,462	0,737	0,355	0,058	0,266	0,348	

Tabla 9. Correlación de Pearson (r) entre las abundancias relativas de las clases más abundantes del bacterioplancton (>1% de la abundancia total) y las variables ambientales del Fiordo Comau. Para la capa marina no se calcularon correlaciones con el POC Total por insuficiencia de datos (n=2). En gris se destacan las correlaciones significativas (p<0,05). Ref.: Temp.: Temperatura, Sal.: Salinidad; Clo: Clorofila-*a*, NO₂⁻: concentración de nitrito, NO₃⁻: concentración de nitrato, Fosf.: concentración de fosfato, Silic.: concentración de silicato, POC Total: Carbono Orgánico Particulado Total.

	Temp.	Sal.	Clo	NO ₂ -	NO ₃ -	Fosf.	Silic.	POC Total
Capa salobre (0,5m; n=3)								
Actinobacteria	0,510	-0,553	-0,915	-0,789	-0,770	0,459	-0,537	0,847
Bacteroidia	-0,450	0,495	0,886	0,745	0,725	-0,518	0,479	-0,881
Cytophagia	0,646	-0,684	-0,970	-0,880	-0,865	0,305	-0,670	0,747
Flavobacteriia	0,738	-0,772	-0,993	-0,934	-0,922	0,181	-0,760	0,656
Cyanobacteria unclassified	-0,156	0,105	-0,448	-0,216	-0,186	0,920	0,124	0,991
Clostridia	0,615	-0,654	-0,959	-0,861	-0,845	0,343	-0,640	0,773
Alphaproteobacteria	0,768	-0,734	-0,251	-0,480	-0,507	-0,950	-0,747	-0,660
Gammaproteobacteria	0,967	-0,953	-0,640	-0,808	-0,826	-0,728	-0,959	-0,278
Verrucomicrobiae	0,207	-0,258	-0,738	-0,551	-0,525	0,719	-0,239	0,973
Thaumarchaeota unclassified	-0,730	0,764	0,991	0,929	0,917	-0,193	0,751	-0,665
Capa marina (20m; n=3)								
Actinobacteria	-0,369	-0,999	-0,898	0,996	0,840	0,644	0,785	-
Bacteroidia	0,168	-0,831	-0,538	0,802	0,435	0,152	0,349	-
Cytophagia	0,323	-0,732	-0,397	0,697	0,286	-0,007	0,195	-
Flavobacteriia	0,287	-0,757	-0,431	0,723	0,322	0,030	0,232	-
Cyanobacteria unclassified	0,724	-0,333	0,073	0,286	-0,190	-0,469	-0,281	-
Clostridia	-0,993	-0,298	-0,656	0,345	0,740	0,905	0,800	-
Alphaproteobacteria	-0,786	0,243	-0,167	-0,194	0,281	0,551	0,370	-
Gammaproteobacteria	-0,679	-0,948	-0,996	0,962	0,979	0,876	0,956	-
Verrucomicrobiae	0,271	-0,768	-0,446	0,735	0,338	0,047	0,248	-
Thaumarchaeota unclassified	-0,349	0,713	0,372	-0,677	-0,260	0,035	-0,168	-

El CCA fue satisfactorio con ambas técnicas moleculares, ya que el 100% de la variabilidad total pudo ser capturada (i.e., variación residual=0). Con el T-RFLP, las variables críticas consideradas explicaron alrededor del 77,7% de la varianza (Figura 13). El primer componente (52,39% de la variabilidad total) dependió principalmente del NO₂⁻ y fosfato, observándose una correlación negativa con ambos parámetros, mientras que el segundo componente (25,31% de la variabilidad total) estuvo correlacionado positivamente con la temperatura. Algunas de las OTUs más abundantes se correlacionaron positivamente

con la temperatura y negativamente con el contenido de fosfato (e.g., OTU21 y OTU35) (Figura 13). Otras OTUs, mostraron correlaciones positivas con el fosfato así como con el NO₂⁻ (e.g., OTU144, OTU22, OTU495, OTU482 y OTU469).

El análisis CCA obtenido de la secuenciación (con las OTUs que aducen a clase) mostró que en conjunto las variables críticas consideradas explicaron alrededor del 69,5% de la varianza (Figura 14). La variable que determinó el primer componente (45,98% de la variabilidad total) fue principalmente la clo-*a*, observándose una correlación positiva. El segundo componente (23,46% de la variabilidad total) estuvo correlacionado positivamente con la salinidad y el NO₂⁻, y negativamente con la temperatura. La presencia de un vector más corto para el fosfato, indica una baja influencia de este factor en la distribución de las OTUs (clases). Estos análisis también fueron ejecutados para los niveles de orden y especie (Ver figuras en Anexo 4 y Anexo 5), obteniéndose una menor varianza en sus componentes, razón por la cual no se presentan en esta sección.

En el primer eje (CCA1) se identificó un grupo asociado con una alta concentración de clo-*a*, salinidad y baja temperatura (Enero 2013 [M]), que incluyó la clase de las *Opitutae* (Figura 14). En el segundo eje (CCA2), el gradiente se estableció sobre la salinidad y temperatura, identificándose un grupo asociado con una alta salinidad y baja temperatura en la parte superior del diagrama, donde se concentraron las muestras Marzo 2012 [M], Julio 2012 [M] y Julio 2012 [S]. Algunas clases en este grupo fueron las: *Verrucomicrobiae, Bacilli, Planctomycetia, Opitutae, Chlorobia, Fusobacteriia y Thaumarchaeota unclassified,* entre otras. El grupo localizado en la parte inferior del diagrama, estuvo determinado por bajas salinidades y altas temperaturas, reuniendo las muestras Marzo 2012 [S] y Enero 2013 [S] con presencia de las clases *Gemmatimonadetes, Negativicutes, Mollicutes y Methanomicrobia.*



Figura 13. Análisis Canónico de Correspondencia de las variables ambientales (en vectores verdes) y las OTUs bacterianas (que aducen a clases; en rojo) obtenidas a partir del T-RFLP de las muestras de agua (en azul) del Fiordo Comau.



Figura 14. Análisis Canónico de Correspondencia de las variables ambientales (en vectores verdes) y las OTUs del bacterioplancton (que aducen a clases; en rojo) obtenidas a partir de la pirosecuenciación Roche 454 de las muestras de agua (en azul) del Fiordo Comau.

Ref.: 1: Actinobacteria, 2: Bacteroidia, 3: Cytophagia, 4: Flavobacteriia, 5: Sphingobacteriia, 6: Bacteroidetes unclassified, 7: Chlorobia, 8: Cyanobacteria unclassified, 9: Deinococci, 10: Bacilli, 11: Clostridia, 12: Negativicutes, 13: Fusobacteriia, 14: Gemmatimonadetes, 15: Nitrospira, 16: Planctomycetia, 17: Alphaproteobacteria, 18: Betaproteobacteria, 19: Deltaproteobacteria, 20: Epsilonproteobacteria, 21: Gammaproteobacteria, 22: Proteobacteria unclassified, 23: Spirochaetia, 24: Mollicutes, 25: Opitutae, 26: Verrucomicrobiae, 27: Methanomicrobia (arquea), 28: Thaumarchaeota unclassified (arquea).

5.2 FIORDO PUYUHUAPI

5.2.1 Caracterización geoquímica del sedimento superficial (0-2cm)

La data ambiental proporcionada por el proyecto SUBPESCA N° 4872-11034-LP08, muestra que los sedimentos superficiales del Fiordo Puyuhuapi estuvieron caracterizados por fracciones finas (< 63 µm), con un rango de 28,84 – 50,65% para el 83,33% de las muestras (Figura 15a). La cabecera de fiordo (sector más cerrado) estuvo caracterizada por menores concentraciones de oxígeno disuelto de fondo (ODF; Figura 15b) y mayores porcentajes de materia orgánica total (MOT; Figura 15c), mientras que la boca (sector más cercano al océano abierto) estuvo caracterizada por altas concentraciones de ODF y bajas de MOT. En la zona intermedia las concentraciones de ODF variaron de 3,28 mL L⁻¹ a valores inferiores al límite de detección, sugiriendo posible anoxia (centro C5), y las concentraciones de MOT fueron bajas. En el centro C5 se registraron las mayores concentraciones de sulfuro intersticial (H₂S; Figura 15d). A lo largo de todo el fiordo persistió la existencia de un entorno reductivo (redox negativo) con valores de potencial de óxido-reducción inferiores a -70 mV, donde los menores fueron registrados en los centros C5 (-334 mV) y C8 (-371 mV) (Figura 15e). El pH fue más alcalino y mayor a 7,06 en el 66,66% de las muestras y más ácido en las muestras restantes con valores de 6,41 en el centro C2 y 6,66 en el centro C5 (Figura 15f).



Figura 15. Distribución horizontal del (a) contenido de fango, (b) oxígeno disuelto de fondo (ODF), (c) materia orgánica total (MOT), (d) contenido de sulfuro de hidrógeno (H₂S), (e) potencial de óxido-reducción (Redox) y (f) pH presentes en el sedimento (primeros 2 cm) a lo largo del Fiordo Puyuhuapi (Ver Tabla en Anexo 6).

5.2.2 Diversidad alfa de la comunidad bacteriana bentónica

5.2.2.1 Resultados obtenidos del análisis de la data del T-RFLP del gen 16S ARNr

A través del T-RFLP se detectaron 96 OTUs con un rango de 22 – 42 OTUs de riqueza, la cual no mostró un patrón claro de distribución geográfica (Tabla 10). La mayor riqueza se registró en el centro C1 (42 OTUs; d=3,54) ubicado en la cabecera del fiordo, donde también se registraron 12 OTUs únicas (i.e., no registradas en ningún otro centro). En este centro también se registró la mayor equidad (o índice de Pielou; J'=0,88) y diversidad de Shannon (H'= 3,28) y de Simpson (1- λ '= 0,94). Los menores índices se registraron en los centros C2 (cabecera) y C7 (boca) con valores de equidad de 0,60 y 0,58, diversidad de Shannon de 1,85 y 1,99 y Simpson de 0,69 y 0,67, respectivamente.

Tabla 10. Índices de diversidad (riqueza, abundancia, índice de Margalef, de Pielou, de Shannon y de Simpson) obtenidos para los distintos centros salmoneros analizados con la técnica de T-RFLP (OTUs que aducen a clases) del Fiordo Puyuhuapi. En gris se destacan los valores máximos.

	C1	C2	C5	C6	C7	C8
Riqueza (S)	42	22	36	29	30	29
N° de OTUs únicas	12	4	17	5	2	9
Abundancia (N)	107.853	416.475	219.688	238.405	245.894	385.379
Índice de Margalef (d)	3,54	1,62	2,85	2,26	2,34	2,18
Equidad de Pielou (J')	0,88	0,60	0,87	0,86	0,58	0,74
Índice de Shannon (H')	3,28	1,85	3,13	2,88	1,99	2,49
Índice de Simpson $(1-\lambda')$	0,94	0,69	0,94	0,92	0,67	0,82

5.2.2.2 Resultados obtenidos del análisis de la data de pirosecuenciación del gen 16S ARNr

A través de la secuenciación, se observó que para todos los centros salmoneros, las curvas de rarefacción se aproximaron a una asíntota indicando que la recuperación de secuencias fue satisfactoria (Figura 16). Un total de 25.476 secuencias fueron recuperadas con un rango de 2.966 – 11.606 secuencias, de las cuales entre un 58,51 y 91,59% fueron

clasificadas (Tabla 11). De estas, se registraron 539 OTUs diferentes (que aducen al nivel taxonómico de especies) con un rango de 178 - 332 OTUs contenidas en un total de 39 clases y 75 órdenes. La mayor riqueza se registró en el centro C5 con 332 OTUs (d=35,70) (OTUs que aducen a especies), de las cuales 177 fueron únicas. En este centro también se registró la mayor diversidad de Shannon y de Simpson, con una equidad de 0,75.



Figura 16. Curva de rarefacción de las OTUs (referida a especies) clasificadas obtenidas del sedimento del Fiordo Puyuhuapi analizadas con la técnica de pirosecuenciación Roche 454.

Tabla 11. Índices de diversidad (riqueza, abundancia, índice de Margalef, de Pielou, de Shannon y de Simpson) obtenidos para los distintos centros salmoneros analizados con la técnica de pirosecuenciación Roche 454 del Fiordo Puyuhuapi durante los meses de julio y agosto de 2009. En gris se destacan los valores máximos.

	C1	C5	C8
Secuencias totales recuperadas	2.966	11.606	10.904
Secuencias clasificadas	1.854	10.630	6.380
Fracción secuencias clasificadas	0,625	0,916	0,585
OTUs (Clase)			
Riqueza (S)	31	30	29
N° de OTUs únicas	5	3	0
Abundancia (N)	2.007	10.708	6.513

	-	- CONTINUACION TABLA ANTERIOR				
	C1	C5	C8			
OTUs (Orden)						
Riqueza (S)	53	51	53			
N° de OTUs únicas	12	7	7			
Abundancia (N)	2.002	10.702	6.507			
OTUs (Especies)						
Riqueza (S)	178	332	272			
N° de OTUs únicas	73	177	109			
Abundancia (N)	1.854	10.630	6.380			
Índice de Margalef (d)	23,52	35,70	30,93			
Equidad de Pielou (J')	0,81	0,75	0,70			
Índice de Shannon (H')	4,18	4,34	3,92			
Índice de Simpson $(1-\lambda')$	0,96	0,97	0,94			

5.2.3 Estructura de la comunidad bacteriana bentónica

5.2.3.1 Resultados obtenidos del análisis de la data del T-RFLP del gen 16S ARNr

La Figura 17 muestra el análisis de agrupamiento de las OTUs de los centros salmoneros obtenido a través del T-RFLP. En términos de abundancia, este análisis permitió reconocer dos grupos con *bootstrap* variable. El primero de ellos estuvo conformado por los centros C2 (cabecera), C7 (boca) y C8 (boca) (*bootstrap*=68%), mientras que el segundo lo estuvo por los centros C1 (cabecera) y C6 (zona intermedia) (*bootstrap*=52%). El centro C5 ubicado en la zona intermedia, se separó del resto el 83% de las veces en el remuestreo.

5.2.3.2 Resultados obtenidos del análisis de la data de pirosecuenciación del gen 16S ARNr

La Figura 18 muestra el análisis de agrupamiento de las OTUs referidas a las clases y órdenes de los centros salmoneros examinados con la técnica de secuenciación. Con estos análisis se observó la presencia de un grupo que varió entre los diferentes niveles taxonómicos, conformándose por los centros C1 (cabecera) y C8 (boca) al nivel de clase (*bootstrap*=56%) y por los centros C5 (zona intermedia) y C8 (boca) al nivel de orden (*bootstrap*=64%).



Figura 17. Análisis de agrupamiento de las OTUs (que aducen a clases) de bacterias del Fiordo Puyuhuapi analizadas a través del T-RFLP. En azul se muestra el valor de *bootstrap* obtenido del análisis *pvclust* en R. La altura denota la disimilitud entre los clusters; a mayor altura, mayor es la disimilitud entre ellos.



Figura 18. Análisis de agrupamiento de las OTUs de bacterias del Fiordo Puyuhuapi al nivel taxonómico de (a) clase, (b) orden y (c) especies analizadas a través de la pirosecuenciación Roche 454. En azul se muestra el valor de *bootstrap* obtenido del análisis *pvclust* en R. La altura denota la disimilitud entre los clusters; a mayor altura, mayor es la disimilitud entre ellos.

5.2.4 Composición de la comunidad bacteriana bentónica

5.2.4.1 Resultados obtenidos del análisis de la data del T-RFLP del gen 16S ARNr

El análisis comparativo SIMPER realizado de acuerdo a la localización de los centros salmoneros (Tabla 12), reveló diferencias en la composición de la comunidad bacteriana, aunque variable (disimilitud promedio entre 60,47 y 73,28%). En la cabecera el 50% de la abundancia estuvo representado por 5 OTUs (OTU20, OTU89, OTU96, OTU467 y OTU550). En la zona intermedia 4 OTUs (OTU467, OTU473, OTU20 y OTU96) representaron el 50% de la abundancia, mientras que en la boca fueron 7 OTUs (OTU472, OTU467, OTU467, OTU467, OTU467, OTU467, OTU467, OTU467, OTU511 y OTU166), de las cuales sólo 2 OTUs contribuyeron en las tres zonas.

Tabla 12. Análisis comparativo (SIMPER) entre las muestras asociadas a la cabecera (centros C1 y C2), zona intermedia (centros C5 y C6) y boca (centros C7 y C8) del Fiordo Puyuhuapi. Como variable biológica se utilizaron las OTUs del T-RFLP (que aducen a clases).

