



**Universidad de Concepción  
Dirección de Postgrado  
Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas  
Programa de Doctorado en Oceanografía**

**Respuesta metabólica de comunidades microbianas  
marinas planctónicas a materia orgánica disuelta de  
distinto origen**



Tesis para optar al grado de Doctora en Oceanografía

**MARÍA LORENA A. GONZÁLEZ HURTADO  
CONCEPCIÓN-CHILE  
2022**

Profesor Guía: Renato Quiñones Bergeret  
Departamento de Oceanografía,  
Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas  
Universidad de Concepción

Universidad de Concepción  
Dirección de Postgrado

La Tesis de “*Doctorado en Oceanografía*” titulada “*Respuesta de comunidades microbianas marinas planctónicas a materia orgánica disuelta de distinto origen*”, de la Sra. “*MARÍA LORENA A. GONZÁLEZ HURTADO*” y realizada bajo la Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas, Universidad de Concepción, ha sido aprobada por la siguiente Comisión de Evaluación:

Dr. Renato Quiñones  
Profesor Guía  
Universidad de Concepción

---

Dra. Ingrid Obernosterer  
Profesora Co- Guía  
Centre national de la recherche  
scientifique (CNRS-Francia)

---

Dra. Verónica Molina  
Miembro Comité de Tesis  
Universidad de Playa Ancha



---

Dra. Camila Fernández  
Miembro Comité de Tesis  
Sorbonne Université  
Universidad de Concepción

---

Dr. Silvio Pantoja  
Miembro Comité de Tesis  
Universidad de Concepción

---

Dr. José Luis Iriarte  
Evaluador Externo  
Universidad Austral de Chile

---

Dra. Pamela Hidalgo  
Directora  
Programa de Doctorado en Oceanografía  
Universidad de Concepción

---

## **Dedicatoria**

A mi hijo Manuel, quien llegó anunciando la primavera, para demostrarme que todo se puede y a enseñarme un amor infinito, como solo un niño lo sabe hacer. A mi esposo Marcelo por su amor, paciencia y apoyo incondicional durante este proceso. A León por estar, cuidar y acompañar a su hermanito y papá siempre, especialmente cuando lo requería a tesis. A mi madre Marina, a mi padre Temístocles y a mis hermanos Tatiana, Augusto y Fernando, quienes son fundamentales en mi vida y siempre están dispuestos a apoyarme.



## Agradecimientos

Comienzo agradeciendo al Dr. Renato Quiñones por aceptar ser mi Profesor Guía durante mi doctorado, por su enseñanza y formación científica, su buena disposición, paciencia, consejos en los distintos aspectos de la vida y a todas sus gestiones para llegar al final de este largo camino, a pesar de las circunstancias inesperadas que se presentaron. A la Dra. Ingrid Obernosterer por ser Profesora Co-Guía de esta Tesis, por su apoyo y enseñanza durante mis estancias en su laboratorio en Francia. Al Dr. Marcelo Fuentes, por su valioso aporte en el desarrollo de esta investigación, desde ayudarme con el lavado de material a la revisión de los artículos científicos generados. A la Dra. Verónica Molina, por su excelente disposición a colaborar en esta investigación a través de su pasión por la ecología microbiana. A la Dra. Camila Fernández y al Dr. Silvio Pantoja por aceptar ser parte de la comisión evaluadora y por proveer de apoyo de laboratorio para aspectos importantes de esta investigación. También quiero agradecer a todo el equipo del Laboratorio de Metabolismo y Ecoalometría, me refiero a Oliver Alarcón y Luis Montecinos por el apoyo en terreno y laboratorio, y a Evelyn Martínez por enseñarme a procesar las muestras de ATP y enzimas. En este contexto también quiero agradecer por su aporte en distintas etapas a la Dra. Valentina Valdés, Dr. Angel Rain, Dra. Odette Vergara, Samuel Soto, Lilian Núñez y Patricio Torres.

Esta tesis doctoral fue posible gracias al financiamiento del Centro Interdisciplinario para la Investigación Acuícola (INCAR; proyecto FONDAP 15110027; ANID), proyecto MEDEA (INSU\_LEFE\_CYBER) y a LIA-MORFUN (LIA 1035). Finalmente agradezco a ANID 2014-21140478 (ex-CONICYT) por el financiamiento de manutención y arancel otorgado como beca para doctorado nacional.

## *Curriculum Vitae*

María Lorena Aydelíz González Hurtado

Nacida el 10 de abril, 1983, en Santiago, Chile.

**2007** Licenciada en Biología Marina, Universidad de Concepción, Chile.

**2008** Bióloga Marina, Universidad de Concepción, Chile.

Tesis: “Interacción química entre la diatomea *Skeletonema japonicus* y la cianobacteria *Synechococcus* sp. Posible implicancia en la sucesión fitoplanctónica en Concepción”

**2014** Magíster en Ciencias con mención en Oceanografía, Universidad de Concepción, Chile.

Tesis: “Fijación de Nitrógeno en ecosistemas extremos desde la oligotrofia a la eutrofia: caso de estudio en el Archipiélago Kerguelen (Océano Austral) y surgencia costera (Chile Central)”

**2018** Candidata a Doctora en Oceanografía, Universidad de Concepción, Chile. Proyecto de

tesis: “Respuesta microbiana marina planctónica a materia orgánica disuelta de distinto origen”



### PUBLICACIONES

Vergara-Soto O., D. Calliari, P. Tiselius, R. Escribano, **M. L. González** and S. Soto-Mendoza (2010). *Functional response of Sagitta setosa (Chaetognatha) and Mnemiopsis leidyi (Ctenophora) under variable food concentration in the Gullmar fjord, Sweden*. Revista de Biología Marina y Oceanografía 45 (1): 35-42

Plominsky, A.M., Delherbe N., Ugalde J., E. Allen, M. Blanchet, P. Ikeda, F. Santibañez, K. Hanselmann, O. Ulloa, R. De la Iglesia, P. von Dassow, M. Astorga, M. J. Gálvez, **M. L. González**, C. Henríquez-Castillo, D. Vaultot, A. Lopes do Santos, G. van den Engh, C. Gimpel, F. Bertoglio, Y. Delgado, F. Docmac, C. Elizondo-Patrone, S. Narváez, F. Sorroche, M. Rojas-Herrera, N. Trefault (2014). *Metagenome Sequencing of the Microbial Community of a Solar Saltern Crystallizer Pond at Cáhul Lagoon, Chile*. Genome Announcements, 2(6), e01172–14. <http://doi.org/10.1128/genomeA.01172-14>

Fernández, C., **M. L. González**, C. Muñoz, V. Molina, and L. Farías (2015). *Temporal and spatial variability of biological nitrogen fixation off the upwelling system of central Chile (35–38.5°S)*, *J. Geophys. Res. Oceans*, 120, 3330–3349, [doi:10.1002/2014JC010410](https://doi.org/10.1002/2014JC010410)

**González M. L.**, S. Blain and I. Obernosterer (2019) *Seasonal freshening of NW Mediterranean surface water impacts microbial heterotrophic activity and dissolved organic matter*. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 106448. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2019.106448>

**González M. L.**, M. E. Fuentes, V. Molina and R. A. Quiñones (*submitted.*) *Effects of ethoxyquin on metabolism and composition of marine microbial communities*. *Aquaculture*.

**González M. L.**, M. E. Fuentes, S. Pantoja-Gutiérrez and R. A. Quiñones (*in prep.*) *Bioavailability of Dissolved Organic Matter derived from aquaculture and its effect on planktonic microbial metabolism*.



#### ÁREAS DE INVESTIGACIÓN

Principal: Oceanografía biológica

Secundaria: Biogeoquímica

Otras: Oceanografía química, Ecología microbiana.

#### EXPERIENCIA DOCENTE

**2022** Comité evaluador de proyecto de tesis y tesis de pregrado “Respuesta metabólica de comunidades microbianas marinas en la columna de agua expuestas a detergente usado en actividades vinculadas a la salmonicultura”. Carrera de Biología marina, Universidad de Concepción. Alumna: Constanza Fariña G., Profesor guía: Dr. Renato Quiñones.

**2022** Profesora de pregrado. Asignatura: “Ecosistemas Acuáticos”, carrera Administración en Ecoturismo. Universidad Andrés Bello, Concepción.

- 2021** Profesora de taller de ciencias “Un mar de cosas por descubrir”, para estudiantes de 7mo básico a 3ro medio, Dirección de Educación Municipal (DAEM) San Pedro de la Paz. Concepción.
- 2017-pres.** *Outreach* INCAR: “Semana de la ciencia”. Experiencias de laboratorio y teoría para estudiantes de enseñanza básica y media. Universidad de Concepción.
- 2016-17** Profesora en taller de transferencia Proyecto CORFO: “Implementación de paquetes tecnológicos para el cultivo de hortalizas y peces (Acuaponía)”. Centro Regional de Estudios Ambientales (CREA), Universidad Católica de la Santísima Concepción (UCSC).
- 2015** Ayudantía en asignatura “Oceanografía”, carrera Ingeniería en Biotecnología marina y acuicultura (Dr. Osvaldo Ulloa). Universidad de Concepción.
- 2012-14** Profesora del programa TALENTOS UdeC. Taller: "Un mar de cosas por aprender" para estudiantes de 1er y 2do año de enseñanza media. Universidad de Concepción
- 2012** Instructora. Simposio "*UV radiation and marine ecosystems: current research and strategies for the future*". *Austral XIII Summer Institute*, Universidad de Concepción.
- 2007** Ayudantía en asignatura “Oceanografía II (Química y Biológica)”, carrera Biología marina, Universidad de Concepción, Chile.
- 2007** Ayudantía en asignatura “Ecotoxicología”, carrera Biología marina, Universidad de Concepción, Chile.
- 2006** Ayudantía en asignatura “Genética y Sociedad”, carrera Biología marina, Universidad de Concepción, Chile.

#### EXPERIENCIA LABORAL

- 2020** Consultor independiente, “Informe métodos de limpieza de fondo marino contaminado por concentrado de cobre”, Centro Regional de Estudios Ambientales (CREA), Universidad Católica de la Santísima Concepción (UCSC).
- 2019-21** Consultor independiente Proyecto FIPA 2019-09 "Establecimiento de una guía metodológica y de protocolos de muestreo y/o registro *in situ* para organismos hidrobiológicos presentes en aguas marítimas costeras." Centro de Investigación en

Biodiversidad y Ambientes Sustentables (CIBAS), Universidad Católica de la Santísima Concepción (UCSC).

- 2012-13** Apoyo técnico. FONDECYT 1100358 “*Light inhibition of nitrification in the euphotic zone: testing a long lasting paradigm in an upwelling system*” PI: Dra. Camila Fernández, Universidad de Concepción. Trabajo en terreno Dichato, Concepción, Chile. Experimentos de fijación de N<sub>2</sub>, toma de muestras para espectrometría de masa, citometría de flujo, nutrientes y ARN.
- 2008-11** Asistente de Investigación, proyecto AGOURON OMZ (Oxygen Minimum Zone), Depto. de Oceanografía, Universidad de Concepción, <http://omz.udec.cl>. PI: Dr. Osvaldo Ulloa. Trabajo de laboratorio y terreno en cruceros oceanográficos, a cargo del muestreo para *sorting* en citómetro de flujo, gases (CH<sub>4</sub>, N<sub>2</sub>O), ADN, ARN y nutrientes.
- 2009-11** Asistente de Investigación, proyecto MI\_LOCO (Gordon and Betty Moore foundation), Depto. de Oceanografía, Universidad de Concepción ([http://mi\\_loco.coas.oregonstate.edu/](http://mi_loco.coas.oregonstate.edu/)). PI: Dr. Osvaldo Ulloa. Trabajo de laboratorio y terreno en cruceros, a cargo del análisis de citometría y la base de datos.
- 2008-11** Apoyo técnico FONDAP-COPAS, Depto. de Oceanografía, Universidad de Concepción (<http://copas.udec.cl>). Muestréos de pigmentos, citometría y ADN.

#### CRUCEROS OCEANOGRÁFICOS

- 2020** Crucero oceanográfico INCAR, Achao, Chiloé, Chile
- 2019** Cruceros oceanográficos EQ y EMOD, Achao y Canal Cauahué, Chiloé, Chile.
- 2010** Crucero Big-RAPA, Universidad de Concepción y C-MORE (Center for microbial oceanography: research and education).
- 2009-11** Crucero mensual MI\_LOCO (Gordon and Betty Moore foundation), Depto. De Oceanografía, Universidad de Concepción
- 2008-12** Crucero AGOURON OMZ (Oxygen Minimum Zone), Depto. de Oceanografía, Universidad de Concepción, (<http://omz.udec.cl>). Iquique y Concepción, Chile.
- 2008-11** Serie de tiempo COPAS, Universidad de Concepción, Chile.

## ESTADÍAS DE INVESTIGACIÓN O ENTRENAMIENTO

- 2019-21** Laboratorio Geoquímica Orgánica Marina (GOM), Dr. Silvio Pantoja. Universidad de Concepción, Chile. Análisis de aminoácidos por HPLC, Laboratorio de Geoquímica Orgánica marina.
- 2018-19** Laboratorio de Metabolismo y Ecoalometría. Dr. Renato Quiñones. Universidad de Concepción. Chile. Técnicas para la determinación de la concentración de Clorofila, ATP, actividad enzimática intra y extracelular de la comunidad microbiana marina. Preparación de embarques, toma de muestras de la columna de agua y montaje de experimentos de microcosmos.
- 2018-19** Laboratorio Internacional Asociado (LIA-MORFUN). Dra. Camila Fernández. Universidad de Concepción. Chile. Técnicas para la determinación de la concentración de Amonio, Nitrógeno y Fosforo Orgánico Disuelto.
- 2015-16** Laboratorio de Oceanografía Microbiana (LOMIC). Dr. Ingrid Obernosterer. Observatoire Oceanologique de Banyuls s/Mer, Sorbonne Univesités, Francia. Determinación de la concentración de oxígeno disuelto por método Winkler y Optodes en agua de mar, y análisis de datos de aminoácidos disueltos.
- 2013-14** Laboratorio de Biología Marina. Dra. Verónica Molina, Universidad Andrés Bello, Santiago y Universidad de Playa Ancha, Valparaíso, Chile. Técnicas Moleculares para la investigación de la expresión del gen *nifH* en muestras marinas
- 2008** Capacitación para usuarios Cell sorter Influx Mariner, Becton Dickinson (ex Cytopenia), Seattle, USA.
- 2006-07** Centro de investigación marina Kristineberg, Universidad de Gotemburgo, Suecia. Dr. Peter Tiselius y Dr. Danilo Calliari, Proyecto de investigación I. Depto. de Ciencias marinas, Universidad de Gotemburgo, Suecia. Dr. Anders Omstedt y Dr. Leif Djurfelt. Proyecto de investigación II. Alumna de intercambio pregrado.
- 2006** Práctica de pregrado. Laboratorio de Oceanografía Pelágica, Estación de Biología Marina, Dichato, Universidad de Concepción, Chile. Supervisora: Dra. Carmen Morales. Muestras de clorofila, conteos en microscopio de epifluorescencia.

## PARTICIPACIÓN EN CONGRESOS Y CURSOS

- 2022** XLI Congreso de Cs. del Mar, Concepción, Chile.  
“*Respuesta microbiana a la Etoxiquina, un aditivo alimentario usado en la salmonicultura*” **González M. L.**, M. E. Fuentes, V. Molina y R.A. Quiñones. (p. oral).  
“*Biodisponibilidad de la materia orgánica disuelta derivada de la salmonicultura*” y su efecto en el metabolismo microbiano de la columna de agua” **González M. L.**, M. E. Fuentes, S. Pantoja-Gutiérrez y R.A. Quiñones. (p. oral).
- 2020** Plenaria INCAR, participante en el *Stand up científico* con la charla: “*La etoxiquina: héroe o villano*” **Gonzalez M. L.** (p. oral).
- 2019** XVIII COLACMAR (Congreso Latinoamericano de Cs. del Mar), Mar del Plata, Argentina. “*Impacto de un aditivo de uso común en la salmonicultura en la actividad enzimática microbiana: el caso de la etoxiquina*”. **González M. L.**, M. Fuentes y R. Quiñones (p. oral)
- 2017** XVII COLACMAR (Congreso Latinoamericano de Cs. del Mar), Camboriu, Brasil. “*Dissolved Organic Matter composition and Microbial Heterotrophic Activity in Mesoscale Structures of Lower Salinity in the NW Mediterranean Sea*”. **González M. L.**, S. Blain and I. Obernosterer (presentación oral).
- 2016** Taller teórico-practico “Generalidades de la acuaponía”. Relatores: Dr. Germán Merino, Dra. Elizabeth Von Brand, Universidad Católica del Norte. Granja agro-acuícola Diaguitas. Diaguitas, Chile.
- 2015** XVI COLACMAR (Congreso Latinoamericano de Cs. del Mar), Santa Marta, Colombia. “*Nitrogen fixation in extreme ecosystems from oligotrophy to eutrophy: case of study on Kerguelen Archipelago (Southern Ocean) and coastal upwelling (central Chile)*”. **González M. L.**, V. Molina y C. Fernández. (p. oral).
- 2014** Curso ATISA (*Advanced Topics in Sustainable Aquaculture*), INCAR Universidad de Concepción, Chile.
- 2014** Curso “*Multi-disciplinary satellite oceanography: platforms, data and applications*” Dr. Andrew Thomas, School of Marine Sciences University of Maine, USA. *Austral Summer Institute XIV*, Universidad de Concepción.

- 2013** ASLO 2013 (*Aquatic Science Meeting*), New Orleans, Louisiana, USA. “*Molecular nitrogen fixation in the southern ocean: case of study of the Fe-fertilized Kerguelen region (KEOPSII cruise)*” **M. L. González**, L. Oriol, F. Dehairs, A. J. Cavagna, C. Fernandez. (p.poster)
- 2013** Curso “*Chemical and biological characteristics of the oceanic phosphorus cycle*” Dr. Ian Salter, Observatoire Océanologique de Banyuls sur Mer, France. *Austral Summer Institute XIII*, Universidad de Concepción.
- 2013** Curso “*Trace metals in the oceanic carbon cycle*” Dr. Maria Nielsdottir University of Southampton, National Oceanography Centre, Southampton, UK. *Austral Summer Institute XIII*, Universidad de Concepción.
- 2012** Curso “*Ecology and Diversity of marine Microorganisms*” (ECODIM VII) Dr. Kurt Hanselmann. *Austral Summer Institute XII*, Universidad de Concepción.
- 2012** XXXII Congreso de Cs. del Mar, Punta Arenas, Chile. “*Fijación de nitrógeno molecular en zonas HNLC: Caso de estudio Archipiélago Islas Kerguelen, Océano Indico Austral*”. **M. L. González**, C. Fernández & L. Flores-Leiva. (p. poster).
- 2011** XXXI Congreso de Cs. de Mar, Viña del Mar, Chile. “*Determinación de la abundancia de picoplancton a lo largo del Pacífico Sur Oriental entre Iquique (20°32’S-70°11’W) e Isla de Pascua (27°07’S-109°21’W)*” Léniz B., C. Venegas, G. Alarcón, **M. L. González** & O. Ulloa. (p. poster).
- 2008** XXVIII Congreso de Cs. de Mar, Viña del Mar, Chile. “*Interacción química entre la diatomea *Skeletonema japonicus* y la cianobacteria *Synechococcus* sp. Posible implicancia en la sucesión fitoplanctónica frente a Concepción*”. **González, M. L.**, O. Ulloa, P. Lavin & G. Alarcón (p. oral).
- 2008** XXVIII Congreso de Cs. de Mar, Viña del Mar, Chile. “*Respuesta funcional de *Sagitta setosa* y *Mnemiopsis leidy* en función al régimen alimentario en el fiordo Gullmar, Suecia*”. Vergara, O., D. Calliari, P. Tiselius, **M. L. González**, R. Escribano & S. Soto (p. oral).
- 2007** XXVII Congreso de Cs. del Mar, Iquique. Chile. “*Efecto del aldehído 2-trans, 4-trans-decadienal en el crecimiento de *Synechococcus* y *Skeletonema costatum*: Posible efecto*

*en la sucesión del fitoplancton” González M. L., D. Calliari, O. Vergara y O. Ulloa (p. oral)*

## BECAS

**2022** Beca FONDAP-INCAR, apoyo para finalización de estudios postgrado.

**2020** Beca FONDAP-INCAR, apoyo para estudios doctorales.

**2015-16** Beca LIA-MORFUN (UdeC-OOB), para estadía doctoral en Laboratorio de Oceanografía Microbiana (LOMIC). Observatoire Oceanologique de Banyuls s/Mer, Sorbonne Univesités, Francia.

**2014-19** Beca doctorado nacional. Agencia Nacional de Investigación y Desarrollo (ANID, ex-CONICYT), Ministerio de Educación, Chile.

**2013-14** Beca COPAS SA programa PFB-3, apoyo para finalización de estudios de magister nacional.

**2011-13** Beca magister nacional. Comisión Nacional de Ciencia y Tecnología (CONICYT), Ministerio de Educación, Chile.

**2006-07** Beca Linnaeus-Palme para intercambio de estudiantes de pregrado, Universidad de Gotemburgo, Suecia.



## Índice de Contenidos

Agradecimientos.....	iv
<i>Curriculum vitae</i> .....	v
Índice de contenidos.....	xiii
Índice de figuras.....	xv
Resumen .....	xvi
<i>Abstract</i> .....	xviii
1.- INTRODUCCIÓN .....	1
1.1. Objetivo general .....	11
2.- HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	12
2.1. Objetivo específico 1.....	12
2.1.1. Hipótesis 1.....	12
2.2. Objetivo específico 2.....	12
2.2.1. Hipótesis 1.....	12
2.2.2. Hipótesis 2.....	12
2.2.3. Hipótesis 3.....	12
2.3. Objetivo específico 3.....	13
2.3.1. Hipótesis 1.....	13
2.3.2. Hipótesis 2.....	13
2.3.3. Hipótesis 3.....	13
3.- MATERIAL Y MÉTODOS .....	14
3.1. Metodología capítulo 1: “Renovación estacional de aguas superficiales del Mediterráneo noroeste impacta la actividad heterótrofa microbiana y la materia orgánica disuelta” .....	14
3.1.1. Estrategia de muestreo .....	15
3.1.2. Procesos microbianos.....	15
3.1.3. Características de la materia orgánica disuelta.....	16
3.1.4. Análisis estadísticos.....	16
3.2. Metodología capítulo 2: “Biodisponibilidad de materia orgánica disuelta derivada de la acuicultura y su efecto en el metabolismo de comunidades microbianas planctónicas” .....	17
3.2.1. Estrategia de muestreo.....	17
3.2.2. Diseño experimental.....	18
3.2.3. Concentración de nutrientes y DOM.....	19
3.2.4. Cuantificación de aminoácidos disueltos.....	20
3.2.5. Clorofila-a y abundancia picoplanctónica.....	20
3.2.6. ATP y actividad enzimática intracelular.....	20
3.2.7. Tasas de respiración y actividad enzimática extracelular.....	21
3.2.8. Análisis estadístico.....	21
3.3. Metodología capítulo 3: “Efectos de la etoxiquina sobre el metabolismo y la composición de comunidades microbianas marinas” .....	22
3.3.1 Estrategia de muestreo.....	23
	xiii

3.3.2. Diseño experimental.....	23
3.3.3. Perfiles metabólicos (Biolog-EcoPlates) .....	25
3.3.4. Análisis molecular.....	25
3.3.5. Análisis estadístico.....	26
4.- RESULTADOS.....	27
4.1. Capítulo 1. Renovación estacional de aguas superficiales del Mediterráneo NO impacta la actividad heterótrofa microbiana y la materia orgánica disuelta.....	27
4.2. Capítulo 2. Biodisponibilidad de materia orgánica disuelta derivada de la acuicultura y su efecto en el metabolismo de comunidades microbianas planctónicas .....	34
4.3. Capítulo 3. Efectos de la etoxiquina sobre el metabolismo y la composición de comunidades microbianas marinas.....	91
5.- DISCUSIÓN.....	152
6.- CONCLUSIONES.....	172
7.- REFERENCIAS.....	174
8.- Anexos.....	178
8.1. Anexo 1: Información suplementaria manuscrito “Seasonal freshening of NW Mediterranean surface water impacts heterotrophic microbial activity and dissolved organic matter”.....	178
8.2. Anexo 2: Información suplementaria manuscrito en preparación “Biodisponibilidad de la materia orgánica disuelta derivada de la salmonicultura y su efecto en el metabolismo microbiano de la columna de agua”.....	180
8.3. Anexo 3: Información suplementaria manuscrito en preparación “Effects of ethoxyquin on metabolism and composition of marine microbial communities”.....	185
8.4 Anexo 4: Características fisicoquímicas e información ecotoxicológica de Etoxiquina .....	209

## Índice de Figuras

Figura 1.1 Modelo del “ <i>loop</i> microbiano” suplementado con vías de transformación de materia orgánica desde productores primarios a bacterias, arqueas y hongos a través de la actividad enzimática extracelular (AEE). Modificado de Hoppe 1991.....	4
Figura 1.2 (a) Perfiles de las fracciones de DOC en la columna de agua oceánica definida por la reactividad observada en agua oligotróficas en el Mar de Los Sargazos NO. (b) Inventarios y tasas de remoción estimadas de cada fracción de DOC. TS es escala de tiempo. Fuente: Hansell and Carlson (2015). (c) Flujos globales ( $GT\ C\ y^{-1}$ ) de producción primaria (PP) y las rutas hacia las vías de MO-bacteria. DOC y POC: carbono orgánico disuelto y particulado respectivamente. FW (otros miembros de la trama trófica). L, SL y RDOC: carbono orgánico disuelto lábil, semi lábil y refractario (modificado de Nagata (2008)).....	5
Figura 3.1 Área de estudio: Mapa del Golfo de Leones en el Mar Mediterráneo Noroeste, con la ubicación de la estación MOLA. Las flechas negras indican las principales corrientes (ex. Laghdass et al. 2010). (b) Sección vertical temporal de la salinidad, donde se observa la presencia de agua de baja salinidad (LSW), entre febrero 2007 y octubre 2008 (ex. González et al. 2019) .....	15
Figura 3.2 Sitio de muestreo, Canal Caucahué, Chiloé, Región de Los Lagos, Chile. Transecta salmones (TS) en el brazo norte del canal y Transecta mitílidos (TM) en el brazo sur del canal.....	18
Figura 3.3 Diseño de experimento de microcosmos EMOD, realizados con agua de mar y la adición de DOM derivada de la acuicultura. P-DOM: derivada del alimento de peces, F-DOM: derivada de fecas de <i>Salmo salar</i> , N-DOM: materia orgánica disuelta natural. M-DOM: una mezcla de las anteriores. tesis.....	19
Figura 3.4 Sitios de muestreo experimento con adición de etoxiquina (EQ). (a) Bahía de Coliumo, región del Biobío, Chile-central. (b) Achao, ubicado en el mar interior de la isla de Chiloé, Región de Los Lagos, Chile. ....	24
Figura 3.5 Diseño de experimentos de microcosmos EQ, realizados con agua de mar y la adición de etoxiquina. Extensión de experimento de 72h en Achao y 48h en Coliumo. ....	24

## RESUMEN

En el ecosistema marino, la producción y degradación de materia orgánica son procesos claves en el ciclo del carbono global, donde los microorganismos cumplen un rol de particular importancia, conectando la materia orgánica disuelta (DOM) con niveles tróficos superiores. La degradación de DOM es realizada por una comunidad microbiana diversa, la que a su vez es mantenida por las características de la DOM. Esta Tesis doctoral busca estimar el impacto de la DOM de fuentes alóctonas, como aquella proveniente de ríos y de actividades humanas como la acuicultura, así como de la adición de compuestos químicos asociados que llegan al océano, sobre el metabolismo y diversidad de comunidades microbianas planctónicas. Para esto, se desarrollaron tres capítulos abarcando cada objetivo específico de la Tesis, a través de la evaluación de las características de la DOM (análisis de aminoácidos, índice de degradación), estimación de la actividad microbiana (producción, respiración, actividad enzimática, utilización de sustratos) y de la composición de la comunidad activa (secuenciación), con datos obtenidos *in situ* y en experimentos de microcosmos enriquecidos. El primer capítulo consistió en determinar si el agua de baja salinidad (LSW) derivada del Río Rhone transporta DOM lábil costa afuera en el Mar Mediterráneo noroeste, y como esta DOM afecta procesos microbianos heterotróficos. Observamos una mayor producción bacteriana y respiración comunitaria, así como características específicas de la DOM asociadas a estas LSW durante la primavera, junto a una baja producción neta comunitaria en un periodo de dos años de serie de tiempo. Sugiriendo que LSW representan un mecanismo de suministro de DOM lábil sustentando el metabolismo heterotrófico microbiano. El segundo capítulo se enfocó en identificar patrones ambientales y respuestas metabólicas microbianas al *input* de DOM derivada de la acuicultura (salmones y mitílidos) en el Canal Caucahué. Observamos que mayores concentraciones de compuestos inorgánicos, orgánicos y un mayor Índice de Degradación (DI) caracterizaron las cercanías de las balsas jaulas y en menor medida de las cuelgas de mitílidos. En los experimentos enriquecidos, las tasas específicas de respiración, de actividad de malato deshidrogenasa (MDH) y actividad enzimática extracelular (EEA) incrementaron significativamente especialmente en los tratamientos con DOM derivada de fecas de salmónidos, concordando con el DI observado. Estos resultados demostraron que la DOM

derivada de la acuicultura es altamente lábil e incrementa la actividad metabólica microbiana de las comunidades planctónicas marinas. Estos resultados nos permiten sugerir incluir en los modelos conceptuales a la DOM derivada de ríos y de la acuicultura, como fuente lábil de rápida utilización por parte de los microorganismos en la construcción de biomasa y/o obtención de energía. Por su parte, la salmonicultura tiene el potencial de generar impactos ambientales por la liberación de productos químicos a la columna de agua. La etoxiquina (EQ) es un antioxidante utilizado en alimentos para peces, que ha sido prohibido por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria. El tercer capítulo de esta tesis evaluó las respuestas de las comunidades microbianas marinas a las adiciones de EQ (10, 100 y 1000  $\mu\text{g L}^{-1}$ ), a través de experimentos de microcosmos en Achao (sitio influenciado por el cultivo de salmón) y Bahía Coliumo (sin salmonicultura) revelando respuestas asociadas a los sitios de estudio y las fracciones de tamaño. Para la fracción  $<1 \mu\text{m}$ , la adición de EQ incrementó el consumo de oxígeno y la degradación de compuestos proteínicos, mientras que la comunidad total disminuyó la respiración y la capacidad de degradar carbohidratos y lípidos. La utilización de sustratos de carbono fue variable, disminuyendo en los tratamientos de mayor concentración, produciendo preferencia por aminoácidos y ácidos carboxílicos en Achao, sugiriendo que altas concentraciones de EQ pueden limitar la capacidad de procesar diferentes fuentes de carbono. En el área Bahía Coliumo la utilización de sustratos fue estimulada por la adición de EQ, principalmente carbohidratos y ácidos carboxílicos. EQ también generó cambios en la composición de la comunidad microbiana activa, donde Alphaproteobacteria presentó menor actividad, mientras Gammaproteobacteria, Bacteroidia y arquea MGII mostraron una mayor actividad asociada con las adiciones de EQ. Los resultados de esta Tesis sugieren una posible excepción respecto a la visión generalizada de la producción primaria como principal fuente de DOM lábil que sustenta la actividad heterotrófica microbiana en la columna de agua, para áreas oligotróficas influenciadas por ríos (Capítulo 1 de esta tesis) y para sistemas afectados a la acuicultura (Capítulo 2 de esta tesis). Esta tesis demuestra por primera vez que EQ puede influir en la capacidad de degradación de materia orgánica de comunidades microbianas planctónicas, produciendo cambios en la actividad de algunos grupos funcionales en el ecosistema marino (Capítulo 3 de esta tesis).

## ABSTRACT

In the marine ecosystem, organic matter production and degradation are key processes in the global carbon cycle, where microorganisms play an important role linking dissolved organic matter (DOM) with higher trophic levels. DOM degradation is carried out by a diverse microbial community, which in turn is maintained by the characteristics of DOM. This doctoral thesis seeks to estimate the impact of dissolved organic matter from allochthonous sources, derived from rivers and human activities such as aquaculture, as well as the addition of associated chemical compounds that reach to the ocean, on metabolism and diversity of the microbial community. To address this issue, three chapters covering each specific objective of the thesis were developed, through the evaluation of DOM (amino acids analysis, degradation index), microbial activity estimation (production, respiration, enzymatic activity, substrates utilization) and active community composition (sequencing), with data obtained *in situ* and enriched microcosm experiments. The first chapter consisted in determining if low salinity waters (LSW) derived from the Rhone River plume transports labile dissolved organic matter offshore in the NW Mediterranean Sea, and how this DOM affects heterotrophic microbial processes. We observed increased bacterial production and community respiration, as well as DOM-specific features associated with these LSW during spring, along with low net community production, over a two-year time series. Suggesting that LSW represent a labile DOM supply mechanism supporting microbial heterotrophic metabolism. The second chapter focused on identifying environmental patterns and microbial metabolic responses to the input of dissolved organic matter derived from aquaculture (salmon and mussel farms) in the Caucahué Channel. We observed that higher concentrations of inorganic and organic compounds and a higher degradation index characterized the vicinity of the salmon farms and, to a lesser extent, the mussel farms. In the enriched experiments, the specific rates of respiration, malate dehydrogenase (MDH) and extracellular enzymatic activity (EEA) increased significantly, especially in the treatments with DOM derived from salmonid feces, in agreement with the observed DI. These results demonstrate that aquaculture-derived DOM is highly labile and increases the microbial metabolic activity of marine planktonic communities. These

observations allow us to suggest the inclusion in conceptual models, the DOM derived from rivers and aquaculture as a labile source of rapid utilization by microorganisms for biomass production and/or to obtain energy. Salmon farming has the potential to generate environmental impacts due to the release of chemical products into the water column. Ethoxyquin (EQ) is an antioxidant used in fish feed, which has been banned by the European Food Safety Authority. The third chapter of this thesis evaluated the responses of marine microbial communities to EQ additions (10, 100 and 1000  $\mu\text{g L}^{-1}$ ), through microcosm experiments in Achao (a site influenced by salmon farming) and Bahía Coliumo (no salmon farming) revealing responses associated with the study sites and size fractions. For  $<1 \mu\text{m}$  size fraction, the addition of EQ increased oxygen consumption and degradation of protein compounds, while the total community decreased respiration rates and the ability to degrade carbohydrates and lipids. The use of carbon substrates was variable, decreasing in the higher concentration treatments, producing a preference for amino acids and carboxylic acids in Achao, suggesting that high concentrations of EQ may limit the ability to process different carbon sources. In the area without salmon farming (Coliumo Bay) the use of substrates was stimulated by the addition of EQ, mainly carbohydrates and carboxylic acids. EQ also generated changes in the active microbial community composition, where Alphaproteobacteria showed lower activity, while Gammaproteobacteria, Bacteroidia and Archaea MGII showed higher activity associated with EQ additions. The results of this thesis suggest a possible exception regarding the general view of primary production as the main source of labile DOM that sustains microbial heterotrophic activity in the water column, for oligotrophic areas influenced by rivers (chapter 1 of this thesis) and for systems affected by aquaculture (chapter 2 of this thesis). This thesis demonstrates for the first time that EQ can influence the organic matter degradation capacity of the microbial community, producing changes in the activity of some functional groups in the marine ecosystem (chapter 3 of this thesis).

## 1.- INTRODUCCION

La producción y degradación de la materia orgánica son procesos fundamentales del ciclo del carbono (C) global, donde los microorganismos actúan como importantes componentes modulando los flujos entre los grandes reservorios de C (Kirchman 2012). La respiración es un proceso fisiológico, en el cual sustratos orgánicos reducidos son oxidados para la obtención de energía (Robinson 2008), está presente en todos los organismos y ocurre en todos los ambientes acuáticos (Williams 1984, Del Giorgio y Williams 2005). Este proceso puede ser tanto aeróbico (i.e. utiliza oxígeno molecular como último aceptor de electrones) como anaeróbico (i.e. que incluye aceptores de electrones como nitrato, manganeso, hierro y sulfato) (Robinson 2008), influyendo en los flujos de energía de los ecosistemas (Codispoti 2005). En ambientes acuáticos óxicos, la degradación completa de la materia orgánica se atribuye a la respiración aeróbica, donde la mayor parte del C utilizado por los microorganismos (principalmente bacterioplancton) es para el proceso de respiración, consumiendo O<sub>2</sub>, liberando CO<sub>2</sub> y mineralizando otros elementos asociados al nitrógeno (N) y fósforo (P) orgánico, así como amonio (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) y fosfato (PO<sub>4</sub><sup>-3</sup>) entre otros (Kirchman 2012).

Las bacterias heterótrofas son los organismos más abundantes en el océano, llegando a alrededor de 10<sup>4</sup>-10<sup>7</sup> cél mL<sup>-1</sup> en la columna de agua (Hobbie *et al.* 1977, Azam *et al.* 1983, Whitman *et al.* 1998, Kirchman 2008). Además, su relación superficie/volumen les provee una ventaja competitiva para la asimilación de sustratos a bajas concentraciones (Pomeroy y Darwin 2007, Kirchman 2008). Las bacterias son responsables de una gran fracción de la respiración aeróbica (Del Giorgio y Cole 2000, Robinson 2008), representando cerca del 40 al 70% de la respiración comunitaria (Kirchman 2012) en la capa superficial del océano, con las mayores contribuciones en aguas oligotróficas (Biddanda *et al.* 2001). El rol de los microorganismos en la degradación de la materia orgánica es de particular importancia, ya que son el enlace entre la materia orgánica disuelta (DOM) y su utilización por niveles tróficos superiores (Azam 1998). Por lo tanto, la respiración es un proceso clave en el ciclo del C y de nutrientes, así como para la comprensión de los cambios en el clima global (Kirchman 2008). Sin embargo, los estudios y mediciones *in situ* de esta variable en el océano global aún son limitados.