Cabecera			Zo	ona interme	dia	Boca		
(similitud	l promedio:	29,60%)*	(similitud	(similitud promedio: 24,11%)*		(similitud promedio: 49,88%)		
OTUs	% Contr.	% Acum.	OTUs	% Contr.	% Acum.	OTUs	% Contr.	% Acum.
OTU20	14,37	14,37	OTU467	15,51	15,51	OTU472	14,95	14,95
OTU89	12,23	26,59	OTU473	14,14	29,65	OTU467	9,96	24,91
OTU96	11,04	37,63	OTU20	11,26	40,92	OTU89	6,60	31,52
OTU467	10,54	48,18	OTU96	11,00	51,91	OTU167	6,15	37,66
OTU550	9,34	57,52	OTU93	10,07	61,98	OTU96	5,88	43,55
OTU490	8,69	66,21	OTU92	9,71	71,69	OTU511	5,87	49,41
OTU295	8,57	74,77	OTU300	9,58	81,27	OTU166	5,81	55,22
OTU29	8,54	83,31	OTU490	9,44	90,71	OTU29	5,78	61,00
OTU26	8,43	91,74				OTU307	5,76	66,76
						OTU196	5,70	72,47
						OTU465	5,69	78,16
						OTU150	5,55	83,70
						OTU499	5,47	89,18
						OTU439	5,42	94,59

* Disimilitud promedio entre cabecera-zona intermedia: 68,96%

Disimilitud promedio entre cabecera-boca: 60,47%

Disimilitud promedio entre zona intermedia-boca: 73,28%

De la misma forma, el análisis comparativo SIMPER realizado de acuerdo al estado operativo de los centros salmoneros (Tabla 13), reveló diferencias en la composición de la comunidad bacteriana entre los centros operativos y no operativos durante la toma de muestras (disimilitud promedio: 66,67%). En las muestras asociadas a centros no operativos, se encontraron 20 OTUs que en conjunto contribuyeron al 90% de la abundancia total, mientras que en las muestras asociadas a centros operativos se encontraron 14 OTUs, de las cuales sólo 7 OTUs contribuyeron en ambos grupos (OTU20, OTU29, OTU89, OTU96, OTU167, OTU467 y OTU490).

Tabla 13. Análisis comparativo (SIMPER) entre las muestras asociadas a centros salmoneros operativos (centro C2, C5 y C7) y no operativos (centros C1, C6 y C8) del Fiordo Puyuhuapi. Como variable biológica se utilizaron las OTUs del T-RFLP (que aducen a clases).

Muestra	s asociadas a cent	ros operativos	Muestras asociadas a centros no operativos				
(si	militud promedio:	31,82%)	(similitud promedio: 32,43%)				
OTUs	% Contribución	% Acumulativo	OTUs	% Contribución	% Acumulativo		
OTU467	16,64	16,64	OTU467	10,00	10,00		
OTU89	10,87	27,51	OTU166	9,88	19,89		
OTU20	10,53	38,04	OTU96	8,92	28,81		
OTU96	9,85	47,89	OTU150	7,70	36,50		
OTU472	9,55	57,44	OTU168	7,28	43,78		
OTU490	8,59	66,03	OTU439	6,97	50,76		
OTU167	3,67	69,70	OTU21	4,12	54,87		
OTU550	3,64	73,34	OTU20	4,01	58,88		
OTU511	3,50	76,84	OTU473	3,69	62,57		
OTU29	3,33	80,17	OTU89	3,03	65,60		
OTU307	3,30	83,47	OTU167	2,84	68,43		
OTU437	3,18	86,64	OTU92	2,80	71,23		
OTU22	2,82	89,47	OTU490	2,79	74,03		
OTU483	2,71	92,18	OTU450	2,58	76,61		
			OTU298	2,58	79,18		
			OTU29	2,51	81,69		
			OTU26	2,44	84,13		
			OTU93	2,33	86,47		
			OTU400	2,30	88,76		
			OTU28	2,28	91,04		

* Disimilitud promedio: 66,67%

5.2.4.2 Resultados obtenidos del análisis de la data de pirosecuenciación del gen 16S ARNr

La composición bacteriana bentónica a nivel de clase (Figura 19) y orden (Figura 20), presentó diferencias entre los centros de acuerdo a su ubicación dentro del fiordo. La cabecera del fiordo (centro C1) estuvo representada por bacterias de las clases *Flavobacteriia* (29,25%) y *Deltaproteobacteria* (14,80%); la zona intermedia (centro C5) por las *Clostridia* (48,32%) y *Bacteroidia* (15,73%); y la boca (centro C8) por las clases *Clostridia* (33,01%) y *Epsilonproteobacteria* (27,91%).



Figura 19. Composición de las comunidades bacterianas y distribución espacial de las OTUs (referidas a las clases) clasificadas, obtenidas con la técnica de pirosecuenciación Roche 454 del sedimento del Fiordo Puyuhuapi.



Figura 20. Composición de las comunidades bacterianas y distribución espacial de las OTUs (referidas a los órdenes) clasificadas, obtenidas con la técnica de pirosecuenciación Roche 454 del sedimento del Fiordo Puyuhuapi.

5.2.4.3 OTUs (especies) abundantes y raras

De un total de 539 OTUs (referidas a especies) detectadas en la secuenciación, se encontraron 52 OTUs abundantes, de las cuales el 21,15% (11 OTUs) fueron sólo abundantes (i.e. no variaron a rara o semi-rara) y el 78,85% restante (41 OTUs) variaron a rara y/o semi-rara (Tabla 14). Estas últimas pertenecieron a 11 clases, donde las más frecuentes fueron las *Clostridia* (15 OTUs) y *Flavobacteriia* (9 OTUs). Se observó que la mayoría de las *Clostridia* (7 OTUs) fueron abundantes en la zona intermedia (centro C5), variando a rara o semi-rara hacia la cabecera y boca del fiordo; mientras que 6 OTUs de *Clostridia* fueron abundantes en la boca (centro C8). En las *Flavobacteriia*, la mayoría (6 OTUs) fue abundante en la cabecera (centro C1) variando a rara o semi-rara hacia la zona intermedia y boca.

Del total de OTUs registradas, 447 OTUs fueron raras, de las cuales sólo el 19,24% (86 OTUs) varió a semi-rara y/o abundante, mientras que el 79,15% restante (281 OTUs) fueron sólo raras (i.e. no variaron a semi-rara o abundante) (Tabla 14). Se observaron 14 OTUs raras en todas las muestras, las cuales pertenecieron a las clases *Actinobacteria*, *Cytophagia, Flavobacteriia, Bacilli, Clostridia, Alphaproteobacteria* y *Deltaproteobacteria*.

Tabla 14. Resumen del total de OTUs raras (i.e., OTUs que contribuyen $\leq 0,2\%$ a la abundancia total), semi-raras (i.e., OTUs que contribuyen entre el 0,2 - 1% de la abundancia total) y abundantes (i.e., OTUs que contribuyen $\geq 1\%$ a la abundancia total) de la comunidad bacteriana bentónica del Fiordo Puyuhuapi.

La distribución de las OTUs raras y abundantes de las comunidades bacterianas del sedimento se muestra en la Figura 21. A partir de este análisis, la mayor riqueza de OTUs se encontró en frecuencias $\leq 0,2\%$ (i.e., OTUs raras) con un rango de 85 – 262 OTUs. De estas, las menores riquezas se encontraron en la cabecera (centro C1) y las mayores en la zona intermedia (centro C5). Sobre el 0,2% la riqueza disminuyó alcanzando de 7 a 10 OTUs entre el 0,601 y 0,999%.



■ C1 (cabecera) ■ C5 (z. intermedia) ■ C8 (boca)

Figura 21. Distribución de la riqueza y abundancia de las OTUs (referidas a especies) raras (i.e., OTUs que contribuyen $\leq 0,2\%$ a la abundancia total), semi-raras (i.e., OTUs que contribuyen entre el 0,2 - 1% de la abundancia total) y abundantes (i.e., OTUs que contribuyen $\geq 1\%$ a la abundancia total) de bacterias del Fiordo Puyuhuapi obtenidas a través de la pirosecuenciación Roche 454.

La Figura 22 muestra la transición de las OTUs a nivel espacial y si estas cambian a semi-raras, abundantes o bien no son detectadas (i.e. abundancia = 0). A través de este análisis se observó que las OTUs raras permanecieron raras entre el 24,43 y 31,76% de las veces, mientras que, la mayor parte de las OTUs, entre el 61,18 y 64,71%, no fueron detectadas entre una zona y otra al comparar muestras ubicadas en diferentes sectores del fiordo.



Figura 22. Transición de las OTUs raras y sus variaciones en abundancia a semi-raras, abundantes o si desaparecen (i.e. abundancia = 0) entre las muestras asociadas a los centros salmoneros del Fiordo Puyuhuapi analizadas a través de la pirosecuenciación Roche 454 (Ver Figura en Anexo 7).

5.2.5 Efecto de las variables físico-químicas sobre la estructura de la comunidad bacteriana bentónica

Se determinó la relación entre las variables ambientales y algunos índices de diversidad a través del coeficiente de Pearson (r, Tabla 15). Se utilizaron las OTUs del T-RFLP debido a que en estos análisis se contó con un mayor número de muestras (vs la secuenciación) permitiendo un cálculo más fiable. Este análisis no reveló relaciones significativas (p<0,05), sin embargo, se observó una tendencia positiva entre el pH y la riqueza (r = 0,623) y el índice de Shannon (r = 0,507), y negativa entre el pH y la abundancia (r = -0,665). También la abundancia se correlacionó negativamente con el potencial redox (r = -0,533).

Tabla 15. Correlación de Pearson (r) entre algunos índices de diversidad (S: riqueza, N: abundancia y H': diversidad de Shannon) obtenidos del T-RFLP (OTUs que aducen a clases) y las variables físico-químicas del Fiordo Puyuhuapi (n=6). Ref: Prof.: profundidad de colecta, ODF: oxígeno disuelto de fondo, H₂S: contenido de sulfuro de hidrógeno, MOT: materia orgánica total.

	Prof.	ODF	Fango	pН	Redox	H_2S	MOT
Riqueza (S)	0,322	-0,401	-0,092	0,623	0,147	0,111	0,105
Abundancia (N)	-0,073	0,329	0,053	-0,665	-0,533	0,071	-0,098
Índice de Shannon (H')	0,333	-0,483	0,406	0,507	0,201	0,255	-0,142

En análisis del coeficiente de Pearson (r) entre las abundancias relativas de las clases bacterianas más abundantes (>1% de la abundancia total) y las variables físico-químicas, se muestra en Tabla 16. Se observaron algunas correlaciones significativas (p<0,05) (Tabla 16). Por ejemplo, las abundancias de *Cytophagia y Flavobacteriia* se correlacionaron negativamente con la profundidad de colecta (r = -0,999 y -0,997), pero positivamente con el potencia redox (*Flavobacteriia*; r = 0,997). Las *Alphaproteobacteria* se correlacionaron positivamente con la MOT (r = 1,000), mientras que las *Deltaproteobacteria* lo hicieron con el pH (r = 0,999). Con una menor significancia, las clases *Clostridia* y *Bacteroidia* tendieron a correlacionarse negativamente con el ODF y positivamente con el contenido de H₂S; mientras que, las *Bacilli, Cytophagia* y *Flavobacteriia* tendieron a correlacionarse positivamente con la MOT.

El CCA fue satisfactorio con ambas técnicas moleculares, por un lado, con el T-RFLP el 88,3% de la variabilidad total pudo ser capturada (variación residual = 0,2317), mientras que con la secuenciación fue del 100% (i.e., variación residual=0). Con el T-RFLP, las variables críticas consideradas explicaron alrededor del 54,08% de la varianza (Figura 23). El primer componente (31,89% de la variabilidad total) dependió principalmente del ODF, observándose una correlación positiva, mientras que el segundo componente (22,19% de la variabilidad total) estuvo correlacionado positivamente con el potencial redox y negativamente con el contenido de H₂S. Algunas de las OTUs se correlacionaron positivamente con el potencial redox (i.e., menos negativo) y negativamente con el contenido de H_2S (OTU32, OTU20), mientras que otras OTUS se correlacionaron positivamente con el potencial redox (i.e., más negativo) (OTU467, OTU21 y OTU472) (Figura 23). La OTU533 se correlacionó positivamente con el H_2S y negativamente con el ODF.

Tabla 16. Correlación de Pearson (r) entre las abundancias relativas de las clases bacterianas más abundantes (>1% de la abundancia total) y las variables físico-químicas del Fiordo Puyuhuapi (n=3). En gris se destacan las correlaciones significativas (p<0,05). Ref: Prof.: profundidad de colecta, ODF: oxígeno disuelto de fondo, H₂S: contenido de sulfuro de hidrógeno, MOT: materia orgánica total.

	Prof.	ODF	Fango	pН	Redox	H_2S	MOT
Actinobacteria	-0,870	-0,395	0,926	0,382	0,890	-0,117	0,747
Bacteroidia	0,340	-0,972	0,527	-0,847	-0,300	0,959	-0,530
Cytophagia	-0,999	0,143	0,592	0,808	0,997	-0,619	0,984
Flavobacteriia	-0,997	0,182	0,560	0,831	0,993	-0,649	0,990
Cyanobacteria unclassified	-0,003	-0,994	0,786	-0,615	0,044	0,805	-0,208
Bacilli	-0,985	-0,065	0,746	0,669	0,991	-0,443	0,927
Clostridia	0,871	-0,583	-0,155	-0,989	-0,850	0,911	-0,955
Negativicutes	-0,880	0,567	0,174	0,986	0,860	-0,903	0,960
Planctomycetia	-0,927	0,474	0,280	0,961	0,910	-0,851	0,985
Alphaproteobacteria	-0,971	0,345	0,413	0,912	0,960	-0,768	1,000
Deltaproteobacteria	-0,755	0,733	-0,045	0,999	0,728	-0,975	0,877
Epsilonproteobacteria	0,683	0,652	-0,997	-0,087	-0,713	-0,185	-0,514
Gammaproteobacteria	-0,292	0,982	-0,569	0,820	0,253	-0,944	0,487
Spirochaetia	0,441	-0,940	0,431	-0,901	-0,403	0,985	-0,620

El análisis CCA obtenido de la secuenciación (OTUs que aducen a clases) mostró que en conjunto las variables críticas consideradas, explicaron el 100% de la varianza (Figura 24). La variable que determinó el primer componente (70,35% de la variabilidad total) fue principalmente la MOT, observándose una correlación negativa. El segundo componente (29,65% de la variabilidad total) estuvo correlacionado positivamente con el ODF. Estos análisis también fueron ejecutados para los niveles de orden y especie, mostrando los mismos patrones (Ver figuras en Anexo 8 y Anexo 9).

En el primer eje (CCA1) se identificó un grupo asociado con una alta concentración de MOT (centro C1, cabecera), que incluyó las clases *Dehalococcoidetes, Verrucomicrobia unclassified, Spartobacteria, Ktedonobacteria y Solibacteres* (Figura 24). En el segundo eje (CCA2), el gradiente se estableció sobre el ODF, identificándose un grupo asociado con bajas concentraciones en el cuarto cuadrante del diagrama, donde se concentró el centro C5 (zona intermedia). Las clases que pertenecieron a este grupo fueron las *Thermotogae, Chloroflexi y Gloeobacteria*. En este nivel taxonómico no se observaron agrupaciones asociadas con altas concentraciones de ODF (centro C8; boca), pero si al nivel de especies donde se identificaron las *Microbacterium esteraromaticum, Flavobacteria bacterium MS024-3C, Clostridium aminobutyricum, Clostridium baratii, Rhodobacterales bacterium CB1024*, entre otras.



Figura 23. Análisis Canónico de Correspondencia de las variables ambientales (en vectores verdes) y las OTUs bacterianas (que aducen a clases; en rojo) obtenidas a partir del T-RFLP de las muestras de sedimento superficial (0-2 cm; en azul) del Fiordo Puyuhuapi. Ref.: ODF: Oxígeno Disuelto de Fondo; H₂S: contenido de Sulfuro de Hidrógeno, MOT: Materia Orgánica Total.


Figura 24. Análisis Canónico de Correspondencia de las variables ambientales (en vectores verdes) y las OTUs bacterianas (que aducen a clases; en rojo) obtenidas a partir de la pirosecuenciación Roche 454 de las muestras de sedimento superficial (0-2 cm; en azul) del Fiordo Puyuhuapi. Ref.: ODF: Oxígeno Disuelto de Fondo; MOT: Materia Orgánica Total. Ref.: 1: Acidobacteriia, 2: Solibacteres, 3: Acidobacteria unclassified, 4: Actinobacteria, 5: Bacteroidia, 6: Cytophagia, 7: Flavobacteriia, 8: Sphingobacteriia, 9: Bacteroidetes unclassified, 10: Chlamydiia, 11: Chlorobia, 12: Chloroflexi, 13: Dehalococcoidetes, 14: Ktedonobacteria, 15: Gloeobacteria, 16: Cyanobacteria unclassified, 17: Bacilli, 18: Clostridia, 19: Erysipelotrichi, 20: Negativicutes, 21: Fusobacteriia, 22: Lentisphaerae unclassified, 23: Nitrospira, 24: Planctomycetia, 25: Alphaproteobacteria, 26: Betaproteobacteria, 27: Deltaproteobacteria, 28: Epsilonproteobacteria, 29: *Gammaproteobacteria*, 30: Proteobacteria unclassified, 31: Spirochaetia, 32: Synergistia, 33: Synergistetes unclassified, 34: Mollicutes, 35: Thermotogae, 36: Opitutae, 37: Spartobacteria, 38: Verrucomicrobia unclassified, 39: Verrucomicrobiae.