Existe un cierto consenso que la respiración, a nivel general, varía espacialmente siguiendo

la producción primaria, pero existen desbalances en algunos ecosistemas (Eissler y Quiñones 1999, Robinson 2008, Kirchman 2012). Algunos estudios en áreas costeras muestran que la respiración bacteriana no se relaciona significativamente con la clorofila-*a*, por lo tanto otras fuentes de materia orgánica (ej. influencia de ríos, actividad antrópica) pueden ser importantes en estas zonas (Kirchman 2008, Kirchman 2012). Se ha demostrado con claridad que las bacterias heterótrofas son grandes contribuyentes a la respiración total en los sistemas acuáticos (Williams y del Giorgio 2005, Kirchman 2008) y que existen factores que modulan este proceso en la columna de agua, como por ejemplo: la cantidad y calidad de la materia orgánica, temperatura, disponibilidad de nutrientes, fitoplancton (como fuente de materia orgánica) y la estructura de la comunidad microbiana, entre otros (Martin *et al.* 2005, Longhurst 2010). Sin embargo, aún existen interrogantes acerca de la importancia de estos factores, así como la interacción entre ellos, las cuales son claves para comprender la variabilidad temporal, espacial y los mecanismos de control.

Existen distintas aproximaciones para medir la respiración en ecosistemas acuáticos, siendo el método más común aquel basado en cambios en la concentración de O<sub>2</sub> a través de incubaciones *in vitro* en luz y oscuridad (Robinson 2008), usando el método de Winkler (Winkler y Whaley 1888). Las incubaciones *in vitro* nos permiten estimar el metabolismo de los ecosistemas acuáticos, que está definido por la razón entre la fotosíntesis (como producción de O<sub>2</sub> o consumo de CO<sub>2</sub>) y la respiración (como consumo de O<sub>2</sub> o producción de CO<sub>2</sub>) (Staeher *et al.* 2012).

Además de la medición directa de respiración a través de cambios en la concentración de O<sub>2</sub> a través de distintas aproximaciones (Winkler, Optodes, entre otros) se han usado aproximaciones basadas en actividad enzimática (González y Quiñones 2009), así como en la actividad del sistema de transporte de electrones (Packard 1971; Owens y King 1975). En este contexto, se ha utilizado la isoenzima Malato deshidrogenasa (MDH), la cual es un componente del ciclo del ácido cítrico (segunda etapa de la respiración) que cataliza la reacción de oxidación del (s)-malato a oxaloacetato utilizando NAD<sup>+</sup> como aceptor de electrones. La isoenzima citoplásmica (s-MDH) puede ser importante en el mantenimiento de un equilibrio redox citoplasmático durante el uso intenso del metabolismo anaeróbico (González y Quiñones 2009).

La actividad de dehidrogenasas se utiliza en ecología terrestre como índice de fertilización en suelos (Skujinš 1973, Parinkina *et al.* 1994, Alef 1995), donde se ha determinado que un incremento en la actividad de MDH implica un aumento en la remineralización de la materia orgánica, reflejando la reacción metabólica oxidativa global de la comunidad microbiana (Martínez *et al.* 2002), por lo que la actividad de MDH se ha propuesto como un indicador de la actividad microbiana en comunidades micropláctónicas en la columna de agua del Sistema de Corrientes de Humboldt (Quiñones *et al.*, 2006; González y Quiñones, 2009).

Por otra parte, en el agua de mar la actividad enzimática hidrolítica extracelular (AEE) está directamente relacionada con la degradación de materia orgánica y se encuentra ampliamente representada en la fracción de tamaño dominada por el bacterioplancton (0.2-3µm) (Fig. 1.1; Hoppe 1983; Hoppe *et al.*, 2002). Sin embargo, en la última década el rol de los hongos marinos ha tomado importancia en la AEE, equiparándose al bacterioplancton, sugiriéndolos como un componente microbiano importante en zonas de surgencia costera (Gutiérrez *et al.*, 2011). Esto se debe a que la actividad hidrolítica de enzimas extracelulares descompone macromoléculas de alto peso molecular (HMW DOM >600 Da) a monómeros de bajo peso molecular (LMW DOM <600 Da), los que pueden ser directamente incorporados a través de la membrana celular por los microorganismos, para su posterior procesamiento, ya sea para biomasa, excreción y/o respiración (Fig. 1.1) (Amon y Benner 1994; Hoppe *et al.*, 2002; Arnosti 2011). La hidrólisis es frecuentemente llamada como la “reacción lenta” en la vía de degradación de la materia orgánica, lo cual se sustenta en que la cantidad de polímeros es mayor respecto a los monómeros en ambiente natural (Kirchman 2012). La actividad de enzimas extracelulares ha sido determinada a través del uso de sustratos análogos fluorescentes (Hoppe *et al.*, 2002), como por ejemplo el methylumbelliferyl (MUF)-b-1-4-glucopyranoside (para la b-glucosidasa) y el 4-methylcoumainylamide (MCA)-leucine (aminopeptidasa), entre otros análogos para diferentes tipos de enzimas (Kirchman 2012). Además, la variabilidad en la actividad enzimática extracelular contribuye a dilucidar la preferencia nutricional de los microorganismos, así como la composición de sustratos poliméricos en los sistemas marinos (Kirchman 2012).

La materia orgánica (OM) es una compleja matriz de diversos compuestos orgánicos, que a su vez tienen diferente composición química, estructura y reactividad (Hansen y Carlson 2002;

Nagata 2008). La MO es generada principalmente en la zona fótica (Arístegui *et al.* 2005; Hansell *et al.*, 2009) por los productores primarios, y solo una pequeña fracción de esta materia orgánica escapa de la remineralización (Ducklow *et al.*, 1995).

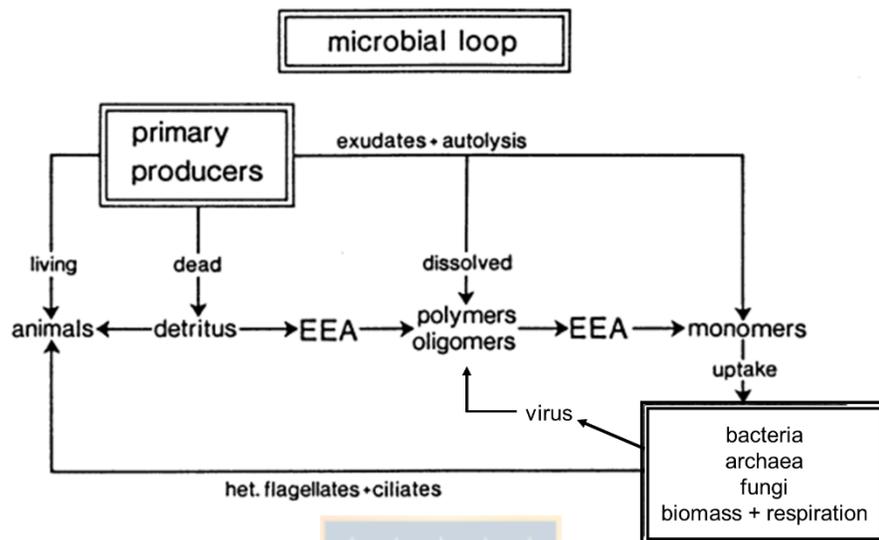


Fig. 1.1 Modelo del “loop microbiano” suplementado con vías de transformación de materia orgánica desde productores primarios a bacterias, arqueas y hongos a través de la actividad enzimática extracelular (AEE). Modificado de Hoppe 1991.

En general, en el ambiente marino la MO no solo es una fuente de C y nutrientes para los microorganismos, sino también provee una superficie de adhesión (Nagata 2008) y por consiguiente la creación de micronichos (Azam 1998). Por lo tanto, las características de la MO (complejidad en composición y estructura) junto con los distintos regímenes de suministro en cada ambiente, son probablemente uno de los mayores factores que ayudan a mantener una alta diversidad en la comunidad procarionte en el océano (Nagata 2008). La MO se puede separar operacionalmente en dos fases: (i) Materia Orgánica Particulada (POM) que corresponde al material sobre los 0,7  $\mu\text{m}$  (plancton y detritus) y (ii) Materia Orgánica Disuelta (DOM, <0,2  $\mu\text{m}$  (Moran *et al.*, 1999, Libes 2009); <0,7  $\mu\text{m}$  (Nagata 2008)), la cual es la forma de C dominante en los océanos (~ 700 Gt DOC, cantidad de C similar en la atmosfera como  $\text{CO}_2$  ~ 750Gt (Eppley *et al.*, 1987, Fasham *et al.*, 2001)). Además la DOM se divide en tres compartimentos principales basados en su degradabilidad y tiempo de recambio: lábil (L-DOM), semilábil (SL-DOM) y

refractaria o recalcitrante (R-DOM) (Nagata 2008, Hansell y Carlson 2015; Fig. 1.2 b y c). La L-DOM es consumida rápidamente en aguas superficiales con tasas de recambio de horas a días, constituyendo una pequeña porción de la DOM (menos del 1% del *pool* de DOC) (Nagata 2008). No obstante, el consumo de L-DOM por bacterias puede ser uno de los mayores flujos de energía, C y nutrientes en el ecosistema pelágico (Nagata 2008) (Fig.2). El consumo de C realizado por bacterias proveniente de la DOM puede alcanzar el 50% de la producción primaria en la zona fótica (Ducklow 2000; Fig.1.2 c). La DOM derivada de la PP puede producirse de diversas formas, como: mediante la excreción del fitoplancton, la digestión de protozoos y metazoos, a través de la excreción y la alimentación desprolija (“sloppy feeding”) del zooplancton, transformaciones de la POM por exoenzimas, así como por la lisis celular (Nagata 2000). En consecuencia, la DOM derivada de la PP es considerada un factor importante en la regulación de la abundancia, actividad y diversidad bacterioplanctónica (Cole *et al.*, 1988; Azam y Malfatti, 2007; Buchan *et al.*, 2014).

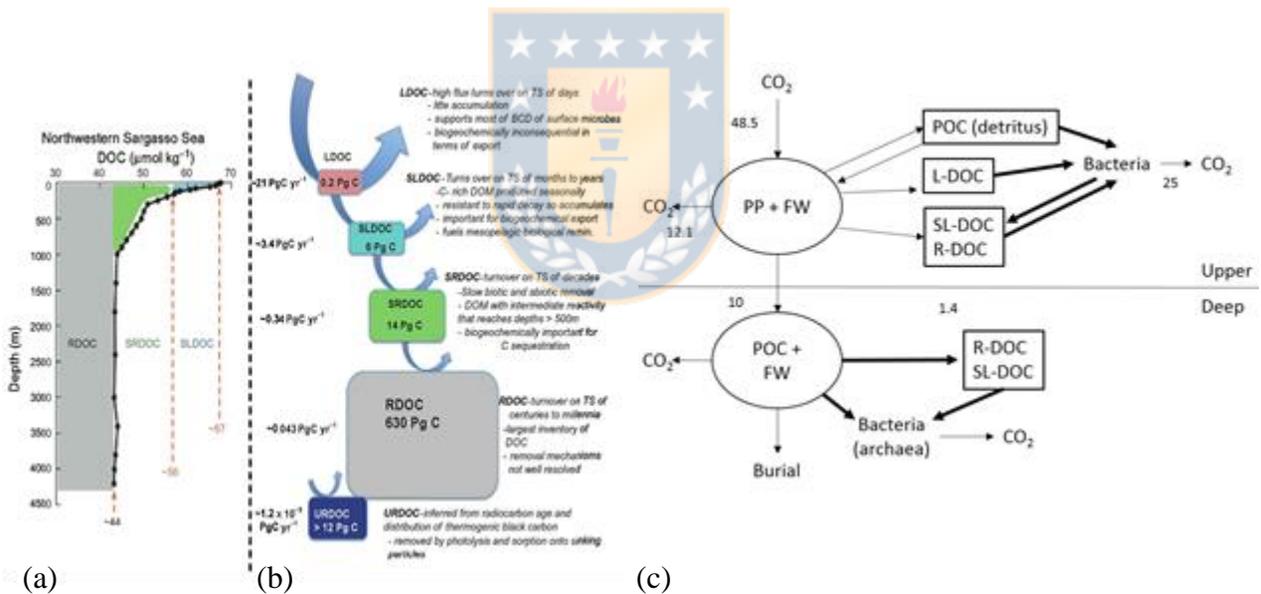


Fig. 1.2 (a) Perfiles de las fracciones de DOC en la columna de agua oceánica definida por la reactividad observada en agua oligotrófica en el Mar de Los Sargazos NO. (b) Inventarios y tasas de remoción estimadas de cada fracción de DOC. TS es escala de tiempo. Fuente: Hansell y Carlson (2015). (c) Flujos globales ( $\text{GT C yr}^{-1}$ ) de producción primaria (PP) y las rutas hacia las vías de MO-bacteria. DOC y POC: carbono orgánico disuelto y particulado respectivamente. FW (otros miembros de la trama trófica). L, SL y RDOC: carbono orgánico disuelto lábil, semi lábil y refractario (modificado de Nagata (2008)).

La caracterización química de la DOM ha tenido avances significativos con la técnica reciente FT-ICR-MS (Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry), pero esta técnica captura principalmente la SL y R-DOM. En consecuencia, aún existen dudas respecto a aquellos compuestos de rápida utilización y con tiempos de recambio menores. Las moléculas más lábiles son muy difíciles de detectar debido a su rápida utilización por parte de los microorganismos. Los amino ácidos (AA) son moléculas de interés, ya que son formas de N altamente lábiles (Sipler y Bronk 2015). Los AA son selectivamente utilizados por microorganismos heterótrofos al compararlo con el “bulk” de la MO, resultando en que la proporción de AA respecto al contenido de C y N decrece en el tiempo y son muy buenos indicadores del estado de alteración de la MO (Cowie y Hedges 1994, Davis *et al.*, 2009). La concentración de Aminoácidos Disueltos Libres (DFAA) varía con las estaciones del año, profundidad, y lugar de estudio (Mopper y Lindroth 1982, Fuhrman 1987) y su fuente puede incluir a productores primarios, lisis celular (Middelboe y Jørgensen 2006), liberación desde micro y macrozooplancton (Steinberg y Saba 2008), productos de excreción de medusas y ctenóforos (Pitt *et al.*, 2009), entre otros. Los DFAA representan una fracción pequeña pero altamente lábil del pool de DOM, la cual puede sostener una gran fracción de la producción bacteriana en el océano (Nagata 2008). Por su parte, los Aminoácidos Totales Hidrolizables (THAA) del *pool* disuelto, representan a los AA libres (DFAA) y aquellos que forman polímeros como péptidos, proteínas y glicoproteínas hidrolizables, siendo alrededor de un orden de magnitud mayor que los DFAA, pero mantienen patrones similares de distribución en la columna de agua (Hansell y Carlson 2015). Además, a través de la concentración (cantidad) y composición (calidad) de AA es posible obtener el Índice de Degradación Dauwe (DI; Dauwe y Middelburg 1998, Dauwe *et al.*, 1999), el cual ha sido utilizado, como su nombre lo indica, para determinar el estado de degradación de la materia orgánica, donde mayores valores indican MO menos degradada y, por lo tanto, de mayor biodisponibilidad. En consecuencia, los AA pueden ser un buen indicador de la labilidad de la MO y una herramienta para estimar la relación entre la composición de la MO y la actividad degradativa de los microorganismos.

Como se mencionó anteriormente, la principal fuente de MO de origen autóctono en el océano es la PP (Duursma 1963, Carlson y Hansell 2015), sin embargo, existen fuentes de MO

alóctona como las de origen terrígeno a través de la descarga de ríos (Bianchi *et al.*, 2004; Medeiros *et al.*, 2017; Montero *et al.*, 2007; Iriarte *et al.*, 2012), derretimiento de glaciares (Hodson *et al.*, 2008; Hood *et al.*, 2009), así como de origen antropogénico, debido al desarrollo de actividades humanas tales como la acuicultura, agricultura y forestal, las cuales pueden alterar la “salud” del ecosistema (Iriarte 2018; González *et al.*, 2019). Así, cambios relacionados al suministro de sustratos orgánicos disueltos de varias fuentes pueden influenciar la diversidad de las comunidades microbianas y su actividad metabólica (Buchan *et al.*, 2014; Blanchet *et al.*, 2016; Montero *et al.*, 2022).

En áreas oligotróficas las bajas concentraciones de elementos inorgánicos (como N, P y Fe) pueden resultar en una limitación de la PP y como consecuencia generar una limitación de C orgánico para los microorganismos heterótrofos. Algunos sistemas oligotróficos como el Mar Mediterráneo, están influenciados por descargas de ríos que pueden transportar MO alóctona al sistema marino costero. La descarga del Río Rhone representa la mayor entrada de MO de origen continental al Mar Mediterráneo Noroeste (Sempéré *et al.*, 2000), donde la biogeoquímica el Golfo de León se ve influenciada por su pluma (Naudin *et al.*, 2001; Diaz *et al.*, 2008). Además, estructuras de mesoescala de baja salinidad (LSW) se desprenden de la pluma del Río Rhone y pueden ser transportadas por kilómetros a mar abierto proporcionando un ambiente idóneo para el incremento localizado de biomasa planctónica y productividad, pudiendo ser un mecanismo adicional de transferencia de materia orgánica desde la costa a mar abierto (Diaz *et al.*, 2008). Junto con esto, se ha reportado que durante la presencia de LSW existe una mayor producción bacteriana en el Mar Mediterráneo Noroeste, sin embargo, esta alza en la producción bacteriana no se relacionó con las concentraciones de DOM (Laghdass *et al.*, 2010) y aún se desconoce si existe alguna relación entre esta actividad microbiana con la calidad de la materia orgánica.

Por otra parte, sistemas como la Patagonia Chilena (ubicada en el borde Sur Este del Océano Pacífico), presentan una geografía muy intrincada compuesta de muchas islas, penínsulas, fiordos y canales (e.g. Silva y Palma 2008). La Patagonia Chilena está constantemente influenciada por agua dulce proveniente de ríos, escorrentías, precipitación y glaciares (Pantoja *et al.*, 2011), siendo fuentes alóctonas de MO. Estas zonas han sido de particular interés para el desarrollo de actividades humanas como el turismo, la pesca y la acuicultura. El desarrollo de la acuicultura,

en particular del cultivo de salmónidos, ha ido en alza de manera significativa llegando a ser el 73% de la producción acuícola del país, posicionando a Chile como el segundo productor de salmónidos a nivel mundial (38%), después de Noruega (19%) (FAO, 2018). Junto con el desarrollo económico que este sector promueve en la zona sur del país, la actividad acuícola puede generar un alto impacto en el ambiente, dentro de los cuales la carga de material orgánico (disuelto y particulado) en la columna de agua y en los sedimentos son algunos de los más importantes (Haya *et al.*, 2001, Soto y Norambuena 2004, Buschmann *et al.*, 2009, Caruso 2014, Iriarte 2018; Quiñones *et al.*, 2019; Molina y Fernandez 2020), siendo el impacto en la columna de agua de los menos estudiados hasta el momento. Esta carga orgánica, puede resultar en un alza de nutrientes los cuales tiene el potencial de incrementar la producción primaria (Wang *et al.*, 2012; Iriarte *et al.*, 2013) y de incrementar el consumo de oxígeno (Hargrave *et al.*, 1993; Buchmann *et al.*, 2006), generando mayor riesgo de hipoxia (Silva y Vargas, 2014; Pérez-Santos, 2017). La contaminación orgánica derivada del cultivo de salmónes en su fase marina, está dada principalmente por los restos de alimento no consumido y fecas de los peces confinados en balsas jaulas, alcanzando alrededor del 20% de la pérdida total de alimento: 3–15% a través de alimento no consumido (Beveridge *et al.*, 1997; Cromey *et al.*, 2002; Reid *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2012) y 15-30% a través de fecas (Reid *et al.*, 2009; Amirkolaie *et al.*, 2011).

Por otra parte, el cultivo de mitílidos en Chile se centra en el “mejillón” o “chorito” (*Mytilus chilensis*), con una producción que excedió las 370 mil toneladas en 2018 (FAO 2020). Es así como Chile se posiciona como el segundo productor de mejillones, después de China, y el principal exportador mundial de este producto, afectando la fijación de precios de este producto en Europa (Salazar y Dresdner 2022). La mayor parte del cultivo de esta especie en Chile se realiza en las aguas interiores de Chiloé, Región de Los Lagos (Jahansen-Guzmán *et al.*, 2021). El cultivo de mitílidos induce una intensa biodepositación de materia orgánica en los sedimentos, dada principalmente por la mortalidad, fecas, pseudofecas y mucus (Chamberlain *et al.*, 2001; La Rosa *et al.*, 2002; Kaal, 2018), lo cual estimula la demanda de oxígeno y la regeneración de nutrientes (Nizzoli *et al.*, 2005; La Rosa *et al.*, 2002).

La DOM desde los centros de cultivos de salmónes se libera indirectamente por la disolución

de POM de desechos (e.g. alimento y fecas) (Navarro *et al.*, 2008), representando una fuente potencial lábil de nutrientes para las bacterias heterotróficas (Navarro *et al.*, 2008; Olsen, 2014, 2017; Montero *et al.*, 2022). Law *et al.* (2014) señalan que las partículas finas provenientes de la salmonicultura pueden alcanzar sobre 1 Km de distancia antes de depositarse en el fondo, tiempo y distancia durante la cual la DOM puede ser liberada a la columna de agua. Asimismo, otros autores como Piedecausa *et al.* (2010) y Fernandez-Jover *et al.* (2007) indican que la liberación de DOM es más rápida y alta en las fecas de peces respecto a los pellets de alimento y que en ambos casos comienza inmediatamente al entrar en contacto con el agua. El alimento utilizado en la salmonicultura se compone de un 40-50% de proteínas de origen marino y vegetal (harina y aceite pescado, soja, entre otros), un 30% de carbohidratos, y un 30% de lípidos, más vitaminas, antioxidantes y ceniza (Davis 2015). Además, con el objetivo de darle a los peces un alimento de alta palatabilidad y eficiente asimilación, es suplementado con aminoácidos esenciales como la metionina y lisina, contribuyendo al *pool* de DON (Rodehutschord *et al.*, 2000). Altas abundancias de comunidades planctónicas autótrofas y heterótrofas se han reportado en las cercanías de los centros de cultivo de salmones y mitílidos (La Rosa *et al.*, 2002; Sakami *et al.*, 2003; Pitta *et al.*, 2006) y en experimentos de microcosmos se ha observado hasta dos veces más producción bacteriana y actividad enzimática extracelular cuando se enriquece con alimento de peces (Montero *et al.*, 2022), lo que sugiere que la DOM derivada de ambos tipos de acuicultura es una fuente lábil de OM y puede potencialmente sostener una mayor actividad de la comunidad microbiana (Olsen *et al.*, 2014, 2017).

La salmonicultura en particular, tiene el potencial de generar otro importante impacto ambiental relacionado al uso de compuestos químicos tales como pesticidas y antibióticos (Haya *et al.*, 2001, Buschmann *et al.*, 2009, Burridge *et al.*, 2010; Quiñones *et al.*, 2019). Entre los compuestos químicos utilizados en la acuicultura, poco se conoce de los aditivos utilizados en la fabricación del alimento, en particular los antioxidantes. La Etoxiquina (1,2-dihidro-6-ethoxy-2,2,4-trimethylquinoline), en adelante EQ, es una amina aromática ampliamente utilizada para evitar la “ranciedad” del alimento, debido a su capacidad de “atrapar” los radicales libres y así evitar la oxidación espontánea de lípidos y otros ingredientes presentes en el alimento (Bohne *et al.*, 2008). Este compuesto también es utilizado en la agroindustria para evitar la

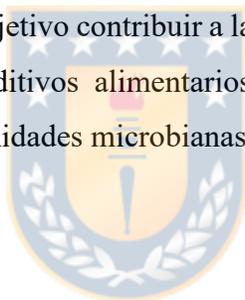
pérdida de color en manzanas y peras (Błaszczuk *et al.*, 2013). La EQ y sus metabolitos (ej. dímeros de etoxiquina (EQDM)) han causado controversia debido a sus posibles efectos carcinogénicos y citotóxicos en células de mamíferos. Así, Błaszczuk (2006) reportó daño en el ADN de linfocitos humanos de manera dosis-dependiente inducida por la EQ y también postula que induce apoptosis (Błaszczuk y Skolimowski 2005). Otros autores han mostrado que la EQ aumenta el número de aberraciones en células de ovario en hámsters (Gille *et al.*, 1991), así como la inhibición de la cadena transportadora de electrones respiratoria mitocondrial en animales (Reyes *et al.*, 1995). Los peces pueden acumular este compuesto en sus órganos y músculos, reportándose, por ejemplo, concentraciones de 1,4 µg EQ en filetes de 200 g de salmón (Lundebye *et al.*, 2010). También se han reportado efectos deletéreos de EQ sobre embriones de pez zebra, *Daphnia magna* y microalgas (Egloff y Pietsch 2018; Pradhan *et al.*, 2020). Por otra parte, Shah *et al.* (2005) reportó la inhibición de la metanogénesis en sistemas de tratamiento biológico. Los estudios ambientales del potencial efecto de la EQ son muy escasos, siendo más común en el estudio de suelos. Papadopoulou *et al.* (2016; 2020) mostró que la EQ y sus metabolitos inhiben significativamente la nitrificación potencial y la AEE de la β-glucosidasa y fosfatasa en el microbiota de suelos. En este contexto, la EFSA (European Food Safety Authority) decidió disminuir la concentración permitida de EQ en los alimentos para peces (de 300 mg/Kg a 150mg/Kg), determinando que no existe evidencia suficiente para catalogar a este aditivo como seguro para el ambiente (EFSA Scientific Opinion 2015). En consecuencia, en junio de 2017, la Comisión Europea suspendió la autorización del uso de EQ como aditivo en el alimento de todas las especies y categorías animales (EU, 2017), lo cual fue corroborado y extendido hasta 2022 (EU, 2021).

La integración de estimaciones de la composición y/o caracterización química de los sustratos orgánicos con análisis microbiológicos, pueden proporcionar nuevas perspectivas y conocimientos acerca de las interacciones y procesos que gobiernan el metabolismo microbiano en el océano (Kujawinski 2011). En ese contexto, los antecedentes en cuanto a la influencia que puede ejercer la fuente y/o composición de la materia orgánica disuelta alóctona, tanto de origen natural como antropogénica, en el metabolismo de la comunidad microbiana marina de la columna de agua, aún son poco claros. Existe aún menos conocimiento acerca del impacto de

aditivos utilizados en la actividad acuícola sobre la degradación de materia orgánica y sus potenciales efectos en la composición de la comunidad microbiana natural. En consecuencia, esta Tesis Doctoral estudia la biodisponibilidad y degradación de materia orgánica disuelta de distintas fuentes, su impacto en el metabolismo de la comunidad microbiana involucrada en estos procesos y como estas variables pueden cambiar al estar expuestas a compuestos químicos de uso común en actividades humanas ligadas al mar, a través de dos escenarios: las descargas de agua de baja salinidad costa afuera del Mar Mediterráneo Noroeste (NO) que proveen MO alóctona natural y la intensa actividad acuícola en el sistema de fiordos y canales de la Patagonia Norte de Chile, que aporta MO alóctona antropogénica y aditivos químicos a la columna de agua.

### 1.1. OBJETIVO GENERAL

Esta tesis doctoral tiene como objetivo contribuir a la comprensión del impacto de la materia orgánica disuelta alóctona y de aditivos alimentarios vinculados a la acuicultura sobre el metabolismo y diversidad de comunidades microbianas planctónicas en ecosistemas marinos.



## 2.- HIPOTESIS Y OBJETIVOS ESPECÍFICOS

### 2.1. Objetivo específico 1

Estimar la relación entre la variabilidad temporal de la respiración, y las características de la materia orgánica disuelta en un área costa afuera del Mar Mediterráneo Noroeste, influenciado por la descarga de ríos.

Hipótesis 1: La variabilidad temporal de la respiración microbiana está asociada al *input* de materia orgánica lábil transportada por agua de baja salinidad (LSW) proveniente del Río Rhone, En el Mar Mediterráneo Noroeste.

### 2.2. Objetivo específico 2

Estimar el impacto de la DOM derivada de la acuicultura en el metabolismo de la comunidad microbiana de la columna de agua a corto plazo.

Hipótesis 1: La DOM en las cercanías de centros de cultivos se caracteriza por ser material mayormente lábil (mayor DI) respecto a la DOM de zonas alejadas de la influencia de la acuicultura.

Hipótesis 2: La actividad metabólica microbiana incrementará con la adición de DOM derivada de la salmonicultura, traduciéndose en mayores tasas de respiración de la comunidad microbiana de la columna de agua en presencia de DOM proveniente de *pellets* (alimento) respecto a la DOM de fecas y DOM “natural”.

Hipótesis 3: La actividad metabólica microbiana incrementará con la adición de DOM derivada de la salmonicultura, traduciéndose en mayores tasas de hidrólisis enzimática extracelular de proteínas, carbohidratos y lípidos en presencia de DOM proveniente de *pellets* (alimento) respecto a la DOM de fecas y DOM “natural”.

### 2.3. Objetivo específico 3

Estimar el impacto del uso de Etoxiquina (EQ) en la degradación de materia orgánica y en la composición de la comunidad microbiana activa de la columna de agua a corto plazo.

Hipótesis 1: Las tasas de respiración microbiana y la actividad de la enzima malato deshidrogenasa (MDH) disminuyen en presencia de EQ.

Hipótesis 2: La utilización de carbohidratos y aminoácidos por parte de la comunidad microbiana disminuye en presencia de EQ.

Hipótesis 3: La presencia de EQ modifica la estructura comunitaria microbiana y disminuye su diversidad.



### 3.- MATERIAL Y METODOS

Para abordar los objetivos planteados en esta tesis, se trabajó mediante 3 aproximaciones de trabajo:

- (i) Una serie de tiempo mensual en la estación MOLA costa afuera del Mar Mediterráneo noroeste, frente a la estación oceanológica de Banyuls sur Mer, Francia (Proyecto MEDEA; NW Mediterranean Sea study; CNRS INSU LEFE CYBER 2007-2009),
- (ii) Un crucero nacional con muestreo espacial (transectas), más un experimento de microcosmos con adición de DOM, en el canal Caucahué, Chiloé (Patagonia norte, Chile) y
- (iii) Dos experimentos de microcosmos con adición de EQ; en Achao, Chiloé (Patagonia norte, Chile) y Coliumo, Concepción (Chile central).

#### **3.1. Capítulo 1: Renovación estacional de aguas superficiales del Mediterráneo NO impacta la actividad heterótrofa microbiana y la materia orgánica disuelta (“Seasonal freshening of NW Mediterranean surface water impacts microbial heterotrophic activity and dissolved organic matter”)**

Para llevar a cabo el objetivo 1, se utilizaron 2 años (2007-2008) de observaciones realizadas a través de la serie de tiempo mensual de la estación MOLA (Microbial Observatory of the Laboratoire Arago, Banyuls-sur-Mer, Francia) (Fig. 3.1). Los datos se recolectaron en el contexto del Proyecto MEDEA (Metabolic balance in the Mediterranean Sea: Linking external source of organic matter to the Activity of major phylogenetic groups of heterotrophic prokaryotes). El objetivo principal del Proyecto MEDEA fue analizar el desbalance entre la producción y respiración de carbono orgánico en océanos oligotróficos (Del Giorgio y Duarte 2002), a través del estudio de la diversidad funcional de procariontes heterótrofos, como respuesta a diferentes fuentes de carbono, y como éstas producen un impacto en el balance metabólico en el Mar Mediterráneo oligotrófico.

3.1.1. *Estrategia de muestreo*: Las muestras de agua de mar fueron colectadas en la estación MOLA ubicada a 20 millas náuticas (42,454°N y 3,688°E) de Banyuls-sur-Mer (Francia) en el Mar Mediterráneo Suroeste (Fig. 3.1). El muestreo se realizó mensualmente durante dos ciclos anuales entre febrero 2007 y octubre 2008, con botellas Niskin de 12L montadas en una roseta. Se tomaron muestras a 8 profundidades entre 0 y 150m para los parámetros biogeoquímicos básicos ( $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$ ,  $\text{Si(OH)}_4$ , Clorofila-a; Laghdass *et al.*, 2010), abundancia celular, materia orgánica disuelta, aminoácidos y producción bacteriana (BP), y a 6 profundidades sobre los 80m (zona eufótica) para la determinación de la respiración comunitaria microbiana (CR) y la producción comunitaria neta (NCP). Además, se obtuvieron perfiles de temperatura y salinidad con un equipo CTD Seabird SBE19.

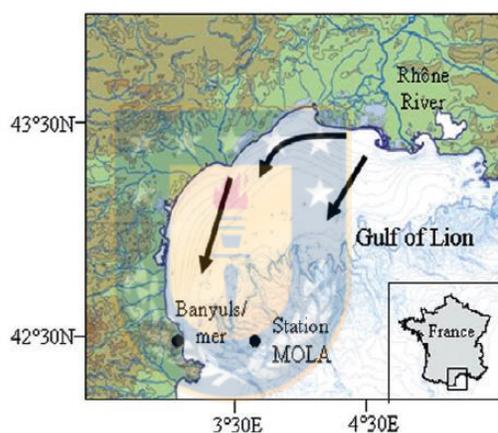


Fig. 3.1 Área de estudio: Mapa del Golfo de Leones en el Mar Mediterráneo Noroeste, con la ubicación de la estación MOLA. Las flechas negras indican las principales corrientes (ex. Laghdass *et al.* 2010). (b) Sección vertical temporal de la salinidad, donde se observa la presencia de agua de baja salinidad (LSW), entre febrero 2007 y octubre 2008 (ex. González *et al.* 2019).

3.1.2. *Procesos microbianos*: La CR y la NCP se determinaron a través de cambios en la concentración de oxígeno disuelto durante incubaciones de 24h en luz y oscuridad, en botellas de 125 mL. Durante las incubaciones se mantuvo la temperatura *in situ* con circulación constante de agua de mar. Todas las mediciones de  $\text{O}_2$  fueron hechas con 8 réplicas. Posteriormente, el cálculo de la respiración se obtuvo por la diferencia entre las concentraciones de  $\text{O}_2$  inicial y

final, determinadas por el método Winkler, según lo descrito por Obernosterer *et al.* (2008). La BP se determinó a través de la incorporación de Leucina (3H) (Smith y Azam 1992, Obernosterer *et al.* 2008), en las mismas profundidades en que se estimó la respiración. La tasa de crecimiento bacteriano (BGR), se determinó dividiendo BP por la biomasa celular derivada de la abundancia celular.

*3.1.3. Concentración y caracterización de la materia orgánica (DOM):* se colectaron muestras para carbono orgánico disuelto (DOC) y para aminoácidos totales hidrolizables (THAA) filtrando a través de dos filtros fibra de vidrio (Whatman GF/F 25mm, 0,7 um) precalcinados. Las muestras de DOC fueron acidificadas con H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (pH 2) y guardadas en tubos de vidrio precalcinados en oscuridad a temperatura ambiente, hasta su posterior análisis. El DOC se analizó por la técnica de Oxidación Catalítica de Alta Temperatura (HTCO) (Benner y Strom 1993). Las muestras de aminoácidos se analizaron por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), después de la hidrólisis ácida en fase líquida según el protocolo descrito por Escoubeyrou y Tremblay (2014). Con la composición y concentración de AA se calculó el Índice de Degradación Dauwe (DI; Dauwe *et al.* 1999) como un indicador del estado de degradación de la DOM. Para más detalles metodológicos, ver sección Resultados, Capítulo 1.

*3.1.4. Análisis estadístico:* para investigar si las estructuras de LSW revelan una señal biogeoquímica específica en la estación MOLA, comparamos los perfiles verticales de la actividad microbiana heterotrófica y las características de la DOM de las fechas con mayor anomalía de salinidad (22 de mayo de 2007 y 9 de junio de 2008) con las medias anuales del periodo de observación. Complementariamente se realizó un Análisis de Componentes Principales (PCA) con los parámetros biogeoquímicos y microbianos de aguas superficiales (5m) de los dos años de estudio.

### **3.2. Capítulo 2: Biodisponibilidad de materia orgánica disuelta derivada de la acuicultura y su efecto en el metabolismo de comunidades microbianas planctónicas (“Bioavailability of Dissolved Organic Matter derived from aquaculture and its effect on planktonic microbial metabolism”)**

Para llevar a cabo el objetivo 2 de esta tesis, se utilizaron dos tipos de aproximaciones para analizar la calidad de DOM derivada de la acuicultura y su potencial efecto en el metabolismo microbiano durante el invierno austral de 2019: i) un muestreo de transectas *in situ* en un canal de Chiloé, y ii) un experimento de microcosmos con adición de DOM derivada de la salmonicultura. Ambos muestreos fueron organizados por el Centro Interdisciplinario para la Investigación Acuícola (INCAR), en el canal Caucahué (42° S; 73° W), ubicado en el mar interior de Chiloé, Región de Los Lagos, Chile (Fig.3.2).

*3.2.1. Estrategia de muestreo:* Se realizaron dos transectas en el canal Caucahué con 4 estaciones y 3 profundidades (2, 10 y 40/50m) por estación, dependiendo de la batimetría del lugar: i) Transecta Salmones (TS); en el brazo norte del Canal Caucahué, con una estación Control (estación Cs) ubicada fuera del canal y 3 estaciones al interior del canal en dirección hacia un centro de cultivo de salmónidos a 2km (estación S1), a 0,5km (estación S2) y a 0 km (estación S3; Fig. 3.2); y ii) Transecta Mitílidos (TM); en el brazo sur del Canal Caucahué, con una estación Control (estación Cm) ubicada fuera del canal y 3 estaciones al interior del canal hacia un centro de cultivo de mitílidos a 2 km (estación M1), 0,5 km (estación M2) y 0 km (estación M3; Fig. 3.2). Las muestras de agua se colectaron con una botella Niskin (10L) para el análisis de nutrientes, materia orgánica disuelta (DOM), clorofila-a, abundancia picoplanctónica, aminoácidos, actividad enzimática intracelular y biomasa. Para el experimento de microcosmos con adición de DOM, se colectaron 300 L agua de 10 m de la estación Cs. Los perfiles de temperatura y salinidad se obtuvieron con un CTD (Minos X, AML Oceanographic).