5.3 COMPARACIÓN DE LOS PATRONES EN LA ESTRUCTURA DE LA COMUNIDAD MICROBIANA MEDIANTE T-RFLP Y PIROSECUENCIACIÓN ROCHE 454 PARA AMBOS FIORDOS

Con los resultados de biodiversidad bacteriana obtenidos con las dos aproximaciones moleculares, se observó que la riqueza promedio de la secuenciación (al nivel taxonómico de especies) fue mayor a la obtenida con el T-RFLP, mientras que, al nivel de clase y orden fueron bastantes similares a la obtenida con el T-RFLP (Tabla 17). El índice de Margalef obtenido de la secuenciación (al nivel taxonómico de especies) fue mayor al del T-RFLP en una orden de magnitud, y el índice de diversidad de Shannon lo fue en una unidad. El índice de Pielou, en cambio, fue mayor en el T -RFLP que en la secuenciación.

A través del T-RFLP se observó que la menor abundancia de OTUs registrada fue de 0,5%, donde se encontraron entre 4 y 17 OTUs en total (Tabla 18), mientras que, la mayoría de las OTUs registradas (entre 10 y 27 OTUs) tuvieron una abundancia relativa de entre 1 a 10%. En la secuenciación, la menor abundancia de OTUs registrada fue de 0,02% (equivalente porcentaje utilizado para la clasificación de las OTUs raras; Ver Figura 10 y Figura 21).

Tabla 17. Promedios (± desviación estándar) de los índices ecológicos de la comunidad microbiana del Fiordo Comau (años 2012 y 2013) y Puyuhuapi (año 2009), obtenidos del T-RFLP y pirosecuenciación Roche 454 (al nivel taxonómico de especies).

Índice ecológico	T-RFLP	Pirosecuenciación Roche 454 (nivel taxonómico = especies)		
Riqueza (S)	31,60±7,85	184,22±75,71 *		
Índice de Margalef (d)	2,48±0,67	21,08±7,99		
Equidad de Pielou (J')	0,78±0,12	0,68±0,11		
Índice de Shannon (H')	2,70±0,57	3,48±0,67		
Índice de Simpson $(1-\lambda')$	0,86±0,11	0,91±0,06		

* Riqueza al nivel de clase = $23,00\pm5,43$; Riqueza al nivel de orden = $40,67\pm9,39$

Muestra	Riqueza de OTUs	H' (Shannon)	J' (índice de Pielou)	Frecuencia de OTUs (%)					
				< 0,5	0,5 - 0,9	1-10	> 10		
Fiordo Comau									
Julio 2012 [S]	40	3,32	0,90	0	11	27	2		
Enero 2013 [S]	17	2,04	0,72	0	4	10	3		
Julio 2012 [M]	37	3,24	0,90	0	6	29	2		
Enero 2013 [M]	34	2,80	0,79	0	17	14	3		
Fiordo Puyuhuapi (muestreo: julio – agosto 2009)									
C1 (cabecera)	42	3,28	0,88	0	14	25	3		
C2 (cabecera)	22	1,85	0,60	0	10	10	2		
C5 (z. intermedia)	36	3,13	0,87	0	11	24	1		
C6 (z. intermedia)	29	2,88	0,86	0	11	16	2		
C7 (boca)	30	1,99	0,58	0	18	10	2		
C8 (boca)	29	2,49	0,74	0	12	16	1		

Tabla 18. Parámetros de la comunidad microbiana y frecuencias de OTUs obtenidas con el T-RFLP en los Fiordos Comau (años 2012 y 2013) y Puyuhuapi (año 2009).

6. DISCUSIÓN

6.1 FIORDO COMAU

6.1.1 Caracterización físico-química de las capas de agua salobre (~0,5m) y marina (20m)

En las aguas superficiales del Fiordo Comau se registraron menores valores de salinidad (<24,10 psu) y mayores en las aguas subsuperficiales (>29,35 psu), siendo estos valores similares a los reportados en los fiordos de la Patagonia Norte de Chile, como el Fiordo Reloncaví (Carrasco & Silva, 2005; Carrasco & Silva, 2007; Silva et al., 2012). Se ha descrito en sistemas de fiordos, que estas diferencias se deben fundamentalmente al aporte de agua dulce proveniente de ríos, precipitaciones y escurrimiento costero que generan una capa superficial menos salina (Sievers, 2006). Particularmente, el Fiordo Comau está fuertemente influenciado por aportes de agua dulce provenientes de los ríos Vodudahue y Lloncochaigua principalmente, y elevadas precipitaciones (e.g., 5.435 mm anual en promedio en la Estación Huinay) (Soto, 2009). La temperatura registrada en la estación Huinay confirma la estacionalidad de las muestras superficiales (capa salobre; ~0,5 m), debido a las variaciones anuales de la radiación solar, con altas temperaturas en los meses de marzo 2012 y enero 2013 coincidentes con la época de verano, y menores en julio 2012 coincidente con la época de invierno. Es esperable que en marzo 2012 las temperaturas sean más bajas debido a la transición verano/otoño, respecto al mes de enero 2013 que se encuentra en el primer tercio de la estación.

La mayor concentración de clo-*a* se localizó a 20 m de profundidad (capa marina) durante enero 2013 (primer tercio del verano; 7,28 mg m⁻³). Estas condiciones también han sido registradas previamente en este fiordo, con altas concentraciones (> 5,3 mg m⁻³) durante el verano austral (enero 2009) y máximas bajo la haloclina (~15m) durante casi todo el año (Iriarte *et al.*, 2013). La tasa de crecimiento fitoplanctónica es regulada por la temperatura del agua, concentración y forma predominante de los nutrientes (e.g., nitrito, nitrato,

amonio), y la cantidad y calidad de la Radiación Fotosintéticamente Activa (PAR; cantidad de radiación capaz de producir actividad fotosintética) (Cloern et al., 2014). En este sentido, Iriarte et al. (2013) también registraron una alta radiación PAR a 10 m de profundidad en el Fiordo Comau, asociada con las altas tasas de crecimiento de fitoplancton durante el verano, lo que explicaría la alta concentración de clo-a en la capa marina. Las bajas concentraciones de clo-*a* observadas en los meses restantes $(0,41 - 1,09 \text{ mg m}^{-3})$ se encuentran dentro del rango de estudios previos para el seno Reloncaví en los primeros 25 m de profundidad (1,5 -5 mg m^{-3}) y en la entrada e interior del Fiordo Comau (< 0,5 mg m⁻³) (Ramírez & Pizarro, 2005). Las bajas concentraciones superficiales en este fiordo, podrían resultar de la estratificación halina semi-permanente de la columna de agua, que actúa como una barrera que restringe la distribución vertical de nutrientes inorgánicos hacia las capas superficiales, y, por lo tanto, el crecimiento fitoplanctónico (Sánchez et al., 2011; Iriarte et al., 2013). La estacionalidad de la concentración de clo-a, como indicador de la biomasa fitoplanctónica, fue mayor durante enero 2013 asociada con una menor concentración de NO3⁻. Estos resultados son consistentes con estudios previos en zonas de fiordos, los cuales indican que esta condición estaría dada por la síntesis de materia orgánica por parte de la comunidad autotrófica (Daneri et al., 2007) y la asimilación de nutrientes por el fitoplancton (Ramírez & Pizarro, 2005; Silva, 2006). Se ha demostrado que el fitoplancton, en términos de clorofila, responde a la adición de NO3⁻ correlacionándose con los florecimientos de diatomeas y una relativamente alta biomasa fitoplanctónica (> 2 mg m⁻³) y producción primaria (Iriarte *et al.*, 2013). Por otra parte, las altas concentraciones de NO₃⁻ en marzo y julio 2012 se deben, probablemente, a los mayores aportes de aguas oceánicas, las cuales constituyen una de las fuentes principales de nutrientes en la zona de fiordos y canales de Chile, ya que las aguas dulces provenientes de los ríos, lluvias y el derretimiento de glaciares son pobres en NO₃⁻ (0 a 2 µM) (Silva, 2006; Mayr et al., 2011).

Las altas concentraciones de silicato registradas en la capa salobre durante julio 2012 (20,69 μ M) estarían asociadas con la menor temperatura y mayor salinidad en ese mes (r = ±1,00; p<0,05). Condiciones similares, i.e., de altas concentraciones de silicato en la capa superficial (> 20 μ M; < 5 m), han sido informadas para sistemas de fiordos, como Reloncaví,

Comau y Puyuhuapi (Silva, 2006), los ríos Ventisquero y Aysén (Silva, 2006), y los canales Moraleda (Silva, 2006), Baker y Mitchell (Silva, 2006; Prado-Fiedler, 2009), entre otros, donde la influencia de ríos y glaciares adyacentes constituyen un aporte importante de silicato a la capa superficial con máximos en la boca de algunos ríos (Silva, 2006; Prado-Fiedler, 2009). En el Fiordo Comau, las concentraciones de silicato en la capa superficial son mayores en invierno (julio 2012), temporada que coincide con un mayor flujo fluvial debido al aumento de las precipitaciones. Por otra parte, las menores concentraciones registradas en enero 2013 serían resultado del consumo por parte del fitoplancton con estructuras silícicas como las diatomeas (Silva, 2006) y por la disminución en los aportes de silicato durante el verano (disminución de las precipitaciones).

6.1.2 Diversidad alfa de la comunidad bacterioplanctónica (bacterias y arqueas) y su asociación con las condiciones ambientales en las capas de agua analizadas (~0,5 y 20m)

Basado en los resultados de biodiversidad bacterioplanctónica obtenidos de la secuenciación (al nivel taxonómico de especies), se observó que las capas de agua analizadas presentaron una diversidad promedio (H' = $3,15\pm0,55$) en el rango inferior a lo reportado en otros estudios de ecosistemas con influencia marina. Por ejemplo, en aguas de deshielo marino (H' = $3,24\pm0,36$) y aguas marinas superficiales (H' = $3,63\pm0,25$) en el Ártico (Bowman et al., 2012), en aguas dulces (H' = $4,33\pm0,74$) y marinas (H' = $4,27\pm0,62$) frente a un gradiente de salinidad en las aguas costeras del Océano Atlántico (Silveira et al., 2011), y en aguas superficiales costeras en la Antártica (H' = $5,88\pm0,43$) (Zeng et al., 2014).

A partir de los resultados obtenidos de la secuenciación (al nivel taxonómico de especies), se observó que la diversidad se correlacionó negativamente (p<0,05) con la clo-*a* en la capa salobre y en menor grado en la capa marina (p>0,05). En otros sistemas de fiordos, como el estuario de la bahía de Moreton en Australia (Hewson & Fuhrman, 2004), así como en experimentos de mesocosmos con bacterias (Kassen *et al.*, 2000), también se ha observado que la diversidad microbiana tiende a disminuir cuando aumenta la productividad. Esto es

consistente con lo ocurrido en enero 2013 (capa marina) donde la diversidad fue menor y la concentración de clo-*a* mayor. No es claro el mecanismo subyacente a este patrón en ambientes heterogéneos, pero es probable que implique mecanismos de adaptación (estrategias k y r), donde la especie mejor adaptada a un ambiente productivo (y altamente estratificado) domine la comunidad, disminuyendo la diversidad (Kassen *et al.*, 2000). En la capa marina en enero 2013 se registró una alta abundancia de arqueas *Thaumarchaeota unclassified*, lo que explicaría la baja diversidad registrada junto con el bajo índice de Pielou.

Se observó que la diversidad bacterioplanctónica (con el método de secuenciación) fue mayor en la capa salobre (H' = $3,32\pm0,41$) que en la marina (H' = $2,98\pm0,71$), donde predominaron bajas salinidades (<24,1 psu). Un comportamiento similar se observó a lo largo del gradiente de salinidad en la Bahía de Delaware, donde las mayores diversidades se asociaron con bajas salinidades (9 muestras, rango: 0,01 - 30,5 psu; Campbell & Kirchman, 2013), coincidiendo con los resultados obtenidos para el Fiordo Comau.

6.1.3 Estructura de la comunidad bacterioplanctónica (bacterias y arqueas) y su asociación con las condiciones ambientales en las capas de agua analizadas (~0,5 y 20m)

A partir de los análisis de agrupamiento obtenidos del T-RFLP y la secuenciación (al nivel taxonómico de clase y orden), se observó que la comunidad del bacterioplancton se diferenció básicamente por la estacionalidad asociada a las muestras (verano e invierno) y en menor grado a las diferencias físico-químicas de las capas (salobre y marina). Sin embargo, el análisis comparativo SIMPER no sugirió grandes discrepancias en la composición de la comunidad bacterioplanctónica, en relación a las proporciones de las OTUs asociadas a las muestras de verano (marzo 2012 y enero 2013) e invierno (julio 2012), pero si se observó que las representantes de las arqueas *Thaumarchaeota (unclassified)* aportaron más a las muestras de invierno (14,74%) que de verano (4,43%). Esta variación en la abundancia coincidió con los cambios en la concentración de NO_2^- , siendo sustentada por una correlación positiva, aunque débil (p>0,05) en la capa salobre. Aquí, las mayores abundancias de

Thaumarchaeota (unclassified) se asociaron con altas concentraciones de NO_2^- en julio 2012. Se ha descrito que estas arqueas oxidan aeróbicamente el amonio (NH4⁺) a NO2⁻, siendo quienes contribuyen más significativamente al proceso de nitrificación en ambientes marinos (Könneke et al., 2005; Treusch et al., 2005). Por otra parte, se ha reportado que altas concentraciones de NH4⁺ son capaces de inducir aumentos en la abundancia y actividad de grupos nitrificantes en aguas marinas árticas (Christman et al., 2011). Se ha reportado que las salmoniculturas liberan NH₄⁺ a la columna de agua debido a la excreción de los salmones, fecas y alimentos no ingeridos, aumentando las concentraciones naturales bajo las balsas jaulas (> 1,5 µM; Soto & Norambuena, 2004; Elizondo et al., 2015). En este estudio, sin embargo, las salmoniculturas se encontraban en descanso durante el mes de invierno (julio 2012). Este descanso corresponde a un período en el que las concesiones no realizan actividad productiva, y según SERNAPESCA (2013) este se realiza cada dos años (2010, 2012 y 2014) entre mayo y julio. En el Fiordo Comau se ha documentado que los ríos aportan agua dulce con altas concentraciones de NH₄⁺ (>1 μ M) (Prado-Fiedler, 2000; Soto & Norambuena, 2004; Elizondo et al., 2015). Esto sugiere que las altas abundancias de Thaumarchaeota (unclassified) en julio 2012 (capa salobre) estarían asociadas con altas concentraciones de NH4⁺ provenientes de los ríos y con la remineralización de materia orgánica *in situ*.

A través de la secuenciación se registró similitud (valor *bootstrap* de 62 – 91%) entre las muestras de julio 2012 (capas salobre y marina) y enero 2013 (capa marina), lo que podría estar dado por la presencia de algunos grupos de arqueas como las *Cenarchaeales* y *Nitrosopumilales* que tuvieron abundancias similares en todas estas muestras (Julio 2012 [S], Julio 2012 [M], Enero 2013 [M]), a diferencia de las capas de marzo 2012 en que las arqueas presentaron bajas abundancias (<0,18%; capa marina) o bien estuvieron completamente ausentes (Marzo 2012 [S]). En este caso, la ausencia de arqueas en marzo 2012 también coincidió con bajas concentraciones de NO₂⁻ en la capa salobre, lo cual podría ser resultado de los menores aportes de NH₄⁺ por parte de los ríos durante el último tercio del verano, donde las menores concentraciones de silicato dan cuenta de menores aportes fluviales durante esta época (Silva, 2006; Prado-Fiedler, 2009). Las bajas concentraciones de arqueas en la capa marina (marzo 2012) no fueron totalmente explicadas por las concentraciones de NO₂⁻, las cuales fueron mayores, incluso, a las de julio 2012. Con esto se sugiere que otros factores podrían estar involucrados en las bajas abundancias de arqueas (e.g., competencia biológica). Se ha descrito que bajo condiciones limitantes de NH₄⁺, las arqueas amonio-oxidantes compiten no sólo con las bacterias amonio-oxidantes, sino que también con bacterias heterotróficas e incluso fitoplancton (Martens-Habbena *et al.*, 2009). Esto podría ser particularmente cierto para las muestras del mes de marzo 2012, donde se registraron altas abundancias de *Cyanobacteria* tanto para la capa salobre como marina.

6.1.4 Composición de la comunidad bacterioplanctónica (bacterias y arqueas) y su asociación con las condiciones ambientales en las capas de agua analizadas (~0,5 y 20m)

En general, la comunidad bacterioplanctónica del Fiordo Comau estuvo constituida por grupos considerados característicos tanto de agua dulce como oceánica, similar a lo encontrado a lo largo del gradiente de salinidad del Estuario del Río Parker en Massachusetts (Crump *et al.*, 2004). Entre estos, las bacterias pertenecientes a las *Proteobacteria*, *Bacteroidetes* y *Actinobacteria*. Estas últimas han sido poco reconocidas como bacterias abundantes en estuarios (Kirchman *et al.*, 2005).