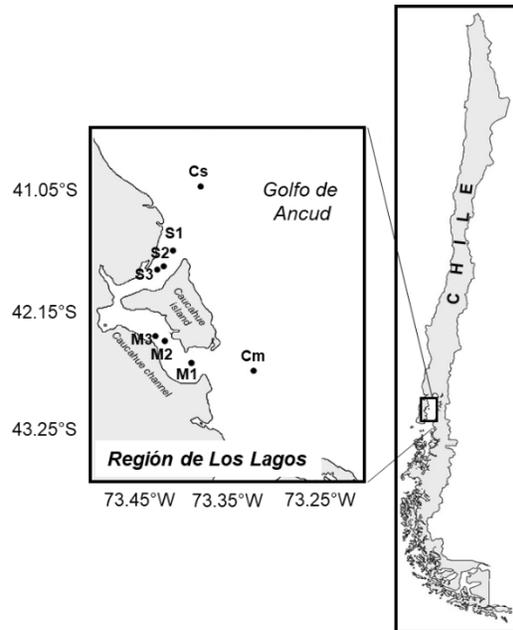


Fig. 3.2 Sitio de muestreo, Canal Caucahué, Chiloé, Región de Los Lagos, Chile. Transecta salmones (TS) en el brazo norte del canal y Transecta mitílidos (TM) en el brazo sur del canal.

3.2.2. *Diseño experimental EMOD*: El agua colectada a 10 m en la estación Cs fue tamizada por una malla de 100  $\mu\text{m}$  para remover organismos planctónicos grandes. El experimento incluyó un Control (sin adición de DOM) y 4 tratamientos con la adición de 200mL de solución de DOM de: alimento de peces en pellets (P-DOM), fecas de *Salmo salar* (F-DOM), Natural (N-DOM) y Mezcla (M-DOM). Cada tratamiento de microcosmo consistió en un triplicado de bidones de alta densidad de 20 L cada uno, incubados en oscuridad en una cámara fría a  $\sim 11^\circ\text{C}$ . Se realizó un sub-muestreo a las 0, 6, 12, 24, 48 y 72 h (Fig. 3.3). Las variables consideradas fueron nutrientes, DOM, aminoácidos y abundancia celular. Además, en cada uno de los tiempos sub-muestreados se utilizaron dos fracciones de tamaño:  $>1 \mu\text{m}$  y  $>100\mu\text{m}$  (FTotal), para la estimación de biomasa (concentración de ATP) y la respuesta metabólica de la comunidad microbiana. Esta última consistió en la medición de la actividad enzimática intracelular de la malato deshidrogenasa (MDH), respiración aeróbica y actividad enzimática extracelular (EEA) de la leucina-aminopeptidasa,  $\beta$ -glucosidasa, y lipasa.

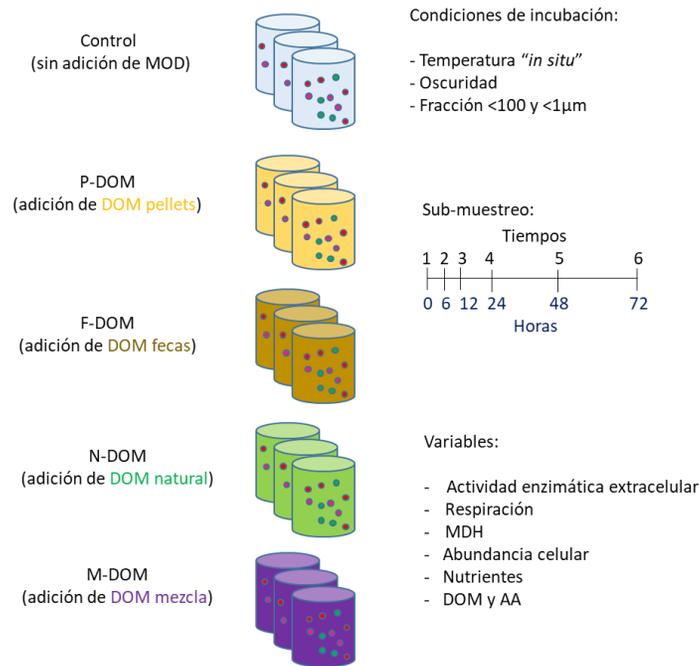


Fig. 3.3 Diseño de experimento de microcosmos EMOD, realizados con agua de mar y la adición de DOM derivada de la acuicultura. P-DOM: derivada del alimento de peces, F-DOM: derivada de fecas de *Salmo salar*, N-DOM: materia orgánica disuelta natural. M-DOM: una mezcla de las anteriores. Los detalles de la obtención de las soluciones de DOM se encuentran en la sección resultados, Capítulo 2 de esta tesis.

3.2.3. *Nutrientes y Materia Orgánica Disuelta.* Se colectaron muestras para la determinación de amonio y se analizaron según el método fluorométrico (Holmes *et al.*, 1999). La concentración de nitrato, nitrito y fosfato se filtraron a través de un GF/F de  $0,7 \mu\text{m}$  y se almacenaron ( $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ ) hasta su análisis por el método colorimétrico estándar (Grasshoff *et al.*, 1983). Las muestras de DOM (carbono, nitrógeno y fósforo orgánico disuelto) se filtraron a través de un GF/F ( $0,7 \mu\text{m}$ ) previamente muflado. Las muestras DOC se acidificaron con HCl y se almacenaron en tubos de vidrio ámbar precalcinados a temperatura ambiente y oscuridad hasta el análisis. La concentración de DOC se analizó mediante la técnica de oxidación catalítica a alta temperatura (Benner y Strom, 1993). El DON y DOP se almacenaron ( $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ ) en botellas precalcinadas y se analizaron mediante el procedimiento de oxidación húmeda (Pujo-Pay y Raimbault, 1994).

3.2.4. *Identificación y cuantificación de aminoácidos disueltos.* Las muestras de aminoácidos disueltos se filtraron a través de filtros GF/F (0,7 µm) precalcinados y fueron almacenadas en tubos de vidrio ámbar muflado y conservadas a -20 °C hasta su análisis. Los aminoácidos se analizaron a través de la derivatización con o-ftaldialdehído (OPA) y 2-mercaptoetanol (Lindroth y Mopper, 1979; Pantoja y Lee, 1999), separados por cromatografía líquida de ultra alta resolución (UHPLC) y detectado por fluorescencia. Los aminoácidos totales hidrolizables (THAA) se cuantificaron después de la hidrólisis química. Los aminoácidos libres disueltos (DFAA) se midieron sin hidrólisis química. Las proteínas disueltas o los aminoácidos combinados disueltos (DCAA) resultaron de la diferencia entre THAA y DFAA. Se utilizó el índice de degradación de Dauwe (DI, Dauwe *et al.*, 1999) calculado en base a los DCAA (sección Resultados, Capítulo 1 y Capítulo 2) como indicador del estado de degradación de DOM.

3.2.5. *Clorofila-a y Abundancia picoplanctónica.* La concentración de clorofila-a se determinó mediante el método fluorométrico según Holm-Hansen *et al.* (1965). La extracción se realizó con acetona al 90% y la fluorescencia se midió con un fluorómetro Trilogy (Turner Designs). 1350 µL de muestra se fijaron con 150 µL de glutaraldehído al 1% para la abundancia de picoplanctónica, se almacenaron a -80 °C hasta del análisis de laboratorio. Las muestras se analizaron por citometría de flujo (InFlux, Becton Dickinson) según Marie *et al.* (1999) y Thompson y Van de Engh (2016).

3.2.6. *Adenosin trifosfato (ATP) y actividad enzimática intracelular.* La concentración de ATP se utiliza como indicador de biomasa viva en estudios ecológicos de microorganismos acuáticos (Karl, 1993). La fracción de ATP requerida (<1 µm y Total) se retuvo mediante un filtro GF/F y se almacenó en nitrógeno líquido hasta su análisis en el laboratorio. El ATP se cuantificó mediante un ensayo de bioluminiscencia (Holm-Hansen y Booth, 1966; Bulleid, 1978; Karl, 1993) utilizando un luminómetro (GloMax, Promega).

En el muestreo de transectas se analizaron las enzimas: piruvato oxidorreductasas (lactato deshidrogenasa, LDH; octopina deshidrogenasa, OPDH; alanopina deshidrogenasa, ALPDH y

estrombina deshidrogenasa; STRDH), etanol deshidrogenasa (EtOHDH), malato deshidrogenasa (MDH) y citrato sintasa (CS). Mientras que para el experimento de microcosmos solo se midió MDH. La actividad enzimática se determinó siguiendo la metodología descrita por González y Quiñones (2009) y dicha actividad fue utilizada como indicador del metabolismo de la columna de agua (González y Quiñones 2009; Garcés *et al.*, 2020; González *et al.*, *submitted*).

*3.2.7. Tasas de respiración aeróbica y de actividad enzimática extracelular (EEA).* La concentración de oxígeno se determinó con un medidor de oxígeno de fibra óptica (FIBOX 3, PreSens) con sensores optode, en botellas de 12 mL incubadas en oscuridad con temperatura controlada. Las tasas de respiración se calcularon mediante la pendiente de la concentración de oxígeno medida cada 2 a 4 h durante un período de 24 h, siguiendo la metodología descrita en Fuentes *et al.* (2015).

La EEA se determinó siguiendo la metodología de Pantoja *et al.* (2011) y Gutiérrez *et al.* (2011), adaptada a microplacas (placas de 96 pocillos). Alícuotas de 200  $\mu$ L de agua de mar en triplicado se incubaron en oscuridad con 1-leucina-4-metilcumarinil-7-amida (MCA-Leu), 4-metilumbeliferil-b-D-glucósido (MUF-Glu) y 4-metilumbeliferil-oleato (MUF- Ole) a 100  $\mu$ M (Hoppe, 1983). La fluorescencia se midió cada 1 h durante 6 h, usando un lector de microplacas multimodo Synergy™ 2 (Biotek; excitación 365 nm, emisión 455 nm) (Hoppe, 1983). Las tasas de EAA se calcularon según lo descrito por Pantoja y Lee (1994).

*3.2.8. Análisis estadístico:* Se corroboraron los supuestos de normalidad utilizando la prueba Kolmogorov-Smirnov. Aquellas variables sin distribución normal fueron transformadas para normalizarlas.

Para comparar los resultados entre estaciones se realizó un ANOVA de una vía, seguido de la prueba Tukey. Complementariamente se realizó un análisis de coordenadas principales (PCoA) con las distancias Euclidianas para visualizar patrones de ordenamiento en relación a las estaciones y profundidad de muestreo.

Para evaluar las diferencias entre tratamientos durante el experimento de microcosmos se aplicó un ANOVA, seguido de la prueba Tukey como análisis a posteriori. Complementariamente se realizó un análisis de coordenadas principales (PCoA) con las distancias Euclidianas para visualizar patrones en relación a los tratamientos y tiempo de incubación.

Para visualizar cambios en la composición de aminoácidos de DFAA y proteínas disueltas, en las transectas y en el experimento, se calculó la matriz de similitud de Bray-Curtis utilizando los datos estandarizados y transformados a raíz cuadrada. Se realizó un análisis de coordenadas principales (PCoA) con vectores de correlación de Pearson superpuestos para visualizar estos cambios. Para determinar los aminoácidos con mayor contribución a la disimilitud asociada, se realizó un análisis SIMPER utilizando el software PRIMER.

Los detalles metodológicos del muestreo de transectas y del experimento EMOD se presentan en la sección Resultados del capítulo 2 de esta tesis.

### **3.3. Capítulo 3: Efectos de la etoxiquina sobre el metabolismo y la composición de comunidades microbianas marinas (“Effects of ethoxyquin on metabolism and composition of marine microbial communities”)**

Para llevar a cabo el objetivo 3 de esta tesis, se realizaron dos experimentos de microcosmos bajo condiciones controladas de temperatura y oxígeno, siguiendo en el tiempo los cambios en las tasas de respiración, actividad enzimática intracelular de la MDH, actividad enzimática extracelular (aminopeptidasa,  $\beta$ -glucosidasa y lipasa), biomasa (ATP), fingerprints metabólicos con Biolog EcoPlates y técnicas moleculares (16S rRNA barcode sequencing). Estas mediciones nos entregaron información de cómo las comunidades microbianas que habitan la columna de agua del mar interior de Chiloé (Achoa), un área impactada por la salmonicultura, y un área contrastante de Chile central (Bahía Coliumo), sin salmonicultura, responden a la adición de etoxiquina.

*3.3.1. Estrategia de muestreo:* se realizaron 2 cruceros oceanográficos organizados por el Centro Interdisciplinario para la Investigación Acuícola (INCAR), durante la primavera austral en la Bahía de Coliumo (región del Biobío; 36.5°S 72.94°W, Fig. 3.4), y durante el verano austral en Achao (región de Los Lagos; 42.52°S 73.20°W, Fig. 3.4). Las muestras de agua se colectaron usando una botella Niskin (10 L) a 3 profundidades (2, 10 y 30m) en Achao y a 10m en Coliumo. Las variables consideradas fueron nutrientes, materia orgánica disuelta (DOM), clorofila y abundancia picoplanctónica. Para los experimentos de microcosmos, se colectaron 300 L de agua de mar a 10 m en cada sitio de estudio. Los perfiles de temperatura y salinidad se obtuvieron con un CTDO (Mínos X, AML, Oceanographic).

*3.3.2. Diseño experimental:* El agua colectada a 10 m en ambos sitios de muestreo fue tamizada por una malla de 63  $\mu\text{m}$  para remover organismos planctónicos grandes. El experimento incluyó la adición de tres concentraciones de EQ (Sigma Aldrich Pestanal® 31519, analytical standard; Anexo 4) al microcosmos, disueltas en DMSO (concentración final  $<0.1\%$  v/v). Las concentraciones de EQ utilizadas en Achao fueron EQ1= 10  $\mu\text{g L}^{-1}$ ; EQ2 = 100  $\mu\text{g L}^{-1}$ ; EQ3 =1000  $\mu\text{g L}^{-1}$ , mientras en Coliumo solo se evaluó EQ1 y EQ3. Se establecieron dos controles: Control (C) sin la adición de EQ, y Control+Solvente (C+S) solo con de DMSO (Fig. 3.5). Cada tratamiento consistió en un triplicado de bidones de 20L de alta densidad, incubados en oscuridad en una cámara fría a  $\sim 12^{\circ}\text{C}$ . Se sub-muestreó a las 0, 6, 12, 24, 48 y 72 h en Achao y a las 0, 6, 12, 24 y 48h en Coliumo, para medir nutrientes, DOM y abundancia celular. La determinación de la concentración de ATP y la respuesta metabólica de la comunidad microbiana se realizó en dos fracciones de tamaño:  $>1 \mu\text{m}$  y  $>63\mu\text{m}$  (FTotal). La respuesta metabólica de la comunidad microbiana se estimó mediante la medición de la actividad enzimática intracelular de la malato deshidrogenasa (MDH), de la tasa de respiración aeróbica y la actividad enzimática extracelular (EEA) de la leucina-aminopeptidasa,  $\beta$ -glucosidasa, y lipasa. Se determinó la utilización de sustratos con Biolog Ecoplates™ y la composición comunitaria activa desde muestras de ARN.

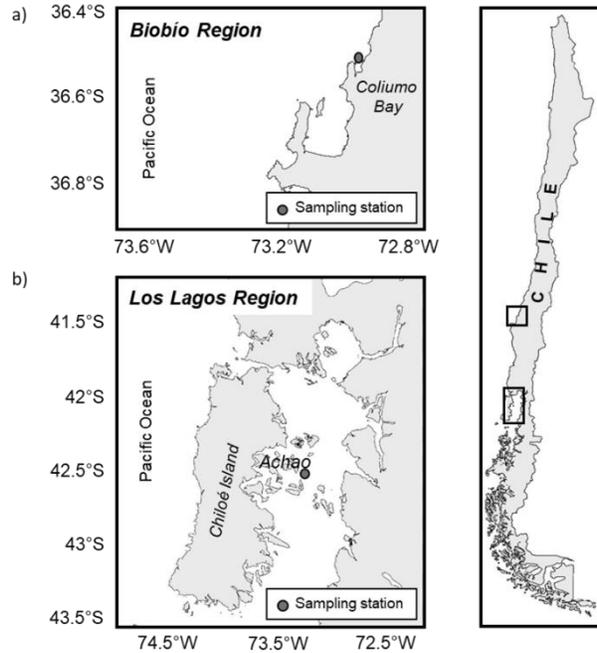


Fig. 3.4 Sitios de muestreo experimento con adición de etoxiquina (EQ). (a) Bahía de Coliumo, región del Biobío, Chile-central. (b) Achao, ubicado en el mar interior de la isla de Chiloé, Región de Los Lagos, Chile.

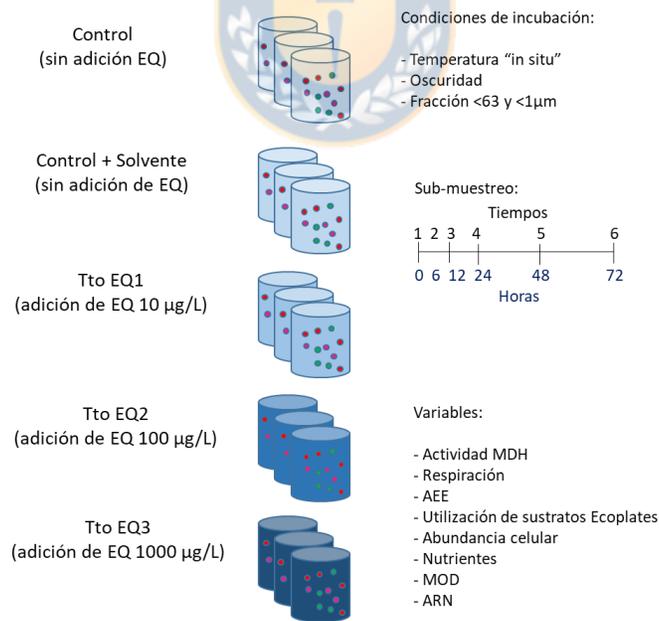


Fig. 3.5 Diseño de experimentos de microcosmos EQ, realizados con agua de mar y la adición de etoxiquina. Extensión de experimento de 72h en Achao y 48h en Coliumo.

La metodología del procesamiento y medición de todas las variables está descrita en detalle en la sección Resultados, Capítulo 3 de esta tesis, y brevemente descritas en la sección inmediatamente anterior (Materiales y Métodos, Capítulo 2) para aquellas variables en común. Por consiguiente, en esta sección se resumirá la metodología de utilización de sustratos y técnicas moleculares utilizadas en este experimento.

*3.3.3. Perfiles metabólicos de la comunidad microbiana:* se utilizaron microplacas Biolog Ecoplates™ para determinar diferencias en el potencial metabólico de las comunidades microbianas expuestas a EQ. Estas microplacas están compuestas de 96 pocillos con 31 fuentes de carbono por triplicado. Cada pocillo contiene, junto con el sustrato, un colorante redox violeta de tetrazolio, el cual forma color púrpura (transformación a formazán) cuando la comunidad microbiana oxida la fuente de carbono y puede ser cuantificado espectrofotométricamente (Sala et al. 2006). Se inocularon 150 µl de muestra en cada pocillo. Las microplacas se incubaron a 22 °C por 72h y se midió la densidad óptica (OD) cada 24 horas 0, 6, 12, 24, 48 and 72 ( $\lambda = 590$  nm) con un lector de microplacas (ELx800 Epoch™, BIO TEK®).

*3.3.4. Análisis molecular de la comunidad microbiana:* La respuesta de la comunidad microbiana activa fue evaluada solo en el experimento de Achao a través del análisis de ARN. Se filtraron 100mL de muestra en filtros PVDF (0.22 µm), los filtros se preservaron con 300 µL de RNAlater a -20 °C hasta la extracción. El ARN se extrajo con el kit de aislamiento mirVana miRNA (Ambion, Life Technologies). Las trazas de ADN fueron removidas con el kit TURBO DNA-free (Ambion) y se cuantificó por el método fluorométrico. El ADN complementario (cDNA) se generó usando el sistema de transcripción reversa ImProm II™ (Promega Corp. Madison, WI) y la amplificación fue comprobada por PCR estándar del 16S rRNA bacteriano. El producto PCR se comprobó a través de electroforesis en un gel de agarosa. Los templados de cDNA fueron secuenciados con MiSeq (Illumina) en el laboratorio GenomaMayor (<http://www.genomamayor.com>, Santiago, Chile) usando los partidores para la región V4 del gen 16S rRNA según Caporaso *et al.*, 2011. El procesamiento de datos para el análisis de secuencias se realizó con QIIME2 (v.2019.7) obteniendo la clasificación taxonómica en ASV

(Amplicon Sequence Variant) (Bolyen *et al.*, 2018). La clasificación taxonómica fue realizada usando la base de datos SILVA138.

3.3.5. *Análisis estadístico:* Para cada experimento, se realizó un análisis exploratorio de las variables a través de correlaciones de Spearman y un análisis multivariado PERMANOVA, usando el software PRIMER 6 con el paquete PERMANOVA+, para evaluar la variabilidad de los parámetros en relación con los tratamientos y tiempo de incubación. Se realizó un Análisis de Coordenadas Principales para visualizar patrones en respuesta a las adiciones de EQ en los diferentes tratamientos y tiempos. Para evaluar diferencias en la actividad metabólica, se comprobaron los supuestos de normalidad (Kolmogorov-Smirnov test) de todas las variables y aquellas sin distribución normal fueron transformadas para su normalización (ver sección Resultados capítulo 3 de esta tesis). Se aplicó un ANOVA de dos vías para cada experimento y se usó un test Tukey como análisis *a posteriori*. Para la respuesta de la comunidad microbiana se corroboró la profundidad de secuenciación con curvas de rarefacción y se obtuvieron los índices de riqueza (S), Shannon ( $H'$ ) y uniformidad ( $J'$ ). Para identificar los cambios de la comunidad microbiana asociada a los tratamientos EQ y el tiempo de incubación, se calculó la matriz de similitud Bray-Curtis, usando la data transformada con raíz cuadrada. Se realizó un PCoA con los vectores de correlación de Pearson superpuestos para visualizar los cambios de la comunidad a nivel de Phyla. Para determinar los taxones (a nivel de ASV) con mayor contribución a la disimilitud asociada a los tratamientos, se realizó un análisis SIMPER utilizando el software PRIMER.

## 4.- RESULTADOS

### **4.1. Capítulo 1: “Renovación estacional de aguas superficiales del Mediterráneo NO impacta la actividad heterótrofa microbiana y la materia orgánica disuelta”**

Manuscrito publicado en la revista *Estuarine, Coastal and Shelf Science* (IF:3.0)

González, M. L., Blain, S., & Obernosterer, I. (2019). Seasonal freshening of NW Mediterranean surface water impacts microbial heterotrophic activity and dissolved organic matter. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 230, 106448.

<https://doi.org/10.1016/j.ecss.2019.106448>

#### Resumen

El Río Rhone representa la fuente más importante de agua dulce, nutrientes y materia orgánica que ingresa al Mar Mediterráneo noroeste (NO). Este aporte fluvial afecta notablemente la biogeoquímica el funcionamiento del ecosistema en la zona estuarina y costera. Además, estructuras de baja salinidad (LSW) originadas cerca de la pluma del Río Rhone pueden ser transportadas a lo largo de la plataforma continental y mar adentro. El objetivo de este estudio fue investigar la influencia de LSW lejos de su fuente, enfocándose en la materia orgánica disuelta (DOM) y en procesos microbianos relacionados durante dos ciclos anuales (2007 y 2008) de una serie de tiempo en un sitio caracterizado por la regular ocurrencia de LSW en primavera (Observatorio Microbiano Laboratorio Arago). Se observó una mayor producción bacteriana heterotrófica y respiración comunitaria, y características específicas de DOM dentro de LSW, al mismo tiempo que una baja producción comunitaria neta. Nuestros resultados sugieren que LSW representa un mecanismo de suministro de DOM lábil, lo que sustenta un incremento del metabolismo microbiano heterótrofo.

Palabras clave: Aguas de baja salinidad (LSW), actividad microbiana heterotrófica, materia orgánica disuelta, Mar Mediterráneo NO.



Contents lists available at ScienceDirect

## Estuarine, Coastal and Shelf Science

journal homepage: <http://www.elsevier.com/locate/ecss>

## Seasonal freshening of NW Mediterranean surface water impacts microbial heterotrophic activity and dissolved organic matter



Maria-Lorena Gonzalez<sup>a,b</sup>, Stéphane Blain<sup>c</sup>, Ingrid Obernosterer<sup>c,\*</sup>

<sup>a</sup> Graduate Program in Oceanography, Department of Oceanography, Faculty of Natural Sciences and Oceanography, University of Concepcion, P.O. Box 160-C, Concepcion, Chile

<sup>b</sup> Interdisciplinary Center for Aquaculture Research (INCAR), University of Concepcion, O'Higgins 1695, Concepcion, Chile

<sup>c</sup> CNRS, Sorbonne Université, Laboratoire D'Océanographie Microbienne (LOMIC), Observatoire Océanologique, F-66650, Banyuls/mer, France

## ARTICLE INFO

## Keywords:

Low salinity waters  
Microbial heterotrophic activity  
Dissolved organic matter  
NW Mediterranean Sea

## ABSTRACT

The Rhone river represents the most important source of freshwater, nutrients and organic matter to the northwestern (NW) Mediterranean Sea and riverine input markedly affects biogeochemistry and ecosystem functioning in the estuarine and coastal zone. Structures of low salinity waters (LSW) originating near the river plume can also be transported along the continental shelf and offshore. The objective of the present study was to investigate the influence of LSW distant from their source, focusing on dissolved organic matter (DOM) and related microbial processes during two annual cycles (2007 and 2008) at a time series site characterized by the regular occurrence of LSW in spring (Microbial Observatory Laboratoire Arago). We observed enhanced bacterial heterotrophic production and community respiration and specific DOM features within these LSW, concurrently with low net community production. Our results suggest that LSW represent a mechanism of labile DOM supply, thereby sustaining enhanced heterotrophic microbial metabolism.

## 1. Introduction

Riverine input represent approximately 40% of fresh water entering the ocean (Dagg et al., 2004), and thereby plays a key role in linking terrestrial and marine environments. Rivers deliver a large amount of inorganic nutrients to the adjacent coastal area, stimulating rates of primary production and associated food web processes (Frame and Lessard, 2009; Iriarte et al., 2012; Liu et al., 2004). Riverine discharge also transports terrigenous particulate (POM) and dissolved organic matter (DOM), mainly from terrestrial vegetation, to the coastal ocean (Bianchi et al., 2004; Medeiros et al., 2017; Opsahl and Benner, 1997). DOM from freshwater input of the 30 major rivers accounts for 90,2 Tg dissolved organic carbon (DOC) per year (Raymond and Spencer, 2015) which represents ~36% of the global DOC flux to the ocean (250 Tg DOC-C yr<sup>-1</sup>; Hedges et al., 1997). The fraction of terrigenous organic matter that is removed in the coastal ocean is not well quantified due to multiple biotic and abiotic processes involved, and the spatio-temporal heterogeneity of river-influenced ocean margins (Bianchi, 2011). In large river systems, such as for example the Mississippi-Atchafalaya river, biological mineralization results in the removal of about 40% of terrestrial DOM in shelf waters (Fichot and Benner, 2014). Export of

terrigenous DOC from the Amazon river varies on a seasonal scale and amounts to 50%–76% (Medeiros et al., 2015). How riverine input of nutrients and organic matter affect marine ecosystems has been investigated in a range of estuarine and coastal environments (Cole et al., 2007; Dagg et al., 2004 and reference therein). The influence of terrestrial input at varying distances from shore is, however, far less understood.

The Mediterranean Sea is a mid-latitude semi-enclosed sea, divided in an eastern extreme oligotrophic basin (<0.1 µg Chlorophyll *a* L<sup>-1</sup>) and a moderately-oligotrophic western basin (0.1–3 µg Chlorophyll *a* L<sup>-1</sup>) (Bosc et al., 2004), mainly due to P-limitation (Krom et al., 1991; McGill, 1965). The Rhone River discharge represents the most important freshwater source to the Mediterranean Sea (Naudin and Cauwet, 1997). The average runoff of 1750 m<sup>3</sup> s<sup>-1</sup> varies strongly with season and is highest during the frequent precipitation events in spring and autumn (Ludwig et al., 2009; Naudin and Cauwet, 1997). The Rhone River represents an important source of inorganic and organic matter of continental origin to the Mediterranean Sea (de Madron et al., 2011). Increased inorganic and organic nutrient concentrations are reported near the Rhone river freshwater plume in shelf waters (100 m depth, up to about 20 nautical miles offshore) in the Gulf of Lion (Diaz et al., 2008;

\* Corresponding author. Laboratoire d'Océanographie Microbienne (LOMIC), 1 avenue Pierre Fabre, 66650, Banyuls sur mer, France.  
E-mail address: [Ingrid.obernosterer@obs-banyuls.fr](mailto:Ingrid.obernosterer@obs-banyuls.fr) (I. Obernosterer).

<https://doi.org/10.1016/j.ecss.2019.106448>

Received 6 May 2019; Received in revised form 18 September 2019; Accepted 18 October 2019

Available online 23 October 2019

0272-7714/© 2019 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Sempéré et al., 2000) and the associated enhanced biological activity in the estuary and adjacent waters has been documented during several previous field studies (Christaki et al., 2009; Joux et al., 2009; Lefevre et al., 1997; Pujo-Pay et al., 2006).

The hydrodynamics of the Rhone river plume are governed by atmospheric conditions, discharge volume and larger scale water mass circulation. When south-easterly winds predominate, the plume remains close to the coast, while north-westerly winds result in the extension of the Rhone river plume in a south-western direction (Demarcq and Wald, 1984). Intrusions of Rhone river water were detected in 5–20% of a 4-year bi-monthly survey in the Bay of Marseille (Frayse et al., 2014), indicating that these events are frequent phenomena in the coastal Mediterranean Sea. Diluted structures with low salinity waters (LSW) detached from the Rhone river plume can be transferred to open waters (Barrier et al., 2016; Diaz et al., 2008; Nencioli et al., 2011; Petrenko et al., 2017). Under conditions of north-westerly winds and in combination with a persistent slope current along the shelf break of the Gulf of Lion (Northern Current (Raimbault and de Madron, 2003)), these LSW can be directed south-west (Fig. 1). The transit of these buoyant water masses can last up to 3 weeks, and they can be transported over relatively long distances (Diaz et al., 2008), rendering the Gulf of Lion an appropriate site for the investigation of cross-shelf exchange (Petrenko et al., 2017).

The objective of the present study was to investigate whether these structures, referred to as lower salinity waters (LSW), represent a supply of biologically labile DOM to the offshore NW Mediterranean Sea. We addressed this question by observations at the time-series site MOLA (Microbial Observatory of the Laboratoire Arago) that is characterized by the recurrence of LSW at surface in spring (Fig. 1). The combined investigation of the temporal changes in environmental characteristics and microbial processes at Station MOLA provided insight on how

freshwater input through these physical features could affect biogeochemistry in the offshore Mediterranean Sea.

## 2. Material and methods

### 2.1. Regional hydrology and seasonality

Station MOLA is located on the edge of the continental shelf at the south-western boundary of the Gulf of Lion (42.454°N and 3.688°E) (bottom depth 600 m) in the NW Mediterranean Sea (Fig. 1). Surface waters of this site are influenced by a northern liguro-provençal current (Raimbault and de Madron, 2003) related to water masses from the Gulf of Lion and the Rhone river. The climatological mean over the past 15 years reveals that the presence of low salinity water (LSW) is a recurrent feature during spring periods at station MOLA (Fig. S2). On a seasonal cycle, Station MOLA is characterized by vertical mixing during winter leading to the input of inorganic nutrients to surface waters ( $\sim 1 \mu\text{M NO}_3^- + \text{NO}_2^-$ ,  $\sim 0.05 \mu\text{M PO}_4^{3-}$ ) (Table S1) that sustain the spring phytoplankton bloom. During the two years considered here, maximum concentrations of Chlorophyll *a* (Chl *a*; 0.75 and 0.85  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) (Fig. S3; Table S1) were observed in the upper 40 m in March 2007 and February 2008, respectively (Laghdass et al., 2010). During summer, the water column is thermally stratified (Fig. S4) and concentrations of inorganic nutrients are low ( $< 0.35 \mu\text{M NO}_3^- + \text{NO}_2^-$ ,  $\sim < 0.03 \mu\text{M PO}_4^{3-}$ ) in the surface mixed layer (10–30 m) and Chl *a* concentrations in surface waters remain  $< 0.2 \mu\text{g L}^{-1}$  (Laghdass et al., 2010) (Table S1).

### 2.2. Sample collection

Seawater was sampled between February 2007 and October 2008 on a monthly time scale except for the autumn-winter period when the

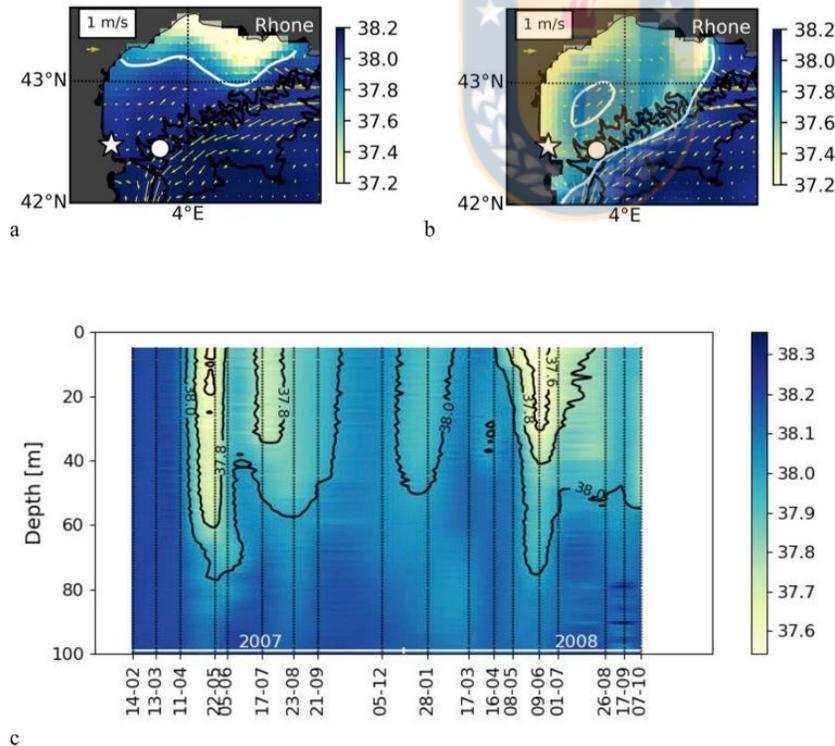


Fig. 1. Spatial and temporal distribution of salinity in the Gulf of Lion (NW Mediterranean Sea). Upper panels: Mean monthly surface salinity (4 km × 4 km) for February 2008 (left panel/a) and June 2008 (right panel/b) (February and May 2007 are shown in S1). Surface salinity distributions are provided by a circulation model overlaid with current speed and directions (yellow arrows), derived from altimetry for the date of sampling at Station MOLA (indicated by a white dot). Black lines represent isobaths (500 m, 1000 m and 2000 m). The white line denotes salinity of 37.85. Lower panel (c). Temporal changes of *in situ* salinity at Station MOLA measured during the years 2007 and 2008. Star indicates the location of Banyuls sur mer. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

sampling frequency was reduced due to bad weather conditions. Samples were collected in the upper 150 m water column with 12 L Niskin bottles mounted on a rosette equipped with a SeaBird SBE 19 CTD. For bacterial heterotrophic production, and the characterization of dissolved organic matter 8 depths in the upper 150 m were sampled. For the determination of microbial community respiration and net community production 6 depths in the euphotic layer were sampled (upper 80 m).

### 2.3. Bacterial heterotrophic production, microbial community respiration and net community production

We used ( $^3\text{H}$ ) leucine incorporation and the centrifugation method to determine bacterial heterotrophic production (BP) (Smith and Azam, 1992). The detailed protocol and data are reported in (Obernosterer et al., 2008; Laghdass et al., 2010). Bacterial growth rates (BGR) were determined by dividing BP by cell biomass derived from bacterial abundance. To convert abundance to biomass, we applied a conversion factor of  $12.4 \text{ fg C cell}^{-1}$  (Fukuda et al., 1998). We measured microbial community respiration (CR) and net community production (NCP) from changes in the concentration of dissolved oxygen ( $\text{O}_2$ ) in 24 h light and dark incubations as described in (Lefevre et al., 2008). Incubations were performed at Photosynthetically Active Radiation (PAR) levels of 1%, 4%, 8%, 25%, 50% and 100% of surface values, using optical density filters (Nickel screens). The outdoor incubators were connected with a running seawater system to maintain the incubation bottles at the temperature of the mixed layer. The 1% light depth was below the mixed layer depth during spring and summer with differences in temperature ranging between  $2^\circ\text{C}$  in May–June and up to  $5^\circ$  in August (Table S1). The measurements at time zero and all incubations were done in 8 replicate 125 mL borosilicate glass bottles. Dissolved  $\text{O}_2$  concentration was determined by spectrophotometric detection of iodine following the Winkler reaction, using a Hitachi U-3010 Spectrophotometer equipped with a sipper system (Labasque et al., 2004).

### 2.4. Dissolved organic carbon and total hydrolysable amino acids

Samples for dissolved organic carbon (DOC) and dissolved total hydrolysable amino acids (THAA) were filtered through two pre-combusted glass fiber filters (Whatman GF/F 25 mm,  $0.7 \mu\text{m}$  nominal pore size). Samples for DOC were acidified ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ , pH 2) and stored in pre-combusted glass tubes at room temperature in the dark until analysis. DOC was analyzed by high temperature catalytic oxidation (HTCO) technique (Benner and Strom, 1993) using a Shimadzu TOC-5000 analyzer.

THAA were analyzed by high performance liquid chromatography (HPLC) after liquid-phase acid hydrolysis according to a recent protocol described by (Escoubeyrou and Tremblay, 2014). This protocol uses a high volume ( $100 \mu\text{L}$ ) of undiluted samples injected on a robust hybrid C18 column. HPLC analyses were performed on an Ultimate 3000 Dionex system equipped with an autosampler and a fluorescence detector (excitation at  $335 \text{ nm}$ , emission at  $450 \text{ nm}$ ). The separation was done with a Phenomenex Gemini C18 column ( $250 \times 4.6 \text{ mm}$ ,  $5 \mu\text{m}$ ,  $110 \text{ \AA}$ ) and a Security Guard column ( $4 \times 3 \text{ mm}$ ). We used the Dauwe Degradation Index (DI (Dauwe and Middelburg, 1998),) calculated based on the relative distribution of individual AA and adapted for DOM (as reported in Peter et al., 2012, Davis et al., 2009; Kaiser and Benner, 2009) as an indicator for the degradation state of DOM. The original DI was calculated from Principal Component Analysis (PCA) applied to diagenetic altered sediments were  $\text{DI} = \sum ((\text{mol}\% \text{ amino acid} - \text{average mol}\% \text{ amino acid}) / \text{standard deviation mol}\%) * \text{PCA amino acid score}$ .