El análisis estadístico multivariado (CCA), que combinó los datos de la secuenciación (al nivel de clase) y las variables físico-químicas del agua, reveló que la comunidad no fue totalmente explicada por las variables de temperatura, salinidad, NO_2^- , fosfato y clo-*a*. En éste, las OTUs menos abundantes (<1% de la abundancia total) se asociaron de manera independiente con alguna de estas variables, mientras que, las OTUs más abundantes (>1% de la abundancia total), entre ellas las arqueas *Thaumarchaeota unclassified* y las bacterias *Cytophagia, Flavobacteriia, Cyanobacteria unclassified, Alphaproteobacteria* y *Actinobacteria*, se concentraron al centro del diagrama revelando una baja correlación con estas variables. Así también lo confirmó el análisis de Pearson entre las abundancias relativas, excepto entre las abundancias de *Actinobacteria* con la salinidad en la capa marina (r = -

0,999; p<0,05). Patrones similares para las *Actinobacteria* han sido observados a lo largo de gradientes de salinidad en el estuario de Delaware (Kirchman *et al.*, 2005) y del río Krka en Croacia (Korlević *et al.*, 2016), donde estas bacterias fueron más abundantes en muestras con bajas salinidades (<10 psu). Esto podría suponer que las abundancias de *Actinobacteria* estarían asociadas con la salinidad en las muestras analizadas del Fiordo Comau.

Se observaron correlaciones débiles tanto en el CCA como el análisis de Pearson, pero las clases *Cytophagia* y *Flavobacteriia* tendieron a variar espacial (i.e., por capas) y estacionalmente, con mayores abundancias en las capas marinas, principalmente en las muestras de verano (2012 y 2013). Resultados similares han sido observados a lo largo de un gradiente de salinidad en el estuario de Delaware, donde estas bacterias fueron más abundantes en muestras marinas, pero no variaron sistemáticamente a lo largo de ese gradiente (Kirchman *et al.*, 2005), sugiriendo que se adaptan rápidamente frente a un gradiente salino.

Dentro de las *Alphaproteobacteria*, los miembros del orden *Rhodobacterales* fueron las más abundantes, alcanzando un 10,69% de abundancia relativa en la capa salobre en enero 2013. Las *Alphaproteobacteria* han sido ampliamente descritas en ambientes marinos (Giovannoni & Rappé, 2000) con altas abundancias en las órdenes *Rickettsiales* y *Rhodobacterales* en aguas costeras (Gilbert *et al.*, 2012). Se ha observado que algunos representantes de las *Rhodobacterales* tienden a estar asociados con altas tasas de producción primaria y altas concentraciones de nutrientes y temperatura en aguas costeras de Plymouth (UK; Gilbert *et al.*, 2012). También se han descrito como el grupo colonizador primario de las capas superficiales en aguas costeras templadas, donde han dominado en abundancia (Dang & Lovell, 2000; 2002; Dang *et al.*, 2008). En el presente estudio, no se encontraron correlaciones significativas entre las abundancias de *Alphaproteobacteria* con las variables ambientales medidas, pero se observó una asociación positiva con la temperatura consistente con los estudios mencionados, lo que podría explicar la alta abundancia de *Rhodobacterales* observada en la capa salobre durante enero 2013.

Las *Gammaproteobacteria*, aunque con un abundancia más baja (< 4,23% de la abundancia total), tendieron a correlacionarse positivamente con la temperatura en la capa marina (r = 0,679; p>0,05), siendo más abundantes en enero 2013 cuando la temperatura fue mayor. De la misma forma, Gilbert *et al.*, (2012) encontraron que las *Gammaproteobacteria* se correlacionaron fuerte y positivamente con la temperatura (r = 0,72; p<0,001) en las aguas costeras de Plymouth (UK). Gilbert *et al.*, (2012) utilizaron la misma técnica molecular que en el presente estudio (i.e., secuenciación), sin embargo, en el Fiordo Comau no se observaron correlaciones tan robustas para las *Alphaproteobacteria* y *Gammaproteobacteria* como las observadas por dichos autores. Lo anterior podría ser explicado debido a la extensa serie de tiempo microbiana que analizaron (6 años; muestras mensuales) a diferencia de los diez meses (en tres instancias) de este estudio.

6.1.4.1 OTUs (especies) abundantes y raras

El reciente desarrollo de la secuenciación masiva aplicado en estudios de ecología microbiana, ha revelado la inmensa diversidad de las comunidades microbianas marinas y la prevalencia de filotipos en la biósfera rara (Galand et al., 2009). Los resultados en este trabajo indicaron que sólo el 7,52% de las OTUs se ciclaron (o variaron) entre raras (y semi-raras) y abundantes, sugiriendo que estas OTUs son raras hasta que las condiciones cambian (Campbell et al., 2011). Estas OTUs pertenecieron a 9 clases donde las más frecuentes fueron las Flavobacteriia (8 especies), Cyanobacteria (6 especies) y Alphaproteobacteria (4 especies). Estudios previos también han mostrado que las Alphaproteobacteria constituyen un grupo frecuente tanto en las taxas raras como abundantes, aun cuando se considera un valor de corte menor para las OTUs raras (<0,01%; Galand et al., 2009). Dentro de este grupo, la familia Rhodobacteraceae ha sido detectada mayoritariamente en las fracciones abundantes (>1%) o raras (<1%) que dentro de la fracción que cicla (Campbell *et al.*, 2011). Estas observaciones también son ciertas en este estudio, donde las especies pertenecientes a esta familia (38 OTUs en total) fueron raras el 94,74% de las veces, mientras que sólo 2 OTUs ciclaron entre abundancias > 1% y < 1%. Estas últimas pertenecieron a las especies Rhodobacter sp. CR07-97 (identidad promedio 99,97±0,01%) y Roseobacter sp. B11 (identidad promedio 99,79±0,01%), detectadas en mayor abundancia en la capa salobre en enero 2013 (5,07 y 3,44%) y menor en marzo 2012 (0,44 y 0,38%), lo que podría estar relacionado con las mayores temperaturas registradas en enero 2013 (20,10°C). Estos resultados coindicen con estudios anteriores de ambientes lacustres, que demuestran que las *Rhodobacter sp.* aumentan rápidamente en abundancia cuando la temperatura alcanza sobre los 20°C (Do *et al.*, 2003). Además, se encontraron OTUs raras de la clase *Spirochaetia* (4 especies) en marzo 2012 (capa salobre; 60 secuencias en total), las cuales han mostrado estar asociadas a bacterias patógenas que son anaeróbicas quimioheterotrófica en la naturaleza pero que pueden ser también parásitos responsables de muchas enfermedades como leptospirosis, enfermedad de Lyme y treponematosis como la sífilis y el pian y espiroquetosis intestinal (Villegas *et al.*, 2004).

Los resultados revelaron que una vasta mayoría de las OTUs raras (79,15%) lo fueron siempre y no fueron detectadas como abundantes (o semi-raras) en ninguna otra muestra. Estas comprenden condiciones ambientales contrastantes, como agua superficial y subsuperficial, y verano (primer y último tercio) e invierno, por lo tanto, se esperaría que las OTUs fueran raras bajo ciertas condiciones ambientales y abundantes cuando las condiciones se volvieran adecuadas. Resultados similares a los obtenidos en este estudio, se han registrado previamente en el Océano Ártico, donde las OTUs que fueron raras en aguas superficiales no se volvieron abundantes en aguas profundas (Galand et al., 2009), así como las OTUs que fueron raras en invierno en aguas superficiales, no se volvieron abundantes durante el verano (Kirchman et al., 2010). Sin embargo, estos estudios no consideraron la vasta mayoría de OTUs raras que son indetectables (i.e. abundancia = 0) cuando las condiciones cambian. En el Fiordo Comau más del 42,53% de las OTUs raras no fueron detectadas en la capa marina luego de ser comparadas con la capa salobre en un mismo período. De la misma manera, más del 54,39% de las OTUs raras no fueron detectadas en la transición entre un mes y el siguiente (i.e. entre marzo 2012 – julio 2012 y julio 2012 – enero 2013). Esto sugiere que de alguna forma, las OTUs raras sí estarían respondiendo a los cambios ambientales del ecosistema, representado en sus abundancias relativas, las cuales desaparecen cuando las condiciones cambian.

Del total de OTUs raras (355 OTUs), 14 OTUs correspondieron a filotipos sin asignar (i.e., *uncultured*) y sólo 2 OTUs *uncultured* se registraron en el grupo de las abundantes. Esto sugiere que la mayoría de las OTUs raras encontradas en las muestras del Fiordo Comau han sido abundantes en otros hábitats, ya que las OTUs clasificadas son fácilmente identificadas comparándose con grandes bases de datos (Galand *et al.*, 2009). Sin embargo, esto cambiaría debido a la nueva clasificación disponible en base a los nuevos descubrimientos, donde una prominencia notable de *Candidate Phyla Radiation* se ha descrito recientemente, representando aproximadamente la mitad de la diversidad del dominio bacteriano (Brown *et al.*, 2015; Attar, 2016; Hug *et al.*, 2016).

6.2 FIORDO PUYUHUAPI

6.2.1 Caracterización geoquímica del sedimento superficial (0-2cm)

Los sedimentos del Fiordo Puyuhuapi presentaron porcentajes de fango dentro de los rangos naturales reportados para este (Sepúlveda et al., 2005) y otros fiordos chilenos (Daneri et al., 2007; Silva & Prego, 2002). De manera similar, las concentraciones de MOT a lo largo del fiordo, permanecieron dentro de los rangos encontrados normalmente en los sedimentos del mar interior de Chiloé (>5,88%; Rudolph et al., 2009) y del Fiordo Puyuhuapi (>5,0%; Silva, 2006). Al igual que en este estudio, Silva (2006) registró altas concentraciones en la cabecera (7,5 - 12,5%) y boca (7,5 - 10%), y más bajas en la zona intermedia (5,0 - 7,5%). En los sistemas de fiordos chilenos, la principal fuente de MOT son la producción primaria, el aporte continental y/o transporte ribereño y la acción antropogénica a lo largo de la costa (Rudolph et al., 2009). En la cabecera del Fiordo Puyuhuapi se encuentra el poblado de Puyuhuapi y el Río Ventisquero (caudal medio invierno = $31,3 \text{ m}^{-3} \text{ s}^{-1}$; Olmos, 2012) (Farías, 2008; Quiroga et al., 2009; Daneri et al., 2012), los cuales podrían ocasionar un enriquecimiento adicional al sedimento además de los aportes de los centros salmoneros o de cultivo de mitílidos provenientes del fouling en las redes de balsas jaulas (Quiroga et al., 2009). Esto es coincidente con las menores concentraciones de ODF registradas en los centros de la cabecera, que probablemente estén relacionadas con el aporte de materia orgánica continental y fluvial, que contribuyen a una mayor demanda de oxígeno durante su degradación (Quiroga *et al.*, 2009). Por otra parte, las condiciones anóxicas registradas en la zona intermedia (centro C5) coincidieron con altas concentraciones de H₂S (100,10 mg L⁻¹), las cuales se encuentran sobre los valores registrados en estudios anteriores. Por ejemplo, en los sedimentos asociados a la Zona de Mínimo Oxígeno (ZMO) en las costas de Perú, donde se encontraron concentraciones máximas de H₂S de 4,43 mg L⁻¹ entre 0-2 cm del sedimento (Solís *et al.*, 2012), y en los sedimentos costeros del fiordo Limfjorden en Dinamarca, con máximos de 13,63 mg L⁻¹ en los primeros 6 cm (Jørgensen, 1977b). El potencial redox negativo da cuenta de la presencia de un entorno reductivo, sugiriendo que en el centro C5 podría existir una alta descomposición anaeróbica de materia orgánica a expensas de la reducción de sulfuro a H₂S (liberado como gas en el proceso de desgasificación) (Telfor & Robinson, 2003; Castillo *et al.*, 2005).

Para clasificar el impacto del enriquecimiento orgánico en sedimentos marinos, Hargrave *et al.* (2008) proponen una relación entre los cambios de potencial redox, pH, disponibilidad de oxígeno disuelto y enriquecimiento orgánico, con el aumento en la concentración de sulfuro en sedimentos marinos. Ante esto, los sedimentos del Fiordo Puyuhuapi, a excepción del centro C5 (zona intermedia), podrían considerarse como óxicos a hipóxicos, con potenciales redox entre < -150 y -50 mV, pH entre 6 y 7, ODF entre 3 y 10 mL L⁻¹ y H₂S < 51,12 mg L⁻¹. Los sedimentos del centro C5, de acuerdo a esta clasificación, se considerarían como severos con anoxia persistente (potencial redox < -150 mV; pH < 6; ODF = 0 mL L⁻¹; H₂S > 102,24 mg L⁻¹). Es importante mencionar que los centros C2 (cabecera), C5 (zona intermedia) y C7 (boca) se encontraban operativos durante la ejecución del proyecto, mientras que los C1 (cabecera) y C6 (zona intermedia) se reportaron como centros no operativos, aunque podrían considerarse como centros abandonados y sin ninguna mantención (Quiroga *et al.*, 2009). El centro C8 (boca) había sido removido del lugar y se reportó la presencia de redes y otros materiales en el fondo (Quiroga *et al.*, 2009).

6.2.2 Diversidad alfa de comunidad bacteriana bentónica y su asociación con las condiciones geoquímicas del sedimento

Con los resultados de biodiversidad bacteriana obtenidos tanto del T-RFLP como secuenciación (al nivel taxonómico de especies), se observó que los sedimentos del fiordo presentaron una diversidad promedio (H' = $2,60\pm0,60$ y $4,15\pm0,21$ para T-RFLP y secuenciación, respectivamente) menor a la registrada previamente en sedimentos bajo una piscicultura en la costa de Pachino en Italia (H'= $3,19\pm0,014$; T-RFLP; Danovaro *et al.*, 2006) y en sedimentos marinos del estuario del Río de las Perlas en China (H'=6,76 en promedio; secuenciación; Wang *et al.*, 2012).

Los índices ecológicos principales (riqueza, diversidad y abundancia) calculados a través del T-RFLP, no se correlacionaron significativamente (p<0,05) con ninguno de los parámetros físico-químicos medidos. Asimismo, no presentaron patrones claros de distribución a lo largo del fiordo, aunque algunos centros que se encontraron operativos durante la toma de muestras, como el C2 (cabecera) y C7 (boca), exhibieron bajos índices de diversidad (H' < 1,99) y riquezas (S < 30 OTUs), mientras que los centros C1 y C8, no operativos y ubicados dentro de la misma zona respectiva que los centros anteriores, exhibieron mayores valores (H' > 2,49 y S > 29 OTUs). En un estudio, de diversidad genómica en sedimentos, Torsvik et al. (1996) encontró un patrón similar con un aparente aumento en la diversidad y riqueza después del cese de cultivo en una piscicultura. No obstante, para el caso de los centros ubicados en la zona intermedia, C5 y C6, esta condición no se cumplió, encontrándose mayor diversidad y riqueza en el centro operativo (centro C5; H' = 3.13 y S = 36 OTUs) vs el no operativo (centro C6; H' = 2.88 y S = 29 OTUs). Otros factores podrían afectar la estructura microbiana en estos ecosistemas, como la presencia de agentes antibacteriales utilizados en las salmoneras. Estos agentes tienen un efecto bacteriostático/bactericida sobre algunas bacterias, con una ventaja selectiva correspondiente para aquellas que se vuelven resistentes (Torsvik et al., 1996). En el presente estudio el uso de agentes antibacteriales no fue analizado, pero podría tener un efecto sobre la diversidad bacteriana bentónica en el centro C6, donde la diversidad disminuye producto su utilización.

Otra explicación del comportamiento opuesto observado en los centros de la zona intermedia, podría ser el efecto de los antibióticos. En sedimentos donde el número de bacterias y la competencia es alta, muchas bacterias inhiben a sus competidores más fuertes produciendo antibióticos o bacteriocinas (Torsvik *et al.*, 1996). Esto podría ser particularmente cierto en el centro C5, donde también se observó una mayor abundancia total de bacterias.

6.2.3 Estructura de la comunidad bacteriana bentónica y su asociación con las condiciones geoquímicas del sedimento

A partir de los análisis de agrupamiento obtenidos con el T-RFLP y la secuenciación (al nivel taxonómico de clase), se observó que la comunidad bacteriana se diferenció básicamente por el estado operacional en que se encontraron los centros más que por la ubicación dentro del fiordo. Así también, lo verificó el análisis comparativo SIMPER, sugiriendo que la composición de la comunidad bacteriana bentónica del Fiordo Puyuhuapi depende de que la muestra se encuentre asociada a un centro operativo o no.

6.2.4 Composición de la comunidad bacteriana bentónica y su asociación con las condiciones geoquímicas del sedimento

La secuenciación (al nivel taxonómico de clase y orden) reveló que la composición bacteriana bentónica varió entre las tres zonas principales del fiordo. Los sedimentos de la cabecera (centro C1) estuvieron dominados por las clases *Flavobacteriia* y *Deltaproteobacteria*; la zona intermedia por las *Clostridia* y *Bacteroidia*; y la boca por las clases *Clostridia* y *Epsilonproteobacteria*. La presencia de estos grupos es consistente con estudios anteriores que han reportado secuencias asociadas a los siguientes phyla: *Firmicutes* (Polymenakou *et al.*, 2005; Vieira *et al.*, 2008; Feng *et al.*, 2009; Leloup *et al.*, 2009; Mahmoudi *et al.*, 2003; Vieira *et al.*, 2008; Feng *et al.*, 2009; Mahmoudi *et al.*, 2013), *Proteobacteria* (Ravenschlag *et al.*, 2009; Mahmoudi *et al.*, 2013), *Polymenakou et al.*, 2005; Vieira *et al.*, 2008; Feng *et al.*, 2009; Mahmoudi *et al.*, 2003; Nieira *et al.*, 2008; Feng *et al.*, 2009; Mahmoudi *et al.*, 2013), mayoritariamente distribuidas en sedimentos.