## 3. Results and discussion

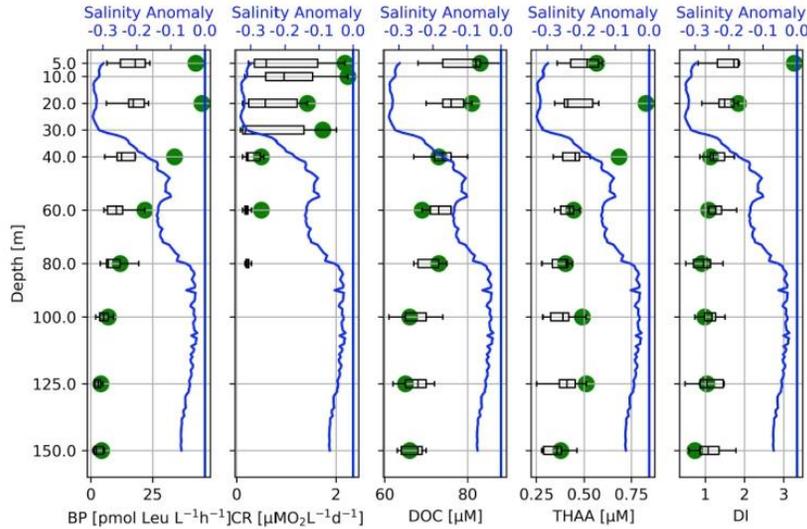
To investigate whether LSW revealed a specific biogeochemical signature at Station MOLA, we compared the depth profiles of microbial heterotrophic activity and of the DOM characteristics at the dates of the

most pronounced salinity anomalies during the observation period (May 22, 2007 and June 9, 2008) with those of the annual medians (Fig. 2).

The extent of the salinity anomalies of about  $-0.3$  was similar in both years, but lower salinity waters were present to 60 m in 2007 and constrained to the upper 30 m in 2008. The annual median values of BP varied between 10 and  $20 \text{ pmol Leu L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  in the upper 60 m water column and they were below  $5 \text{ pmol Leu L}^{-1} \text{ h}^{-1} \geq 100 \text{ m}$  for both years. During LSW, rates of BP were 2–4 times higher than the annual medians in the upper 40 m water column, a pattern that was particularly pronounced in 2008. Annual medians of CR varied between 0.5 and  $1 \mu\text{mol O}_2 \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$  in the upper 40 m water column and they were  $<0.5 \mu\text{mol O}_2 \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$  below this depth. During LSW in 2008, rates of CR were up to 3-fold higher than the annual median, while differences were minor in 2007. In addition, bacterial growth rates revealed highest values ( $0.17\text{--}0.26 \text{ d}^{-1}$ ) during the LSW of both years (Table S1). These observations indicate a signature of enhanced microbial heterotrophic activity within LSW that was more pronounced in 2008 than in 2007, possibly due to a stronger dilution with surrounding water masses during our first year of observation.

To link these observations to the characteristics of DOM, we considered bulk DOC, the concentration of dissolved THAA and the DI (Fig. 2). Annual medians of bulk DOC concentrations varied between  $60 \mu\text{M}$  and  $80 \mu\text{M}$  in the upper 150 m water column. In surface waters, we did not observe any pronounced differences between the annual medians and LSW. This is most likely due to the high DOC concentrations in surface waters during summer observed at our study site (Laghdass et al., 2010). The accumulation of DOC in stratified surface waters during summer is a recurrent phenomenon reported for Mediterranean waters (Avril, 2002; Romera-Castillo et al., 2010; Sánchez-Pérez et al., 2016) and other oligotrophic oceans (for BATS- (Carlson et al., 2002); for HOTS- (Church et al., 2002)). Inorganic nutrient limitation of heterotrophic microbes has been suggested as the underlying mechanism for the observed build-up of DOC in stratified surface waters (Thingstad and Rassoulzadegan, 1999). This idea is supported by short-term (24 h) incubation experiments performed at our study site revealing that labile organic carbon and phosphorus were the main limiting factors of BP during summer (Laghdass et al., 2012).

Amino acids represent a quantitatively significant and biologically labile fraction of DOM, and temporal or spatial changes of this pool can therefore provide insights to modifications of DOM characteristics (Davis et al., 2009; Kaiser and Benner, 2012). The concentrations of dissolved THAA varied between 262 and  $1027 \text{ nM}$ , with higher concentrations in the upper 40 m. Within LSW in 2008, THAA concentrations were up to 2-fold higher than the annual median, a pattern that was absent in 2007 (Fig. 2 and Fig. S5). The contribution of dissolved THAA to DOC, referred to as the amino acid yield, varied between 1.4 and 5.6% in the upper 150 m water column. The depth profiles of the amino acid yields during the LSW events were similar to those observed for dissolved THAA (data not shown). The DI is a chemical based indicator of the degradation state of organic matter, using the relative distribution of individual amino acids (Dauwe and Middelburg, 1998). Over the course of organic matter degradation, certain amino acids are selectively utilized resulting in a decrease of the DI (Dauwe et al., 1999). Based on the amino acid composition of marine plankton and sediment organic matter from varying depth layers, the DI was initially proposed to characterize the degradation stage of particulate organic matter. Its application has been extended to DOM in a range of marine (Amon et al., 2001; Davis et al., 2009; Tremblay et al., 2015; Kaiser and Benner, 2009) and freshwater environments (Ylla et al., 2011; Peter et al., 2012), with values ranging from  $-3$  to  $+5$ . The observed decreases in the DI over the course of biodegradation experiments further suggest this index to reflect changes in DOM bioavailability (Amon et al., 2001; Rochelle-Newall et al., 2004). At Station MOLA, the annual median DI varied between 1 and 1.5 and no pronounced depth profile was detectable over the 150 m water column. These positive values are indicative of overall diagenetically fresh DOM (Davis et al., 2009; Kaiser and Benner, 2009;

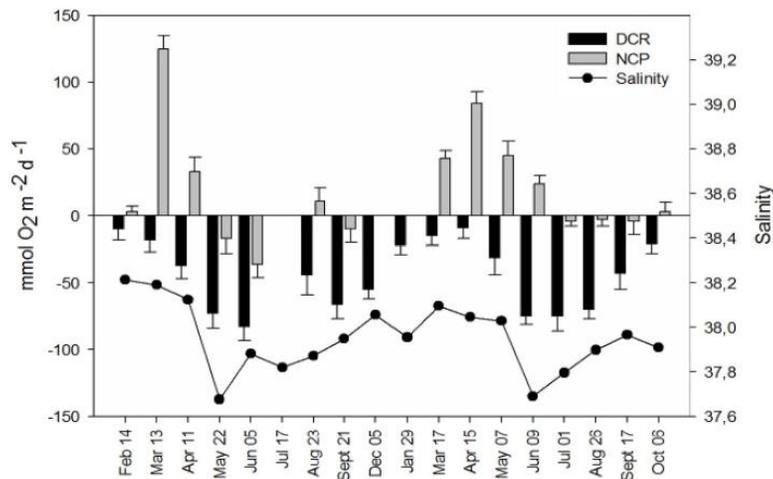


**Fig. 2.** Depth profiles of salinity anomaly (blue line), microbial activity and DOM characteristics (box plots) at Station MOLA for the year 2008. The black lines across the boxes represent the median annual values. The ends of the boxes define the 25th and 75th percentile and the error bars represent the 10th and 90th percentiles. Dots represent the individual value for the date for which the salinity anomaly is shown (June 9, 2008). Results for 2007 are shown in Fig. S5. BP: Bacterial heterotrophic production ( $\text{pmol Leu L}^{-1} \text{h}^{-1}$ ), CR: Community Respiration ( $\mu\text{M O}_2 \text{L}^{-1} \text{d}^{-1}$ ), DOC: Dissolved Organic Carbon ( $\mu\text{M}$ ), THAA: Total Hydrolyzable Amino Acids ( $\mu\text{M}$ ), DI: Dauwe Degradation Index. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

Peter et al., 2012). In LSW, the DI was noticeably higher in the upper 20 m as compared to the respective average median values in both years (Fig. 2 and Fig. S5). Thus, DOM in the uppermost water layer of LSW had a different chemical signature that is indicative of more bioavailable DOM. Complementary to the analyses illustrated in Fig. 2, we carried out a Principal Component Analysis (PCA) with the combined biogeochemical and microbial parameters of the two years from surface waters (5 m) (Fig. S6). The PCA analysis revealed one group consisting of samples from May and June from both years being explained by variables of microbial activity (BP,  $r = 0.85$ ; CR,  $r = 0.77$ ; BGR,  $r = 0.88$ ) and features of DOM (dissolved THAA concentration,  $r = 0.48$ ; amino acid yields,  $r = 0.21$ ; DI,  $r = 0.52$ ) that were positively correlated with PC1. By contrast, this group was also explained by salinity, which was negatively correlated with PC1 ( $r = -0.81$ ). Taken together, these results suggest that LSW contains bioavailable DOM that sustains enhanced microbial heterotrophic activity in the offshore NW Mediterranean Sea.

This observation raises the question of the origin of the DOM within

LSW. The LSW that we observe at Station MOLA most likely originate from the Rhone River and its plume (Fig. 1). The pronounced pattern observed within LSW could be due to an enrichment in compounds from recent primary production occurring in the vicinity of the estuary (Diaz et al., 2008) and in small amounts of riverine, terrigenous DOM. Besides these sources that can be considered allochthonous to our study site, *in situ* primary production within the LSW could fuel the observed enhanced microbial activity. To address this question we followed the pattern in euphotic depth integrated fluxes of net community production (NCP) and CR. Highest fluxes of NCP were observed in March and April in both years, corresponding to the spring bloom period (Fig. 3). During the LSW in May and June 2007, NCP was negative and associated with highest depth-integrated fluxes of CR, illustrating a switch from net autotrophy in March and April to net heterotrophy in May and June 2007. During the LSW event in 2008, euphotic layer integrated fluxes of CR were again enhanced and associated with low positive (June 2008) and negative (July 2008) fluxes of NCP (Fig. 3). These NCP fluxes



**Fig. 3.** Euphotic depth integrated fluxes of Net Community Production (NCP) and Community Respiration (CR) and salinity at 5 m depth. Results are shown for 2007 (February 14 to December 5) and 2008 (January 29 to October 6).

indicate low *in situ* primary production in LSW. The depletion in nitrate and phosphate in LSW (Table S1) could be the limiting factor of autotrophic activity, while heterotrophs can utilize these elements in organic form. These results support the idea that heterotrophic microbial processes are favored as compared to autotrophic processes within these buoyant water masses, suggesting that external rather than *in situ* produced DOM sustains heterotrophic activity.

Our observations from a time-series site in the NW Mediterranean Sea extend previous studies within LSW lenses in close vicinity to the Rhone river estuary and they provide insights on how biological activity in these water masses could change with time and distance from its origin. Direct measurements and satellite observations report increased autotrophic productivity in coastal LSW lenses as compared to surrounding marine waters (Auger et al., 2011; Diaz et al., 2008), and the high NCP determined *in situ* (Joux et al., 2009) suggests net autotrophy of the system in the vicinity of the estuary. With increasing distance from the plume and time since formation, inorganic nutrients are depleted and primary production is based on regenerated nutrients (Diaz et al., 2008). This suggests a scenario where autotrophic processes dominate in early stages of LSW and heterotrophic processes become more important with distance and time.

Primary production in coastal marine environments and export of terrigenous DOC are potential sources of organic carbon for the open oligotrophic ocean (Smith and Mackenzie, 1987; Bauer and Druffel, 1998; Medeiros et al., 2015) and proposed transport mechanisms are physical features such as for example mesoscale eddies, internal waves or currents. The resulting spatio-temporal decoupling between the origin of organic matter in the coastal zone and its respiration in open waters was suggested to explain in part the imbalance between primary production and respiration in the oligotrophic ocean (Duarte et al., 2013; Williams et al., 2013). The LSW could represent this linkage in the NW Mediterranean Sea. In addition to recent and *in situ* primary production, photochemical transformations of DOM could be an important mechanism in providing bioavailable substrates in these buoyant surface water masses in particular when compounds of terrigenous origin are present (Abboudi et al., 2008; Amon and Benner, 1996; Obernosterer and Hemdl, 2000). The combination of a suite of tools including satellite-based and autonomous instrumentation offers the possibility for a more detailed characterization and adapted sampling strategy of these mesoscale features at different locations in the open ocean. Taken together, our study illustrates the potential of water masses of estuarine origin to affect biological activity in the offshore oligotrophic ocean. The extension, lifetime and occurrence of these types of buoyant water masses will govern their impact on marine biogeochemistry and ecosystem functioning at different scales and distances from shore.

#### Declaration of competing interest

None.

#### Acknowledgements

We thank the captain and the crew of the *R/V Nereis* for their support aboard and the members of the Service d'Observation de l'Observatoire Océanologique in Banyuls for their help in sample collection. We are grateful to Louise Oriol and Jocelyne Caparros for their enthusiastic participation to the cruises to Station MOLA. We thank Karine Escoubeyrou from the platform Bio2Mar for the amino acid analyses. L. Zudaire provided the CTD profiles for all cruises. We thank 3 anonymous reviewers for their insightful comments on a previous version of the manuscript. This work was conducted as part of the national project MEDEA (INSU-LEFE-CYBER). This work is part of the PhD thesis of M.L. Gonzalez. M.L. González was funded by the National Doctorate Scholarship (CONICYT-Chile), INCAR (FONDAP 15110027), and LIA-MOR-FUN (LIA 1035). We also thank to Patricio Torres and Angel Rain for their help in the construction of some supplementary figures. Salinity

data are from Copernicus and *in situ* data are available online (<http://www.obs-vlfr.fr/proof/index2.php>).

#### Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2019.106448>.

#### References

- Abboudi, M., Jeffrey, W., Ghiglione, J.-F., Pujo-Pay, M., Oriol, L., Sempere, R., Charriere, B., Joux, F., 2008. Effects of photochemical transformations of dissolved organic matter on bacterial metabolism and diversity in three contrasting coastal sites in the Northwestern Mediterranean Sea during summer. *Microb. Ecol.* 55 (2), 344–357.
- Amon, R., Benner, R., 1996. Photochemical and microbial consumption of dissolved organic carbon and dissolved oxygen in the Amazon River system. *Geochem. Cosmochim. Acta* 60 (10), 1783–1792.
- Amon, R.M., Fitznar, H.-P., Benner, R., 2001. Linkages among the bioreactivity, chemical composition, and diagenetic state of marine dissolved organic matter. *Limnol. Oceanogr.* 46 (2), 287–297.
- Auger, P., Diaz, F., Ulses, C., Estournel, C., Neveux, J., Joux, F., Pujo-Pay, M., Naudin, J., 2011. Functioning of the planktonic ecosystem on the Gulf of Lions shelf (NW Mediterranean) during spring and its impact on the carbon deposition: a field data and 3-D modelling combined approach. *Biogeosciences* 8 (11), 3231–3261.
- Avril, B., 2002. DOC dynamics in the northwestern Mediterranean Sea (DYFAMED site). *Deep Sea Res. Part II Top. Stud. Oceanogr.* 49 (11), 2163–2182.
- Barrier, N., Petrenko, A.A., Ourmières, Y., 2016. Strong intrusions of the Northern Mediterranean Current on the eastern Gulf of Lion: insights from in-situ observations and high resolution numerical modelling. *Ocean Dyn.* 66 (3), 313–327.
- Bauer, J.E., Druffel, E.R., 1998. Ocean margins as a significant source of organic matter to the deep open ocean. *Nature* 392 (6675), 482.
- Benner, R., Strom, M., 1993. A critical evaluation of the analytical blank associated with DOC measurements by high-temperature catalytic oxidation. *Mar. Chem.* 41 (1–3), 153–160.
- Bianchi, T.S., 2011. The role of terrestrially derived organic carbon in the coastal ocean: a changing paradigm and the priming effect. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108 (49), 19473–19481.
- Bianchi, T.S., Filley, T., Dria, K., Hatcher, P.G., 2004. Temporal variability in sources of dissolved organic carbon in the lower Mississippi River. *Geochem. Cosmochim. Acta* 68 (5), 959–967.
- Bosc, E., Bricaud, A., Antoine, D., 2004. Seasonal and interannual variability in algal biomass and primary production in the Mediterranean Sea, as derived from 4 years of SeaWiFS observations. *Glob. Biogeochem. Cycles* 18 (1).
- Carlson, C.A., Giovannoni, S.J., Hansell, D.A., Goldberg, S.J., Parsons, R., Otero, M.P., Veagin, K., Wheeler, B.R., 2002. Effect of nutrient amendments on bacterioplankton production, community structure, and DOC utilization in the northwestern Sargasso Sea. *Aquat. Microb. Ecol.* 30 (1), 19–36.
- Church, J., M., Ducklow W., H., Karl M., D., et al., 2002. Multiyear increases in dissolved organic matter inventories at Station ALOHA in the North Pacific Subtropical Gyre. *Limnology and Oceanography* 47 (1), 1–10.
- Cole, J.J., Prairie, Y.T., Caraco, N.F., McDowell, W.H., Tranvik, L.J., Striegl, R.G., Duarte, C.M., Kortelainen, P., Downing, J.A., Middelburg, J.J., 2007. Plumbing the global carbon cycle: integrating inland waters into the terrestrial carbon budget. *Ecosystems* 10 (1), 172–185.
- Christaki, U., Courties, C., Joux, F., Jeffrey, W.H., Neveux, J., Naudin, J.-J., 2009. Community structure and trophic role of ciliates and heterotrophic nanoflagellates in Rhone River diluted mesoscale structures (NW Mediterranean Sea). *Aquat. Microb. Ecol.* 57 (3), 263–277.
- Dagg, M., Benner, R., Lohrenz, S., Lawrence, D., 2004. Transformation of dissolved and particulate materials on continental shelves influenced by large rivers: plume processes. *Cont. Shelf Res.* 24 (7–8), 833–858.
- Dauwe, B., Middelburg, J.J., 1998. Amino acids and hexosamines as indicators of organic matter degradation state in North Sea sediments. *Limnol. Oceanogr.* 43 (5), 782–798.
- Dauwe, B., Middelburg, J.J., Herman, P.M., Heip, C.H., 1999. Linking diagenetic alteration of amino acids and bulk organic matter reactivity. *Limnol. Oceanogr.* 44 (7), 1809–1814.
- Davis, J., Kaiser, K., Benner, R., 2009. Amino acid and amino sugar yields and compositions as indicators of dissolved organic matter diagenesis. *Org. Geochem.* 40 (3), 343–352.
- de Madron, X.D., Guieu, C., Sempere, R., Conan, P., Cossa, D., D'Ortenzio, F., Estournel, C., Gazeau, F., Rabouille, C., Stemmann, L., 2011. Marine ecosystems' responses to climatic and anthropogenic forcings in the Mediterranean. *Prog. Oceanogr.* 91 (2), 97–166.
- Demarq, H., Wald, L., 1984. La dynamique superficielle du panache du Rhône d'après l'imagerie infrarouge satellitaire. *Oceanol. Acta* 7 (2), 159–162.
- Diaz, F., Naudin, J.-J., Courties, C., Rimmelin, P., Oriol, L., 2008. Biogeochemical and ecological functioning of the low-salinity water lenses in the region of the Rhone River freshwater influence, NW Mediterranean Sea. *Cont. Shelf Res.* 28 (12), 1511–1526.
- Duarte, C.M., Regaudie-de-Gioux, A., Arrieta, J.M., Delgado-Huertas, A., Agusti, S., 2013. The oligotrophic ocean is heterotrophic. *Ann. Rev. Mar. Sci.* 5, 551–569.

- Escoubeyrou, K., Tremblay, L., 2014. Quantification of free, dissolved combined, particulate, and total amino acid enantiomers using simple sample preparation and more robust chromatographic procedures. *Limnol. Oceanogr. Methods* 12 (7), 421–431.
- Fichot, C.G., Benner, R., 2014. The fate of terrigenous dissolved organic carbon in a river-influenced ocean margin. *Glob. Biogeochem. Cycles* 28 (3), 300–318.
- Frame, E.R., Lessard, E.J., 2009. Does the Columbia River plume influence phytoplankton community structure along the Washington and Oregon coasts? *J. Geophys. Res.: Oceans* 114 (C2).
- Frayse, M., Paireaud, I., Ross, O.N., Faure, V.M., Pinazo, C., 2014. Intrusion of Rhone River diluted water into the Bay of Marseille: generation processes and impacts on ecosystem functioning. *J. Geophys. Res.: Oceans* 119 (10), 6535–6556.
- Fukuda, R., Ogawa, H., Nagata, T., Koike, I., 1998. Direct determination of carbon and nitrogen contents of natural bacterial assemblages in marine environments. *Appl. Environ. Microbiol.* 64 (9), 3352–3358.
- Hedges, J., Keil, R., Benner, R., 1997. What happens to terrestrial organic matter in the ocean? *Org. Geochem.* 27 (5–6), 195–212.
- Iriarte, J.L., Vargas, C.A., Tapia, F.J., Bermúdez, R., Urrutia, R.E., 2012. Primary production and plankton carbon biomass in a river-influenced upwelling area off Concepción, Chile. *Prog. Oceanogr.* 92, 97–109.
- Joux, F., Jeffrey, W.H., Abboudi, M., Neveux, J., Pujo-Pay, M., Oriol, L., Naudin, J.J., 2009. Ultraviolet radiation in the rhone river lenses of low salinity and in marine waters of the northwestern mediterranean sea: attenuation and effects on bacterial activities and net community production. *Photobiol.* 85 (3), 783–793.
- Kaiser, K., Benner, R., 2009. Biochemical composition and size distribution of organic matter at the Pacific and Atlantic time-series stations. *Mar. Chem.* 113 (1–2), 63–77.
- Kaiser, K., Benner, R., 2012. Organic matter transformations in the upper mesopelagic zone of the North Pacific: chemical composition and linkages to microbial community structure. *J. Geophys. Res.: Oceans* 117 (C1).
- Krom, M., Kress, N., Brenner, S., Gordon, L., 1991. Phosphorus limitation of primary productivity in the eastern Mediterranean Sea. *Limnol. Oceanogr.* 36 (3), 424–432.
- Labasque, T., Chaumery, C., Aminot, A., Kergoat, G., 2004. Spectrophotometric Winkler determination of dissolved oxygen: re-examination of critical factors and reliability. *Mar. Chem.* 88 (1–2), 53–60.
- Laghdass, M., West, N.J., Batailler, N., Caparros, J., Catala, P., Lantoiné, F., Oriol, L., Lebaron, P., Obernosterer, I., 2010. Impact of lower salinity waters on bacterial heterotrophic production and community structure in the offshore NW Mediterranean Sea. *Environ. Microbiol. Rep.* 2 (6), 761–769.
- Laghdass, M., Catala, P., Caparros, J., Oriol, L., Lebaron, P., Obernosterer, I., 2012. High contribution of SAR11 to microbial activity in the north west Mediterranean Sea. *Microb. Ecol.* 63 (2), 324–333.
- Lefevre, D., Minas, H., Minas, M., Robinson, C., Williams, P.L.B., Woodward, E., 1997. Review of gross community production, primary production, net community production and dark community respiration in the Gulf of Lions. *Deep Sea Res. Part II Top. Stud. Oceanogr.* 44 (3–4), 801–832.
- Lefevre, D., Guigue, C., Obernosterer, I., 2008. The metabolic balance at two contrasting sites in the Southern Ocean: the iron-fertilized Kerguelen area and HNLC waters. *Deep Sea Res. Part II Top. Stud. Oceanogr.* 55 (5–7), 766–776.
- Liu, H., Dagg, M., Campbell, L., Urban-Rich, J., 2004. Picoplankton and bacterioplankton in the Mississippi River plume and its adjacent waters. *Estuaries* 27 (1), 147–156.
- Ludwig, W., Dumont, E., Meybeck, M., Heussner, S., 2009. River discharges of water and nutrients to the Mediterranean and Black Sea: major drivers for ecosystem changes during past and future decades? *Prog. Oceanogr.* 80 (3–4), 199–217.
- McGill, 1965. The relative supplies of phosphate, nitrate and silicate in the Mediterranean sea. *Rapp. P. V. Réun. Comm. Int. Exp. Sci. Mer. Médit* 18, 737–744.
- Medeiros, P.M., Babcock-Adams, L., Seidel, M., Castela, R.M., Di Iorio, D., Hollibaugh, J.T., Dittmar, T., 2017. Export of terrigenous dissolved organic matter in a broad continental shelf. *Limnol. Oceanogr.* 62 (4), 1718–1731.
- Medeiros, P.M., Seidel, M., Ward, N.D., Carpenter, E.J., Gomes, H.R., Niggemann, J., Krusche, A.V., Richey, J.E., Yager, P.L., Dittmar, T., 2015. Fate of the Amazon river dissolved organic matter in the tropical atlantic ocean. *Glob. Biogeochem. Cycles* 29 (5), 677–690.
- Naudin, J., Cauwet, G., 1997. Transfer mechanisms and biogeochemical implications in the bottom nepheloid layer. A case study of the coastal zone off the Rhone River (France). *Deep Sea Res. Part II: Top. Stud. Oceanogr.* 44 (3–4), 551–575.
- Nencioli, F., d'Ovidio, F., Doglioli, A., Petrenko, A., 2011. Surface coastal circulation patterns by in-situ detection of Lagrangian coherent structures. *Geophys. Res. Lett.* 38 (17).
- Obernosterer, I., Christaki, U., Lefevre, D., Catala, P., Van Wambeke, F., Lebaron, P., 2008. Rapid bacterial mineralization of organic carbon produced during a phytoplankton bloom induced by natural iron fertilization in the Southern Ocean. *Deep Sea Res. Part II Top. Stud. Oceanogr.* 55 (5–7), 777–789.
- Obernosterer, I., Herndl, G.J., 2000. Differences in the optical and biological reactivity of the humic and nonhumic dissolved organic carbon component in two contrasting coastal marine environments. *Limnol. Oceanogr.* 45 (5), 1120–1129.
- Opsahl, S., Benner, R., 1997. Distribution and cycling of terrigenous dissolved organic matter in the ocean. *Nature* 386 (6624), 480.
- Peter, S., Shen, Y., Kaiser, K., Benner, R., Durisch-Kaiser, E., 2012. Bioavailability and diagenetic state of dissolved organic matter in riparian groundwater. *J. Geophys. Res.: Biogeosciences* 117 (G4).
- Petrenko, A.A., Doglioli, A.M., Nencioli, F., Kersalé, M., Hu, Z., d'Ovidio, F., 2017. A review of the LATEX project: mesoscale to submesoscale processes in a coastal environment. *Ocean Dyn.* 67 (3–4), 513–533.
- Pujo-Pay, M., Conan, P., Joux, F., Oriol, L., Naudin, J.J., Cauwet, G., 2006. Impact of phytoplankton and bacterial production on nutrient and DOM uptake in the Rhône River plume (NW Mediterranean). *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 315, 43–54.
- Raimbault, P., de Madron, X.D., 2003. Research activities in the Gulf of Lion (NW Mediterranean) within the 1997–2001 PNOC project. *Oceanol. Acta* 26 (4), 291–298.
- Raymond, P.A., Spencer, R.G., 2015. 'Riverine DOM'. *Biogeochemistry of Marine Dissolved Organic Matter*. Elsevier, pp. 509–533.
- Rochelle-Newall, E.J., Pizay, M.D., Middelburg, J.J., Boschker, H.T., Gattuso, J.P., 2004. Degradation of riverine dissolved organic matter by seawater bacteria. *Aquat. Microb. Ecol.* 37 (1), 9–22.
- Romera-Castillo, C., Sarmiento, H., Alvarez-Salgado, X.A., Gasol, J.M., Marrasé, C., 2010. Production of chromophoric dissolved organic matter by marine phytoplankton. *Limnol. Oceanogr.* 55 (1), 446–454.
- Sánchez-Pérez, E.D., Marín, I., Nunes, S., Fernández-González, L., Peters, F., Pujo-Pay, M., Conan, P., Marrasé, C., 2016. Aerosol inputs affect the optical signatures of dissolved organic matter in NW Mediterranean coastal waters. *Sci. Mar.* 80 (4), 437–446.
- Sempere, R., Yoro, S.C., Van Wambeke, F., Charrière, B., 2000. Microbial decomposition of large organic particles in the northwestern Mediterranean Sea: an experimental approach. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 198, 61–72.
- Smith, D.C., Azam, F., 1992. A simple, economical method for measuring bacterial protein synthesis rates in seawater using 3H-leucine. *Mar. Microb. Food Webs* 6 (2), 107–114.
- Smith, S.V., Mackenzie, F.T., 1987. The ocean as a net heterotrophic system: implications from the carbon biogeochemical cycle. *Glob. Biogeochem. Cycles* 1 (3), 187–198.
- Thingstad, T.F., Rassoulzadegan, F., 1999. Conceptual models for the biogeochemical role of the photic zone microbial food web, with particular reference to the Mediterranean Sea. *Prog. Oceanogr.* 44 (1–3), 271–286.
- Tremblay, L., Caparros, J., Leblanc, K., Obernosterer, I., 2015. Origin and fate of particulate and dissolved organic matter in a naturally iron-fertilized region of the Southern Ocean. *Biogeosciences* 12, 607–621.
- Williams, P.J.L.B., Quay, P.D., Westberry, T.K., Behrenfeld, M.J., 2013. The oligotrophic ocean is autotrophic. *Ann. Rev. Mar. Sci.* 5, 535–549.
- Ylla, I., Sanpera-Calbet, I., Muñoz, I., Román, A.M., Sabater, S., 2011. Organic matter characteristics in a Mediterranean stream through amino acid composition: changes driven by intermittency. *Aquat. Sci.* 73 (4), 523.

## 4.2. Capítulo 2: “Biodisponibilidad de la materia orgánica disuelta derivada de la acuicultura y su efecto en el metabolismo microbiano de la columna de agua”

Manuscrito en preparación para ser enviado a la revista *Frontiers* (I.F.:5,2):

González M. L., Fuentes M. E., Pantoja-Gutiérrez S. y Quiñones R.A. (*in prep.*) Bioavailability of dissolved organic matter derived from aquaculture and its effect on microbial metabolism of the water column

### Resumen

La acuicultura introduce materia orgánica alóctona a la columna de agua, principalmente a través de alimento no consumido y fecas de peces (salmonicultura) y de fecas y pseudofecas (mitilicultura). Esta investigación identifica patrones ambientales asociadas a la acuicultura y respuestas metabólicas microbianas al *input* de materia orgánica disuelta (DOM) derivada de la salmonicultura. Se evaluaron parámetros químicos y biológicos a distintas distancias de un centro de cultivo de salmones y de un centro de cultivo de mitílidos mediante un muestreo oceanográfico en el Canal Caucahué. Las características de la DOM derivada de la salmonicultura y su impacto sobre la respiración y actividad enzimática extracelular (EEA) se evaluó a través de experimentos con adición de DOM de pellets (P-DOM), de fecas (F-DOM), DOM natural (N-DOM) y DOM-mezcla (M-DOM), en 2 fracciones de tamaño de la comunidad microbiana ambiental ( $<1\mu\text{m}$  y  $<100\mu\text{m}$ ). Observamos que mayores concentraciones de amonio, nitrógeno y fósforo orgánico disuelto, aminoácidos libres, proteínas disueltas y un mayor DI (Índice de degradación) caracterizaron las cercanías de las balsas jaulas y en menor medida a las cuelgas de mitílidos. Mayores tasas metabólicas se observaron en los tratamientos enriquecidos. Las tasas específicas de respiración fueron variables en la fracción  $<1\mu\text{m}$ , sin embargo, se observaron incrementos significativos ( $\approx 100\%$ ) en P, F y M-DOM, y en la fracción  $<100\mu\text{m}$  se observó una marcada influencia de P-DOM ( $\approx 1000\%$ ). La actividad específica de MDH de ambas fracciones mostró incrementos significativos F- y M-DOM ( $\approx 1000\%$ ). La EEA en ambas fracciones mostró incrementos notables en F- y M-DOM con máximos para

aminopeptidasa (10000%), seguido de glucosidasa (1200%) y lipasa (900%). Esto concuerda con las características de DOM y con el DI observado. Este estudio demuestra que la DOM derivada de la acuicultura es altamente lábil, lo cual incrementa la actividad metabólica microbiana de las comunidades que habitan en áreas cercanas a cultivos de salmónidos, generando un potencial impacto en la biogeoquímica del cuerpo de agua receptor.

Palabras clave: acuicultura, materia orgánica disuelta, biodisponibilidad, aminoácidos, metabolismo microbiano.



## 1. Introducción

La Patagonia chilena tiene una intrincada geografía compuesta por islas, penínsulas, fiordos y canales (Silva y Palma, 2008), siendo constantemente influenciada por agua dulce proveniente de ríos, escorrentías, precipitación y glaciares (Pantoja *et al.*, 2011), las cuales son fuentes alóctonas de materia orgánica (MO). Estas zonas también reciben MO alóctona de origen antropogénico, debido al desarrollo de actividades humanas como la acuicultura, agricultura, y forestales, las cuales pueden alterar la “salud” del ecosistema (Iriarte, 2018). El desarrollo de la acuicultura, en particular del cultivo de salmónidos, ha aumentado significativamente en Chile, llegando a ser el 73% de la producción acuícola del país, posicionándolo como el segundo productor de salmónidos a nivel mundial, después de Noruega (FAO, 2018).

La acuicultura puede generar un alto impacto en el ambiente, dentro de los cuales, la carga de material orgánico (disuelto y particulado) en la columna de agua y en los sedimentos es una de los más importantes (Haya *et al.*, 2001; Soto y Norambuena 2004; Buschmann *et al.*, 2009; Caruso, 2014; Quiñones *et al.*, 2019), siendo el impacto en la columna de agua de los menos estudiados hasta el momento. La carga orgánica derivada del cultivo de salmones está dada principalmente por restos de alimento no consumido y fecas de los peces confinados en balsas jaulas (Burrige *et al.*, 2010), además de la excreción y mucus (Molina y Fernández, 2020). Por su parte, el cultivo de mitílidos induce una intensa biodepositación de materia orgánica en los sedimentos, dada principalmente por, fecas, pseudofecas, y restos de los bivalvos (Chamberlain *et al.*, 2001; Kaal, 2018), lo cual estimula la demanda de oxígeno y la regeneración de nutrientes (Nizzoli *et al.*, 2005).

La DOM es el principal sustrato para la actividad heterotrófica de microorganismos marinos (Cole *et al.*, 1982; Azam *et al.*, 1983), en particular para bacterias y arqueas, como heterótrofos osmótrofos dominantes (Azam, 1998; del Giorgio y Cole, 1998; Hansell y Carlson, 2015). Además, en la última década el rol de los hongos marinos ha tomado importancia en la potencial utilización del DOM (Gutiérrez *et al.*, 2011; Feng *et al.*, 2012; Jones *et al.*, 2019; Priest *et al.*, 2020). El rol de los microorganismos en la degradación de la materia orgánica es crucial, ya que son el enlace entre la DOM y niveles tróficos superiores (Azam, 1998).

La principal fuente de DOM lábil es la producción primaria (PP) como origen autóctono (Azam *et al.*, 1983; Duclow *et al.*, 1995; Aristegui *et al.*, 2005; Azam y Malfatti, 2007). La DOM derivada de la PP puede generarse mediante diversos procesos tales como los exudados del fitoplancton, la digestión de protozoos y metazoos, la excreción y la *sloppy feeding* del zooplancton, transformaciones de la materia orgánica particulada (POM) por exoenzimas y la lisis celular (Nagata, 2000). La DOM lábil es consumida rápidamente en aguas superficiales con tasas de recambio de horas a días, constituyendo una pequeña porción de la DOM (menos del 1% del *pool* de carbono orgánico disuelto, DOC) (Nagata, 2008). No obstante, el consumo de DOM lábil por bacterias puede ser uno de los mayores flujos de energía, C y nutrientes en el ecosistema pelágico (Nagata, 2008).

La DOM desde los cultivos se libera indirectamente por la disolución de POM de desechos (e.g. alimento y fecas) (Navarro *et al.*, 2008), representando una potencial fuente altamente lábil de nutrientes para las bacterias heterotróficas (Navarro *et al.*, 2008; Olsen, 2014, 2017; Montero *et al.*, 2022). Law *et al.* (2014) señalan que el alcance de partículas finas provenientes de la salmonicultura puede llegar sobre 1 Km de distancia antes de depositarse en el fondo, tiempo y distancia durante el cual la DOM puede ser liberada a la columna de agua. Asimismo, Fernández-Jover *et al.* (2007) y Piedecausa *et al.* (2010) indican que la liberación de DOM es mayor y más rápida en las fecas de peces respecto a los pellets de alimento y que en ambos casos, comienza inmediatamente al entrar en contacto con el agua. Altas abundancias de comunidades planctónicas autótrofas y heterótrofas se han reportado en las cercanías de los centros de cultivo (La Rosa *et al.*, 2002; Sakami *et al.*, 2003; Pitta *et al.*, 2006) y en experimentos de microcosmos se ha observado hasta dos veces más producción bacteriana y actividad enzimática extracelular cuando se enriquece con alimento de peces (Montero *et al.*, 2022), lo que sugiere que la DOM derivada de la acuicultura intensiva es una fuente lábil de OM y puede potencialmente sostener una mayor actividad de la comunidad microbiana (Olsen *et al.*, 2014, 2017). Finalmente, los residuos de la acuicultura no solo afectan el área circundante, sino que también pueden alterar el ecosistema a diferentes niveles en la zona costera, reduciendo la biomasa, densidad y diversidad del bentos, plancton (incluyendo el bacterioplancton) y necton, modificando la trama trófica natural (Pillay, 1990; Gowen, 1991; Arvanitoyannis y Kassaveti,

2008; Olsen *et al.*, 2014, 2017; Molina y Fernández, 2020; Montero *et al.*, 2022), así como el estado trófico de los ecosistemas, pudiendo cambiar de predominantemente autotrófico (e.g. diatomeas) a uno heterotrófico (e.g. flagelados) (Thinstad *et al.*, 2010).