Si bien estas variaciones son claras, no se observó que fueran totalmente explicadas por las variables físico-químicas de ODF y MOT. Así lo confirmó el análisis estadístico multivariado (CCA), que combinó los datos de la secuenciación (al nivel de taxonómico de clase, orden y especies) y las variables físico-químicas del sedimento, en el cual algunas de las OTUs menos abundantes (<1% de la abundancia total) se correlacionaron con las concentraciones de ODF y MOT, mientras que, las OTUs más abundantes (>1% de la abundancia total), entre ellas las clases *Flavobacteriia*, *Deltaproteobacteria*, *Clostridia*, *Bacteroidia* y *Epsilonproteobacteria*, se concentraron al centro del diagrama revelando una baja correlación con estas variables. Sin embargo, el análisis de Pearson entre las abundancias relativas de las OTUs más abundantes (que aducen a clases) y los factores físico-químicos, reveló algunas fuertes correlaciones (p<0,05) positivas y negativas, sugiriendo que, factores distintos al ODF y MOT modulan las abundancias de las OTUs abundantes en los sedimentos del Fiordo Puyuhuapi.

Por ejemplo, el phyla de las *Firmicutes* (entre ellas las *Clostridia* y *Bacilli*) y Bacteroidetes (entre ellas las Bacteroidia, Cytophagia y Flavobacteriia), abundantes en todas las muestras de sedimento analizadas (>10,18%), tendieron a correlacionarse positivamente con la MOT y el potencial redox, con mayores abundancias en sedimentos con un alto contenido de MOT (clases Bacilli, Cytophagia y Flavobacteriia) y entornos reducidos (Cytophagia) como el centro C1 ubicado en la cabecera. Mientras que, las Clostridia y Bacteroidia tendieron a correlacionarse negativamente con el ODF y positivamente con el contenido de H₂S, con mayores abundancias en condiciones anóxicas y altas concentraciones de H₂S (centro C5). Aunque se encontraron bajas significancias, estas correlaciones fueron semejantes y concordantes entre las diferentes clases mencionadas, sugiriendo que los parámetros ODF, H₂S, MOT y potencial redox podrían explicar la distribución de las Firmicutes y Bacteroidetes en los sedimentos salmoneros del Fiordo Puyuhuapi. Las bacterias pertenecientes a estos phyla han sido registradas en sedimentos marinos contaminados con altos niveles de hidrocarburos de petróleo (Polymenakou et al., 2005; Mahmoudi et al., 2013). También, Vieira et al. (2008) han sugerido que las altas abundancias de estos grupos son indicadoras de ambientes marinos contaminados. Por lo tanto, se sugiere que los sedimentos de los centros C1 y C5 podrían estar contaminados debido a las altas abundancias registradas de *Bacteroidetes* y *Firmicutes*, respectivamente.

Las Proteobacteria constituyeron uno de los tres phyla más abundantes en los sedimentos del Fiordo Puyuhuapi, comprendiendo entre el 8,68 y 49,13% con máximas abundancias en la boca (centro C8). Dentro de estas, las clases Deltaproteobacteria y Epsilonproteobacteria fueron las más abundantes, con máximos valores en la cabecera (14,80%) y boca (27,91%) del fiordo, respectivamente. Las Deltaproteobacteria se correlacionaron positivamente con el pH (p<0,05), siendo más abundantes en los sedimentos óxicos de la cabecera (pH=7,44) y menos abundantes en los sedimentos anóxicos de la zona intermedia (pH=6,66). Resultados similares se han observado en los sedimentos lacustres en la Meseta Tibetana, donde las abundancias de *Deltaproteobacteria* aumentaron junto con el pH (7,0-8,0) (Xiong et al., 2012). Por otra parte, se ha descrito que las Deltaproteobacteria son principalmente sulfato-reductoras y estrictamente anaeróbicas (Orphan et al., 2001; Leloup et al., 2009), pero algunas también han sido observadas en sedimentos hipóxicos altamente impactados por actividades agrícolas e industriales (Mahmoudi et al., 2015), y en sedimentos óxicos superficiales en el abismo del Pacífico Sur (Durbin & Teske, 2011). Thomas et al. (2008) sugirieron que las Deltaproteobacteria podrían descender de ancestros aeróbicos con metabolismos complejos, donde las Myxococcales y Bdellovibrionales aún conservan esta característica. Esto sugiere que, las Deltaproteobacteria, encontradas en los sedimentos del Fiordo Puyuhuapi, podrían estar asociadas a grupos aeróbicos, donde el pH sería el principal factor determinante de su distribución.

Las abundancias relativas de *Epsilonproteobacteria* no se correlacionaron significativamente con ninguno de los parámetros físico-químicos medidos, aunque mostró correlaciones negativas más débiles (p>0,05) con el porcentaje de fango y el potencial redox, siendo más abundantes en la boca del fiordo, donde las concentraciones de estos parámetros fueron menores. En los sedimentos marinos, las *Epsilonproteobacteria* han sido registradas superficialmente en el Mar de Wadden, Alemania (Llobet-Brossa *et al.*, 1998), la Fosa de Japón (Li *et al.*, 1999), en sedimentos anóxicos ricos en metano de California (Orphan *et al.*,

2001) y en la Antártica (Bowman & McCuaig, 2003), entre otros. Se ha observado que algunas *Epsilonproteobacteria*, por ejemplo del *Arcobacter*, son quimioautótrofas que tienen la habilidad de llevar a cabo la sulfato-oxidación (Orphan *et al.*, 2001). Aunque no se observó un ambiente oxidado en los sedimentos de la boca del fiordo, se sabe que la degradación de la materia orgánica siempre existe, incluso bajo condiciones reducidas (Froelich *et al.*, 1979). Asimismo, podría existir la presencia de micro-nichos oxidativos en un entorno reducido (redox negativo), estructura que también se ha registrado en los sedimentos costeros del fiordo Limfjorden en Dinamarca (Jørgensen, 1977b). Los ambientes oxidados son propios de sedimentos gruesos o de aquellos que son pobres en materia orgánica (ZoBell, 1946), características que también fueron observadas en la boca del Fiordo Puyuhuapi, con menores porcentajes de fango y MOT. Esto sugiere la presencia de una estructura heterogénea en los sedimentos del Fiordo Puyuhuapi, donde los miembros de las *Epsilonproteobacteria* llevarían a cabo la sulfato-reducción en la boca del fiordo, bajo condiciones reducidas.

Las condiciones físico-químicas en los sedimentos del centro C5 fueron favorables para el desarrollo de la sulfato-reducción (ODF \approx 0 mL L⁻¹, H2S > 12 mg L⁻¹, pH < 7 y Eh < 0; Telfor & Robinson, 2003; Castillo *et al.*, 2005), sin embargo, las bacterias sulfatoreductoras más comunes no fueron registradas. Entre estas, las *Desulfobacterales*, *Desulfovibrionales* y *Syntrophobacterales* de la clase *Deltaproteobacteria* (Dexter-Dyer, 2003), las *Thermodesulfobacteria* (Dexter-Dyer, 2003) y las *Beggiatoa* (clase *Gammaproteobacteria*) (Jørgensen, 1977a), mientras que, otras se registraron en baja abundancia, como las pertenecientes a las familias *Peptococcaceae* (clase *Clostridia*) y *Nitrospiraceae* (clase *Nitrospira*), ambas menores al 1% de abundancia relativa. Esto sugiere que probablemente exista otro grupo taxonómico asociado a la sulfato-reducción en el centro C5, por ejemplo, se ha registrado que las arqueas *Archaeoglobus* también son capaces de llevar a cabo este proceso (Canfield & Raiswell, 1999), dominio que en este caso no fue analizado en los sedimentos del Fiordo Puyuhuapi.

6.2.4.1 OTUs (especies) abundantes y raras

Los resultados en este trabajo indicaron que sólo el 7,61% de las OTUs ciclaron entre raras (y semi-raras) y abundantes, sugiriendo que estas OTUs son raras hasta que las condiciones cambian (Campbell *et al.*, 2011). Estas pertenecieron a las clases *Clostridia* (15 OTUs) y *Flavobacteriia* (9 OTUs), principalmente, las cuales mostraron una variación a lo largo del fiordo. En la cabecera (centro C1), la mayoría de las OTUs abundantes que variaron a rara o semi-rara en las otras muestras, pertenecieron a las *Flavobacteriia* (6 OTUs), mientras que en la zona intermedia (centro C5) y boca (centro C8) estas pertenecieron a las *Clostridia* con 7 y 6 OTUs, respectivamente. Estudios previos indican que las *Bacteroidetes* representan un gran número de OTUs raras en aguas superficiales árticas (Galand *et al.*, 2009). También constituyen un grupo frecuente dentro de las fracciones que ciclan entre raras y abundantes temporalmente en la columna de agua, cambios asociados principalmente a aumentos en abundancia de la familia *Flavobacteriaceae* (Campbell *et al.*, 2011).

Los resultados revelaron que una vasta mayoría de las OTUs raras (82,00%) lo fueron siempre y no fueron detectadas como abundantes (o semi-raras) en ninguna otra muestra. Estas comprenden variaciones espaciales a lo largo del fiordo y condiciones ambientales contrastantes, como sedimentos más protegidos en la cabecera y con mayor influencia oceánica en la boca. Resultados similares a los obtenidos en este estudio, se han registrado previamente en ambientes marinos, donde las OTUs raras permanecieron raras aun cuando las condiciones estacionales (Kirchman *et al.*, 2010) y espaciales (Galand *et al.*, 2009) cambiaron. Sin embargo, estos estudios no consideraron la vasta mayoría de OTUs raras que son indetectables (i.e. abundancia = 0) cuando las condiciones cambian. Al igual que en el Fiordo Comau, un alto porcentaje de OTUs raras no fueron detectadas (>61,18%) al comparar las muestras entre sí. Esto sugiere que de alguna forma, las OTUs raras sí estarían respondiendo a los cambios físico-químicos del ecosistema, representado en sus abundancias relativas, en el que las OTUs raras de la cabecera (con menor ODF y mayor MOT) no son registradas en la zona intermedia (ODF \approx 0 mL L⁻¹ y menor MOT), así como las OTUs entre la zona intermedia y la boca (mayor ODF).

6.2.4.2 Presencia de patógenos en sedimentos con impacto de salmonicultura

Dentro de las Firmicutes, las Clostridia fueron la clase más abundante (75,96% en promedio de las *Firmicutes*) en el Fiordo Puyuhuapi. El principal hábitat de este grupo es el suelo, pero también han sido encontrados en aguas residuales, ríos, agua de mar, carne fresca y peces (Haagsma, 1991). Se ha reportado que las *Clostridia* causan varias enfermedades, como el botulismo, tétano, gangrena enfisematosa, edema maligno, hepatitis necrótica infecciosa, enterotoxemia y gangrena gaseosa (Haagsma, 1991). En el Fiordo Puyuhuapi, se encontraron especies relacionadas a las Clostridium botulinum (identidad promedio 89,73±2,25%) y C. perfringens (identidad promedio 94,76±1,13%) con una abundancia entre 0,10 y 1,21%. Se ha documentado que estas especies se encuentran entre las bacterias patógenas asociadas a peces (Novotny et al., 2004), sugiriendo que también podrían estarlo con los peces de cultivo en las concesiones analizadas. La C. botulinum es el agente causal del botulismo, y las del tipo E han sido registradas en sedimentos marinos y lacustres, y en intestino de peces (Novotny et al., 2004). Se ha reportado en los Grandes Lagos de América del Norte que esta bacteria ha matado miles de peces y aves acuáticas desde el año 1999 (Getchell & Bowser, 2006). Las esporas de C. botulinum tipo E son sólo perjudiciales si germinan, producen la toxina y luego son consumidas por un huésped susceptible (Getchell *et al.*, 2006). La potente toxina se produce bajo condiciones anaeróbicas y altas en nutrientes, que ocurren en organismos muertos, por lo tanto, los peces que mueren con esporas en sus tejidos pronto se convierten en un sustrato adecuado para estas bacterias de descomposición (Getchell et al., 2006; Haagsma, 1991). También pueden permanecer por muchos años (al menos 20 años) en el suelo y agua debido a que las esporas son altamente resistentes (Haagsma, 1991). Esto podría revelar el motivo por el cual la C. botulinum fue más abundante en el centro C8 (boca) (1,21% del total de abundancia) que en el resto de los centros (< 0,11%), aunque este centro se haya encontrado abandonado y no operativo. Los riesgos para la salud humana en la manipulación o consumo de peces infectados con C. botulinum son un problema que deberían vigilarse más de cerca en este fiordo. Para esto se propone la necesidad de información que documente la distribución de la C. botulinum tipo E en peces y su rol como vectores potenciales de esta bacteria.

Otra especie infecciosa de *Clostridium* registrada en los sedimentos del Fiordo Puyuhuapi, es la *C. tetani* (identidad promedio 99,33±0,26%) pero en menores proporciones (0,03 - 0,32%). Esta bacteria produce el tétano en animales y humanos que crece en los tejidos lesionados resultando en toxemia (Haagsma, 1991). Es encontrada más comúnmente en estiércol de caballos que de otros animales (Haagsma, 1991), por lo que su origen podría estar dado por aportes terrígenos a lo largo del fiordo.

Dentro de las *Epsilonproteobacteria*, algunas especies de *Arcobacter* fueron registradas, entre ellas las *A. butzleri* (1,38%; identidad promedio 99,99±0,01%) y *A. cryaerophilus* (1,49%; identidad promedio 98,55±0,03%) abundantes en la boca (centro C8). Estas especies son consideradas patógenos emergentes, donde se les ha registrado en enfermedades entéricas en humanos y animales, y ocasionalmente en bacteriemia (Snelling *et al.*, 2006). La *A. butzleri* ha sido aislada del agua de mar y ha sido más abundante cuando se encuentra asociada al plancton que en un estado puramente libre, lo cual trae implicancias ecológicas y epidemiológicas (Maugeri *et al.*, 2004). En este estudio, la presencia de especies de *Arcobacter* indicaría un potencial grado de infección en los sedimentos del centro C8, y, aunque se encontró abandonado y no operativo, los efectos siguen evidenciándose.

6.3 COMPARACIÓN DE LOS PATRONES EN LA ESTRUCTURA DE LA COMUNIDAD MICROBIANA MEDIANTE T-RFLP Y PIROSECUENCIACIÓN ROCHE 454 PARA AMBOS FIORDOS

Con los resultados de biodiversidad bacteriana, se observó que la riqueza promedio de la secuenciación (al nivel taxonómico de especies) fue mayor a la obtenida con T-RFLP en más de un 80%, pero fue bastante similar en los niveles superiores de clase y orden. Algunos estudios han mostrado que las OTUs del T-RFLP podrían estar al nivel de clase o género (Hewson & Fuhrman, 2004; van Dorst *et al.*, 2014), donde un taxón dado podría estar representado por más de una unidad taxonómica operacional (OTU) (Gillevet *et al.*, 2009). La diversidad de Shannon obtenida de la secuenciación (al nivel taxonómico de especies) fue mayor a la obtenida por T-RFLP. Estudios anteriores han demostrado que los métodos de

fingerprint como el T-RFLP subestiman la diversidad alfa, siendo inadecuados en comparaciones con otras investigaciones de la ecología microbiana (van Dorst *et al.*, 2014). Aunque la literatura indica que la diversidad del T-RFLP es sólo un 50% de la diversidad de la secuenciación (Pilloni *et al.*, 2012), en este trabajo representó más de un 75%.

El índice de Pielou fue mayor en los resultados obtenidos por T-RFLP, sugiriendo que la distribución de la diversidad es más equitativa con el T-RFLP que con la secuenciación. Lo anterior es consistente con el mayor número de OTUs abundantes que de semi-raras registradas en el T-RFLP. En la secuenciación (al nivel taxonómico de especies) se observó un vasto número de OTUs raras que coexisten con un menor número de abundantes y semi-raras. Estas diferencias entre ambas técnicas, han sido observadas en muchos otros trabajos, donde ellos se refieren al éxito de la secuenciación en recuperar las OTUs raras (Fuhrman 2009). Aunque la literatura indica que ambas tienen una detección <0,1% (Hewson & Fuhrman, 2004; Fuhrman 2009), en este trabajo la detección del T-RFLP fue >0,5% (Ver Tabla 18).

En este estudio, ambas técnicas moleculares de diferente resolución fueron capaces de diferenciar patrones generales de estructura comunitaria (análisis de agrupamiento) en las muestras de agua (Fiordo Comau) y sedimento (Fiordo Puyuhuapi). Se ha demostrado en diferentes ecosistemas, que la secuenciación 454 es un método robusto y reproducible para la recuperación fiable de la diversidad y estructura de comunidades microbianas complejas, con una reproducibilidad al nivel taxonómico de clase y orden, comparables a otras herramientas de detección como el T-RFLP (van Dorst *et al.*, 2014; Pilloni *et al.*, 2012). En este estudio, para cada técnica molecular se empleó un número de muestras diferente. Para el Fiordo Comau se utilizaron cuatro muestras para T-RFLP y seis para secuenciación, mientras que, para el Fiordo Puyuhuapi se utilizaron seis muestras para T-RFLP y sólo tres para secuenciación. Por lo tanto, ambas técnicas fueron utilizadas de manera complementaria, donde el T-RFLP fue capaz de detectar la estructura general de las comunidades microbianas en las dos zonas de estudio, además de obtener valores de riqueza similares a los obtenidos con la secuenciación (al nivel de clase y orden).

7. CONCLUSIONES

- i) La variabilidad ambiental, asociada a la salinidad y disponibilidad de nutrientes (nitrito y nitrato), afectó diferencialmente la estructura y composición comunitaria del bacterioplancton (bacterias y arqueas) en los estratos salobres (o aguas superficiales) y marinos (o subsuperficiales) del Fiordo Comau. Sin embargo, la comunidad superficial no fue menos diversa como se propuso, al contrario, la comunidad superficial fue más diversa (para la secuenciación) y compleja que la subsuperficial, debido a la presencia de bacterias características de agua oceánica (e.g., *Alphaproteobacteria* y *Gammaproteobacteria*) y dulce (e.g., *Actinobacteria*).
- ii) En la superficial. alta abundancia de Alphaproteobacteria, capa una Gammaproteobacteria y Actinobacteria respondieron a bajas concentraciones de nitrito y nitrato, y altas temperaturas durante el verano 2013. La capa marina estuvo representada por las clases Cytophagia y Flavobacteriia, cuyas abundancias fueron mayores durante el verano (2012 y 2013), mientras que, las arqueas Thaumarchaeota (unclassified) fueron características de las muestras de invierno (año 2012), asociándose a una mayor concentración de nitrito.
- iii) La estructura y composición bacteriana bentónica del Fiordo Puyuhuapi respondieron tanto al estado operativo del centro (análisis SIMPER mediante T-RFLP) como a los cambios espaciales en el fiordo (análisis SIMPER mediante T-RFLP y de composición mediante secuenciación). La cabecera (centro C1) estuvo representada por las clases *Flavobacteriia* y *Deltaproteobacteria*, las cuales se asociaron con una mayor disponibilidad de materia orgánica total y un mayor nivel de pH. La zona intermedia (centro C5) estuvo compuesta por las *Clostridia* y *Bacteroidia*, cuyas abundancias tendieron a ser mayores asociadas a bajas concentraciones de oxígeno disuelto de fondo y altas de H₂S. En la boca (centro C8) fueron más abundantes las *Clostridia* y *Epsilonproteobacteria*, asociadas con una alta concentración de H₂S y un entorno reducido.

- iv) La materia orgánica explicó mayormente, pero no significativamente, la estructura y composición de las comunidades bacterianas bentónicas en un ecosistema de fiordo con influencia salmonera como el Fiordo Puyuhuapi, aunque también el estado operacional del centro salmonero fue imperante. La comunidad bacteriana fue más rica y diversa (para el T-RFLP) en sitios con menor influencia de la salmonicultura (i.e., en un centro no operativo), pero no necesariamente con mayor influencia marina (hacia la boca del fiordo) como se propuso. Ante el menor número de muestras analizadas con secuenciación (3 muestras), se hace necesario el empleo de un mayor número (que incluya centros operativos y no operativos), con el fin de determinar si el estado operacional del centro también interviene en los cambios de la composición bacteriana bentónica.
- v) A través de una comparación en la estructura de la comunidad microbiana entre las diferentes aproximaciones moleculares (T-RFLP y pirosecuenciación Roche 454), se observó que ambas fueron capaces de diferenciar los patrones generales de estructura (análisis de agrupamiento) de las comunidades bacterioplanctónicas (Fiordo Comau) y bentónicas (Fiordo Puyuhuapi). Se sugiere que para estudios de tipo experimental, en donde sean requeridas muchas réplicas o un seguimiento temporal, así como en estudios de patrones de diversidad asociados a factores ambientales, podrían verse beneficiados por la alta reproducibilidad de los T-RFLPs, considerando la limitación de la asignación taxonómica. En contraste, estudios que requieran una caracterización minuciosa de la diversidad y abundancia de grupos taxonómicos con precisión filogenética, deberán apostar por una estrategia de bibliotecas de clones o pirosecuenciación con *barcoding*.

8. REFERENCIAS

- Acinas, S.G. 2007. Diversidad y estructura de una comunidad microbiana. Actualidad SEM
 Boletín Informativo de la Sociedad Española de Microbiología, 44:24–29.
- Attar, N. 2016. Bacterial evolution: CPR breathes new air into the tree of life. Nat. Rev. Microbiol., 14(6):332–333.
- Bengtsson-Palme, J., F. Boulund, J. Fick, E. Kristiansson & D.J. Larsson. 2014. Shotgun metagenomics reveals a wide array of antibiotic resistance genes and mobile elements in a polluted lake in India. Front. Microbiol., (5):648.
- Bissett, A., C. Burke, P.L. Cook & J.P. Bowman. 2007. Bacterial community shifts in organically perturbed sediments. Environ. Microbiol., 9(1):46–60.
- Bissett, A., J. Bowman & C. Burke. 2006. Bacterial diversity in organically-enriched fish farm sediments. FEMS Microbiol. Ecol., 55(1):48–56.
- Bowman, J.P. & R.D. McCuaig. 2003. Biodiversity, community structural shifts, and biogeography of prokaryotes within Antarctic continental shelf sediment. Appl. Environ. Microbiol., 69(5):2463–2483.
- Bowman, J.S., S. Rasmussen, N. Blom, J.W. Deming, S. Rysgaard & T. Sicheritz-Ponten. 2012. Microbial community structure of Arctic multiyear sea ice and surface seawater by 454 sequencing of the 16S RNA gene. ISME J., 6(1):11–20.
- Brown, C.T., L.A. Hug, B.C. Thomas, I. Sharon, C.J. Castelle, A. Singh, M.J. Wilkins,
 K.C. Wrighton, K.H. Williams & J.F. Banfield. 2015. Unusual biology across a group comprising more than 15% of domain Bacteria. Nature, 523(7559): 208.
- Buschmann, A.H., F. Cabello, K. Young, J. Carvajal, D.A. Varela & L. Henríquez.2009. Salmon aquaculture and coastal ecosystem health in Chile: analysis of

regulations, environmental impacts and bioremediation systems. Ocean Coast. Manag., 52(5):243–249.

- Buschmann, A.H., V.A. Riquelme, M.C. Hernández-González, D. Varela, J.E. Jiménez, L.A. Henríquez, P.A. Vergara, R. Guíñez & L. Filún. 2006. A review of the impacts of salmonid farming on marine coastal ecosystems in the southeast Pacific. ICES J. Mar. Sci., 63(7):1338–1345.
- **Cabello, F. 2006.** Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment. Environ. Microbiol., 8(7):1137–1144.
- **Campbell, B.J. & D.L. Kirchman. 2013.** Bacterial diversity, community structure and potential growth rates along an estuarine salinity gradient. ISME J., 7(1):210–220.
- Campbell, B.J., L. Yu, J.F. Heidelberg & D.L. Kirchman. 2011. Activity of abundant and rare bacteria in a coastal ocean. PNAS, 108(31):12776–12781.
- Canfield, D.E. & R. Raiswell. 1999. The evolution of the sulfur cycle. Am. J. Sci., 299(7-9):697–723.
- Canfield, D.E., B.B. Jørgensen, H. Fossing, R. Glud, J. Gundersen, N.B. Ramsing, B. Thamdrup, J.W. Hansen, L.P. Nielsen & P.O.J. Hall. 1993. Pathways of organic carbon oxidation in three continental margin sediments. Mar. Geol., 113(1-2):27–40.
- Carballa, M., M. Smits, C. Etchebehere, N. Boon & W. Verstraete. 2011. Correlations between molecular and operational parameters in continuous lab-scale anaerobic reactors. Appl. Microbiol. Biotechnol., 89(2):303–314.
- Carrasco, C. & N. Silva. 2005. 3.1 Distribución de temperatura, salinidad, oxígeno disuelto y nutrientes entre Puerto Montt y boca del Guafo. Informes Preliminares. Taller de Resultados Crucero CIMAR, 35–45.

- **Carrasco, C. & N. Silva. 2007.** 2.2 Distribución de temperatura, salinidad, oxígeno disuelto y nutrientes entre Puerto Montt y boca del Guafo (CIMAR 12 fiordos). Informes Preliminares. Taller de Resultados Crucero CIMAR, 10:35–46.
- Castillo, J.R.F., P.G. Hernández, M.S. Muñoz & C.M. Rodríguez. 2005. Relaciones entre potenciales redox y concentraciones de sulfuros en aguas termales de Cuba. Centro Nacional de Medicina Natural y Tradicional, Ciudad de la Habana, 20pp.
- Chelossi, E., L. Vezzulli, A. Milano, M. Branzoni, M. Fabiano, G. Riccardi & I.M. Banat. 2003. Antibiotic resistance of benthic bacteria in fish-farm and control sediments of the Western Mediterranean. Aquacult., 219(1), 83–97.
- Christman, G.D., M.T. Cottrell, B.N. Popp, E. Gier & D.L. Kirchman. 2011. Abundance, diversity, and activity of ammonia-oxidizing prokaryotes in the coastal Arctic Ocean in summer and winter. Appl. Environ. Microbiol., 77(6):2026–2034.
- Clarke, K.R. & R.M. Warwick. 2001. Change in marine communities: an approach to statistical analysis and interpretation. 2nd edition, PRIMER-E, Plymouth, 172pp.
- Cloern, J.E., S.Q. Foster & A.E. Kleckner. 2014. Phytoplankton primary production in the world's estuarine-coastal ecosystems. Biogeosci., 11(9):2477–2501.
- Cottrell, M.T. & D.L. Kirchman. 2000. Natural assemblages of marine proteobacteria and members of the *Cytophaga-Flavobacter* cluster consuming low-and high-molecularweight dissolved organic matter. Appl. Environ. Microbiol., 66(4):1692–1697.
- **Cottrell, M.T. & D.L. Kirchman. 2003.** Contribution of major bacterial groups to bacterial biomass production (thymidine and leucine incorporation) in the Delaware estuary. Limnol. Oceanogr., 48(1):168–178.
- Cowie, R.O.M., E.W. Maas & K.G. Ryan. 2011. Archaeal diversity revealed in Antarctic sea ice. Antarct. Sci., 23: 531–536.

- Crump, B.C., C.S. Hopkinson, M.L. Sogin & J.E. Hobbie. 2004. Microbial biogeography along an estuarine salinity gradient: combined influences of bacterial growth and residence time. Appl. Environ. Microbiol., 70(3):1494–1505.
- Daneri, G., O. Pizarro, D. Figueroa, P. Montero, J.L. Irirate, H. González, E. Quiroga,
 R. Ortiz, F. Tapia, R. Geisecke, S. Pantoja, P. Hall & R. Norambuena. 2007.
 Evaluación de la capacidad de carga del Estuario Reloncaví, X Región. PROYECTO
 FIP 2007–21. 266pp.
- Daneri, G., P. Montero, L. Lizárraga, R. Torres, J.L. Iriarte, B. Jacob, H.E. González
 & F.J. Tapia. 2012. Primary Productivity and heterotrophic activity in an enclosed marine area of central Patagonia (Puyuhuapi channel; 44°S, 73°W). Biogeosciences Discuss., 9(5):5929–5968.
- Dang, H. & C.R. Lovell. 2000. Bacterial primary colonization and early succession on surfaces in marine waters as determined by amplified rRNA gene restriction analysis and sequence analysis of 16S rRNA genes. Appl. Environ. Microbiol., 66(2): 467-475.
- Dang, H. & C.R. Lovell. 2002. Numerical dominance and phylotype diversity of marine *Rhodobacter* species during early colonization of submerged surfaces in coastal marine waters as determined by 16S ribosomal DNA sequence analysis and fluorescence in situ hybridization. Appl. Environ. Microbiol., 68(2): 496-504.
- Dang, H., T. Li, M. Chen & G. Huang. 2008. Cross-ocean distribution of *Rhodobacterales* bacteria as primary surface colonizers in temperate coastal marine waters. Appl. Environ. Microbiol., 74(1): 52-60.
- Danovaro, R., G.M. Luna, A. Dell'Anno & B. Pietrangeli. 2006. Comparison of two fingerprinting techniques, terminal restriction fragment length polymorphism and automated ribosomal intergenic spacer analysis, for determination of bacterial diversity in aquatic environments. Appl. Environ. Microbiol., 72(9):5982–5989.

- Dávila, P., D. Figueroa & E. Mulle. 2002. Freshwater input into the coastal ocean and its relation with the salinity distribution off austral Chile (35–55°S). Cont. Shelf. Res., 22: 521–534.
- Deming, J.W. & J.A. Baross. 1993. The early diagenesis of organic matter: bacterial activity. En Organic geochemistry: Pinciples and Applications. M.H. Engel & S.A. Macko (eds.), Springer Science+Business Media New York, 119-144.
- **Dexter-Dyer, B. 2003.** A Field Guide to Bacteria. Comstock Publishing Assoc.: Ithaca, NY, Vol. 1, 24–220.
- Do, Y S., T.M. Schmidt, J.A. Zahn, E.S. Boyd, A. de la Mora & A.A. DiSpirito. 2003. Role of *Rhodobacter sp.* strain PS9, a purple non-sulfur photosynthetic bacterium isolated from an anaerobic swine waste lagoon, in odor remediation. Appl. Environ. Microbiol., 69(3):1710–1720.
- Durbin, A.M. & A. Teske. 2011. Microbial diversity and stratification of South Pacific abyssal marine sediments. Environ. Microbiol., 13(12):3219–3234.
- Edwards, A., A.M. Anesio, S.M. Rassner, B. Sattler, B. Hubbard, W.T. Perkins, M. Young & G.W Griffith. 2011. Possible interactions between bacterial diversity, microbial activity and supraglacial hydrology of cryoconite holes in Svalbard. ISME J., 5: 150–160.
- **Elizondo-Patrone, C., K. Hernández, B. Yannicelli, L.M. Olsen & V. Molina. 2015.** The response of nitrifying microbial assemblages to ammonium (NH₄⁺) enrichment from salmon farm activities in a northern Chilean Fjord. Estuarine Coastal Shelf Sci., 166:131–142.
- **FAO Fisheries and Aquaculture Department. 2010.** The state of world fisheries and aquaculture 2010. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, 218pp.

- FAO Fisheries and Aquaculture Department. 2016. The state of world fisheries and aquaculture 2016. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, 200pp.
- Farías, N. 2008. Comparación de las características oceanográficas físicas y químicas presentes durante invierno y primavera en el canal Puyuguapi, seno Ventisquero y canal Jacaf. Crucero CIMAR 1, 7, 9 fiordos. Tesis para optar al grado de Oceanógrafo, Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, Valparaíso, 75pp.
- Feng, B.W., X.R. Li, J.H. Wang, Z.Y. Hu, H. Meng, L.Y. Xiang & Z.X. Quan. 2009. Bacterial diversity of water and sediment in the Changjiang estuary and coastal area of the East China Sea. FEMS Microbiol. Ecol., 70(2):236–248.
- Findlay, R.H., L. Watling & L.M. Mayer. 1995. Environmental impact of salmon net-pen culture on marine benthic communities in Maine: a case study. Estuaries, 18(1):145– 179.
- **FIP. 2005.** Diagnóstico económico y social de la acuicultura en Chile. Fondo de Investigación Pesquera y Acuicultura, Informe final Volumen I, Coquimbo, 783pp.
- Folk, R.L. 1974. Petrology of Sedimentary Rocks. Hemphill Pub., Texas, 129 pp.
- Froelich, P., G.P. Klinkhammer, M.A.A. Bender, N.A. Luedtke, G.R. Heath, D. Cullen,
 P. Dauphin, D. Hammond, B. Hartman & V. Maynard. 1979. Early oxidation of organic matter in pelagic sediments of the eastern equatorial Atlantic: suboxic diagenesis. Geochim. Cosmochim. Acta, 43(7):1075–1090.
- **Fuhrman, J.A. 2009.** Microbial community structure and its functional implications. Nature, 459(7244):193–199.
- Galand, P.E., E.O. Casamayor, D.L. Kirchman & C. Lovejoy. 2009. Ecology of the rare microbial biosphere of the Arctic Ocean. PNAS, 106(52):22427–22432.

- Getchell, R.G. & P.R. Bowser. 2006. Ecology of type E botulism within dreissenid mussel beds. Aquatic Invaders, 17(2):1–8.
- Getchell, R.G., W.J. Culligan, M. Kirchgessner, C.A. Sutton, R.N. Casey & P.R. Bowser. 2006. Quantitative polymerase chain reaction assay used to measure the prevalence of *Clostridium botulinum* type E in fish in the lower Great Lakes. Journal of aquatic animal health, 18(1):39–50.
- Gilbert, J.A., J.A. Steele, J.G. Caporaso, L. Steinbrück, J. Reeder, B. Temperton, S. Huse, A.C. McHardy, R. Knight, I. Joint, P. Somerfield, J.A. Fuhrman & D. Field.
 2012. Defining seasonal marine microbial community dynamics. ISME J., 6(2):298–308.
- Gillevet, P.M., M. Sikaroodi & A.P. Torzilli. 2009. Analyzing salt-marsh fungal diversity: comparing ARISA fingerprinting with clone sequencing and pyrosequencing. Fungal Ecology, 2(4):160–167.
- Giovannoni S. & M. Rappé. 2000. Evolution, diversity, and molecular ecology of marine prokaryotes. In: Kirchman DL (ed) Microbial ecology of the oceans. Wiley-Liss Publishers, New York, p 47–84.
- González, H.E., L.Castro, G.Daneri, J.L.Iriarte, N. Silva, C.A.Vargas, R. Giesecke & N. Sánchez. 2011. Seasonal plankton variability in Chilean Patagonia fjords: Carbon flow through the pelagic food web of Aysen Fjord and plankton dynamics in the Moraleda Channel basin. Cont. Shelf Res., 31(3):225–243.
- González, H.E., L.R. Castro, G. Daneri, JL. Iriarte, N. Silva, F. Tapia, E. Teca & C.A Vargas. 2013. Land–ocean gradient in haline stratification and its effects on plankton dynamics and trophic carbon fluxes in Chilean Patagonian fjords (47–50°S). Prog. Oceanogr. 119: 32–47.
- González, H.E., M.J. Calderón, L. Castro, A. Clement, L.A. Cuevas, G. Daneri, J.L. Iriarte, L. Lizárraga, R. Martínez, E. Menschel, N. Silva, C. Carrasco, C.