Los efectos de las actividades humanas como la acuicultura en la Patagonia chilena ha concentrado la atención científica en los últimos años (e.g. Iriarte *et al.*, 2018; Quiñones *et al.*, 2019). No obstante, aún es poco conocido cómo la fuente y/o composición de la materia orgánica puede influenciar el metabolismo de la comunidad microbiana. La intensa actividad acuícola en el sistema de fiordos y canales de la Patagonia Norte de Chile proveen escenarios naturales para estudiar la biodisponibilidad de la DOM derivada de la acuicultura y como responde el metabolismo (respiración y actividad enzimática) de las comunidades microbianas de la columna de agua a estas fuentes alóctonas de DOM.

## 2. Materiales y Métodos

### 2.1 Área de estudio y muestreo

Se utilizaron dos tipos de aproximaciones para analizar la calidad de DOM derivada de la acuicultura y su potencial efecto en el metabolismo microbiano durante el invierno austral de 2019: (i) un muestreo de transectas (junio) y (ii) un experimento de microcosmos con adición de DOM derivada de la salmonicultura (agosto). Ambos muestreos fueron organizados por el Centro Interdisciplinario para la Investigación Acuícola (INCAR), en el canal Caucahué (42° S; 73° W), ubicado en el mar interior de Chiloé, Región de Los Lagos, Chile (Fig.1).

Se realizaron dos transectas de 4 estaciones y 3 profundidades (2, 10 y 40/50m) dependiendo de la batimetría del lugar: (i) Transecta Salmones (TS); a lo largo del brazo norte del Canal Caucahué, con una estación Control (Cs) ubicada fuera de la boca del canal a 6 km de la concesión de acuicultura más cercana y 3 estaciones hacia un centro de cultivo de salmónidos a 2km (S1), 0,5km (S2) y 0km (S1), al interior del canal (Fig. 1 y Tabla 1); y (ii) Transecta Mitílicos (TM); a lo largo del brazo sur del Canal Caucahué, con una estación Control (Cm) ubicada fuera del canal y 3 estaciones hacia un centro de cultivo de mitílicos a 2km (M1), 0,5km (M2) y 0km (M1), al interior del canal (Fig.1 y Tabla 1). Las muestras de agua se colectaron

con una botella Niskin (10L) para el análisis de nutrientes, materia orgánica disuelta (DOM), clorofila-a, abundancia picoplanctónica, aminoácidos, actividad enzimática intracelular y biomasa. Para el experimento de microcosmos con adición de DOM, se colectó 300 L agua de 10m de la estación Cs. Los perfiles de temperatura y salinidad se obtuvieron con un CTD (Mínos X, AML Oceanographic).

## **2.2 Diseño experimental**

El agua colectada a 10m en la estación Cs fue tamizada por una malla de 100  $\mu\text{m}$  para remover organismos planctónicos grandes. El experimento incluyó un Control (sin adición de DOM) y 4 tratamientos con la adición de 200mL de DOM de: pellets (P-DOM), fecas (F-DOM), Natural (N-DOM) y Mezcla (M-DOM). Cada tratamiento de microcosmos consistió en un triplicado de bidones de 20L de alta densidad (lavados previamente con HCL 5%), incubados en oscuridad en una cámara fría a  $\sim 11^{\circ}\text{C}$ . Se realizó un sub-muestreo a 0, 6, 12, 24, 48 y 72 h para la medición de nutrientes, DOM, aminoácidos y abundancia celular. Se utilizaron dos fracciones de tamaño:  $>1 \mu\text{m}$  y  $>100\mu\text{m}$  (FTotal), para la estimación de biomasa (concentración de ATP) y la respuesta metabólica de la comunidad microbiana. Esta última consistió en la medición de la actividad enzimática intracelular malato deshidrogenasa (MDH), respiración aeróbica y actividad enzimática extracelular (EEA) de la leucina-aminopeptidasa,  $\beta$ -glucosidasa, y lipasa.

## **2.3 Preparación de soluciones de DOM**

Todas las soluciones se prepararon utilizando agua de mar proveniente de la estación Cs (filtrada por 0,7  $\mu\text{m}$  y esterilizada). Para la solución de pellets (P-DOM), se utilizó alimento de peces en formato pellets estándar de 6mm de calibre (Salmon Food®, dieta exploradora) sin medicación. 10g se molieron en un mortero y se adicionaron a 1 L de agua de mar, obteniendo una pre-solución de 10g/L. El vaso de vidrio (previamente muflado 4 h  $450^{\circ}\text{C}$  temperatura) con la pre-solución se mantuvo en un agitador magnético a 50 rpm por 4h. Finalmente, la pre-solución fue filtrada por una malla, de 25 $\mu\text{M}$  (para sacar partículas grandes no disueltas) y luego por un GFF de 0,7  $\mu\text{m}$  (muflado), la fase disuelta fue recuperada en botellas DS mufladas y

preservada a 4°C hasta su utilización. Para la solución de Fecas (F-DOM), se colectaron fecas desde peces cultivados (*Salmo salar*) en el laboratorio INCAR de la Estación de Biología Marina de la Universidad de Concepción en Dichato. Las fecas obtenidas se preservaron en tubos falcon estériles a -80°C, al momento de preparar la solución se utilizó 10g de fecas y se procedió de la misma forma descrita previamente. Para la solución natural (N-DOM) se filtraron 60 L de agua de agua de mar de 10m de la estación Cs en GFF de 0,7 µM con una bomba peristáltica, con tubos de silicona previamente lavados con HCL 5%. Los filtros obtenidos fueron preservados en nitrógeno líquido hasta el momento de preparar la solución. Para la obtención de la solución N-DOM, se molieron los filtros congelados en un mortero, luego el contenido se dispuso en tubos falcon estériles, con agua de mar filtrada y esterilizada, y se utilizó un Ultraturax para hacer una mayor disrupción mecánica de los filtros y la POM contenida en ellos. Posteriormente se utilizó un sonicador por 3h, utilizando hielo para evitar la elevación de la temperatura, luego se centrifugo a 2000 rpm por 5 min y se obtuvo el sobrenadante como solución de N-DOM en botellas de vidrio DS previamente mufladas. La solución de mezcla (M-DOM) se obtuvo mezclando 3 partes iguales del volumen de cada solución detallada previamente.

#### **2.4 Nutrientes y Materia Orgánica Disuelta.**

Se colectaron las muestras de amonio usando botellas Duran Schott de 50 mL y se analizaron según el método fluorométrico (Holmes *et al.*, 1999), usando un fluorómetro Turner Designs. Las muestras para la determinación de nitrato, nitrito y fosfato se filtraron a través de un GF/F de 0,7 µm y se almacenaron en tubos Falcon de 15 mL (-20 °C) hasta su análisis por el método colorimétrico estándar (Grasshoff *et al.*, 1983). Los análisis de nutrientes se realizaron con un autoanalizador de flujo segmentado Seal AA3 en el Laboratorio de Biogeoquímica del Departamento de Oceanografía de la Universidad de Concepción. Las muestras de DOM se filtraron a través de GF/F previamente muflado (Whatman, 25 mm, tamaño de poro nominal de 0,7 µm).

Las muestras de DOC se acidificaron con HCl fumante al 37 % y se almacenaron a temperatura ambiente en tubos de vidrio ámbar precalcificados en oscuridad hasta el análisis. La

concentración de DOC se determinó mediante la técnica de oxidación catalítica a alta temperatura (Benner y Strom, 1993), utilizando un analizador Shimadzu TOC-5000.

Las muestras para la determinación del contenido de nitrógeno y el fósforo orgánico disuelto (DON y DOP) se almacenaron (-20 °C) utilizando botellas Duran Schott de 25 ml precalcinados y se analizaron mediante el procedimiento de oxidación húmeda (Pujo-Pay y Raimbault, 1994). Las concentraciones de DON y DOP se corrigieron para  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NO}_2^-$  y  $\text{PO}_4^{3-}$ , respectivamente.

## 2.5 Identificación y cuantificación de aminoácidos disueltos

Las muestras de aminoácidos disueltos se filtraron a través de filtros de fibra de vidrio precalcinados (Whatman GF/F 25 mm, tamaño de poro nominal de 0,7  $\mu\text{m}$ ), almacenadas en un tubo de vidrio ámbar de 4 mL (previamente calcinado) y conservadas a -20 °C hasta su análisis.

Los aminoácidos se transformaron en derivados fluorescentes mediante o-ftaldialdehído (OPA) y 2-mercaptoetanol (Lindroth y Mopper, 1979; Pantoja y Lee, 1999), separados por UHPLC (Shimadzu/Nexera) utilizando un gradiente de acetato de sodio/metanol, y detectado por fluorescencia. Los picos de los productos fluorescentes se convirtieron a concentraciones con el estándar externo de aminoácidos (AA) Pierce N° 20088, que contiene ácido aspártico (asp), ácido glutámico (glu), serina (ser), histidina (his), glicina (gly), treonina (thr), arginina (arg), alanina (ala), tirosina (tyr), valina (val), metionina (met), fenilalanina (phe), isoleucina (ile) y leucina (leu). Los aminoácidos totales hidrolizables (THAA) se cuantificaron después de la hidrólisis química con HCl 7 N a 150 °C durante 2 h bajo  $\text{N}_2$  y se neutralizaron con KOH 6 N. Los aminoácidos libres disueltos (DFAA) se midieron sin hidrólisis química. Las proteínas disueltas o los aminoácidos combinados disueltos (DCAA) resultaron de la diferencia entre THAA y DFAA.

Utilizamos el índice de degradación de Dauwe (DI; Dauwe y Middelburg, 1998) calculado en base a la distribución relativa de los AA individuales de DCAA, adaptado para DOM (como se informa en Peter *et al.*, 2012; Davis *et al.*, 2009; Kaiser y Benner, 2009; González *et al.*, 2019) como indicador del estado de degradación de DOM. El DI original se calculó a partir del análisis de componentes principales (PCA) aplicado a sedimentos alterados diagenéticamente,

donde  $DI = \Sigma ((\text{mol \% de aminoácidos} - \text{mol \% de aminoácidos promedio}) / \text{desviación estándar mol \%}) * \text{puntuación de aminoácidos en el PCA}$ .

## 2.6 Clorofila-a

La concentración de clorofila-a se determinó mediante el método fluorométrico según Holm-Hansen et al. (1965), a partir de los extractos de 0,3 L de agua de mar filtrada a través de GF/F (Whatman, 25mm, 0,7- $\mu\text{m}$ ). La extracción se realizó con acetona al 90% y la fluorescencia se midió con un fluorómetro Trilogy (Turner Designs).

## 2.7 Abundancia Celular

Las muestras para la determinación de la abundancia de bacterioplancton, cianobacterias y piceocariotas se tomaron por duplicado (1350  $\mu\text{L}$  en crioviales estériles), se fijaron con 150  $\mu\text{L}$  de glutaraldehído al 1 % y se almacenaron a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  antes del análisis de laboratorio. Las muestras se analizaron por citometría de flujo (InFlux, Becton Dickinson) según Marie et al. (1999) y Thompson y Van de Engh (2016).

## 2.8 Adenosin trifosfato (ATP)

La concentración de ATP se utiliza como indicador de biomasa viva en estudios ecológicos de microorganismos acuáticos (Karl, 1993). La fracción de ATP requerida ( $<1\ \mu\text{m}$  y Total) se retuvo mediante un filtro Whatman GF/F. Se filtró 1 L de agua de mar y se almacenó en nitrógeno líquido hasta su análisis en el laboratorio. El ATP se cuantificó mediante un ensayo de bioluminiscencia (Holm-Hansen y Booth, 1966; Bulleid, 1978; Karl, 1993) utilizando un luminómetro (GloMax, Promega).

Dado que el ATP se usa como un indicador de la biomasa del microplancton, medimos las concentraciones de ATP fraccionadas por 1 y 100  $\mu\text{m}$ , y usamos el término “actividad específica” como unidades de “actividad/unidades de ATP” (González y Quiñones, 2009), para MDH, AEE y respiración aeróbica.

## 2.9 Actividad enzimática intracelular

Se analizó las actividades de las siguientes enzimas: piruvato oxidorreductasas (lactato deshidrogenasa, LDH; octopina deshidrogenasa, OPDH; alanopina deshidrogenasa, ALPDH y estrombina deshidrogenasa; STRDH), etanol deshidrogenasa (EtOHDH), malato deshidrogenasa (MDH) y citrato sintasa (CS) para el muestreo de transectas. En el caso del experimento de microcosmos solo se midió la actividad de MDH.

La máxima actividad de las piruvato oxidorreductasas (MPOR), corresponde a la suma de todas las piruvato oxidorreductasas, incluyendo EtOHDH. La actividad enzimática se midió siguiendo la versión descrita por González y Quiñones (2009), en base a la metodología propuesta por Schiedek (1997), Childress y Romero (1979) y Vetter *et al.* (1994).

## 2.10 Tasas de respiración aeróbica

La concentración de oxígeno se determinó con un medidor de oxígeno de fibra óptica (FIBOX 3, PreSens) con sensores Optode, en botellas de DBO de 12 mL, incubadas en oscuridad con temperatura controlada. Las tasas de respiración se calcularon mediante la pendiente de la concentración de oxígeno medida cada 2 a 4 h durante un período de 24 h según lo descrito en Fuentes *et al.* (2015), Garcés *et al.* (2020) y González *et al.*, (*submitted*).

## 2.11 Actividad Enzimática Extracelular (EEA)

La EEA se determinó siguiendo la metodología de Pantoja *et al.* (2011) y Gutiérrez *et al.* (2011), adaptada a microplacas (placas de 96 pocillos). Alícuotas de 200  $\mu$ L de agua de mar en triplicado se incubaron en oscuridad con l-leucina-4-metilcumarinil-7-amida (MCA-Leu), 4-metilumbeliferil-b-D-glucósido (MUF-Glu) y 4-metilumbeliferil-oleato (MUF- Ole) a 100  $\mu$ M (Hoppe, 1983). Los controles se corrieron con muestras de agua de mar previamente hervidas durante 10 min. Se midió la fluorescencia cada 1 h durante 6 h, usando un lector de microplacas multimodo Synergy<sup>TM</sup> 2 (Biotek; excitación 365 nm, emisión 455 nm) (Hoppe, 1983). Se construyeron l curvas de calibración midiendo la fluorescencia en agua de mar con los productos de hidrólisis MCA y MUF en concentraciones que oscilan entre 0,1 y 2  $\mu$ M. Las tasas se calcularon según lo descrito por Pantoja y Lee (1994).

## 2.12 Análisis estadístico

Los supuestos de normalidad fueron corroborados utilizando la prueba Kolmogorov-Smirnov para todas las variables medidas en el estudio de transectas y para el experimento de microcosmo. Las variables sin distribución normal fueron transformadas estadísticamente (Tabla S7).

Para comparar los resultados entre estaciones de ambas transectas se realizó análisis de varianza (ANOVA) de una vía, seguido de una comparación múltiple utilizando la prueba Tukey como análisis a posteriori. La comparación entre estaciones de las variables enzimas intracelulares y aminoácidos en las transectas, fueron realizadas con una prueba no paramétrica (Mann Whitney). Complementariamente se realizó un análisis de componentes principales (PCoA) de las distancias Euclidianas para visualizar patrones de las variables estimadas en las transectas.

Para evaluar las diferencias entre tratamientos durante el experimento de microcosmo se aplicó un ANOVA de dos vías, luego se realizó una comparación múltiple utilizando la prueba Tukey como análisis a posteriori. Para la concentración de DFAA, proteínas disueltas e Índice Dauwe se llevó a cabo un ANOVA de 1 vía y la prueba Tukey como análisis a posteriori. Complementariamente se realizó un análisis de componentes principales (PCoA) de las distancias Euclidianas para visualizar patrones de las variables estimadas en el experimento de microcosmos.

Las significancias estadísticas corresponden a un valor  $p < 0,05$  en las pruebas estadísticas ANOVA, pos hoc Tukey y Mann-Witney, presentadas en las tablas S2, S3, S4 y S5.

Para visualizar cambios en la composición de aminoácidos de DFAA y proteínas disueltas, en las transectas (asociados a las estaciones y profundidad) y en el experimento de microcosmos (asociado a los tratamientos y tiempo), se calculó la matriz de similitud de Bray-Curtis utilizando los datos estandarizados y transformados a raíz cuadrada. Se realizó un análisis de coordenadas principales (PCoA) con vectores de conexiones de Pearson superpuestos para visualizar estos cambios. Para determinar los aminoácidos con mayor contribución a la disimilitud asociada (entre estaciones o entre tratamientos, según corresponda), se realizó un análisis SIMPER utilizando el software PRIMER.

### 3. Resultados

#### 3.1 Condiciones oceanográficas durante muestreo de transectas en Canal Caucahué.

Las condiciones hidrográficas del canal Caucahué durante el muestreo de transectas se muestran en las Figs. 2 y S1. La temperatura y salinidad incrementa desde los 10,5 °C y 32,7 en superficie a >11°C y 32,9 a 60m, respectivamente, en ambas transectas. Las concentraciones de amonio aumentan significativamente (ANOVA y Prueba Tukey;  $p < 0,05$ ) desde  $<0,05 \mu\text{M}$  en la superficie de ambas estaciones control a  $>0,55$  y  $>0,15\mu\text{M}$  en las cercanías de las balsas jaulas y cuelgas de mitílidos respectivamente (i.e. estación S3 y M3, Fig. 2a y b). Un patrón similar se observa para las concentraciones de nitrito, donde las estaciones cercanas a los centros de cultivos muestran valores significativamente mayores ( $>0,4 \mu\text{M}$ ; ANOVA y Prueba Tukey;  $p < 0,05$ ) a las estaciones control ( $<0,2 \mu\text{M}$ , Fig. 2c y d). En contraste, se observaron menores concentraciones de  $\text{NO}_3^-$  ( $<15 \mu\text{M}$ ) y  $\text{PO}_4^{3-}$  ( $<1,7 \mu\text{M}$ ) asociadas a la superficie de las estaciones cercanas a los centros de cultivo en ambas transectas en comparación a las estaciones control ( $\text{NO}_3^- >17$  y  $\text{PO}_4^{3-} >1,7 \mu\text{M}$ ; Fig. 2e, f, g y h). Estas diferencias solo fueron significativas para nitrato en la Transecta Salmonidos (TS) (ANOVA y Prueba Tukey;  $p < 0,05$ ). La razón N/P muestra valores  $<10$  a lo largo de ambas transectas (Tabla 1), en particular en TS se observa un ligero gradiente, disminuyendo esta razón desde la estación Cs (9,6) hacia la estación S3 en superficie (9,1) y hacia el fondo (8,3).

#### 3.1.2 Clorofila, abundancia picoplanctónica y DOM.

Ambas transectas se caracterizaron por valores de clorofila-a  $\leq 0,7 \mu\text{g L}^{-1}$ . TS muestra un gradiente con las mayores concentraciones ( $>0,6 \mu\text{g L}^{-1}$ ) asociadas a la superficie (sobre 10m) en las cercanías del cultivo (estación S3 y S2), mostrando diferencias significativas respecto a la estación Cs ( $0,2 \mu\text{g L}^{-1}$ ; Fig. 3a; ANOVA y Prueba Tukey;  $p < 0,05$ ). En la Transecta Mitílidos (TM) la mayor concentración de clorofila-a se observó en M1 ( $0,65 \mu\text{g L}^{-1}$ ) a 2m de profundidad, diferenciándose significativamente de la estación Cm (Fig. 3b; ANOVA y Prueba Tukey;  $p < 0,05$ ).

La contribución de picofitoplancton (*Synechococcus* sp. y Picoeucariontes) y bacterioplancton es consistente con la distribución de clorofila en ambas transectas (Tabla 1), mostrando un gradiente en TS, con concentraciones significativamente mayores en las cercanías del cultivo de salmones ( $>3,5$ ,  $>12,5$ ,  $>600 \times 10^3$  cel. mL<sup>-1</sup>, respectivamente) respecto a Cs (ANOVA y Prueba Tukey;  $p < 0,05$ ). En TM, la mayor concentración de células se presenta principalmente en la estación M1, seguidas de M2 y M3 (Tabla 1), diferenciándose de la estación Cm (ANOVA y Prueba Tukey;  $p < 0,05$ ).

La distribución de nitrógeno y fósforo orgánico disuelto (DON y DOP) se condice con la distribución de clorofila y picoplancton a lo largo de TS (Fig. 3e y g), con las mayores concentraciones ( $>6$  y  $>0,5$   $\mu\text{M}$ , respectivamente) observadas en las cercanías de las balsas jaulas de cultivo del salmón. La disminución de DON y DOP en el fondo coincide con el máximo de  $\text{NH}_4^+$  en S3 a 40m (Fig. 2a y 3e). En TM el DON y DOP presentan gradientes similares a los de TS, con mayores concentraciones en las estaciones cercanas a los cultivos de mitílidos (M3 y M2), y una disminución en superficie de M1 (Fig. 3f y h), con diferencias marginalmente significativas (ANOVA y Prueba Tukey;  $p < 0,06$ ). En contraste, las mayores concentraciones de DOC ( $>70$   $\mu\text{M}$ ) se observaron en las estaciones control de ambas transectas (Cs y Cm, Fig. 3a y b) con una disminución significativa (ANOVA y Prueba Tukey;  $p < 0,05$ ) en las cercanías de los dos tipos de cultivos (S3, S2, M3 y M2,  $<70$   $\mu\text{M}$ ).

### 3.1.3 Características de la materia orgánica disuelta (DOM)

Las estaciones S3 y S2 en superficie (2-10m) muestran concentraciones de proteínas disueltas y DFAA notablemente mayores respecto a Cs en TS alcanzando valores de 0,75 y 7  $\mu\text{M}$  respectivamente (Fig. 4a y S3a), sin embargo, estas diferencias no fueron significativas. El Cs muestra una acumulación de proteínas disueltas con valores entre 3 y 5  $\mu\text{M}$  (Fig. 4a). El DI es congruente con la distribución de las concentraciones de proteínas disueltas, mostrando valores significativamente altos (DI=6-9; Mann-Whitney Test;  $p < 0,05$ ) cerca de los cultivos de salmónidos, particularmente en la superficie de S2 y S3 siendo hasta 3 veces mayor que la estación Cs (Fig. 4c). De igual manera, la contribución de los aminoácidos libres y proteínas disueltas a la concentración de DOC (%DOC<sub>DFAA</sub> y %DOC<sub>DCAA</sub>, respectivamente) fue

notablemente mayor en superficie en S2 y S3 (3-5 %DOC<sub>DFAA</sub> y 40-45 %DOC<sub>DCAA</sub>) sin diferencias significativas (Fig. 4e y S3c).

En contraste, la estación Cm en el TM muestra valores significativamente mayores de DFAA especialmente a 10m de profundidad (0,65  $\mu\text{M}$ ; Fig. S3d; Mann-Whitney Test;  $p < 0,05$ ). Las proteínas disueltas presentan concentraciones similares a lo largo de la transecta sobre los 10 m de profundidad, pero con una alta concentración en Cm a 50m (11  $\mu\text{M}$ , Fig. 4b). El DI también presentó valores significativamente mayores en Cm (11; Mann-Whitney Test;  $p < 0,05$ ); sin embargo, en las cercanías del cultivo de mitílidos también se observaron valores notablemente altos, en particular del DI a 10 y 50m (6 y 8,5 respectivamente, Fig. 4d). Esto es concordante con los %DOC<sub>DFAA</sub> y %DOC<sub>DCAA</sub> en dicha transecta (Figs. 4f y S3d).

La composición aminoacídica relativa de DFAA y proteínas disueltas varió entre estaciones, especialmente entre el sitio control y las estaciones cercanas a los cultivos de salmones y mitílidos (S3 y M3, respectivamente; Fig. S5a y b). El análisis SIMPER mostró que la disimilitud varía un 21,8 y 35,7% para S3 y M3 respectivamente al compararlo con el control (Cs y Cm; Tabla S6), con una contribución individual sobre el 4% de cada AA, 3 a 4 de los 14 aminoácidos analizados acumulan sobre el 50% de esta disimilitud. Complementariamente se realizó un PCoA con la concentración de AA de proteínas disueltas y DFAA. Las proteínas disueltas indican que las estaciones S3 y S2 se caracterizan principalmente por la contribución de Thr ( $r = 0,9$ ), Met ( $r = 0,4$ ) y Glu ( $r = 0,2$ ), mientras el Cs principalmente por Asp ( $r = -0,8$ ), His ( $r = -0,8$ ) y Arg ( $r = -0,9$ ), correlacionados con el PCoA1 (Fig. S4a). Por el contrario, la TM muestra que la estación Cm se caracteriza por la mayor contribución de Thr ( $r = -0,9$ ), Met ( $r = -0,8$ ) y Ala ( $r = -0,7$ ), correlacionados con el PCoA1 (Fig. S4b).

Los DFAA en ambas transectas mantienen la tendencia de las proteínas disueltas, caracterizando la estación S3 2m y Cm por la contribución de Thr ( $r = 0,99$  y  $r = -0,99$ , respectivamente), correlacionado con PCoA1 (Fig. S4c y d).

### **3.1.4 Biomasa y actividad enzimática potencial intracelular**

Las mayores concentraciones de biomasa microbiana (ATP  $< 100\mu\text{m}$ ) en TS se observa en el fondo de S1 (50m) y hacia S2 y S3 ( $\sim 0,02 \mu\text{g ATP L}^{-1}$ ; Fig. S2a) diferenciándose de Cs (ANOVA

y Prueba Tukey;  $p < 0,05$ ). En cambio, en TM la biomasa se concentra en superficie y 10m en las cercanías de los cultivos de mitílidos (M3), con diferencias marginalmente significativas (Fig. S2b; ANOVA y Prueba Tukey;  $p < 0,06$ ).

Diferencias significativas (Mann-Whitney Test;  $p < 0,05$ ) se observaron en la estación S3 respecto a Cs asociadas la actividad específica MDH en TS de la zona de estudio. La mayor actividad se observó a 10m en la estación S3 ( $1,75 \text{ pmol NADH min}^{-1} \text{ pg ATP}^{-1}$ ) disminuyendo hacia el fondo y hacia la boca del canal (Fig. S2c). La mayor actividad de MPOR ( $\sim 0,1 \text{ pmol NADH min}^{-1} \text{ pg ATP}^{-1}$ ) se observó entre 10 y 50 m de profundidad en las cercanías de las balsas jaulas (S3 y S2) y en la estación Cs (Fig. S2e). Por otra parte, la actividad de la CS fue mayor ( $>0,75 \text{ pmol NTB-CoA min}^{-1} \text{ pg ATP}^{-1}$ ) en la capa superficial (sobre 10m) dentro del canal, extendiéndose a los 50m de profundidad en la estación Cs (Fig. S2g).

En TM, se observó una mayor actividad específica de la MDH asociada a 2 y 10 m de profundidad en toda la transecta, especialmente en M1 llegando a  $2 \text{ pmol NADH min}^{-1} \text{ pg ATP}^{-1}$  (Fig. S2d), mientras que la MPOR tuvo mayor actividad ( $0,55 \text{ pmol NADH min}^{-1} \text{ pg ATP}^{-1}$ ) asociado al fondo de la zona de cultivo de mitílidos (M3; 50m; Fig. S2f). Similarmente a MDH, la actividad de la CS se asoció principalmente a la superficie de toda la transecta (sobre 10m), en particular en M2 y Cm ( $>0,5 \text{ pmol NTB-CoA min}^{-1} \text{ pg ATP}^{-1}$ ; Fig. S2h).

### 3.1.5 Análisis multivariado

El análisis multivariado PCoA muestra una distribución en relación con las estaciones y a la profundidad de muestreo, donde los dos ejes principales explican más del 57% en ambas transectas (Fig. 5a y b). En TS se observa un grupo correspondiente a Cs y S1 relacionadas con la concentración de DOC, correlacionada positivamente ( $r=0,6$ ) con el PCoA1. Mientras que las muestras de las estaciones S2 y S3, cercanas al centro de cultivo de salmones, muestran una mayor distancia en el PCoA, relacionándose con la concentración de DON ( $r=-0,3$ ) y DOP ( $r=-0,5$ ), la abundancia picoplanctónica (bacterias,  $r=-0,7$ ; Synechococcus,  $r=-0,7$ ; picoeucariontes,  $r=-0,9$ ), clorofila ( $r=-0,9$ ) y las características de la DOM (proteínas disueltas,  $r=-0,7$ ; %DOC<sub>THAA</sub>,  $r=-0,7$ ; DI,  $r=-0,6$ ; DFAA,  $r=-0,7$ ; %DOC<sub>DFAA</sub>,  $r=-0,7$ ) las cuales fueron negativamente correlacionadas con el PC1, diferenciándose del sitio control. Cabe destacar que

la estación S3 (2m), se relaciona notablemente con la concentración de amonio, DI, concentración de aminoácidos y su contribución al DOC (Fig. 5a). Por otra parte, en la TM se observa que las muestras de 10 y 50 m de la estación Cm se relacionan notablemente con la características de la DOM (proteínas disueltas,  $r=0,5$ ; %DOC<sub>THAA</sub>,  $r=0,3$ ; DI,  $r=0,4$ ; DFAA,  $r=0,4$ ; %DOC<sub>DFAA</sub>,  $r=0,4$ ) que se correlacionaron positivamente con PCoA1, mientras que las muestras superficiales (2 y 10m) de las estaciones más cercanas al centro de cultivo (M2 y M3) se relacionaron principalmente con el DON ( $r=-0,8$ ), DOP ( $r=-0,7$ ), amonio ( $r=-0,6$ ), NO<sub>2</sub> ( $r=-0,8$ ), las cuales se correlacionan negativamente con el PCoA1 (Fig. 5b).

### **3.2 Experimento de microcosmos enriquecido con materia orgánica disuelta derivada de la salmonicultura.**

#### **3.2.1 Concentración de materia orgánica disuelta y nutrientes durante el experimento.**

Los cambios de concentraciones de DOM y nutrientes inorgánicos se muestran en la Tabla 2. En las incubaciones de microcosmos las concentraciones de DOC y DON fueron significativamente mayores en los tratamientos respecto al control (ANOVA y prueba Tukey;  $p < 0,05$ ), excepto por N-DOM, donde P y F-DOM alcanzaron sobre un 160 y 350% en comparación al control respectivamente. Mientras que para el DOP solo P-DOM fue significativamente mayor durante todo el experimento con un 400% sobre el control (Tabla 2; ANOVA y Prueba Tukey;  $p < 0,05$ ). Durante el experimento, la concentración de DOC se mantuvo estable en el Control y N-DOM, con una ligera acumulación de 7% y 4% respectivamente, entre el inicio y final del experimento. En P-DOM se acumuló ligeramente en un 7% hasta las 24h, para caer drásticamente en un 54% desde las 48h hasta el final del experimento (Tabla 2). En cambio, en F-DOM y M-DOM disminuyen en el tiempo de manera constante en un 29 y 45% respectivamente al final del experimento (Tabla 2). El DON, se comporta de manera similar al DOC, con una ligera acumulación del 6% en el Control, sin embargo, el N-DOM disminuye en un 26% a las 72h. En P, F y M-DOM el DON disminuye de forma constante en el tiempo, con una diferencia  $>40\%$  entre 0 y 72h (Tabla 2). La concentración

de DOP en todos los tratamientos aumenta sobre el 60% a las 72h, excepto en N-DOM (Tabla 2).

La concentración de amonio fue significativamente mayor (ANOVA y Prueba Tukey;  $p < 0,05$ ) en todos los tratamientos (excepto para N-DOM), donde P y F-DOM alcanzaron valores sobre el 25000% en comparación al control a las 72h (Tabla 2). Las concentraciones de nitrato y nitrito no mostraron cambios significativos entre los tratamientos y el control (ANOVA y Prueba Tukey;  $p > 0,05$ ), sin embargo, se observaron menores concentraciones de nitrato en todos los tratamientos, especialmente en P y F-DOM a las 24h (-29 y -35% respectivamente) en comparación al control (Tabla 2). Por el contrario, se observó un incremento de hasta un 80% en las concentraciones de nitrito, especialmente en F-DOM seguido por M-DOM, mientras P-DOM se mantuvo cercano a los valores del control (Tabla 2). Por su parte, la concentración de fosfato fue más alta en los tratamientos respecto al control, pero solo se encontraron diferencias significativas en P-DOM (ANOVA y Prueba Tukey;  $p < 0,05$ ) el cual mostró entre un 246% y un 67% sobre el control (Tabla 2).

En el tiempo, la concentración de amonio fue variable según el tratamiento, donde el control y N-DOM muestran una acumulación de amonio del 100% hasta las 24 y 48h respectivamente, para luego decaer en un -15 y -80% al final del experimento. En contraste, P-DOM, F-DOM y M-DOM incrementan en un 65, 103 y 20% respectivamente, entre las 0h y 72h (Tabla 2). El nitrato disminuyó  $>20\%$  en todos los tratamientos incluido el control, en cambio el nitrito aumento  $>40\%$  en la mayoría de los tratamientos, entre el inicio y fin del experimento (Tabla 2). El fosfato disminuyó en el tiempo en un 18%, 60%, 35% y 55% en el Control, P, F y M-DOM respectivamente, sin embargo, N-DOM aumentó en un 100% al final del experimento (Tabla 2).

### **3.2.2 Biomasa y abundancia bacterioplanctónica en respuesta a la adición de DOM derivada de la salmonicultura.**

La concentración de ATP Total fue significativamente mayor en todos los tratamientos (ANOVA y Prueba Tukey;  $p < 0,05$ ), especialmente en M, seguido de F, P y N-DOM hasta las 24h (6-15%, 4-10%, 2-8% y 1-2% sobre el control, respectivamente), sin embargo, P-DOM

aumenta notablemente en un 164 y 243% a las 48 y 72h respectivamente (Fig. S6a). Similarmente, la biomasa F<1 aumentó en todos los tratamientos durante el experimento, con una mayor respuesta en F y N-DOM hasta las 24h (81 y 95% sobre el control, respectivamente), luego a las 48 y 72h, P-DOM aumenta fuertemente en un 240 y 419% respecto al control (Fig. S6b).

En el tiempo, para ambas fracciones la biomasa de todos los tratamientos y control aumento de 0h a 72h, excepto en el control de F<1, donde se observó una disminución de ATP del 14% (S6a y b).

La abundancia microbiana en los tratamientos incrementó significativamente desde las 12h en F y M-DOM (ANOVA y Prueba Tukey;  $p < 0,05$ ), superando al control sobre el 700% a las 48h. Sin embargo, en P-DOM, se observó un aumento significativo solo desde las 48h, alcanzando un 2000% de cambio relativo al control (ANOVA y Prueba Tukey;  $p < 0,05$ ; Fig. S6c).

La AB aumentó notablemente en el tiempo, sobre 1000% en P, F y M-DOM, mientras el control y N-DOM alcanzaron un 300 y 600% de aumento respectivamente, al final del experimento (Fig. S6c).

### **3.2.3 Actividad específica de la enzima intracelular Malato deshidrogenasa (MDH) en respuesta a la adición de DOM derivada de la salmonicultura.**

En la fracción FTotal, la adición de F y M-DOM incrementaron rápida (desde las 0h) y significativamente (ANOVA y Prueba Tukey;  $p < 0,05$ ) la actividad específica de MDH, alcanzando las máximas diferencias a las 12h para ambos tratamientos (>1000%). En cambio, la adición de P-DOM, si bien aumentó la actividad de MDH, esta solo fue significativa desde las 24h (500%; ANOVA y Prueba Tukey;  $p < 0,05$ ; Fig. 6a). La respuesta de MDH en F<1 fue similar, pero de mayor magnitud que la observada en FTotal. La adición de F y M-DOM incrementaron rápida y significativamente la actividad MDH desde las 0h, con máximas sobre 2000% respecto al control a las 24h, en cambio P-DOM tuvo un menor impacto, con máximos de 400% y 296% a las 0 y 24h respectivamente. La adición de N-DOM en ambas fracciones se mantuvo en valores cercanos al control (Fig. 6b).

En el tiempo, la actividad específica de la MDH Total y <1 aumentó sobre 200% para todos los tratamientos y el control, entre el inicio (0h) y el final del experimento (72h).

### **3.2.4 Tasas de respiración específica en respuesta a la adición de DOM derivada de la salmonicultura.**

Todas las incubaciones comenzaron en condiciones óxicas, con concentraciones sobre 300  $\mu\text{mol O}_2 \text{ L}^{-1}$  (6,7  $\text{mL O}_2 \text{ L}^{-1}$ ). El consumo de oxígeno en el control de ambas fracciones aumento en el tiempo en un 10% y 5% para la fracción Total y >1 respectivamente, sin embargo, en ambos casos la tasa de respiración disminuyó hasta las 12h, con una recuperación hacia el final del experimento.

La adición de F y M-DOM produjo un aumento rápido (200%, 0h) y significativo de la respiración en FTotal, manteniéndose hasta las 24h (ANOVA y Prueba Tukey;  $p < 0,05$ ; Fig. 6c). Mientras que con la adición de P-DOM la respiración fue notablemente mayor (1000%) a las 12 y 24h. Posterior a las 24h todos los tratamientos se mantienen en valores cercanos al control (Fig. 6c).

La respiración específica en la fracción <1 fue variable entre tratamientos en el tiempo. La adición de N y M-DOM aumento la respiración rápidamente al inicio del experimento (20 y 12% respectivamente), pero desde las 6 hasta las 12h P, F y M DOM aumentan significativamente sobre el 100%. Posteriormente los tratamientos presentan tasas menores al control, hasta el final del experimento, siendo significativo para P-DOM (ANOVA y Prueba Tukey;  $p < 0,05$ ; Fig. 6d).

### **3.2.5 Tasas de Actividad Enzimática Extracelular (EEA) específica en respuesta a la adición de DOM derivada de la salmonicultura**

Se detectó EEA para los tres sustratos utilizados en este estudio, en ambas fracciones de tamaño durante toda la incubación de microcosmos.

### 3.2.5.1 Actividad específica de Leucina-aminopeptidasa (LAP).

La adición de F y M- DOM incremento rápida (desde las 0h) y significativamente la actividad de LAP en la FTotal respecto al control, a P-DOM y a N-DOM durante todo el experimento, con máximos sobre 13000% en F-DOM y 4000% en M-DOM respecto al control (Fig. 7a; ANOVA y Prueba Tukey;  $p < 0,05$ ). En P y N-DOM la actividad de LAP se mantiene cercana al control hasta las 12h, ambas con un significativo aumento a las 48h (1300 y 3000% respecto al control). Similarmente, en la fracción  $<1$ , F y M-DOM producen los mayores y significativos (ANOVA y Prueba Tukey;  $p < 0,05$ ) incrementos de LAP, con un aumento promedio de 6000% y 2600% sobre el control (Fig. 7b). Mientras que P y N-DOM permanecen cercanos al Control, excepto a las 48h, donde se observa un incremento cercano al 1000% respecto al control (Fig. 7b).

La actividad específica de LAP de ambas fracciones fue variable en el tiempo, la cual aumentó para la fracción Total en el Control, P-DOM y N-DOM (167,465 y 132% respectivamente) en relación al valor inicial, mientras que en F y M-DOM disminuyó en un -21 y -10 % respectivamente (Fig. 7a). La actividad de LAP de la fracción  $<1$  decrece en el tiempo, tanto en el Control como en F y N-DOM, disminuyendo en un -60, -10 y -70%, respectivamente. En cambio, en P y particularmente en M-DOM, la actividad de LAP incrementó al final del experimento (17 y 1300% respectivamente; Fig. 7b).

### 3.2.5.2 Actividad enzimática específica de $\beta$ -glucosidasa (GLU).

En la fracción FTotal, la adición de DOM de todos los tratamientos aumenta paulatina y ligeramente la actividad de GLU hasta las 12h, con un notorio cambio desde las 24h (Fig. 7c). Sin embargo, la actividad de GLU en F-DOM es significativamente mayor al control durante todo el experimento, especialmente 48h (1000%; Fig. 7c; ANOVA y Prueba Tukey;  $p < 0,05$ ). P-DOM y M-DOM estimulan la actividad de GLU significativamente desde las 24h en adelante, pero en menor proporción que F-DOM, excepto a las 24 y 48h respectivamente (Fig. 7c; ANOVA y Prueba Tukey;  $p < 0,05$ ). En la fracción  $>1$  se observó un comportamiento altamente variable de la actividad GLU en los distintos tratamientos, sin embargo, F y M-DOM en general

muestran un cambio positivo, significativo a las 48h (>200%; Fig. 7d, ANOVA y Prueba Tukey;  $p < 0,05$ ).

La actividad específica de GLU aumentó en el tiempo para ambas fracciones y en todos los tratamientos, incluido el control (Fig. 7c y d), donde los incrementos más destacados se observaron en P, F y M-DOM al final del experimento (>400%).

### **3.2.5.3 Actividad específica de la Lipasa (LIP).**

La adición de DOM en la fracción FTotál mostró un estímulo de la actividad de LIP en todos los tratamientos, excepto N-DOM el cual fue menor que el control hasta las 24h. (Fig. 7e). Un incremento rápido y significativo se observó en F-DOM (desde las 0h) en la actividad de LIP (Fig. 7e, ANOVA y Prueba Tukey;  $p < 0,05$ ), con máximos a las 12h sobre 4000%; adicionalmente, fue significativamente mayor que P-DOM, excepto a las 48h. La adición de P-DOM también generó un aumento significativo en la actividad de LIP desde el inicio del experimento, pero en menor proporción que F y M-DOM (excepto a las 48h), con máximo sobre 2000%. La M-DOM fue el tratamiento con mayor estímulo sobre la actividad de LIP, pero solo desde las 12h en adelante, con máximos de 12000% a las 24h (Fig. 7e). En la fracción <1 se observó un comportamiento similar a FTotál. Donde todos los tratamientos generaron un aumento de la actividad de LIP, excepto N-DOM, el cual se mantuvo cerca de los valores del control. F-DOM generó un respuesta rápida y significativa desde las 0h hasta el final del experimento, con valores máximos a las 72h, pero con el mayor cambio respecto al control a las 6h (>500%). De igual forma, F-DOM fue significativamente mayor que P-DOM en todo el experimento. P-DOM en general mostró un estímulo positivo de la actividad de LIP, en menor proporción que F y M-DOM, siendo significativo desde las 12h (>100%). Por su parte M-DOM generó los mayores cambios respecto al control (>800%), pero solo fue significativo después de las 12h (Fig. 7f; ANOVA y prueba Tukey;  $p < 0,05$ ).

La actividad específica de LIP aumentó en el tiempo para ambas fracciones y en todos los tratamientos, incluido el control (>500%, Fig. 7e y f).

### 3.2.6 Características de la DOM derivada de la salmonicultura durante experimento de microcosmo.

Durante el experimento de microcosmo, todas las concentraciones de DFAA fueron mayores en los tratamientos respecto al control, con diferencias significativas para P, F y M-DOM (Figs. 8a y S7a; ANOVA y Prueba Tukey;  $p < 0,05$ ). No obstante, las diferencias entre estos tratamientos no fueron significativas. El control mostró concentraciones entre 58,3 nM y 164 nM de DFAA. Se observó un 10000% más concentración de DFAA en F-DOM, seguido por P y M-DOM (7600 y 5400% respectivamente) al inicio del experimento (0h), mientras N-DOM mostró un 100% más (Fig. 8a). Durante el experimento, la concentración de DFAA se mantuvo relativamente estable en el Control y N-DOM, con valores promedio de 92 y 235 nM respectivamente. Sin embargo, se observó una acumulación entre el inicio y final del experimento de 181% en el Control y de 1,5% en N-DOM (Fig. 8a). Por otra parte, la concentración de DFAA en P-DOM se mantuvo relativamente estable hasta las 24h con valores entre 4000 y 5000 nM, disminuyendo drásticamente en un -83% desde las 48h hasta el final del experimento (Fig. 8a). En cambio, F-DOM y M-DOM, que comenzaron con concentraciones de 6000 y 3000 nM respectivamente, disminuyeron en el tiempo de manera rápida y constante en un -94 y -91% respectivamente al final del experimento (Fig. 8), quedando en concentraciones menores a P y N-DOM.

La concentración promedio de proteínas disueltas (DCAA) fueron mayores en casi todos los tratamientos en comparación al control (3,9 a 7,9 uM), con diferencias significativas solo para P-DOM (Figs. 8b y S7b; ANOVA y Prueba Tukey;  $p < 0,05$ ). La mayor diferencia se observó en P-DOM, seguido de F y M-DOM, con 600, 500 y 150% sobre el control, respectivamente a las 0h (Fig. 8b). Durante el experimento, el control se mantuvo relativamente estable, con una ligera acumulación del 7,7% al final del experimento. Por su parte P-DOM, con valores iniciales de 28,9  $\mu$ M muestra una disminución paulatina en el tiempo del -27%, sin embargo, F-DOM que comienza con 23,8  $\mu$ M disminuye la concentración de proteínas drásticamente a las 6h, llegando a valores bajo el control (-54%) entre 12 y 48h, y a una diferencia de -66% entre inicio y final de la incubación. M-DOM y N-DOM muestran una disminución más lenta y constante

desde las 6h sobre -50%, donde N-DOM también muestra valores bajo el control desde las 12h (-67%; Fig. 8b).

El Índice de Degradación Dauwe (DI) promedio durante el experimento fue mayor en los tratamientos con adición de F-DOM (DI= 7,4) y N-DOM (DI=7,5), seguido por M-DOM (DI=6,7) (Fig. S7c). P-DOM mostró el menor valor DI (4,9), el cual fue más bajo que el Control (DI=5,7). Las diferencias entre los tratamientos y el control no fueron significativas (ANOVA y Prueba Tukey;  $p > 0,05$ ), sin embargo, el DI de F y N-DOM fueron significativamente mayores que el de P-DOM (ANOVA y Prueba Tukey;  $p < 0,05$ ). La DOM del control y los tratamientos aumentaron el valor DI entre 0 y 72h, excepto F-DOM (Fig. 8c). Durante el experimento, el DI de la DOM del control se mantuvo relativamente estable, con un ligero aumento del 10%, al final del experimento. P-DOM mostró el mayor aumento llegando al 70% sobre el valor inicial. Mientras que en el caso de F-DOM se observó una disminución del valor DI desde las 24h a 72h llegando a un -47% y a un -9,7% desde el valor inicial (Fig. 8c).

### **3.2.7 Composición aminoacídica de proteínas disueltas y DFAA durante la incubación.**

La composición relativa de DFAA fue variable entre tratamientos y en el tiempo (Fig. S9a). El análisis SIMPER mostró que la disimilitud varía entre 16,8 a 37,7% para N-DOM y M-DOM, respectivamente, al compararlo con el control (Tabla S4). Los 14 aminoácidos analizados mostraron una contribución individual a la disimilitud sobre el 4%, y entre 4 a 6 de los 14 aminoácidos acumulan sobre el 50% de esta disimilitud (Tabla S4). El análisis de PCoA muestra que ambos ejes principales explican en un 75% la variabilidad, observándose una agrupación por tratamiento y tiempo. El grupo consistente en las muestras de Control y N-DOM se explican principalmente por la Asp ( $r = 0,6$ ) y Glu ( $R = 0,4$ ) correlacionadas con PCo1, así como por Thr ( $r = -0,7$ ) correlacionado con PCo2. El grupo F-DOM se explica por Val ( $r = -0,7$ ), Ile ( $r = -0,7$ ) y Leu ( $r = -0,8$ ) hasta las 12h, mientras His ( $r = 0,6$ ) explica los últimos tiempos, correlacionado con PCo1. Los grupos P y M-DOM se explican principalmente por Met ( $r = 0,2$ ), mientras que Gly ( $r = -0,7$ ) y Arg ( $r = -0,4$ ) contribuyen de 0 a 24h, correlacionados con el PCo1 (Fig. S9b)

Al analizar la composición aminoacídica de las proteínas disueltas (DCAA), podemos observar variabilidad entre tratamientos y tiempos experimentales (Fig. S8a). El análisis

SIMPER mostró una disimilitud entre 15,3 a 21,4 correspondientes a M-DOM y N-DOM respectivamente, donde 4 de los 14 aminoácidos analizados acumulan sobre el 50% de la disimilitud (Tabla S4). El PCoA muestra que ambos ejes principales explican 75% de la variabilidad y nos permite visualizar una agrupación por tratamiento, con el control notablemente definido (Fig. S8b). Este grupo control se explicó principalmente por Asp, Arg y Met ( $r = 0,8; 0,4; 0,5$ ; respectivamente), mientras que los tratamientos se explican mayormente por Glu ( $r = 0,7$ ) correlacionados positivamente con el PCoA1, y Thr ( $r = -0,9$ ) y Ser ( $r = -0,9$ ) correlacionadas negativamente con PCoA1 (Fig. S8a y b). Esto coincide con el análisis *in-situ* (transecta sector salmonicultura).

### 3.2.8 Análisis multivariado del experimento de microcosmo.

Complementariamente se llevó a cabo un análisis de coordenadas principales con la combinación de parámetros biogeoquímicos y actividad microbiana de todo el experimento. El PCoA explica en un 59,5% de la variabilidad en el experimento, revelando agrupaciones en relación con los tratamientos y secundariamente al tiempo de incubación (Fig. 9). Se puede observar un grupo bien definido correspondiente a P-DOM entre 0 y 24h, mientras que los últimos dos tiempos de este tratamiento se separan. Esta agrupación se basa principalmente en las variables Fosfato ( $r = 0,7$ ), proteínas disueltas ( $r = 0,7$ ), DFAA ( $r = 0,6$ ), DOC ( $r = 0,6$ ), DON ( $r = 0,6$ ) y DOP ( $r = 0,5$ ), correlacionadas positivamente con el PCoA1. Mientras esta agrupación también fue explicada por DI, el cual se correlaciona negativamente con el PC1 ( $r = -0,5$ ). Por otra parte, podemos observar un grupo correspondiente al Control y N-DOM en todos los tiempos, y a uno un poco más disperso a lo largo del PCoA1 correspondiente a F y M-DOM, los cuales son explicados principalmente por la actividad metabólica microbiana (MDH, EEA y DI) que se correlacionan negativamente con PCoA1 ( $R = -0,8; -0,4$  (LAP),  $-0,5$  (GLU),  $0,7$  (LIP);  $-0,5$  respectivamente).

## 4. Discusión

La acuicultura puede liberar cantidades significativas de DOM rica en C, N y P, así como nutrientes inorgánicos. Sin embargo, hay información limitada respecto a las características de la DOM derivada del cultivo de organismos y su biodisponibilidad, especialmente en el medio marino y menor conocimiento aun en relación con su efecto en la actividad metabólica de la comunidad microbiana de la columna de agua donde se encuentra el cultivo. Nuestro estudio contribuye a la comprensión de estos factores en el ambiente acuático marino, investigando si la actividad acuícola produce alguna señal biogeoquímica en el canal Caucahué. Así, comparamos perfiles de las características de la DOM, de nutrientes y de variables biológicas (clorofila, abundancia picoplanctónica) a lo largo de dos transectas a diferentes distancias de un centro de cultivo de salmónidos (TS) y de un cultivo de mitílidos (TM), con una estación de referencia (Cs y Cm) para cada transecta.

Para evaluar el efecto de la DOM derivada de la salmonicultura en el metabolismo microplanctónico, se realizó un experimento de microcosmo con adición de DOM proveniente de pellets (alimento), fecas, natural y mezcla comparado con un control sin adición de DOM.

### 4.1 Señal biogeoquímica de la acuicultura en el canal Caucahué

Las condiciones hidrográficas durante esta investigación son consistentes con las reportadas por Sobarzo *et al.* (2018) para el canal Caucahué, asociadas a la presencia de Aguas Subantárticas Modificadas (MSAW), con menor temperatura y salinidad en superficie y hacia el interior del canal (Fig. S1), posiblemente por la influencia de agua dulce de escorrentías y precipitaciones, pero no llega a alcanzar rangos de salinidad propias de agua estuarina (<31) (Sievers y Silva 2006).

Varios de los parámetros estimados en este estudio muestran valores significativamente mayores en las cercanías de los centros de cultivo tanto de salmones como mitílidos, especialmente el  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_2$ , clorofila, DON, DOP, picoplancton (auto y heterótrofo), aminoácidos e índice de degradación Dauwe, particularmente en la cercanía del cultivo de salmones. Estos resultados sugieren que el cultivo de organismos en el Canal Caucahué puede

modificar tanto las concentraciones naturales de nutrientes orgánicos e inorgánicos, como la calidad de la materia orgánica en la columna de agua, lo que influye en la respuesta de la comunidad microbiana planctónica tanto autótrofa como heterótrofa. Estas observaciones se conciden con las altas concentraciones de  $\text{NH}_4^+$ , DON y bacterioplancton encontradas en aguas cerca de cultivos de peces reportadas por Navarro *et al.* (2008), de  $\text{NO}_2$  por Wu *et al.* (1994), de  $\text{NH}_4^+$  y  $\text{PO}_4^{3-}$  observado por Pitta *et al.* (1999) y de mitílidos ( $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_3$ ,  $\text{NO}_2$  y  $\text{PO}_4^{3-}$ ) reportado por Nozzoli *et al.* (2005), pero difieren de lo reportado por Soto y Norambuena (2004) quienes no encuentran efectos significativos de los cultivos de salmones en la columna de agua asociadas a estas variables.

Las concentraciones de  $\text{NH}_4^+$  de ambas transectas están en el rango reportado por Fernández *et al.* (2019) para la misma zona de estudio. Las altas concentraciones de  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_2$ , y DON, asociadas a los centros de cultivo estarían dadas por los aportes desde el alimento de peces no consumido, fecas, excreción, mucus, así como también de la mortalidad de los dos tipos de organismos cultivados. Desde estas fuentes de MO se puede producir amonificación, procesos como la amonio y nitrito oxidación (nitrificación) y la asimilación directa de amonio por parte del fitoplancton y otras comunidades picoplanctónicas (Fernández *et al.*, 2019; Molina y Fernández, 2020). Experimentos de disolución han demostrado la liberación inmediata de amonio tanto desde fecas como de alimento de peces a corto plazo (Fernández-Jover *et al.*, 2007; Fernández *et al.*, 2019), siendo una fuente de amonio para ensamblajes microbianos que lo utilizan rápidamente (Fernández *et al.*, 2019). Las menores concentraciones de  $\text{NO}_3$  y  $\text{PO}_4^{3-}$  en superficie en las cercanías de los centros de cultivo, coinciden con las mayores concentraciones de clorofila y abundancia picoplanctónica, lo que sugiere la utilización de estos compuestos por parte del fitoplancton. Sin embargo, esto contrasta con lo reportado por Navarro (2008) quienes no encuentra diferencias significativas en la concentración de pigmentos fotosintéticos en las cercanías de los cultivos de salmones, pero sí un aumento de la abundancia y biomasa de microorganismos heterótrofos, lo que coincide con nuestros hallazgos (Tabla 1).

La transecta de mitílidos tuvo mayores concentraciones de clorofila y abundancia picoplanctónica en la estación M1, asociada a menores temperaturas y salinidad, posiblemente relacionada con la influencia de agua dulce (Sobarzo *et al.*, 2018). En las cercanías de las cuevas

de mitílidos también se observaron mayores concentraciones de bacterioplancton, sugiriendo un aporte a la actividad heterotrófica respecto a los organismos autótrofos en este punto, y además considerando la naturaleza de los organismos filtradores consumidores de fitoplancton puede influir en las menor concentraciones asociadas a la cercanía de las cuelgas.

Asimismo, las concentraciones de DON y DOP coinciden con la distribución de clorofila y picoplancton en la TS, mientras en TM se concentran en las cercanías de las cuelgas de mitílidos. Además, la disminución de ambos en el fondo coincide con los máximos de  $\text{NH}_4^+$ , lo que sugiere una alta remineralización de MO en las proximidades de los centros de cultivo. Sin embargo, en ambas transectas, las concentraciones de DOC fueron mayores en los sitios control, lo que sugiere (i) una posible utilización por parte de la comunidad microbiana en las cercanías de los cultivos (mayor abundancia picoplantónica y actividad de MDH) y /o (ii) la presencia de DOM con más contenido de nitrógeno y fosforo en estas zonas respecto al sitio control. En ambos casos la concentración de C, N y DOP se encuentra en los rangos reportados para el mar interior de Chiloé (González *et al.*, 2019 y González *et al.* *submitted*).

#### **4.1.1 Características de la materia orgánica disuelta en el canal Caucahué**

Las características de la DOM fueron abarcadas a través del análisis de aminoácidos en ambas transectas, los aminoácidos representan una parte importante cuantitativa y biológicamente lábil de la DOM, por lo tanto, cambios temporales y/o espaciales de este pool proporciona información sobre las modificaciones de las características de la DOM (Davis *et al.*, 2009; Kaiser y Benner, 2012). La concentración de DFAA, así como el  $\% \text{DOC}_{\text{DFAA}}$  encontrados en Caucahué están dentro de rangos reportados previamente ( $0,3-1,7 \mu\text{M}$  y  $<1\%$ , respectivamente) para sitios costeros sin influencia de la acuicultura (Pantoja *et al.*, 2009; Valdés *et al.*, 2017), sin embargo, en el presente estudio ambas variables (DFAA y  $\% \text{DOC}_{\text{DFAA}}$ ) aumentan cerca de los sitios de cultivo, pero en menor proporción para el cultivo de mitílidos (Fig. S3). La concentración de proteínas disueltas (Fig. 4) también se encuentra en los rangos reportados para otras zonas costeras ( $0,1-10 \mu\text{M}$ ; Coffin, 1989; Pantoja *et al.*, 2011), pero por sobre las concentraciones y contribución al DOC ( $\% \text{DOC}_{\text{DCAA}}$ ) para zonas costeras oligotróficas como el Mar Mediterráneo ( $0,2 - 1 \mu\text{M}$  y  $1,4-5,6\%$ , respectivamente; González *et al.*, 2019) y

el Océano Austral (0,1-0,4  $\mu\text{M}$  y 0,9-4,4%, respectivamente; Tremblay, 2015). Al igual que los DF<sub>FAA</sub>, las mayores concentraciones de proteínas disueltas y su contribución al DOC se asoció a los centros de cultivo, exceptuando la estación Cm. Lo cual refleja que el cultivo de salmón (y en menor medida el de mitílidos) es un aporte de aminoácidos libres y de proteínas disueltas a la columna de agua sugiriendo una mayor biodisponibilidad de la DOM en estas áreas, desde que el %DOC<sub>DCAA</sub> y %DOC<sub>DF<sub>FAA</sub></sub> se han utilizado como un indicador (Benner y Kaiser, 2011; Shen *et al.*, 2016). Sin embargo, en la transecta TM se observó un aumento asociado a la estación control (Cm), lo que sugiere un posible mecanismo de acumulación o preservación de la DOM por una menor actividad (o más lenta) actividad microbiana (Tremblay *et al.*, 2015), incluso posiblemente atribuible a algún co-limitante de la actividad heterotrófica (i.e Fe, Obernosterer *et al.*, 2014). Otra posibilidad es que exista una fuente de DOM fresca en ese sitio que no haya sido registrada en esta investigación.

El Índice de Degradación Dauwe (DI) utiliza la distribución relativa de los aminoácidos individuales como indicador químico del estado de degradación de la materia orgánica (Dauwe y Middelburg, 1998). Durante la degradación de la materia orgánica, algunos aminoácidos son utilizados de forma selectiva disminuyendo el valor de DI (Dauwe *et al.*, 1999) y su aplicación se ha extendido al estudio de la degradación de la DOM en ambientes marinos y dulceacuícolas (Davis *et al.*, 2009; Kaiser y Benner, 2009; Ylla *et al.*, 2011; Peter *et al.*, 2012; Tremblay *et al.*, 2015; González *et al.*, 2019), evidenciando cambios en la biodisponibilidad de la DOM (Rochell-Newall *et al.*, 2004).

En ambas transectas realizadas en Caucahué se determinó que el DI es positivo y congruente con la distribución de proteínas disueltas, lo que refleja una DOM fresca diagenéticamente (Kaiser y Benner, 2009; Peter *et al.*, 2012). Los valores DI fueron significativamente mayores asociados a los cultivos de salmones y de mitílidos en ambas transectas, pero especialmente en las cercanías al cultivo de salmones (TS; Fig. 4 c), mientras que en TM los valores mayores se encontraron en el sitio control (Cm). Sin embargo, en la estación M3, bajo los 10m, el DI aumenta posiblemente asociado a la DOM liberada de las cuelgas (biodepostación) de mitílidos. Esto sugiere que en el canal Caucahué existe una señal químicamente diferente indicativa de DOM más biodisponible asociadas a ambos tipos de cultivos. Esto es consistente con la

composición aminoacídica y el % molar de las transectas, presentando una mayor disimilitud entre las estaciones cercanas a los cultivos y sitios control, donde la Thr, Met y Glu de las proteínas disueltas fue notablemente mayor en las cercanías de los cultivos en TS, mientras que Asp, Glu y Arg lo fueron en la estación M3 en TM, lo cual también concuerda con los grupos que mejor explican la distribución de las muestras en el PCoA (Fig. S4). Cabe señalar que el alto DI observado en la superficie de S3 y en la estación Cm coincidieron en su alto % molar de Thr, lo cual difiere con lo señalado por Dauwe y Middelburg (1998) en un estudio de sedimentos del Mar del Norte, donde el enriquecimiento con Thr se asoció a un estado de la materia orgánica más degradado. Sin embargo, un estudio reciente reportó a la Thr como uno de los mayores constituyentes de proteínas disueltas (DCAA) y DFAA sobre la plataforma costera del Atlántico SO (Garzón-Cardona *et al.*, 2022). Estas diferencias pueden deberse a la matriz estudiada (DOM de la columna de agua vs POM en sedimentos), a procesos como la utilización preferencial durante la degradación microbiana, la resíntesis de proteínas por microorganismos, así como la sorción y desorción sobre material particulado, los cuales pueden alterar la composición de aminoácidos en sistemas acuáticos (Hedges y Hare, 1987; Keil *et al.*, 1994; Aufdenkampe *et al.*, 2001). Tomando esto en consideración, los resultados sugieren que la presencia de cultivos de salmones y mitílidos en el canal Caucahué implica la adición de DOM biodisponible a la columna de agua, pudiendo influir en la composición de aminoácidos tanto libres como de proteínas disueltas disponibles en el ambiente, a nivel local.

#### **4.1.2 Actividad enzimática intracelular específica de la comunidad microplanctónica en el canal Caucahué.**

De las enzimas medidas en este estudio, la actividad enzimática específica de MDH fue la que mostró mayor actividad, lo que coincide con lo reportado por González y Quiñones (2009) para comunidades microplanctónicas en la zona centro-sur y norte de Chile. En ambas transectas realizadas en Caucahué, la actividad de la MDH se encuentra en el rango reportado por González *et al.* (submitted) y Garcés *et al.* (2020) medida en experimentos de microcosmos en sitios cercanos a la zona de estudio (Achao, Mar interior de Chiloé), en el centro-sur de Chile (bahía Coliumo) y en comunidades microbianas de la columna de agua en el norte de Chile (González

y Quiñones, 2009). La actividad específica de la MDH se caracterizó por ser significativamente mayor en las cercanías a los centros de cultivo (S3 y S2) y en la estación M1, donde también se observó una mayor concentración de clorofila-a, abundancia picoplanctónica, amonio y nitrito. Esto se relaciona con la mayor remineralización asociada a estos lugares debido a la concentración y biodisponibilidad de materia orgánica (Figs. 3 y 4), ya que un incremento en la actividad de MDH indica, en general, un incremento en la remineralización de materia orgánica en suelos (Martínez *et al.*, 2002) y se ha propuesto como un indicador de actividad microbiana en comunidades microplanctónicas en la columna de agua del Sistema de Corrientes de Humboldt (Quiñones *et al.*, 2002; González y Quiñones, 2009). Por otra parte, la actividad de la Citrato Sintasa (CS) se asoció principalmente a comunidades microbianas de la zona más superficial de la columna de agua (2 y 10m) en ambas transectas, lo que es consistente, ya que la CS es característica del metabolismo aeróbico, participando en el primer paso del ciclo de Krebs catalizando la formación de citrato desde el acetyl-CoA y oxalacetato. La CS puede ser utilizada como índice cuantitativo de esta vía metabólica (Lehninger, 1975). En zonas costeras del norte de Chile se ha reportado una correlación significativa de CS y MDH con la concentración de oxígeno en la columna de agua (González y Quiñones, 2009), dado el rol conocido de estas enzimas en el metabolismo aeróbico involucrado en la producción de energía (Lehninger, 1975; Hochachka y Somero, 1984; Vetter *et al.*, 1994). Por el contrario, la actividad de MPOR se asoció a profundidades mayores (10 m y 40/50m), lo cual también es consistente dada su función relacionada al metabolismo anaeróbico y fermentativo (González y Quiñones, 2009). La actividad de MPOR en TS se encuentra en los rangos reportados por González y Quiñones (2009) para el norte de Chile; no obstante, los valores de TM están por sobre lo reportado por estos autores, lo que podría interpretarse como un indicio del aporte del cultivo de mitílidos a las condiciones propicias para metabolismo asociado a la hipoxia a través de, por ejemplo, la biodepositación en el fondo. Esto sugiere una estructuración en el metabolismo de la columna de agua, con un metabolismo principalmente aeróbico asociado a superficie, un metabolismo hipóxico asociado al fondo, y un metabolismo intermedio indicador de mayor remineralización de MO asociada a los centros de cultivo.

La señal biogeoquímica de la acuicultura a través de las variables analizadas en el canal Caucahué, mostraron una variabilidad asociada a la cercanía a los centros de cultivo y secundariamente a la profundidad (Fig. 5) para cada transecta. En conjunto, los resultados reflejan que los cultivos de salmónidos y mitílidos contribuyen con materia orgánica disuelta biodisponible (lábil) alóctona que puede sustentar el metabolismo y actividad de la comunidad microbiana, donde las proteínas disueltas pueden llegar a contribuir cerca del 50% de DOC en las cercanías de los cultivos (Fig. 4). Esto concuerda con estudios previos que reportan que el material proteínico representa una fracción mayor de la materia orgánica derivada de la salmonicultura y lo han sugerido como de alto valor para la actividad heterotrófica (Nimptsh *et al.*, 2015; Kamjunke *et al.*, 2017). No obstante, sitios un poco lejanos a los cultivos estudiados (i.e. Cm) mostraron la posible presencia de otras fuentes de DOM biodisponible (i.e. DI en estación control Cm; Fig. 5b), lo cual puede relacionarse a cambios o aportes desde la circulación por el lado sur del mar interior de Chiloé, como lo describe González *et al.* (2019), quienes reportaron mayor DOM lábil de origen autóctono, y/o provenientes de plantas de agua residuales en el mar interior de Chiloé (Pavón *et al.*, 2022).

#### **4.2 Respuesta metabólica de la comunidad microbiana planctónica marina a la adición de DOM derivada de la salmonicultura**

La actividad específica de MDH en el control del experimento de microcosmo estuvo en los rangos reportados por Garcés *et al.* (2020) y González *et al.* (submitted) en el mar interior de Chiloé (0-10 y 3 pmol NADH pg ATP-1 min<sup>-1</sup>, respectivamente), así como fue consistente con los valores encontrados en la columna de agua del canal Caucahué en este estudio (Fig. S2 c). La adición de F y M-DOM aumentaron notablemente la actividad de MDH desde el inicio del experimento en ambas fracciones de tamaño llegando a un promedio en el tiempo de sobre 400%, respecto al control. En cambio, la adición P-DOM si bien generó una estimulación en la actividad de MDH, esta fue de menor medida y más tardía (después de las 12h; Fig. 6 a y b). Cabe señalar que la magnitud de la actividad de la MDH en la F<1µm fue mayor que la FTot durante el experimento. Como se discutió en la sección previa, el incremento de la actividad de la MDH se ha utilizado como indicativo del aumento de la remineralización de MO, ya que

refleja la reacción oxidativa metabólica global de la comunidad microbiana (Martínez *et al.*, 2002) y es un indicador de la actividad microbiana planctónica en la columna de agua (González y Quiñones, 2009), en este caso dado por la adición de DOM de distintas fuentes.

Por otra parte, las tasas específicas de consumo de oxígeno fueron poco consistentes con lo observado para MDH, coincidiendo parcialmente solo para la  $F_{total}$ , hasta las 24h, con mayores tasas en los tratamientos de F y M-DOM respecto al control. Las tasas de respiración para P-DOM fueron notablemente mayores, pero solo entre las 12 y 24h para luego disminuir a valores incluso bajo el control. Por otro lado, la  $F > 1\mu\text{m}$  fue altamente variable entre tratamientos y en el tiempo. Como se observó para MDH, las tasas específicas de respiración de la  $F < 1$  en general fueron 2 veces mayor que la  $F_{total}$ . El consumo de oxígeno en el control de la  $F_{total}$  estuvo en el rango de estudios previos en el mar interior de Chiloé (González *et al.*, submitted), pero para  $F < 1$  estuvieron por sobre lo reportado en dicho estudio.

La actividad enzimática extracelular (AEE) específica se estimó para tres enzimas: leucina aminopeptidasa (LAP),  $\beta$ -glucosidasa ( $\beta$ -GLU) and lipasa (LIP), como indicadores de la degradación de compuestos proteínicos, glúcidos y lípidos respectivamente. Durante el experimento la AEE de las tres enzimas fueron detectadas para ambas fracciones de tamaño. Al igual que para MDH y la respiración específica, la respuesta de la AEE de la  $F > 1\mu\text{m}$  fue mayor que  $F_{total}$ , especialmente en LAP, posiblemente porque  $F < 1$  se “beneficia” de la disminución o ausencia de predadores y a su vez por la mayor biomasa (concentración de ATP) en  $F_{total}$ , resultando en mayor actividad específica (MDH, respiración y AEE) para  $F > 1\mu\text{m}$ , como se ha observado en otras investigaciones (González y Quiñones, 2009; Garcés *et al.*, 2020; González *et al.*, submitted). La AEE específica de todas las enzimas en el control y para ambas fracciones estuvieron en los rangos reportados por González *et al.* (submitted); LAP:  $F_{total} = 3-10$ ,  $F > 1\mu\text{m} = 0-2$ , GLU:  $F_{total} = 3-10$ ,  $F > 1\mu\text{m} = 5-8$ , LIP:  $F_{total} = 10-35$ ,  $F > 1\mu\text{m} = 5-25$ , excepto LAP en  $F > 1\mu\text{m}$ , la cual fue 10 veces mayor en este estudio. Cabe señalar que la AEE no específica en los controles ( $10-86 \text{ nmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ; data no mostrada) fueron consistentes con los rangos reportados por Pantoja *et al.*, (2011; LAP: 1,2 a 182  $\text{nmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ,  $\beta$ -GLU: 0,08-61  $\text{nmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ), por Gutiérrez *et al.* (2011; LAP: 10 a 229  $\text{nmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) en Chile central, por González *et al.* (submitted; 18 a 77  $\text{nmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) en Achao, mar interior de Chiloé, por Obayashi *et al.* (2005;

LAP: 15-80 nmol L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> ) en aguas superficiales costeras en Japón, y por Caruso *et al.*, (2003; LAP: 11-446 nmol L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>) con actividad acuicultora en el Mar Mediterráneo. Sin embargo, las tasas no específicas de β-GLU en el control de este estudio (5 a 13 nmol L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>) estuvieron por debajo de las reportadas por Garcés *et al.* (2020; 114-142 nmol L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>) y González *et al.* (*submitted*; 22-69 nmol L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>) para un área en el mar interior de Chiloé (Achao) y de Caruso *et al.* (2003; 92-140 nmol L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>) para un área influenciada por acuicultura en el Mar Mediterráneo. Las tasas no específicas de LIP (13-175 nmol L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>; data no mostrada) se encuentran ligeramente sobre el rango de las reportadas para la zona sur de Chile (González *et al.* *submitted*; 41-128 nmol L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>) y dentro del rango reportado por Yamada *et al.* (2010; 15-230 nmol L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>) para aguas superficiales en Tokyo. El promedio en el tiempo de las tasas no específicas de FTotal en los tratamientos F y M-DOM fueron 8 y 4 veces mayores a los rangos reportados previamente para LEU (mencionados más arriba), sin embargo, el P-DOM se mantuvo en el límite superior. Para GLU, todos los tratamientos se mantuvieron en el rango, mientras que para LIP; P, F y M-DOM superaron los rangos 6, 4 y 8 veces respectivamente.

La adición de F y M-DOM en los experimentos generaron la mayor estimulación en la actividad específica de las tres enzimas estudiadas, lo cual es consistente con lo observado para la actividad de MDH y la respiración en este experimento. La respuesta de la actividad específica de LAP fue muy rápida (0h) y significativa durante toda la incubación, en cambio el aumento de la actividad específica de GLU y LIP fueron más notorias después de las 6-12h. Esto puede ser reflejo de la alta reactividad de los compuestos proteínados (aminoácidos) respecto a los glúcidos y lípidos que están contenidos en las fecas y alimento de peces. Ahora bien, la actividad específica de LAP fue particularmente alta para F-DOM, sugiriendo que esta fuente de materia orgánica genera un mayor impacto que la impulsada por el alimento (P-DOM), el cual solo aumentó notoriamente la actividad de LAP desde las 48h. La respuesta de la actividad específica de GLU a la adición de F y M-DOM generó un aumento más paulatino en comparación con LAP, este aumento fue significativo en ambas fracciones especialmente a las 48h (1000%), donde también P-DOM generó las máximas tasas, pero de menor magnitud que F-DOM. Estos resultados al igual que en LAP refleja una mayor reactividad y degradación de la DOM derivada de fecas respecto a los otros tratamientos. La respuesta de la actividad específica de LIP, al igual

que LAP y GLU, fue rápida y significativa a la adición de F-DOM en ambas fracciones, sin embargo, la adición de M-DOM generó el máximo estímulo durante el experimento, después de las 12h. La alta actividad registrada en el tratamiento de M-DOM observada en LAP, y en segundo lugar para LAP y GLU, refleja que la mezcla de compuestos orgánicos puede resultar en una mayor actividad metabólica, como posible resultado de, por ejemplo, el “priming effect” (PE). El PE es un proceso donde la adición de materia orgánica lábil modifica (generalmente incrementa) la degradación microbiana de DOM recalcitrante o menos lábil (Blagodatskaya y Kuzyakov 2008).

Los resultados de nuestro estudio asociados a la actividad metabólica microbiana (actividad específica de MDH, respiración y AEE) pueden estar relacionados al nivel de “procesamiento” que tienen ambos sustratos principales (fecas y alimento) y es consistente con lo observado por Fernández-Jover *et al.*, (2007) y Piedecausa *et al.*, (2010), quienes reportaron que la liberación de DOM es más rápida y alta en las fecas respecto al pellet. Estos resultados reflejan que la DOM derivada de la salmonicultura tiene efectos diferenciales, donde la F y M-DOM generan la mayor actividad metabólica, dejando a P-DOM en tercer lugar manteniendo valores muy cercanos a control y N-DOM durante las primeras horas 12h del experimento. Esto concuerda con lo reportado por Montero *et al.*, (2020), quienes observaron las máximas tasas de EEA de aminopeptidasa después de las 24h-48h del bacterioplancton, en respuesta a la adición de DOM derivado de pellets. Cabe señalar que el aumento “tardío” de la actividad en P-DOM concuerda con el alza en la biomasa en ambas fracciones y en la abundancia bacterioplanctónica desde las 48h en nuestro experimento, sugiriendo un potencial uso del C en la producción de biomasa. La adición de N-DOM generó cambios pequeños respecto al control, lo cual también coincide con el estudio de Montero *et al.* (2022), quienes encontraron mayor actividad (producción bacteriana y AEE-LAP) en enriquecimientos con DOM de alimento de salmones en comparación con DOM de un cultivo de diatomeas. Por otra parte, la menor y tardía actividad en los tratamientos con P-DOM podría estar ligada a la presencia de etoxiquina (González *et al.*, *submitted*) y sus metabolitos, así como de otros aditivos utilizados en la fabricación de alimento de peces de los cuales aún no se conoce el efecto en el metabolismo de la comunidad microbiana planctónica marina. Estos resultados indican que la DOM derivada de la salmonicultura es rápidamente

metabolizada y, por lo tanto, puede ser considerada como un sustrato reactivo e importante para la actividad microbiana heterótrofa en la columna de agua.