Valenzuela, C.A. Vargas & C. Molinet. 2010. Primary production and plankton dynamics in the Reloncaví Fjord and the Interior Sea of Chiloé, Northern Patagonia, Chile. Mar. Ecol. Prog. Ser., 402:13–30.

- Gutiérrez, M.H. P.E. Galand, C. Moffat & S. Pantoja. 2015. Melting glacier impacts community structure of Bacteria, Archaea and Fungi in a Chilean Patagonia fjord. Environ. Microbiol., 17(10): 3882–3897.
- Haagsma, J. 1991. Pathogenic anaerobic bacteria and the environment. Rev. Sci. Tech., 10(3):749–764
- Hargrave, B.T., G.A. Phillips, L.I. Doucette, M.J. White, T.G. Milligan, D.J. Wildish & R.E. Cranston. 1997. Assessing benthic impacts of organic enrichment from marine aquaculture. Water Air Soil Pollut., 99:641–650.
- Hargrave, B.T., M. Holmer & C.P. Newcombe. 2008. Towards a classification of organic enrichment in marine sediments based on biogeochemical indicators. Mar. Pollut. Bull., 56(5):810–824.
- Hengst, M.B., S. Andrade, B. González & J.A. Correa. 2010. Changes in epiphytic bacterial communities of intertidal seaweeds modulated by host, temporality, and copper enrichment. Microb. Ecol., 60(2):282–290.
- Hewson, I. & J.A. Fuhrman. 2004. Richness and diversity of bacterioplankton species along an estuarine gradient in Moreton Bay, Australia. Appl. Environ. Microbiol., 70(6):3425–3433.
- Holmer, M., & E. Kristensen. 1992. Impact of marine fish cage farming on metabolism and sulfate reduction of underlying sediments. Mar. Ecol. Prog. Ser., 80(2):191–201.
- Hug, L.A., B.J. Baker, K. Anantharaman, C.T. Brown, A.J. Probst, C.J. Castelle, C.N. Butterfield, A.W. Hernsdorf, Y. Amano, K. Ise, Y. Suzuki, N. Dudek, D.A.

Relman, K.M. Finstad, R. Amundson, B.C. Thomas & J.F. Banfield. 2016. A new view of the tree of life. Nat. Microbiol., 1:160–48.

- Hugoni, M., N. Taib, D. Debroas, I. Domaizon, I.J. Dufournel, G. Bronner & P.E. Galand. 2013. Structure of the rare archaeal biosphere and seasonal dynamics of active ecotypes in surface coastal waters. PNAS, 110(15):6004–6009.
- Ibieta, P., V. Tapia, C. Venegas, M. Hausdorf & H. Takle. 2011. Chilean salmon farming on the horizon of sustainability: review of the development of a highly intensive production, the ISA crisis and implemented actions to reconstruct a more sustainable aquaculture industry. En: B. Sladonja (ed.). Aquaculture and the Environment - A Shared Destiny. InTech, Croatia, pp. 215 – 246.
- Inagaki, F., M. Suzuki, K. Takai, H. Oida, T. Sakamoto, K. Aoki, K.H. Nealson & K. Horikoshi. 2003. Microbial communities associated with geological horizons in coastal subseafloor sediments from the Sea of Okhotsk. Appl. Environ. Microbiol., 69(12):7224–7235.
- Iriarte, J.L., S. Pantoja, H.E. González, G. Silva, H. Paves, P. Labbé, L. Rebolledo, M.V. Ardelan & V. Häussermann. 2013. Assessing the micro-phytoplankton response to nitrate in Comau Fjord (42°S) in Patagonia (Chile), using a microcosms approach. Environ. Monit. Assess., 185(6):5055–5070.
- Jørgensen, B.B. 1977a. Distribution of colorless sulfur bacteria (*Beggiatoa spp.*) in a coastal marine sediment. Mar. Biol., 41(1):19–28.
- Jørgensen, B.B. 1977b. The sulfur cycle of a coastal marine sediment (Limfjorden, Denmark). Limnol. Oceanogr., 22(5):814–832.
- Jørgensen, B.B. 1982. Mineralization of organic matter in the sea bed-the role of sulphate reduction. Nature, 296:643–645.

- Karakassis, I., M. Tsapakis, C.J. Smith & H. Rumohr. 2002. Fish farming impacts in the Mediterranean studied through sediment profiling imagery. Mar. Ecol. Prog. Ser., 227:125–133.
- Kassen, R., A. Buckling, G. Bell & P.B. Rainey. 2000. Diversity peaks at intermediate productivity in a laboratory microcosm. Nature, 406(6795):508–512.
- Kemp, P.F. & J.Y Aller. 2004. Estimating prokaryotic diversity: when are 16S rDNA libraries large enough? Limnol. Oceanogr. Methods, 2(4):114–125.
- Kirchman, D.L., A.I. Dittel, R.R. Malmstro & M.T. Cottrell. 2005. Biogeography of major bacterial groups in the Delaware Estuary. Limnol. Oceanogr., 50(5):1697–1706.
- Kirchman, D.L., M.T. Cottrell & C. Lovejoy. 2010. The structure of bacterial communities in the western Arctic Ocean as revealed by pyrosequencing of 16S rRNA genes. Environ. Microbiol., 12(5):1132–1143.
- Könneke, M., A.E. Bernhard, J.R. de la Torre, C.B. Walker, J.B. Waterbury & D.A. Stahl. 2005. Isolation of an autotrophic ammonia-oxidizing marine archaeon. Nature, 437(7058):543–546.
- Korlević, M., L. Šupraha, Z. Ljubešić, J. Henderiks, I. Ciglenečki, J. Dautović & S. Orlić. 2016. Bacterial diversity across a highly stratified ecosystem: A salt-wedge Mediterranean estuary. Syst. Appl. Microbiol., 39(6):398–408.
- La Rosa, T., S. Mirto, A. Mazzola & R. Danovaro. 2001. Differential responses of benthic microbes and meiofauna to fish-farm disturbance in coastal sediments. Environ. Pollut., 112(3):427–434.
- La Rosa, T., S. Mirto, E. Favaloro, B. Savona, G. Sarà, R. Danovaro & A. Mazzola. 2002. Impact on the water column biogeochemistry of a Mediterranean mussel and fish farm. Water Res., 36(3):713–721.

- Lane, D.J., B. Pace, G.J. Olsen, D.A. Stahl, M.L. Sogin & N.R. Pace. 1985. Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. PNAS, 82:6955–6959.
- Leloup, J., H. Fossing, K. Kohls, L. Holmkvist, C. Borowski & B.B. Jørgensen. 2009. Sulfate-reducing bacteria in marine sediment (Aarhus Bay, Denmark): abundance and diversity related to geochemical zonation. Environ. Microbiol., 11(5):1278–1291.
- Levings, C.D., A. Ervik, P. Johannessen & J. Aure. 1995. Ecological criteria used to help site fish farms in fjords. Estuaries, 18(1):81–90.
- Li, L., C. Kato & K. Horikoshi. 1999. Microbial Diversity in Sediments Collected from the Deepest Cold-Seep Area, the Japan Trench. Mar. Biotechnol., 1:391–400.
- Liu, Y., Y. Tandong, N. Jiao, L. Tian, A. Hu, W. Yu & S. Li. 2011. Microbial diversity in the snow, a moraine lake and a stream in Himalayan glacier. Extremophiles, 15: 411– 421.
- Llobet-Brossa, E., R. Rosselló-Mora & R. Amann. 1998. Microbial Community Composition of Wadden Sea Sediments as Revealed by Fluorescence In Situ Hybridization. Appl. Environ. Microbiol., 64(7): 2691–2696.
- Luczak, C., M.A. Janquin & A. Kupka. 1997. Simple standard procedure for the routine determination of organic matter in marine sediment. Hydrobiologia, 345:87–94.
- Ludwig, J.A. & J.F. Reynolds. 1988. Statistical ecology: a primer on methods and computing. Wiley, 337pp.
- Madigan, M.T., J.M. Martinko & J. Parker. 1997. Brock biology of microorganisms. Ed.: Englewood Cliffs, NJ: Prentice Hall. Vol. 514, 1061pp.
- Madrid, V.M., G.T. Taylor, M.I. Scranton & A.Y. Chistoserdov. 2001. Phylogenetic diversity of bacterial and archaeal communities in the anoxic zone of the Cariaco Basin. Appl. Environ. Microbiol., 67(4):1663–1674.
- Mahmoudi, N., M.S. Robeson, H.F. Castro, J.L. Fortney, S.M. Techtmann, D.C. Joyner,
 C.J. Paradis, S.M. Pfiffner & T.C. Hazen. 2015. Microbial community composition and diversity in Caspian Sea sediments. FEMS Microbiol. Ecol., 91(1):1–11.
- Mahmoudi, N., T.M. Porter, A.R. Zimmerman, R.R. Fulthorpe, G.N. Kasozi, B.R. Silliman & G.F. Slater. 2013. Rapid degradation of deepwater horizon spilled oil by indigenous microbial communities in Louisiana saltmarsh sediments. Environ. Sci. Technol., 47(23):13303–13312.
- Margesin, R. & V. Miteva. 2011. Diversity and ecology of psychrophilic microorganisms. Res. Microbiol., 162: 346–361.
- Martens-Habbena, W., P. Berube & H. Urakawa. 2009. Ammonia oxidation kinetics determine niche separation of nitrifying Archaea and Bacteria. Nature, 461(7266):976–979.
- Maugeri, T.L., M. Carbone, M.T. Fera, G.P. Irrera & C. Gugliandolo. 2004. Distribution of potentially pathogenic bacteria as free living and plankton associated in a marine coastal zone. J. Appl. Microbiol., 97(2):354–361.
- Mayr, C., G. Försterra, V. Häussermann, A. Wunderlich, J. Grau, M. Zieringer & A. Altenbach. 2011. Stable isotope variability in a Chilean fjord food web: implications for N-and C-cycles. Mar. Ecol. Prog. Ser., 428:89–104.
- Meyer, F., D. Paarmann, M. D'Souza, R. Olson, E.M. Glass, M. Kubal, T. Paczian, A. Rodriguez, R. Stevens, A. Wilke, J. Wilkening & R.A. Edwards. 2008. The metagenomics RAST server a public resource for the automatic phylogenetic and functional analysis of metagenomes. BMC Bioinf., 9:386.
- **MoBio Laboratories Inc. 2010.** PowerSoil[®] DNA Isolation Kit: Instruction Manual. Version 08202010, 20pp.

- Møller, A.K., D.A. Søborg, W.A. Al-Soud, S.J. Sørensen & N. Kroer. 2013. Bacterial community structure in High-Arctic snow and freshwater as revealed by pyrosequencing of 16S rRNA genes and cultivation. Polar Res., 32: 17390.
- Montero, P., G. Daneri, H.E. González, J.L. Iriarte, F.J. Tapia, L. Lizarraga, N. Sánchez & O. Pizarro. 2011. Seasonal variability of primary production in a fjord ecosystem of the Chilean Patagonia: Implications for the transfer of carbon within pelagic food webs. Cont. Shelf Res., 31(3):202–215.
- Morán, A.C., M.B. Hengst, R. De la Iglesia, S. Andrade, J.A. Correa & B. González.
 2008. Changes in bacterial community structure associated with coastal copper enrichment. Environ. Toxicol. Chem., 27(11):2239–2245.
- Navarro, N., R.L. Leakey & K.D. Black. 2008. Effect of salmon cage aquaculture on the pelagic environment of temperate coastal waters: seasonal changes in nutrients and microbial community. Mar. Ecol. Prog. Ser., 361:47–58.
- Naylor, R. & M. Burke. 2005. Aquaculture and ocean resources: raising tigers of the sea. Annu. Rev. Environ. Resour., 30:185–218.
- Naylor, R.L., J. Eagle & W.L. Smith. 2003. Salmon aquaculture in the Pacific Northwest a global industry with local impacts. Environment: Science and Policy for Sustainable Development, 45(8):18–39.
- Novotny, L., L. Dvorska, A. Lorencova, V. Beran & I. Pavlik. 2004. Fish: a potential source of bacterial pathogens for human beings. A review. Vet. Med. Czech, 49(9):343–358.
- **Olmos, V. 2012.** Estimaciones de los tiempos de recambio en fiordos de la provincia de Aysén, Chile. Habilitación Profesional para optar al Título de Geofísico, Universidad de Concepción, Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas, Concepción, 111pp.

- Olsen, L.M., M. Holmer & Y. Olsen. 2008. Perspectives of nutrient emission from fish aquaculture in coastal waters. Literature review with evaluated state of knowledge. Final Report. The Fishery and Aquaculture Industry Research Fund, 87pp.
- Orphan, V.J., K.U. Hinrichs, W.I.I.I. Ussler, C.K. Paull, L.T. Taylor, S.P. Sylva, J.M. Hayes & E.F. DeLong. 2001. Comparative analysis of methane-oxidizing archaea and sulfate-reducing bacteria in anoxic marine sediments. Appl. Environ. Microbiol., 67(4):1922–1934.
- Pantoja, S., J.L. Iriarte & G. Daneri. 2011. Oceanography of the Chilean Patagonia. Cont. Shelf Res., 31(3):149–153.
- Parsons, T.R., Y. Maita & C.A. Lalli. 1984. A Manual of Chemical and Biological Methods for Seawater Analysis. Pergamon Press, Oxford, 173pp.
- Pedrós-Alió, C. 2006. Marine microbial diversity: can it be determined? Trends in microbiology, 14(6):257–263.
- Pickard, G.L. 1971. Some physical oceanographic features of inlets of Chile. J. Fish. Res. Bd. Canada, 28(8):1077–1106.
- Pilloni, G., M.S. Granitsiotis, M. Engel & T. Lueders. 2012. Testing the limits of 454 pyrotag sequencing: reproducibility, quantitative assessment and comparison to T-RFLP fingerprinting of aquifer microbes. PloS one, 7(7):e40467.
- Piquet, A.M.-T., H. Bolhuis, M.P. Meredith & A.G.J. Buma. 2011. Shifts in coastal Antarctic marine microbial communities during and after meltwater-related surface stratification. FEMS Microbiol. Ecol., 76: 413–427.
- Piquet, A.M.-T., J.F. Scheepens, H. Bolhuis, C. Wiencke & A.G.J Buma. 2010. Variability of protistan and bacterial communities in two Arctic fjords (Spitsbergen). Polar Biol., 33: 1521–1536.

- Piquet, A.M.-T., W.H. van de Poll, R.J.W. Visser, C. Wiencke, H. Bolhuis & A.G.J. Buma. 2014. Springtime phytoplankton dynamics in Arctic Krossfjorden and Kongsfjorden (Spitsbergen) as a function of glacier proximity. Biogeosciences 11: 2263–2279.
- Pitta, P., E.T. Apostolaki, T. Tsagaraki, M. Tsapakis & I. Karakassis. 2006. Fish farming effects on chemical and microbial variables of the water column: a spatiotemporal study along the Mediterranean Sea. Hydrobiologia, 563(1):99–108.
- Polymenakou, P.N., S. Bertilsson, A. Tselepides & E.G. Stephanou. 2005. Bacterial community composition in different sediments from the Eastern Mediterranean Sea: a comparison of four 16S ribosomal DNA clone libraries. Microb. Ecol., 50(3):447–462.
- Prado-Fiedler, R. 2000. Distribución espacial del amonio en fiordos y canales comprendidos entre Puerto Montt y Laguna San Rafael en período de primavera. Cienc. Tecnol. Mar, 23:15–24.
- Prado-Fiedler, R. 2009. Winter and summer distribution of dissolved oxygen, pH and nutrients at the heads of fjords in Chilean Patagonia with possible phosphorus limitation. RBMO, 44(3):783–789.
- Quince, C., A.W. Walker, J.T. Simpson, N.J. Loman & N. Segata. 2017. Shotgun metagenomics, from sampling to analysis. Nat. Biotechnol., 35(9):833–844.
- Quiroga, E., F. Tapia & F. Godoy. 2009. Evaluación Ambiental de la Condición de Fondo de las Áreas Geográficas de Uso Intensivo de la Salmonicultura en la Región de Aysén, Zonas Puyuhuapi y Jacaf. Proyecto N°4872-11034-LP08 de la Subsecretaría de Pesca, Chile, 141pp.
- Ramírez, B. & E. Pizarro. 2005. Distribución de clorofila-a y feopigmentos en los canales australes chilenos comprendidos entre Puerto Montt y la laguna San Rafael, Chile. Cienc. Tecnol. Mar., 28(1):45–62.