La alta reactividad de los sustratos utilizados en el experimento (reflejados en la alta actividad metabólica), fue consistente con las características de la DOM, las cuales se estimaron a través del análisis de aminoácidos, ya que, como se discutió previamente (ver sección 4.1.1), los aminoácidos son un parte cuantitativamente importante y biológicamente lábil de la DOM (Davis *et al.*, 2009; Kaiser y Benner, 2012). Sin embargo, hasta donde sabemos, no se han reportado experimentos de esta naturaleza asociados a la DOM derivada de la salmonicultura. La concentración de proteínas (DCAA) y aminoácidos libres disueltos (DFAA) en el control, se encuentran en el rango medido en la columna de agua en este estudio (Figs. 4 a y S3 a) y para otros sitios costeros (Coffin, 1989; Pantoja *et al.*, 2009; 2011; Valdés *et al.*, 2017). La F y P-DOM fueron los sustratos con mayor concentración de DFAA y proteínas disueltas, al inicio del experimento, respectivamente (Fig. 8), a pesar de que la concentración inicial de nitrógeno, fósforo y carbono orgánico disuelto fue mayor en P-DOM (Tabla 2), lo cual coincide con Wang *et al.*, (2013) quien reporta un mayor contenido de C y N en el alimento respecto al de fecas en un centro de cultivo de salmones en Noruega. La concentración de DFAA y proteínas disueltas disminuyeron su concentración drásticamente en los tratamientos F y M-DOM desde el inicio del experimento (0h), mientras P-DOM se mantiene constante hasta las 24h y luego cae hacia las últimas horas del experimento (Fig. 8). La contribución de las proteínas y aminoácidos libres disueltos a la concentración de DOC ( $\% \text{DOC}_{\text{DCAA}}$  y  $\% \text{DOC}_{\text{DFAA}}$ ) varía entre 20-65% y 0,8-18%, respectivamente (data no mostrada), lo que es consistente con lo encontrado en las cercanías de los cultivos en este estudio (Fig. 4) y con la proporción general de proteínas utilizadas en el alimento de peces (40-50%; Davis, 2015). El mayor aporte de  $\% \text{DOC}_{\text{DCAA}}$  y  $\% \text{DOC}_{\text{DFAA}}$  proviene de F-DOM, y su variación en el tiempo fue similar a los observado para DCAA y DFAA, disminuyendo rápidamente en el tiempo en particular para F y M-DOM (Fig. 8 a y b). Similarmente a lo observado en la concentración de carbono y nitrógeno orgánico disuelto, los cuales disminuyen en casi todos los tratamientos, siendo notorio para P-DOM solo desde las 48h removiendo entre el 28 y 49% inicial (Tabla 2). Estos resultados son consistentes con lo reportado por Davis *et al.*, (2009) en un experimento con enriquecimiento de DOM y POM de

diferentes orígenes marinos (plancton, diatomeas, anfípodos), pero a largo plazo (20-33 días), quienes observan una notable disminución en DAA, %DOC<sub>DAA</sub>, DON y DOC al inicio del experimento (2 días). Por su parte, DI fue variable en el tiempo y entre tratamientos, dada la alta actividad generada con el enriquecimiento que paralelamente va modificando la calidad de la DOM (Owaga *et al.*, 2001; Davis *et al.*, 2009). En general, en nuestros experimentos se observó un mayor DI de F-DOM, seguido por N y M-DOM (Figs. 8 c y S7), y por el contrario P-DOM presento los valores menores (incluso que el control). Esto es consistente con la actividad metabólica observada y puede explicar el menor efecto o más lenta reacción de la P-DOM observada en las tasas metabólicas. Cabe señalar que el DI estimado en todos los tratamientos fueron positivos, altos y consistente con lo encontrado en el estudio de transectas en la columna de agua (TS, Fig. 4 c) indicando que la DOM, tanto en el sitio de estudio como la derivada de alimento, fecas, natural y mezcla, son sustratos biodisponibles. Además, el mayor valor DI en F-DOM (DI = 6-9, Fig. S7) es congruente con los valores de DI encontrados en la estación más cercana al cultivo de salmónidos (S3; Fig. 4b).

La variación entre tratamientos y en el tiempo también se evidencia al observar la composición aminoacídica y el % molar de las proteínas disueltas y DFAA, donde las primeras mostraron una mayor disimilitud en comparación al control de N-DOM, seguido de F y P-DOM (Tabla S6) en contraste a DFAA que mostró mayor disimilitud en M-DOM durante el experimento. En las proteínas disueltas la contribución de Asp, Arg y Met se relacionaron con el control, mientras los tratamientos principalmente con Glu, Thr y Ser, lo cual también es consistente con la composición aminoacídica de proteínas disueltas en las cercanías de centros de cultivo de salmónes (TS). Similarmente a lo observado y discutido previamente en el estudio de transecta (sección 4.1.1), el mayor DI encontrado en F, N y M-DOM, coincide con la contribución de Thr. Sin embargo, esto no se refleja en los DFAA durante el experimento (Fig. S9 a y b).

Los resultados del experimento de microcosmo con adición de DOM analizado en su conjunto, reflejan una variación principalmente dada por los tratamientos y secundariamente por el tiempo (Fig. 9). Esta variación asociada a los tratamientos caracteriza principalmente a P-DOM como una fuente de DOM y nutrientes inorgánicos, posiblemente dada la concentración

resultante en el experimento (Tabla 2). Sin embargo, los tratamientos F y M-DOM se caracterizaron por su mayor actividad metabólica (MDH, respiración y AEE) y DI, lo que concuerda con lo reportado por González *et al.* (2019), quienes relacionan la biodisponibilidad de la DOM a través del análisis de aminoácidos y el aumento de la actividad microbiana heterotrófica en un área oligotrófica. Así como con Kamjunke *et al.* (2017), quienes reportan una alta producción bacteriana asociada a DOM lábil (a través de medidas de fluorescencia, espectrometría de masa de ultra alta resolución y espectroscopia de resonancia nuclear magnética) derivada de la acuicultura. Lo que refleja que la calidad de la DOM es un factor fundamental para el metabolismo de la comunidad microbiana planctónica.

En el océano los aminoácidos y proteínas se consideran sustratos altamente lábiles que sostienen una proporción muy significativa de la producción microbiana (Nagata 2008), así como de AEE (Hoppe *et al.*, 2002). La producción primaria es considerada la principal fuente de DOM lábil de origen autóctono (Azam *et al.*, 1983; Duclow *et al.*, 1995; Aristegui *et al.*, 2005; Azam y Malfatti, 2007) y en sistemas costeros altamente productivos se ha observado una mayor tasa de AEE asociada a floraciones fitoplanctónicas (Gutiérrez *et al.*, 2011; Pantoja *et al.*, 2011). Además, se ha observado en sistemas oligotróficos que la influencia de DOM alóctona proveniente de ríos es un sustrato lábil, con mayor DI, sosteniendo una alta producción bacteriana y respiración comunitaria (González *et al.*, 2019). Por otra parte, uno de los mayores riesgos de la acuicultura es el alto enriquecimiento de sustancias orgánicas e inorgánicas en la columna de agua y sedimentos (Hargrave *et al.*, 2010; Quiñones *et al.*, 2019), como fuente alóctona de materia orgánica. La carga orgánica (eutroficación) y otros problemas ambientales derivados de la acuicultura han sido reportados a nivel global y su frecuencia ha ido en aumento (Zhang *et al.* 2019). Tomando esta información en conjunto, nuestros resultados sustentan y amplían estudios previos (ej. Nimptsch *et al.*, 2015; Kamjunke *et al.*, 2017; Montero *et al.*, 2022) que reportan que la DOM derivada de la acuicultura, en particular de la salmonicultura, es una fuente de DOM biodisponible, especialmente la proveniente de fecas de salmónidos, sosteniendo altas tasas metabólicas de la comunidad microbiana en la columna de agua. Esto puede tener implicancias en el ciclo de C, N y P a nivel local, por ejemplo, mayores tasas de respiración resultan en un mayor consumo de oxígeno en la columna de agua, lo cual puede

incrementar el riesgo de generación de condiciones hipóxicas, como se ha sugerido para otras zonas influenciadas por la acuicultura en Chile, como el fiordo Puyuhuapi (Schneider *et al.*, 2014; Silva y Vargas, 2014; Pérez-Santos, 2017).

## 5. Conclusiones

Nuestros resultados indican que áreas cercanas a centros de cultivo de salmones y mitílicos en el canal Caucahué, presentan una mayor concentración de DOM (nitrógeno y fosforo), y de mayor labilidad en comparación con sitios más apartados; así como también una mayor concentración de nutrientes regenerados como el  $\text{NH}_4^+$ , abundancia picoplanctónica y actividad metabólica microbiana (MDH). No obstante, nuestro estudio no discrimina otras posibles fuentes de materia orgánica lábil provenientes de las cercanías del canal Caucahué en el mar interior de Chiloé.

El experimento de microcosmos indicó que la DOM derivada de la salmonicultura incrementa las tasas de actividad de la MDH, respiración (consumo de oxígeno) y AEE (especialmente la de LEU) de la comunidad microbiana, con efectos diferenciales en el metabolismo según su origen. Los resultados indican que la materia orgánica disuelta de fecas es más biodisponible que las provenientes de otras fuentes estudiadas, generando respuestas más rápidas y de mayor magnitud en las tasas metabólicas de la comunidad microbiana planctónica marina.

Finalmente, la acuicultura genera señales biogeoquímicas en la columna de agua dadas principalmente por la entrada de materia orgánica alóctona proveniente de los cultivos y la subsecuente remineralización de nutrientes. Esta materia orgánica disuelta derivada de la acuicultura es un sustrato biodisponible para la comunidad microbiana, sosteniendo una alta actividad metabólica en la columna de agua.

## Referencias

- Arístegui, J., Agustí, S., Middelburg, J. J., & Duarte, C. M. (2005). Respiration in the mesopelagic and bathypelagic zones of the oceans. *Respiration in aquatic ecosystems*, 181(205), 10.1093.
- Arvanitoyannis, I. S., & Kassaveti, A. (2008). Fish industry waste: treatments, environmental impacts, current and potential uses. *International journal of food science & technology*, 43(4), 726-745.
- Aufdenkampe, A. K., Hedges, J. I., Richey, J. E., Krusche, A. V., & Llerena, C. A. (2001). Sorptive fractionation of dissolved organic nitrogen and amino acids onto fine sediments within the Amazon Basin. *Limnology and Oceanography*, 46(8), 1921-1935.
- Azam, F. (1998). Microbial control of oceanic carbon flux: the plot thickens. *Science*, 280(5364), 694-696.
- Azam, F., Fenchel, T., Field, J. G., Gray, J. S., Meyer-Reil, L.-A., & Thingstad, F. (1983). The ecological role of water-column microbes in the sea. *Marine ecology progress series*, 257-263.
- Azam, F., & Malfatti, F. (2007). Microbial structuring of marine ecosystems. *Nature Reviews Microbiology*, 5(10), 782-791.
- Benner, R., & Kaiser, K. (2011). Biological and photochemical transformations of amino acids and lignin phenols in riverine dissolved organic matter. *Biogeochemistry*, 102(1), 209-222.
- Benner, R., & Strom, M. (1993). A critical evaluation of the analytical blank associated with DOC measurements by high-temperature catalytic oxidation. *Marine Chemistry*, 41(1-3), 153-160.
- Blagodatskaya, E., & Kuzyakov, Y. (2008). Mechanisms of real and apparent priming effects and their dependence on soil microbial biomass and community structure: critical review. *Biology and Fertility of Soils*, 45(2), 115-131.
- Bulleid, N. (1978). An improved method for the extraction of adenosine triphosphate from marine sediment and seawater. *Limnology and Oceanography*, 23(1), 174-178.
- Burridge, L., Weis, J. S., Cabello, F., Pizarro, J., & Bostick, K. (2010). Chemical use in salmon aquaculture: a review of current practices and possible environmental effects. *Aquaculture*, 306(1-4), 7-23.
- Buschmann, A. H., Cabello, F., Young, K., Carvajal, J., Varela, D. A., & Henríquez, L. (2009). Salmon aquaculture and coastal ecosystem health in Chile: analysis of regulations, environmental impacts and bioremediation systems. *Ocean & Coastal Management*, 52(5), 243-249.
- Carlson, C. A., & Hansell, D. A. (2015). DOM sources, sinks, reactivity, and budgets. *Biogeochemistry of marine dissolved organic matter*, 65-126.
- Caruso, G. (2014). Effects of aquaculture activities on microbial assemblages. *Oceanography*, 2(02).
- Caruso, G., Genovese, L., Mancuso, M., & Modica, A. (2003). Effects of fish farming on microbial enzyme activities and densities: comparison between three Mediterranean sites. *Letters in Applied Microbiology*, 37(4), 324-328

- Chamberlain, J., Fernandes, T. F., Read, P., Nickell, T. D., & Davies, I. M. (2001). Impacts of biodeposits from suspended mussel (*Mytilus edulis* L.) culture on the surrounding surficial sediments. *ICES Journal of Marine Science*, 58(2), 411-416.
- Childress, J., & Somero, G. (1979). Depth-related enzymic activities in muscle, brain and heart of deep-living pelagic marine teleosts. *Marine Biology*, 52(3), 273-283.
- Coffin, R. B. (1989). Bacterial uptake of dissolved free and combined amino acids in estuarine waters. *Limnology and Oceanography*, 34(3), 531-54
- Cole, J. J. (1982). Interactions between bacteria and algae in aquatic ecosystems. *Annual review of Ecology and systematics*, 13, 291-314.
- Dauwe, B., & Middelburg, J. J. (1998). Amino acids and hexosamines as indicators of organic matter degradation state in North Sea sediments. *Limnology and Oceanography*, 43(5), 782-798.
- Dauwe, B., Middelburg, J. J., Herman, P. M., & Heip, C. H. (1999). Linking diagenetic alteration of amino acids and bulk organic matter reactivity. *Limnology and Oceanography*, 44(7), 1809-1814.
- Davis, D. A. (Ed.). (2015). *Feed and feeding practices in aquaculture*. Woodhead publishing.
- Davis, J., Kaiser, K., & Benner, R. (2009). Amino acid and amino sugar yields and compositions as indicators of dissolved organic matter diagenesis. *Organic Geochemistry*, 40(3), 343-352.
- Del Giorgio, P. A., & Cole, J. J. (1998). Bacterial growth efficiency in natural aquatic systems. *Annual review of Ecology and systematics*, 503-541.
- Ducklow, H., Carlson, C., Bates, N., Knap, A., & Michaels, A. (1995). Dissolved organic carbon as a component of the biological pump in the North Atlantic Ocean. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 348(1324), 161-167.
- FAO. 2018. *The State of World Fisheries and Aquaculture 2018 - Meeting the sustainable development goals*. Rome. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO <http://www.fao.org/3/I9540EN/i9540en.pdf>.
- Fernandez-Jover, D., Sanchez-Jerez, P., Bayle-Sempere, J., Carratala, A., & Leon, V. M. (2007). Addition of dissolved nitrogen and dissolved organic carbon from wild fish faeces and food around Mediterranean fish farms: implications for waste-dispersal models. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 340(2), 160-168.
- Fernandez, C., Rain-Franco, A., Rojas, C., & Molina, V. (2020). Ammonium release via dissolution and biological mineralization of food pellets used in salmon farming. *Aquaculture Research*, 51(2), 779-793. doi:<https://doi.org/10.1111/are.14428>
- Fuentes, M. E., Quinones, R. A., Gutierrez, M. H., & Pantoja, S. (2015). Effects of temperature and glucose concentration on the growth and respiration of fungal species isolated from a highly productive coastal upwelling ecosystem. *fungus ecology*, 13, 135-149.
- Garcés, D. V., Fuentes, M. E., & Quiñones, R. A. (2020). Effect of Azamethiphos on enzymatic activity and metabolic fingerprints of marine microbial communities from the water column. *Aquaculture*, 529, 735650.
- Garzón-Cardona, J. E., Guinder, V. A., Alonso, C., Martínez, A. M., Pantoja-Gutiérrez, S., Kopprio, G. A., Krock B. & Lara, R. J. (2021). Chemically unidentified dissolved

- organic carbon: A pivotal piece for microbial activity in a productive area of the Northern Patagonian shelf. *Marine Environmental Research*, 167, 105286.
- González, H. E., Nimptsch, J., Giesecke, R., & Silva, N. (2019). Organic matter distribution, composition and its possible fate in the Chilean North-Patagonian estuarine system. *Science of The Total Environment*, 657, 1419-1431.
- Gonzalez, M. L., Blain, S., & Obernosterer, I. (2019). Seasonal freshening of NW Mediterranean surface water impacts microbial heterotrophic activity and dissolved organic matter. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 230, 106448.
- Gonzalez, M. L., Fuentes M.E., Molina V. & Quiñones R.A. Effects of ethoxyquin on metabolism and composition of marine microbial communities. *Aquaculture* (submitted June 2022)
- González, R., & Quiñones, R. (2009). Common catabolic enzyme patterns in a microplankton community of the Humboldt Current System off northern and central-south Chile: Malate dehydrogenase activity as an index of water-column metabolism in an oxygen minimum zone. *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography*, 56(16), 1095-1104.
- Gowen, R. (1992). *Aquaculture and the environment*. Special Publication European Aquaculture Society.
- Grasshoff, K., Ehrhardt, M., & Kremling, K. (1983). *Seawater Analysis*. In: *Chemie, Weinheim*.
- Gutiérrez, M., Pantoja, S., Tejos, E., & Quiñones, R. (2011). The role of fungi in processing marine organic matter in the upwelling ecosystem off Chile. *Marine Biology*, 158(1), 205-219.
- Hargrave, B. T. (2010). Empirical relationships describing benthic impacts of salmon aquaculture. *Aquaculture Environment Interactions*, 1(1), 33-46
- Haya, K., Burrige, L., & Chang, B. (2001). Environmental impact of chemical wastes produced by the salmon aquaculture industry. *ICES Journal of Marine Science*, 58(2), 492-496.
- Hedges, J. I., & Hare, P. (1987). Amino acid adsorption by clay minerals in distilled water. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 51(2), 255-259.
- Hochachka, P. W., & Somero, G. N. (1984). *Biochemical Adaptation* Princeton University Press. Princeton, New Jersey, 538.
- Holm-Hansen, O., Lorenzen, C. J., Holmes, R. W., & Strickland, J. D. (1965). Fluorometric determination of chlorophyll. *ICES Journal of Marine Science*, 30(1), 3-15.
- Holm-Hansen, O., & Booth, C. R. (1966). The measurement of adenosine triphosphate in the ocean and its ecological significance 1. *Limnology and Oceanography*, 11(4), 510-519.
- Holmes, R. M., Aminot, A., Kérouel, R., Hooker, B. A., & Peterson, B. J. (1999). A simple and precise method for measuring ammonium in marine and freshwater ecosystems. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 56(10), 1801-1808.
- Hoppe, H.-G. (1983). Significance of exoenzymatic activities in the ecology of brackish water: measurements by means of methylumbelliferyl-substrates. *Marine ecology progress series*, 299-308.
- Hoppe, H. G., Arnosti, C., & Herndl, G. J. (2002). Ecological significance of bacterial enzymes in the marine environment. *Enzymes in the environment: activity, ecology, and applications*, 73-107.

- Horta, P. A., Rörig, L. R., Costa, G. B., Baruffi, J. B., Bastos, E., Rocha, L. S., Destri, G., & Fonseca, A. L. (2021). Marine Eutrophication: Overview from Now to the Future. *Anthropogenic Pollution of Aquatic Ecosystems*, 157-180.
- Iriarte, J. L. (2018). Natural and human influences on marine processes in Patagonian Subantarctic coastal waters. *Frontiers in Marine Science*, 5, 360.
- Kaal, J. Sources of organic detritus under mussel farms in the Ría de Ares-Betanzos.
- Kaiser, K., & Benner, R. (2009). Biochemical composition and size distribution of organic matter at the Pacific and Atlantic time-series stations. *Marine Chemistry*, 113(1-2), 63-77.
- Kaiser, K., & Benner, R. (2012). Organic matter transformations in the upper mesopelagic zone of the North Pacific: Chemical composition and linkages to microbial community structure. *Journal of Geophysical Research: Oceans*, 117(C1).
- Kamjunke, N., Nimptsch, J., Harir, M., Herzsprung, P., Schmitt-Kopplin, P., Neu, T. R., Graeber, D., Osorio, S., Valenzuela, J., Reyes, C.R., Woelfl, S., & Hertkorn, N. (2017). Land-based salmon aquacultures change the quality and bacterial degradation of riverine dissolved organic matter. *Scientific reports*, 7(1), 1-15.
- Karl, D. M. (2003). Total microbial biomass estimation derived from the measurement of particulate adenosine-5'-Triphosphate. In *Handbook of methods in aquatic microbial ecology* (pp. 359-368): CRC Press.
- Keil, R. G., Tsamakis, E., Fuh, C. B., Giddings, J. C., & Hedges, J. I. (1994). Mineralogical and textural controls on the organic composition of coastal marine sediments: Hydrodynamic separation using SPLITT-fractionation. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 58(2), 879-893.
- La Rosa, T., Mirto, S., Favaloro, E., Savona, B., Sarà, G., Danovaro, R., & Mazzola, A. (2002). Impact on the water column biogeochemistry of a Mediterranean mussel and fish farm. *Water Research*, 36(3), 713-721.
- Law, B., Hill, P., Maier, I., Milligan, T., & Page, F. (2014). Size, settling velocity and density of small suspended particles at an active salmon aquaculture site. *Aquaculture Environment Interactions*, 6(1), 29-42.
- Lehninger, A. L. (1975). *Biochemistry*. Worth Publ. Inc., New York.
- Lindroth, P., & Mopper, K. (1979). High performance liquid chromatographic determination of subpicomole amounts of amino acids by precolumn fluorescence derivatization with o-phthaldialdehyde. *Analytical chemistry*, 51(11), 1667-1674.
- Marie, D., Partensky, F., Vaulot, D., & Brussaard, C. (1999). Enumeration of phytoplankton, bacteria, and viruses in marine samples. *Current protocols in cytometry*, 10(1), 11.11. 11-11.11. 15.
- Martínez, C. A., Montiel, M. C., & Reyes, L. L. (2002). Actividad biológica en un transecto altitudinal de suelos de La Malinche, Tlaxcala. *Terra Latinoamericana*, 20(2), 141-146.
- Molina, V., & Fernández, C. (2020). Bacterioplankton response to nitrogen and dissolved organic matter produced from salmon mucus. *MicrobiologyOpen*, 9(12), e1132.
- Montero, P., Gutiérrez, M. H., Daneri, G., & Jacob, B. (2022). The Effect of Salmon Food-Derived DOM and Glacial Melting on Activity and Diversity of Free-Living Bacterioplankton in Chilean Patagonian Fjords. *Frontiers in Microbiology*, 12. doi:10.3389/fmicb.2021.772900

- Nagata T (2000) Production mechanisms of dissolved organic matter. In: Kirchman DL (ed) Microbial ecology of the oceans. Wiley-Liss, New York, NY, p 121–152
- Nagata T (2008) Organic matter-bacteria interactions in seawater. In: Kirchman DL (ed) Microbial ecology of the oceans, 2nd edn. Wiley, New York, pp 207–241
- Navarro, N., Leakey, R. J., & Black, K. D. (2008). Effect of salmon cage aquaculture on the pelagic environment of temperate coastal waters: seasonal changes in nutrients and microbial community. *Marine ecology progress series*, 361, 47-58.
- Nimptsch, J., Woelfl, S., Osorio, S., Valenzuela, J., Ebersbach, P., von Tuempling, W., Palma, R., Encina, F., Figueroa, D., Kamjunke, N., & Graeber, D. (2015). Tracing dissolved organic matter (DOM) from land-based aquaculture systems in North Patagonian streams. *Science of the Total Environment*, 537, 129-138
- Nizzoli, D., Welsh, D. T., Bartoli, M., & Viaroli, P. (2005). Impacts of mussel (*Mytilus galloprovincialis*) farming on oxygen consumption and nutrient recycling in a eutrophic coastal lagoon. *Hydrobiologia*, 550(1), 183-198.
- Obayashi, Y., & Suzuki, S. (2005). Proteolytic enzymes in coastal surface seawater: significant activity of endopeptidases and exopeptidases. *Limnology and oceanography*, 50(2), 722-726
- Obernosterer, I., Fourquez, M., & Blain, S. (2015). Fe and C co-limitation of heterotrophic bacteria in the naturally fertilized region off the Kerguelen Islands. *Biogeosciences*, 12(6), 1983-1992.
- Olsen, L. M., Hernández, K. L., Van Ardelan, M., Iriarte, J. L., Bizsel, K. C., & Olsen, Y. (2017). Responses in bacterial community structure to waste nutrients from aquaculture: an in situ microcosm experiment in a Chilean fjord. *Aquaculture Environment Interactions*, 9, 21-32.
- Olsen, L. M., Hernández, K. L., Van Ardelan, M., Iriarte, J. L., Sánchez, N., González, H. E., Tokle, N., & Olsen, Y. (2014). Responses in the microbial food web to increased rates of nutrient supply in a southern Chilean fjord: possible implications of cage aquaculture. *Aquaculture Environment Interactions*, 6(1), 11-27.
- Ogawa, H., Amagai, Y., Koike, I., Kaiser, K., & Benner, R. (2001). Production of refractory dissolved organic matter by bacteria. *Science*, 292(5518), 917-920.
- Pantoja, S., Gutiérrez, M., Ampuero, P., & Tejos, E. (2011a). Degradation capability of the coastal environment adjacent to the Itata River in central Chile (36.5 S). *Biogeosciences*, 8(8), 2063-2074.
- Pantoja, S., Iriarte, J. L., & Daneri, G. (2011b). Oceanography of the Chilean Patagonia. *Continental shelf research*, 31(3-4), 149-153.
- Pantoja, S., & Lee, C. (1994). Cell-surface oxidation of amino acids in seawater. *Limnology and Oceanography*, 39(7), 1718-1726.
- Pantoja, S., & Lee, C. (1999). Peptide decomposition by extracellular hydrolysis in coastal seawater and salt marsh sediment. *Marine Chemistry*, 63(3-4), 273-291.
- Pantoja, S., Rossel, P., Castro, R., Cuevas, L. A., Daneri, G., & Córdova, C. (2009). Microbial degradation rates of small peptides and amino acids in the oxygen minimum zone of Chilean coastal waters. *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography*, 56(16), 1055-1062.

- Pavón, A., Riquelme, D., Jaña, V., Iribarren, C., Manzano, C., Lopez-Joven, C., ... & García, K. (2022). The High Risk of Bivalve Farming in Coastal Areas With Heavy Metal Pollution and Antibiotic-Resistant Bacteria: A Chilean Perspective. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 377.
- Peter, S., Shen, Y., Kaiser, K., Benner, R., & Durisch-Kaiser, E. (2012). Bioavailability and diagenetic state of dissolved organic matter in riparian groundwater. *Journal of Geophysical Research: Biogeosciences*, 117(G4).
- Pérez-Santos, I. (2017). Deep ventilation event during fall and winter 2015 in the Puyuhuapi Fjord (44.6 S). *Latin american journal of aquatic research*, 45(1), 223-227.
- Piedecausa, M., Aguado-Giménez, F., García-García, B., & Telfer, T. (2010). Total ammonia nitrogen leaching from feed pellets used in salmon aquaculture. *Journal of Applied Ichthyology*, 26(1), 16-20.
- Pillay, T. V. R. (1990). *Aquaculture: principles and practices: fishing news books*.
- Pitta, P., Apostolaki, E., Tsagaraki, T., Tsapakis, M., & Karakassis, I. (2006). Fish farming effects on chemical and microbial variables of the water column: a spatio-temporal study along the Mediterranean Sea. *Hydrobiologia*, 563(1), 99-108.
- Pitta, P., Karakassis, I., Tsapakis, M., & Zivanovic, S. (1999). Natural vs. mariculture induced variability in nutrients and plankton in the eastern Mediterranean. *Hydrobiologia*, 391(1), 179-192.
- Pujo-Pay, M., & Raimbault, P. (1994). Improvement of the wet-oxidation procedure for simultaneous determination of particulate organic nitrogen and phosphorus collected on filters. *Marine Ecology-Progress Series*, 105, 203-203.
- Quiñones, R. A., Fuentes, M., Montes, R. M., Soto, D., & León-Muñoz, J. (2019). Environmental issues in Chilean salmon farming: a review. *Reviews in Aquaculture*, 11(2), 375-402.
- Quiñones, R. A., González, R. R., Levipan, H., Gerdhard, J., & Gutiérrez, M. H. (2006). Living in the oxygen minimum zone: A metabolic perspective. *Gayana (Concepción)*, 70, 68-72.
- Rochelle-Newall, E. J., Pizay, M.-D., Middelburg, J. J., Boschker, H. T., & Gattuso, J.-P. (2004). Degradation of riverine dissolved organic matter by seawater bacteria. *Aquatic Microbial Ecology*, 37(1), 9-22.
- Sakami, T., Abo, K., Takayanagi, K., & Toda, S. (2003). Effects of water mass exchange on bacterial communities in an aquaculture area during summer. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 56(1), 111-118.
- Schiedek, D. (1997). *Marenzelleria cf. viridis* (Polychaeta: Spionidae)—ecophysiological adaptations to a life in the coastal waters of the Baltic Sea. *Aquatic Ecology*, 31(2), 199-210
- Schneider, W., Pérez-Santos, I., Ross, L., Bravo, L., Seguel, R., & Hernández, F. (2014). On the hydrography of Puyuhuapi Channel, Chilean Patagonia. *Progress in Oceanography*, 129, 8-18.
- Shen, Y., Fichot, C. G., Liang, S. K., & Benner, R. (2016). Biological hot spots and the accumulation of marine dissolved organic matter in a highly productive ocean margin. *Limnology and Oceanography*, 61(4), 1287-1300.

- Sievers, H. A., & Silva, N. (2006). 4.1 Masas de agua y circulación en los canales y fiordos australes. *Avances en el conocimiento oceanográfico de las aguas interiores chilenas, Puerto Montt a cabo de Hornos*, 53-58.
- Silva, N., & Palma, S. (2008). 1.1 The CIMAR Program in the austral Chilean channels and fjords. *Progress in the oceanographic knowledge of Chilean interior waters, from Puerto Montt to Cape Horn. Comité Oceanográfico Nacional-Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, Valparaíso, Chile*, 11-15.
- Silva, N., & Vargas, C. A. (2014). Hypoxia in Chilean patagonian fjords. *Progress in Oceanography*, 129, 62-74.
- Sobarzo, M., Bravo, L., Iturra, C., Troncoso, A., Riquelme, R., Campos, P., & Agurto, C. (2018). Hydrodynamics of a channel occupied by the aquaculture industry in southern Chile: implications for connectivity between farms. *Aquaculture Environment Interactions*, 10, 291-307.
- Soto, D., & Norambuena, F. (2004). Evaluation of salmon farming effects on marine systems in the inner seas of southern Chile: a large-scale mensurative experiment. *Journal of Applied Ichthyology*, 20(6), 493-501.
- Thingstad, T. F., Strand, E., & Larsen, A. (2010). Stepwise building of plankton functional type (PFT) models: A feasible route to complex models? *Progress in Oceanography*, 84(1-2), 6-15.
- Thompson, A. W., & van den Engh, G. (2016). A multi-laser flow cytometry method to measure single cell and population-level relative fluorescence action spectra for the targeted study and isolation of phytoplankton in complex assemblages. *Limnology and Oceanography: Methods*, 14(1), 39-49.
- Tremblay, L., Caparros, J., Leblanc, K., & Obernosterer, I. (2015). Origin and fate of particulate and dissolved organic matter in a naturally iron-fertilized region of the Southern Ocean. *Biogeosciences*, 12(2), 607-621.
- Valdés, V. P., Fernandez, C., Molina, V., Escribano, R., & Joux, F. (2017). Dissolved compounds excreted by copepods reshape the active marine bacterioplankton community composition. *Frontiers in Marine Science*, 343.
- Vetter, R., Lynn, E., Garza, M., & Costa, A. (1994). Depth zonation and metabolic adaptation in Dover sole, *Microstomus pacificus*, and other deep-living flatfishes: factors that affect the sole. *Marine Biology*, 120(1), 145-159.
- Wang, X., Andresen, K., Handá, A., Jensen, B., Reitan, K. I., & Olsen, Y. (2013). Chemical composition and release rate of waste discharge from an Atlantic salmon farm with an evaluation of IMTA feasibility. *Aquaculture environment interactions*, 4(2), 147-162.
- Wu, R., Lam, K., MacKay, D., Lau, T., & Yam, V. (1994). Impact of marine fish farming on water quality and bottom sediment: a case study in the sub-tropical environment. *Marine Environmental Research*, 38(2), 115-145.
- Yamada, N., & Suzumura, M. (2010). Effects of seawater acidification on hydrolytic enzyme activities. *Journal of Oceanography*, 66(2), 233-241.
- Ylla, I., Sanpera-Calbet, I., Muñoz, I., Romaní, A. M., & Sabater, S. (2011). Organic matter characteristics in a Mediterranean stream through amino acid composition: changes driven by intermittency. *Aquatic sciences*, 73(4), 523-535.

- Yuan, J., Xiang, J., Liu, D., Kang, H., He, T., Kim, S., Lin, Y., Freeman, C., & Ding, W. (2019). Rapid growth in greenhouse gas emissions from the adoption of industrial-scale aquaculture. *Nature Climate Change*, 9(4), 318-322
- Zhang Y, He P, Li H, Li G, Liu J, Jiao F, Zhang J, Huo Y, Shi X, Su R, Ye N, Liu D, Yu R, Wang Z, Zhou M, Jiao N (2019) *Ulva prolifera* green-tide outbreaks and their environmental impact in the Yellow Sea, China. *Natl Sci Rev* 6:825–838
- Zhang, G., Liang, S., Shi, X., & Han, X. (2015). Dissolved organic nitrogen bioavailability indicated by amino acids during a diatom to dinoflagellate bloom succession in the Changjiang River estuary and its adjacent shelf. *Marine Chemistry*, 176, 83-95.

## Leyendas de Figuras

Fig. 1 Localización del área de estudio y estaciones de muestreo de transectas en el Canal Caucahué, Chiloé, Región de Los Lagos, Chile. Transecta Salmones (TS) con estaciones de muestreo desde una estación control (Cs), ubicada fuera del canal, hacia a un centro cultivo de salmones al interior del brazo norte del canal, estaciones S1 (2km), S2 (0.5 km) y S3 (0 Km). Transecta Mitílidos (TM) con estaciones de muestreo desde una estación control (Cm), ubicada fuera del canal, hacia a un centro cultivo de mitílidos al interior del brazo sur del canal, estaciones M1 (2km), M2 (0.5 km) y M3 (0 Km).

Fig. 2 Distribución de la concentración de (a y b) amonio ( $\mu\text{M}$ ); (c y d) nitrito ( $\mu\text{M}$ ); (e y f) nitrato ( $\mu\text{M}$ ); (g y h) fosfato ( $\mu\text{M}$ ) a lo largo de ambas transectas. Paneles izquierdos corresponden a Transecta Salmones (TS). Paneles derechos corresponden a Transecta Mitílidos (TM).

Fig. 3 Distribución de la concentración de (a y b) clorofila-a ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ); (c y d) carbono orgánico disuelto; (e y f) nitrógeno orgánico disuelto; (g y h) fósforo orgánico disuelto ( $\mu\text{M}$ ) a lo largo de ambas transectas. Paneles izquierdos corresponden a Transecta Salmones (TS). Paneles derechos corresponden a Transecta Mitílidos (TM).

Fig. 4 Distribución de la concentración de (a y b) proteínas disueltas (DCAA); (c y d) Índice de Degradación Dauwe (DI); (e y f) contribución de proteínas disueltas al DOC ( $\% \text{DOC}_{\text{DCAA}}$ ) a lo largo de ambas transectas. Paneles izquierdos corresponden a Transecta Salmones (TS). Paneles derechos corresponden a Transecta Mitílidos (TM).

Fig. 5 Análisis de Coordenadas Principales a nivel de transecta considerando las variables ambientales, características de la DOM y metabólicas. Símbolos y colores representan cada punto de muestreo. Los vectores muestran las variables que generaron el ordenamiento de los muestreos: amonio, nitrato nitrito, fosfato, clorofila-a, abundancia picoplanctónica, características de la DOM y tasas específicas de enzimas intracelulares (MDH, CS y MPOR), Panel superior corresponde a transecta salmones (TS) e inferior a transecta mitílidos (TM).

Fig. 6 Actividad específica de MDH ( $\text{pmol NADH pg ATP}^{-1} \text{ min}^{-1}$ ) (a y b) y tasa de respiración específica ( $\text{pmol O}_2 \text{ pg ATP}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) (c y d) durante el experimento de microcosmos. Paneles izquierdos corresponden a la fracción total, paneles derechos corresponden a la fracción  $<1 \mu\text{m}$ .

Fig. 7 Actividad enzimática extracelular específica de (pmol pg ATP<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>) (a y b) LAP, leucina-aminopeptidasa; (c y d) GLU, β-glucosidasa; (e y f) LIP, lipasa durante el experimento de microcosmos. Paneles izquierdos corresponden a la fracción total, paneles derechos corresponden a la fracción <1 μm.

Fig. 8 Concentración de (a) aminoácidos disueltos libres (DFAA; nM), (b) proteínas disueltas (DCAA; μM) e (c) Índice de degradación Dauwe (DI) durante el experimento de microcosmos.

Fig. 9 Análisis de Coordenadas Principales (PCoA) de variables químicas, características de la DOM y actividad metabólica durante el experimento de microcosmos. Símbolos y colores representan cada submuestreo para cada tratamiento. Los vectores muestran las variables que generaron el ordenamiento de los submuestras. Amonio, Nitrato, Nitrito, Fosfato, DOC, DON, DOP, DFAA, DCAA, DI, MDH, Tasas de respiración (Re), LAP, GLU y LIP. El número 100 y 1 corresponden a la tasa metabólica observada para la fracción <100μm y <1 μm respectivamente.