- Ravenschlag, K., K. Sahm & R. Amann. 2001. Quantitative molecular analysis of the microbial community in marine Arctic sediments (Svalbard). Appl. Environ. Microbiol., 67(1):387–395.
- Román, I. 2010. Estudio comparativo entre el perfil bacteriano de sedimento de Mangle en la Ciénaga Cucharillas y Bahía de Jobos por medio de la técnica "Terminal Restriction Fragment length Polymorphism" (T-RFLP). Requisito parcial para la obtención del Grado de Maestría en Ciencias en Gerencia Ambiental En Evaluación y Manejo de Riesgo Ambiental. Universidad Metropolitana, San Juan, Puerto Rico, 146pp.
- Rosch, C. & H. Bothe. 2005. Improved assessment of denitrifying, N2-fixing, and totalcommunity bacteria by terminal restriction fragment length polymorphism analysis using multiple restriction enzymes. Appl. Environ. Microbiol., 71:2026–2035.
- Rudolph, A., P. Medina, C. Urrutia & R. Ahumada. 2009. Ecotoxicological sediment evaluations in marine aquaculture areas of Chile. Environ. Monit. Assess., 155(1-4):419–429.
- Sakami, T., K. Abo, K. Takayanagi & S. Toda. 2003. Effects of water mass exchange on bacterial communities in an aquaculture area during summer. Estuarine Coastal Shelf Sci., 56(1):111–118.
- San Martín, B., T. Yatabe, A. Gallardo & P. Medina. 2010. Manual de buenas prácticas en el uso de antibióticos y antiparasitarios en la salmonicultura chilena. Laboratorio de Farmacología Veterinaria, Universidad de Chile & SERNAPESCA, Santiago, 43pp.
- Sánchez, N., H.E. González & J.L. Iriarte. 2011. Trophic interactions of pelagic crustaceans in Comau Fjord (Chile): their role in the food web structure. J. Plankton Res., 33(8):1212–1229.
- Sepúlveda, J., S. Pantoja, K. Hughen, C. Lange, F. González, P. Muñoz, L. Rebolledo,R. Castro, S. Contreras, A. Ávila, P. Rossel, G. Lorca, M. Salamanca & N. Silva.

2005. Fluctuations in export productivity over the last century from sediments of a southern Chilean fjord (44 S). Estuarine Coastal Shelf Sci., 65(3):587–600.

- Sepúlveda, J., S. Pantoja & K.A. Hughen. 2011. Sources and distribution of organic matter in northern Patagonia fjords, Chile (~44–47°S): a multi-tracer approach for carbon cycling assessment. Cont. Shelf. Res., 31: 315–329.
- SERNAPESCA. 2013. Programación de períodos de descanso de las agruaciones de concesiones de salmonideos en las regiones de Los Lagos, Aysén y Magallanes. Servicio Nacional de Pesca y Acuicultura, 1p.
- Shah, N., H. Tang, T.G. Doak & Y. Ye. 2011. Comparing bacterial communities inferred from 16S rRNA gene sequencing and shotgun metagenomics. En: Pacific Symposium on Biocomputing, pp. 165–176.
- Shannon, C.E. & W. Weaver. 1949. The mathematical theory of communication. University of Illinois Press, Urbana, IL.
- Sievers, H. 2006. Temperatura y salinidad en canales y fiordos australes. Avances en el conocimiento oceanográfico de las aguas interiores chilenas, Puerto Montt a cabo de Hornos. N. Silva & S. Palma (eds.), Comité Oceanográfico Nacional Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, Valparaíso, 31–36.
- Silva, N. 2006. 3.2 Oxígeno disuelto, pH y nutrientes en canales y fiordos australes. Avances en el conocimiento oceanográfico de las aguas interiores chilenas, Puerto Montt a cabo de Hornos. N. Silva & S. Palma (eds.), Comité Oceanográfico Nacional - Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, Valparaíso, 37–43.
- Silva, N. & P. Ortiz. 2002. C y N, su distribución y estequiometría, en sedimentos superficiales de la región sur de la zona de fiordos y canales australes de Chile, 52° 56°S (crucero CIMAR-fiordo 3). Cienc. Tecnol. Mar., 25(1):89–108.

- Silva, N. & R. Prego. 2002. Carbon and nitrogen spatial segregation and stoichiometry in the surface sediments of southern Chilean inlets (41–56 S). Estuarine Coastal Shelf Sci., 55(5):763–775.
- Silva, N., C. Calvete & H. Sievers. 1998. Masas de agua y circulación para algunos canales australes entre Puerto Montt y Laguna San Rafael, Chile (Crucero Cimar-Fiordo 1). Cienc. Tecnol. Mar., 21: 17–48.
- Silva, N., C.A. Vargas & R. Prego. 2011. Land-ocean distribution of allochthonous organic matter in surface sediments of the Chiloé and Aysén interior seas (Chilean Northern Patagonia). Cont. Shelf Res., 31(3):330–339.
- Silva, N., P. Reinoso & G. Arancibia. 2012. 2.2. Distribución vertical de temperatura, salinidad, oxígeno disuelto y nutrientes, en la sección estero Reloncaví a boca del Guafo. Informes Preliminares. Taller de Resultados Crucero CIMAR. 10pp.
- Silveira, C.B., R.P. Vieira, A.M. Cardoso, R. Paranhos, R.M. Albano & O.B. Martins. 2011. Influence of salinity on bacterioplankton communities from the Brazilian rain forest to the coastal Atlantic Ocean. PLoS One, 6(3):e17789.
- Snelling, W.J., M. Matsuda, J.E. Moore & J.S.G. Dooley. 2006. Under the microscope: *Arcobacter*. Lett. Appl. Microbiol., 42(1):7–14.
- Sogin, M.L., H.G. Morrison, J.A. Huber, D.M. Welch, S.M. Huse, P.R. Neal, J.M. Arrieta & G.J. Herndl. 2006. Microbial diversity in the deep sea and the underexplored "rare biosphere". PNAS, 103(32):12115–12120.
- Solís J.A, W. Carhuapoma, F. Velazco & M. Graco. 2012. Validación y cuantificación de sulfuros de hidrógeno (H₂S) en agua intersticial de sedimentos marinos recientes. Inf. Inst. Mar Perú, 39(1-2):77–81.
- Sommer, M. 2009. Acuicultura Insostenible en Chile (Unsustainable aquaculture in Chile). REDVET, 10(3):1–23.

- Soto, D. & F. Norambuena. 2004. Evaluation of salmon farming effects on marine systems in the inner seas of southern Chile: a large-scale mensurative experiment. J. Appl. Ichthyol., 20(6):493–501.
- **Soto, M.V. 2009.** Geography of the chilean fjord region. Marine benthic fauna of Chilean Patagonia. Santiago: Nature In Focus, 43–52.
- Suzuki, R. & H. Shimodaira. 2006. Pvclust: an R package for assessing the uncertainty in hierarchical clustering. Bioinformatics, 22(12):1540–1542.
- Taketani, R.G., C.A. Yoshiura, A.C.F. Dias, F.D. Andreote & S.M. Tsai. 2010. Diversity and identification of methanogenic archaea and sulphate-reducing bacteria in sediments from a pristine tropical mangrove. Antonie van Leeuwenhoek, 97(4):401– 411.
- Telfor, T. & K. Robinson. 2003. Environmental quality and carrying capacity for aquaculture in Mulroy Bay, Co. Donegal. Marine Environment and Health Series, Ireland, N°9, 103pp.
- Tironi, A., V.H. Marin & F.J. Campuzano. 2010. A management tool for assessing aquaculture environmental impacts in Chilean Patagonian fjords: integrating hydrodynamic and pellets dispersion models. J. Environ. Manage., 45(5):953–962.
- Torsvik, V., R. Sørheim & J. Goksøyr. 1996. Total bacterial diversity in soil and sediment communities—a review. J. Ind. Microbiol., 17(3-4):170–178.
- Treusch, A.H., S. Leininger, A. Kletzin, S.C. Schuster, H.P. Klenk & C. Schleper. 2005. Novel genes for nitrite reductase and Amo-related proteins indicate a role of uncultivated mesophilic crenarchaeota in nitrogen cycling. Environ. Microbiol., 7(12):1985–1995.

- van Dorst, J., A. Bissett, A.S. Palmer, M. Brown, I. Snape, J.S. Stark, B. Raymond, J. McKinlay, M. Ji1, T. Winsley & B.C. Ferrari. 2014. Community fingerprinting in a sequencing world. FEMS Microbiol. Ecol., 89(2):316–330.
- Vargas, C.A., R.A. Martinez, V. San Martin, M. Aguayo, N. Silva & R. Torres. 2011. Allochthonous subsidies of organic matter across a lake–river–fjord landscape in the Chilean Patagonia: implications for marine zooplankton in inner fjord areas. Cont. Shelf. Res., 31: 187–201.
- Venter, J.C., K. Remington, J.F. Heidelberg, A.L. Halpern, D. Rusch, J.A. Eisen, D. Wu, I. Paulsen, K.E. Nelson, W. Nelson, D.E. Fouts, S. Levy, A.H. Knap, M.W. Lomas, K. Nealson, O. White, J. Peterson, J. Hoffman, R. Parsons, H. Baden-Tillson, C. Pfannkoch, Y.H. Rogers & H.O. Smith. 2004. Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso Sea. Science, 304:66–74.
- Vetriani, C., H.V. Tran & L.J. Kerkhof. 2003. Fingerprinting microbial assemblages from the oxic/anoxic chemocline of the Black Sea. Appl. Environ. Microbiol., 69(11):6481– 6488.
- Vezzulli, L., E. Chelossi, G. Riccardi & M. Fabiano. 2002. Bacterial community structure and activity in fish farm sediments of the Ligurian sea (Western Mediterranean). Aquaculture International, 10(2):123–141.
- Vieira, R.P., A.M. González, A.M. Cardoso, D.N. Oliveira, R.M. Albano, M.M. Clementino, O.B. Martins & R. Paranhos. 2008. Relationships between bacterial diversity and environmental variables in a tropical marine environment, Rio de Janeiro. Environ. Microbiol., 10(1):189–199.
- Villegas, I.A., E.B. Aguilar, R.B. Perez, P. de L. Varela, S.O. Legaz & J.M.P. Virseda. 2004. Espiroquetosis colónica: una causa poco frecuente de diarrea en el adulto. Gastroenterología y hepatología, 27(1):21–23.

- Wang, Y., H.F. Sheng, Y. He, J.Y. Wu, Y.X. Jiang, N.F.Y. Tam & H.W. Zhou. 2012. Comparison of the levels of bacterial diversity in freshwater, intertidal wetland, and marine sediments by using millions of illumina tags. Appl. Environ. Microbiol., 78(23):8264–8271.
- Wildish, D.J., B.T. Hargrave & G. Pohle. 2001. Cost-effective monitoring of organic enrichment resulting from salmon mariculture. ICES J. Mar. Sci., 58: 469–476.
- Wilhelm, L., G.A. Singer, C. Fasching, T.J. Battin & K. Besemer. 2013. Microbial biodiversity in glacier-fed streams. ISME J., 7: 1651–1660.
- Xiong, J., Y. Liu, X. Lin, H. Zhang, J. Zeng, J. Hou, Y. Yang, T. Yao, R. Knight & H. Chu. 2012. Geographic distance and pH drive bacterial distribution in alkaline lake sediments across Tibetan Plateau. Environ. Microbiol., 14(9):2457–2466.
- Zeng, Y., T. Zheng & H. Li. 2009. Community composition of the marine bacterioplankton in Kongsfjorden (Spitsbergen) as revealed by 16S rRNA gene analysis. Polar Biol., 32: 1447–1460.
- Zeng, Y.X., Y. Yu, Z.Y. Qiao, H.Y. Jin & H.R. Li. 2014. Diversity of bacterioplankton in coastal seawaters of Fildes Peninsula, King George Island, Antarctica. Arch. Microbiol., 196(2):137–147.
- **ZoBell, C.E. 1946.** Studies on redox potential of marine sediments. AAPG Bulletin, 30(4):477–513.

9. ANEXOS





Anexo 2. Promedios (y desviación estándar) de los factores físico-químicos del agua del Fiordo Comau. Ref.: POC: Carbono Orgánico Particulado, DOC: Carbono Orgánico Disuelto.

	Capa Salobre (0m)			Capa Marina (20m)			
	Marzo 2012	Julio 2012	Enero 2013	Marzo 2012	Julio 2012	Enero 2013	
Temperatura (°C)	16,53	8,82	20,10	11,12	10,22	11,48	
Salinidad (psu)	20,00	24,10±0,71	18,49±0,69	29,35±0,07	30,20±1,13	31,60	
Clorofila- <i>a</i> (mg m ⁻³)	0,41	1,09±0,08	$0,62{\pm}0,00$	$0,84{\pm}0,02$	0,62±0,09	$7,28{\pm}0,58$	
Nitrito (µM)	0,08±0,02	0,38±0,06	0,10	0,38	0,30±0,05	$0,14{\pm}0,02$	
Nitrato (µM)	1,31±1,11	12,81±1,14	1,69	14,01	16,53±1,01	$0,53{\pm}0,07$	
Fosfato (µM)	1,34±1,37	1,07±0,09	0,39	1,01	1,42±0,07	0,47±0,12	
Silicato (µM)	14,03±4,15	20,69	11,35	15,70	20,73	0,49±0,16	
POC (µg L ⁻¹)	320,09	273,79±7,66	203,68±12,13	296,45±14,91	159,27±3,99	472,60±229,03	
DOC (µmol L ⁻¹)	147,38±6,07	105,42±1,41	98,38±9,60	187,92±37,36	SD*	143,13±9,02	
POC total (mg L ⁻¹)	2,04±0,00	1,54±0,02	1,38±0,13	2,56±0,45	SD*	2,19±0,34	

* SD: sin dato

POC total = POC + DOC

Anexo 3. *Heatmap* de las OTUs (referidas a especies) del bacterioplancton (bacterias y arqueas) presentes en la capa salobre y marina del Fiordo Comau analizadas con la técnica de pirosecuenciación Roche 454. La escala de color representa las abundancias de las OTUs encontradas, donde los valores positivos (colores verdes) denotan mayor abundancia y menor hacia los valores negativos (colores rojos). En azul se muestran los valores de *bootstrap* obtenidos del análisis *pvclust* en R.



Anexo 4. Análisis Canónico de Correspondencia de las variables ambientales (en vectores verdes) y las OTUs (que aducen a órdenes) del bacterioplancton (bacterias y arqueas; en cruces rojas) obtenidos a partir de la pirosecuenciación Roche 454 de las muestras de agua del Fiordo Comau.



Anexo 5. Análisis Canónico de Correspondencia de las variables ambientales (en vectores verdes) y las OTUs (que aducen a especies) del bacterioplancton (bacterias y arqueas; en cruces rojas) obtenidos a partir de la pirosecuenciación Roche 454 de las muestras de agua del Fiordo Comau.



Anexo 6. Factores físico–químicos del sedimento (primeros 2 cm) de los centros salmoneros del Fiordo Puyuhuapi (Fuente: Quiroga *et al.*, 2009). Ref.: ODF: contenido de Oxígeno Disuelto de Fondo, MOT: Materia Orgánica Total, H₂S: contenido de Sulfuro de Hidrógeno.

	C1	C2	C5	C6	C7	C8
Localización	Cabecera	Cabecera	Z. Intermedia	Z. Intermedia	Boca	Boca
Profundidad de colecta (m)	40	27	59	42	48	62
ODF (mL L ⁻¹)	2,78	2,94	0,00	3,28	3,48	3,93
Fango (< 63 um) (%)	33,37	39,18	33,27	50,65	5,38	28,84
pН	7,44	6,41	6,66	7,18	7,07	7,06
Potencial redox (mV)	-163	-275	-334	-70	-201	-371
H ₂ S (mg L ⁻¹)	0,02	26,55	100,10	5,92	5,42	24,32
MOT (%)	16,66	15,52	5,61	5,78	9	6,66

Anexo 7. *Heatmap* de las OTUs (referidas a especies) presentes en los sedimentos de los centros salmoneros del Fiordo Puyuhuapi analizadas con la técnica de pirosecuenciación Roche 454. La escala de color representa las abundancias de las OTUs encontradas, donde los valores positivos (colores verdes) denotan mayor abundancia y menor hacia los valores negativos (colores rojos). En azul se muestran los valores de *bootstrap* obtenidos del análisis *pvclust* en R.



Anexo 8. Análisis Canónico de Correspondencia de las variables ambientales (en vectores verdes) y las OTUs (que aducen a órdenes) bacterianas (en cruces rojas) obtenidas a partir de la pirosecuenciación Roche 454 del sedimento del Fiordo Puyuhuapi. Ref.: MOT: Materia Orgánica Total, ODF: contenido de Oxígeno Disuelto de Fondo.



Anexo 9. Análisis Canónico de Correspondencia de las variables ambientales (en vectores verdes) y las OTUs (que aducen a clases) bacterianas (en cruces rojas) obtenidas a partir de la pirosecuenciación Roche 454 del sedimento del Fiordo Puyuhuapi. Ref.: MOT: Materia Orgánica Total, ODF: contenido de Oxígeno Disuelto de Fondo.