### Leyendas de Tablas

Tabla 1: Coordenadas (latitud y longitud) de estaciones y profundidad de muestreo en ambas transectas. Valores promedio y desviación estándar de la razón N/P y abundancia picoplanctónica en cada profundidad y estación de muestreo. Bact: bacterioplancton, Syn: *Synecoccus*, Peuk: piceucariontes.

Tabla 2: Valores promedio y desviación estándar de concentración de nutrientes, carbono, nitrógeno y fósforo orgánico disueltos durante experimento de microcosmo. Porcentaje de acumulación (+) o consumo (-) entre tiempo inicial y tiempo final para cada variable (% 72 h - 0 h).

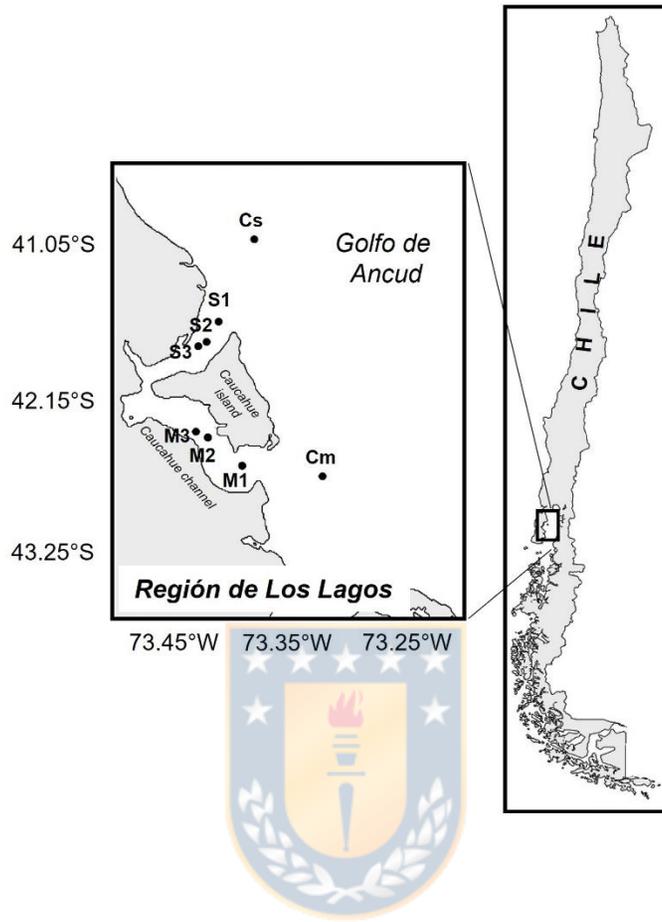


Fig. 1

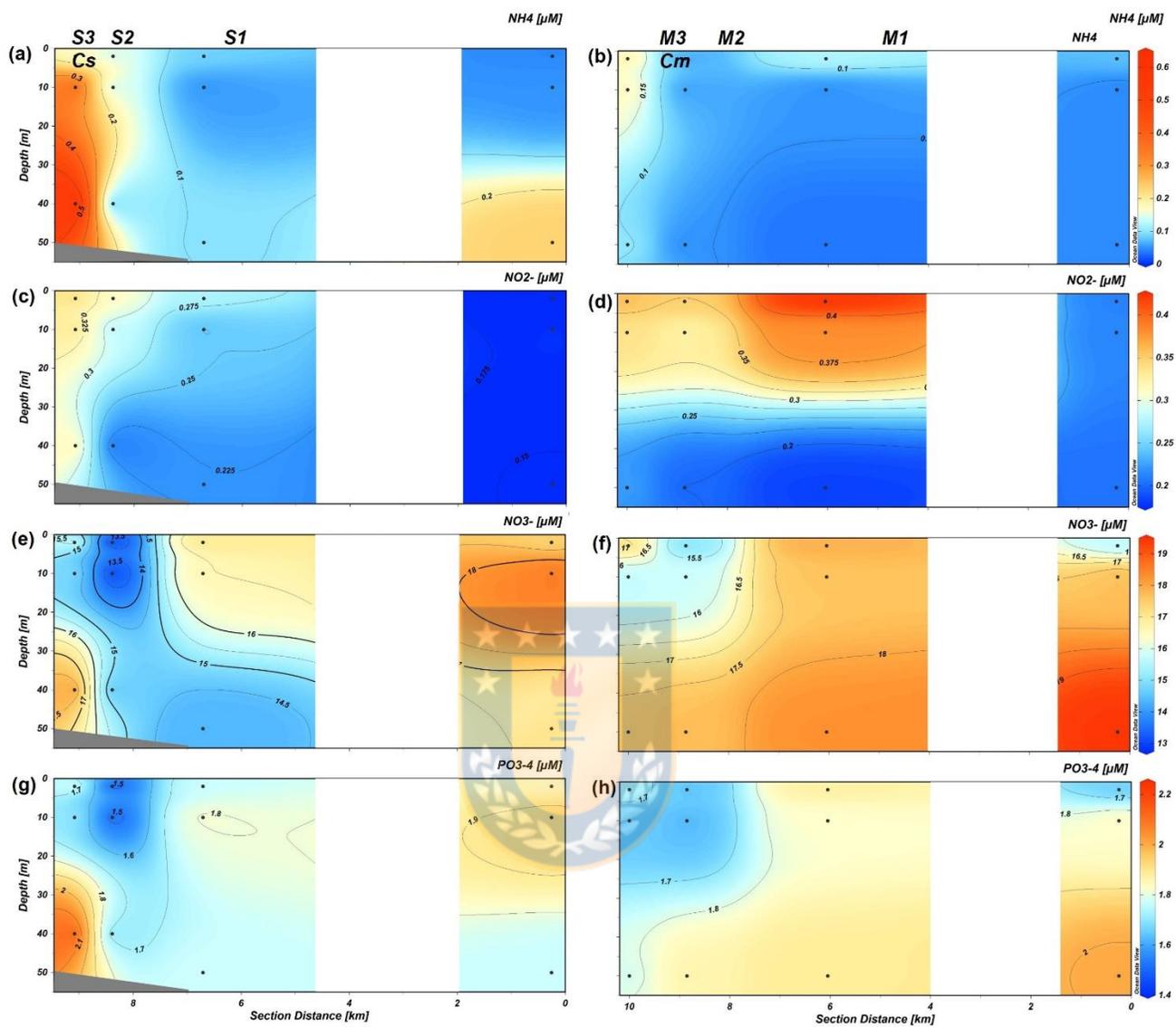


Fig. 2

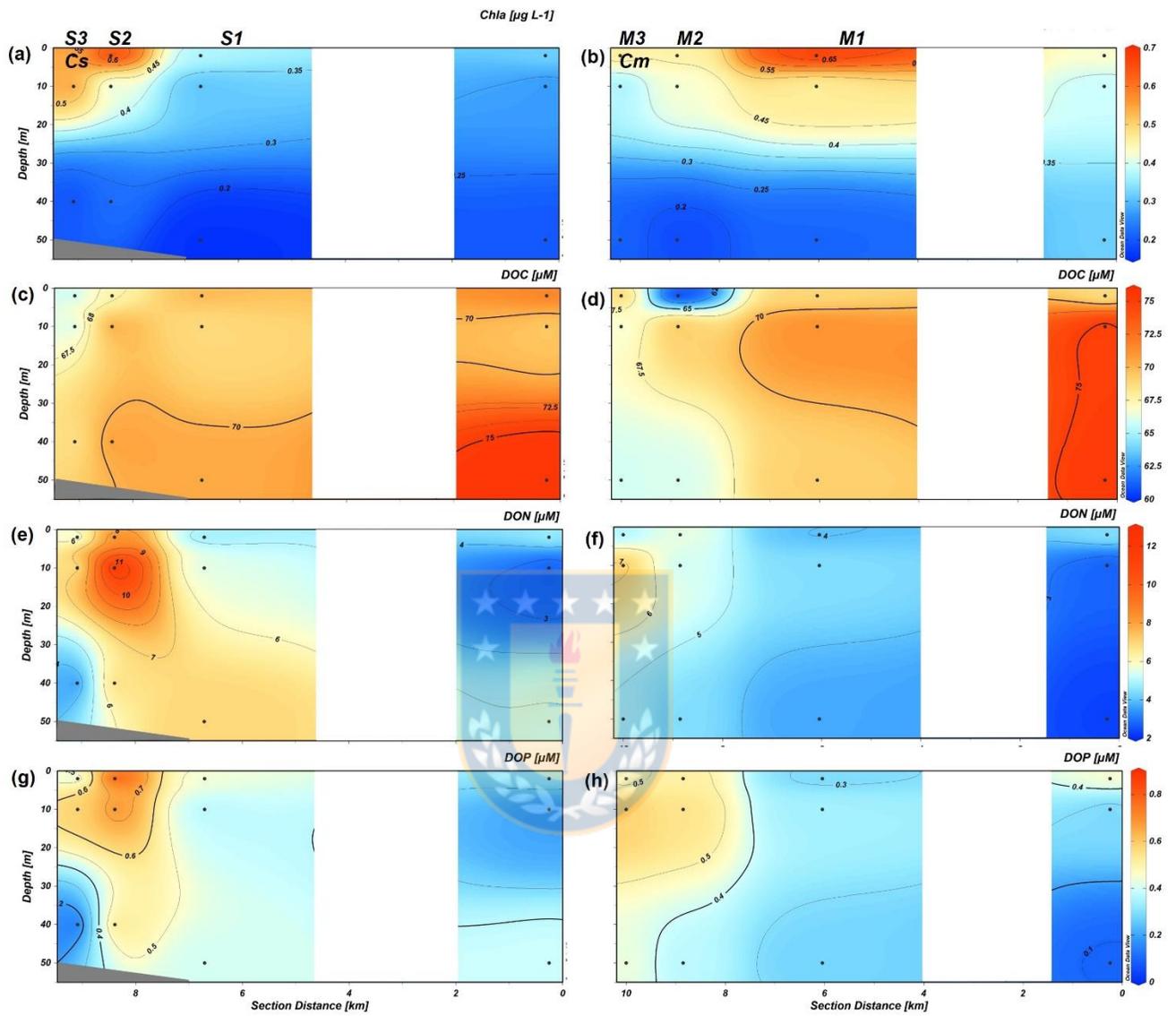


Fig. 3

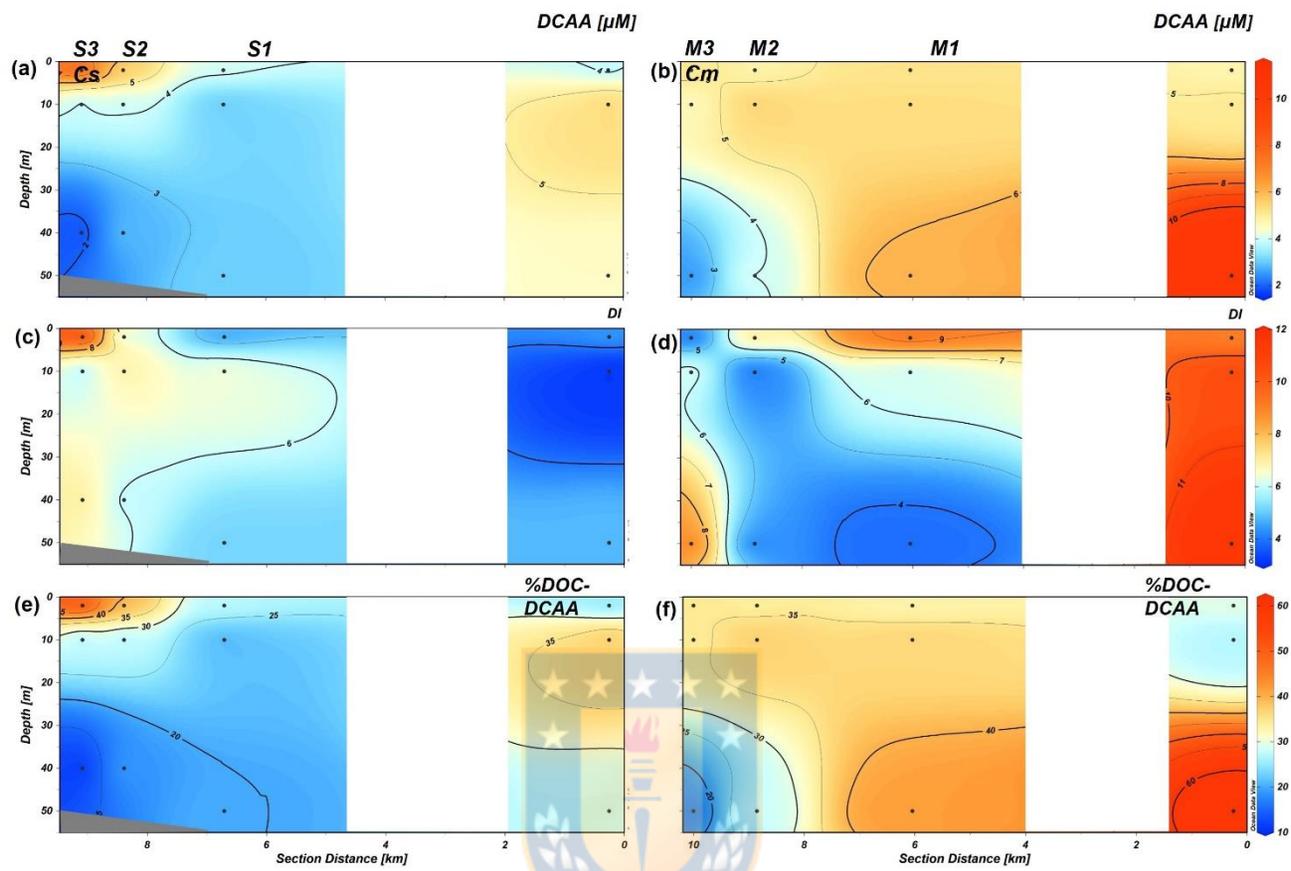


Fig. 4

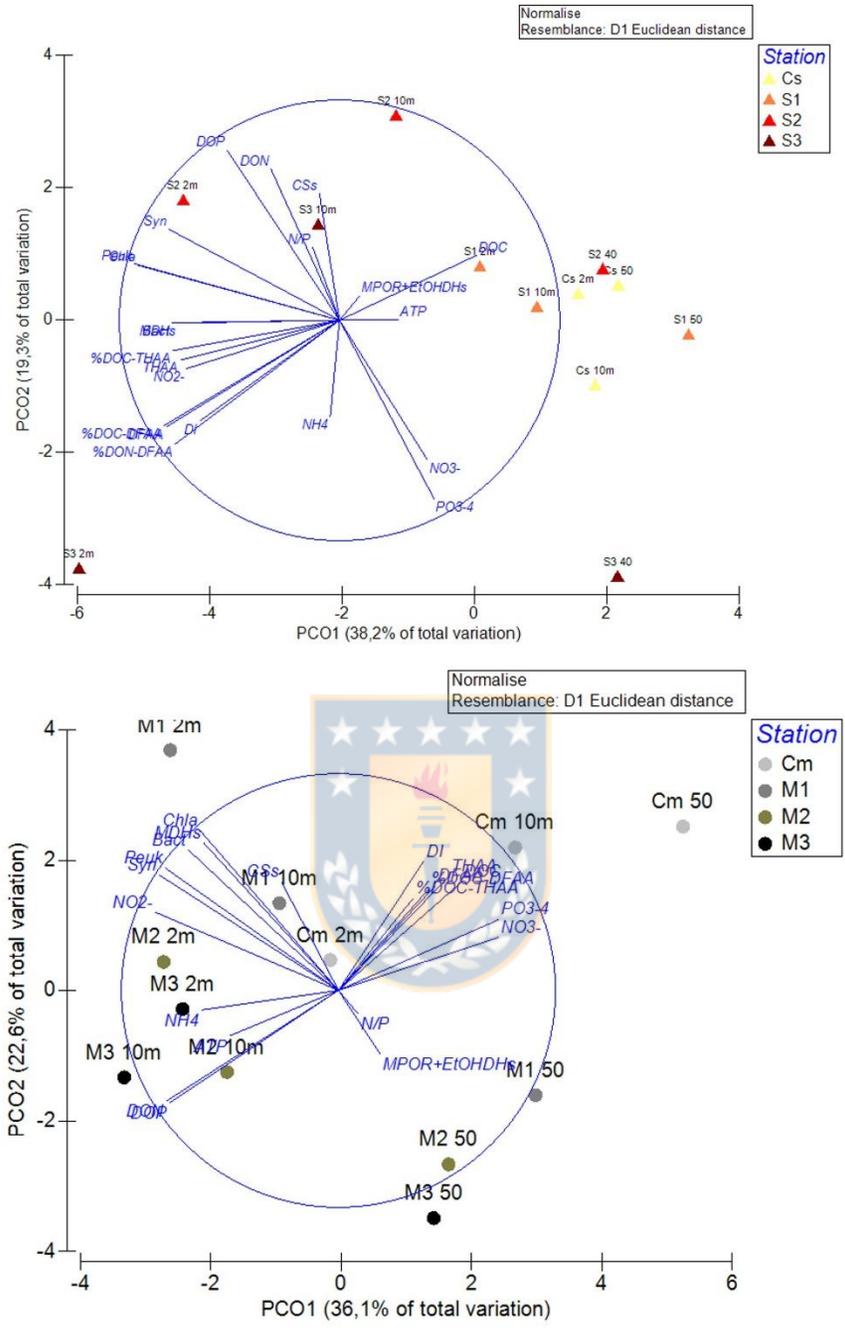


Fig. 5

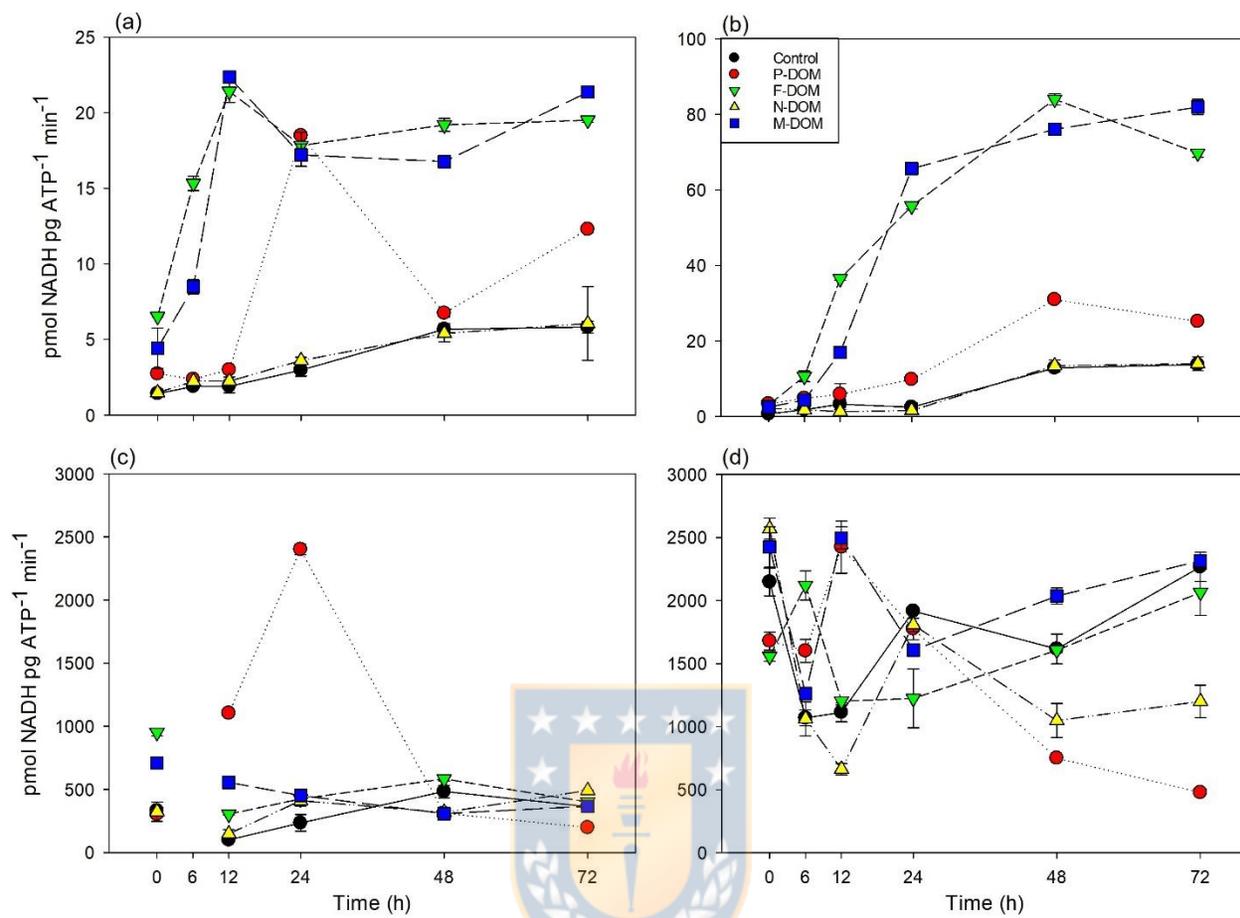


Fig. 6

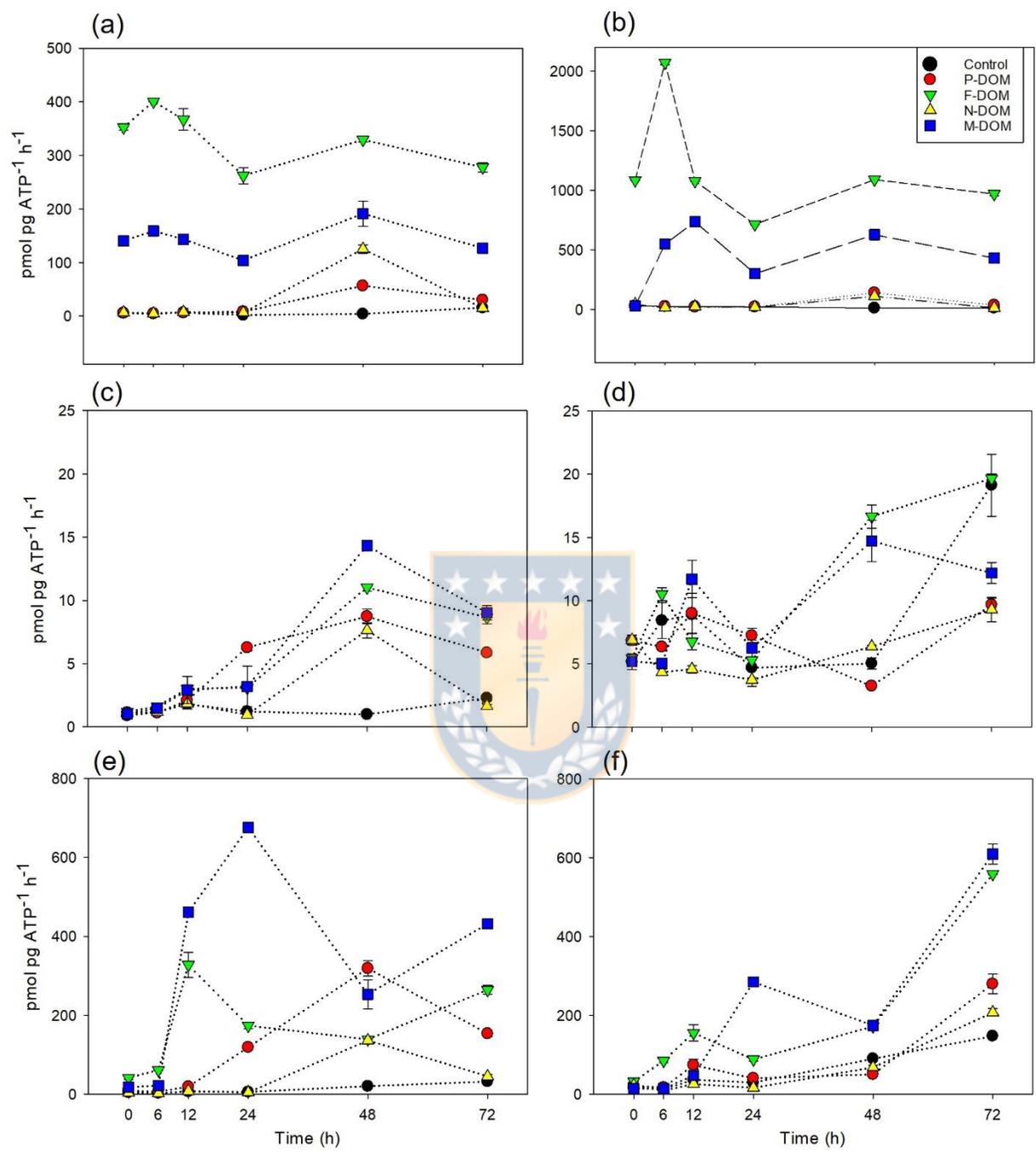


Fig. 7

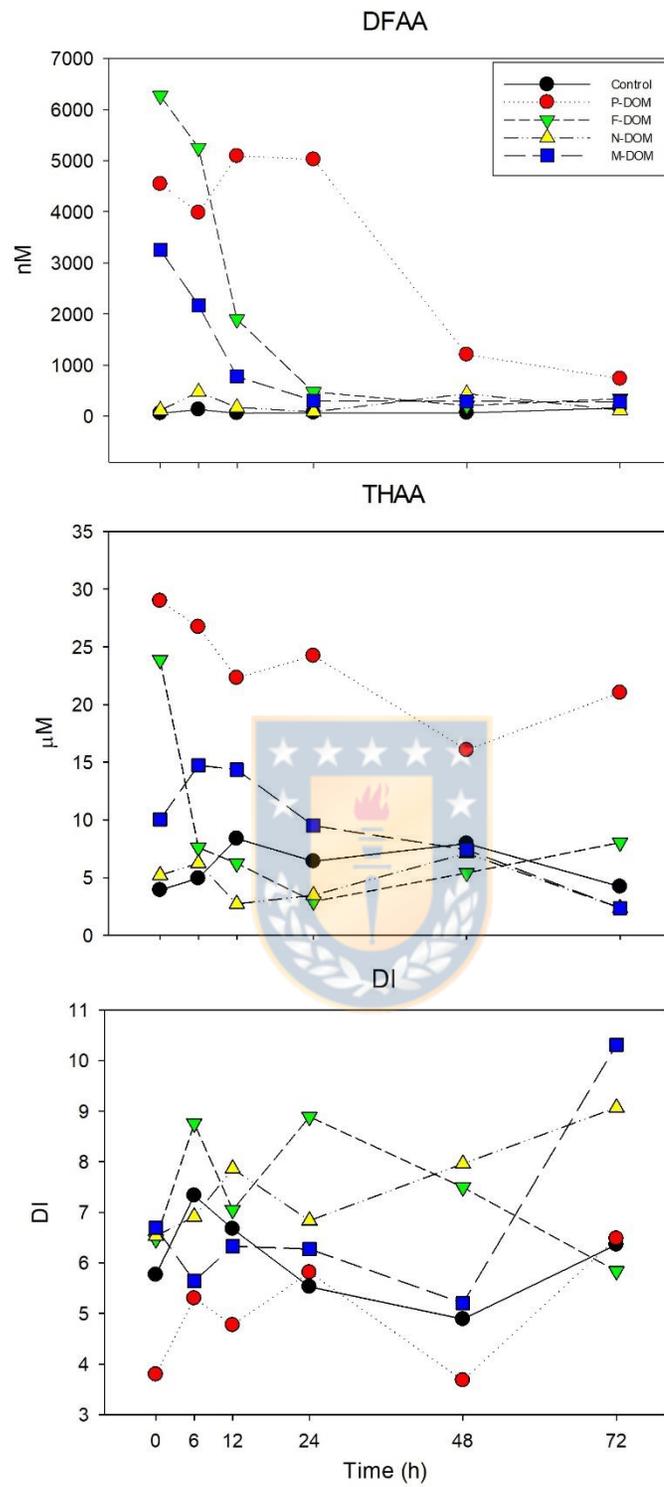


Fig. 8

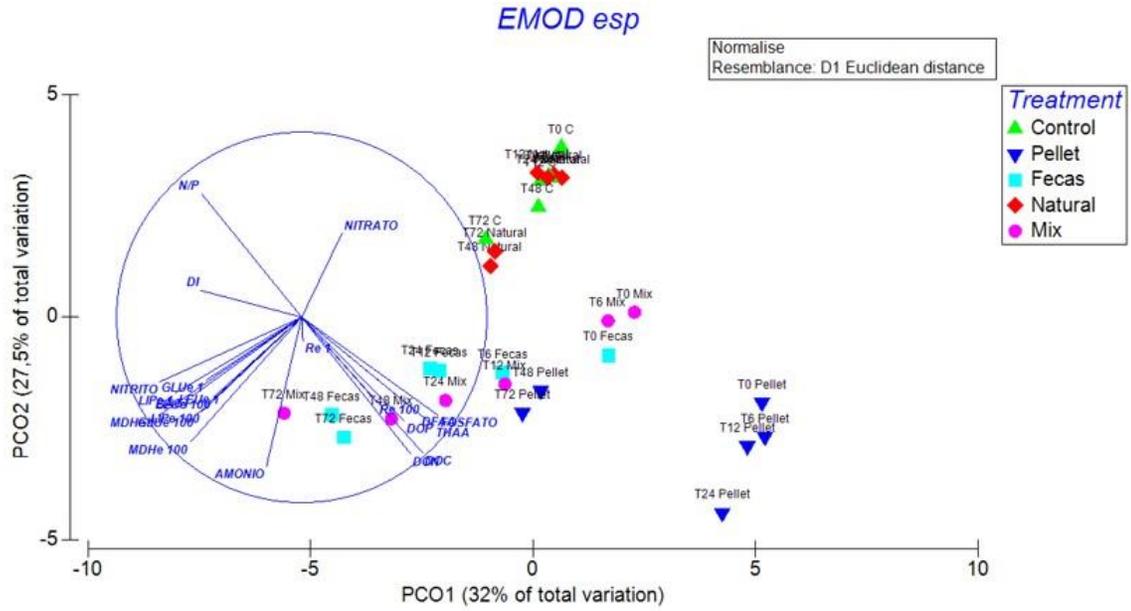


Fig. 9

Tabla 1

Station	Latitude	Longitude	Depth	N/P	Bact ( $10^3$ cel mL $^{-1}$ )	Syn ( $10^3$ cel mL $^{-1}$ )	Peuk ( $10^3$ cel mL $^{-1}$ )
Cs	-42,05	-73,38	2	9.64 ± 0.4	558 ± 17	3.33 ± 0.1	6.77 ± 0.2
			10	9.60 ± 0.1	542 ± 20	2.17 ± 0.2	5.21 ± 0.1
			50	9.54 ± 0.2	536 ± 3	2.60 ± 0.1	4.52 ± 0.4
S1	-42,10	-73,41	2	9.84 ± 0.2	612 ± 15	3.42 ± 0.3	15.78 ± 0.5
			10	9.26 ± 0.2	453 ± 33	2.94 ± 0.1	13.67 ± 0.6
			50	8.34 ± 0.2	163 ± 16	0.92 ± 0.0	3.61 ± 0.1
S2	-42,11	-73,42	2	9.08 ± 0.2	823 ± 9	4.76 ± 0.7	26.11 ± 0.0
			10	9.08 ± 0.2	763 ± 1	3.44 ± 0.5	18.88 ± 1.4
			40	8.97 ± 0.2	574 ± 5	1.50 ± 0.0	4.84 ± 0.7
S3	-42,12	-73,43	2	9.15 ± 0.1	821 ± 1	3.44 ± 0.0	23.65 ± 0.7
			10	9.11 ± 0.4	802 ± 20	4.38 ± 0.1	24.26 ± 1.1
			40	8.26 ± 0.0	724 ± 4	1.54 ± 0.2	4.20 ± 0.1
Cm	-42,20	-73,32	2	9.54 ± 0.1	717 ± 16	3.06 ± 0.1	13.35 ± 0.2
			10	9.79 ± 0.0	677 ± 24	3.07 ± 0.1	11.49 ± 0.0
			50	9.80 ± 0.0	662 ± 14	2.49 ± 0.0	7.62 ± 0.3
M1	-42,19	-73,39	2	9.77 ± 0.1	978 ± 16	5.17 ± 1.0	29.85 ± 0.5
			10	9.87 ± 0.1	803 ± 7	4.33 ± 0.3	21.74 ± 1.3
			50	9.77 ± 0.1	641 ± 41	2.06 ± 0.0	6.68 ± 0.4
M2	-42,17	-73,42	2	9.36 ± 0.6	763 ± 7	4.42 ± 0.4	21.63 ± 1.1
			10	9.91 ± 0.1	736 ± 19	3.42 ± 0.4	17.13 ± 0.3
			50	9.61 ± 0.1	624 ± 14	2.04 ± 0.0	5.58 ± 0.3
M3	-42,17	-73,43	2	10.06 ± 0.3	811 ± 35	4.14 ± 0.2	17.75 ± 0.2
			10	9.71 ± 0.6	766 ± 77	4.46 ± 0.4	18.22 ± 1.0
			50	9.97 ± 0.3	542 ± 122	2.02 ± 0.0	5.30 ± 0.2

Tabla 2

Variable	Treatment	0h	6h	12h	24h	48h	72h	% 72h-0h
DOC ( $\mu\text{M}$ )	Control	72.4 $\pm$ 0.7	67.8 $\pm$ 1.6	71.8 $\pm$ 2.4	87.0 $\pm$ 8.5	78.9 $\pm$ 4.4	77.5 $\pm$ 14.9	7.1
	P-DOM	369.7 $\pm$ 4.2	386.8 $\pm$ 0.5	393.1 $\pm$ 2.3	394.7 $\pm$ 2.9	191.1 $\pm$ 10.8	187.8 $\pm$ 10.2	-49.2
	F-DOM	175.7 $\pm$ 6.6	174.3 $\pm$ 1.3	152.2 $\pm$ 1.1	150.2 $\pm$ 2.5	125.1 $\pm$ 3.3	125.0 $\pm$ 5.5	-28.8
	N-DOM	72.4 $\pm$ 0.2	69.1 $\pm$ 3.8	74.6 $\pm$ 6.7	79.4 $\pm$ 2.1	123.8 $\pm$ 2.5	75.4 $\pm$ 4.3	4.1
	M-DOM	221.7 $\pm$ 5.4	196.4 $\pm$ 3.1	198.7 $\pm$ 23.5	150.5 $\pm$ 1.2	145.4 $\pm$ 5.9	119.9 $\pm$ 5.3	-45.9
DON ( $\mu\text{M}$ )	Control	5.9 $\pm$ 0.3	9.4 $\pm$ 3.9	6.8 $\pm$ 1.9	4.9 $\pm$ 0.2	5.3 $\pm$ 0.0	6.2 $\pm$ 3.1	6.7
	P-DOM	40.0 $\pm$ 1.0	44.2 $\pm$ 2.9	36.0 $\pm$ 1.8	33.3 $\pm$ 0.2	14.4 $\pm$ 4.0	19.0 $\pm$ 1.0	-52.4
	F-DOM	26.6 $\pm$ 2.5	23.6 $\pm$ 1.6	18.2 $\pm$ 0.5	20.3 $\pm$ 1.8	15.2 $\pm$ 0.1	16.3 $\pm$ 1.4	-39.0
	N-DOM	8.6 $\pm$ 3.8	7.4 $\pm$ 1.8	6.0 $\pm$ 6.9	5.4 $\pm$ 0.5	10.8 $\pm$ 0.0	6.3 $\pm$ 0.3	-26.6
	M-DOM	27.5 $\pm$ 0.4	22.7 $\pm$ 1.0	18.5 $\pm$ 1.9	17.0 $\pm$ 3.2	14.7 $\pm$ 2.2	11.2 $\pm$ 0.8	-16.3
DOP ( $\mu\text{M}$ )	Control	0.2 $\pm$ 0.0	0.6 $\pm$ 0.4	0.4 $\pm$ 0.2	0.2 $\pm$ 0.0	0.2 $\pm$ 0.1	0.4 $\pm$ 0.2	63.2
	P-DOM	1.2 $\pm$ 0.2	3.5 $\pm$ 0.5	2.6 $\pm$ 1.1	2.5 $\pm$ 0.4	0.3 $\pm$ 1.0	2.1 $\pm$ 1.0	85.3
	F-DOM	0.3 $\pm$ 0.2	0.4 $\pm$ 0.3	0.3 $\pm$ 0.1	0.9 $\pm$ 0.1	0.3 $\pm$ 0.2	0.5 $\pm$ 0.2	65.8
	N-DOM	0.5 $\pm$ 0.5	0.4 $\pm$ 0.1	0.4 $\pm$ 0.3	0.3 $\pm$ 0.1	0.3 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	-100.0
	M-DOM	0.7 $\pm$ 0.3	0.8 $\pm$ 0.0	0.9 $\pm$ 0.5	0.3 $\pm$ 0.2	0.3 $\pm$ 0.2	1.1 $\pm$ 0.2	69.5
Ammonium ( $\mu\text{M}$ )	Control	0.05 $\pm$ 0.00	0.08 $\pm$ 0.00	0.14 $\pm$ 0.02	0.14 $\pm$ 0.00	0.10 $\pm$ 0.00	0.04 $\pm$ 0.00	-15.5
	P-DOM	7.61 $\pm$ 0.08	6.58 $\pm$ 0.04	5.54 $\pm$ 0.01	6.81 $\pm$ 0.02	10.12 $\pm$ 0.06	12.59 $\pm$ 0.11	65.5
	F-DOM	5.44 $\pm$ 0.14	6.31 $\pm$ 0.01	10.67 $\pm$ 0.05	13.34 $\pm$ 0.00	11.05 $\pm$ 0.04	11.05 $\pm$ 0.15	103.2
	N-DOM	0.12 $\pm$ 0.02	0.10 $\pm$ 0.01	0.14 $\pm$ 0.03	0.19 $\pm$ 0.00	0.02 $\pm$ 0.00	0.02 $\pm$ 0.00	-82.9
	M-DOM	3.77 $\pm$ 0.01	3.54 $\pm$ 0.07	3.88 $\pm$ 0.00	7.59 $\pm$ 0.07	4.53 $\pm$ 0.01	4.52 $\pm$ 0.04	20.4
Nitrate ( $\mu\text{M}$ )	Control	17.3 $\pm$ 0.2	12.9 $\pm$ 3.4	13.2 $\pm$ 2.3	14.4 $\pm$ 0.0	13.0 $\pm$ 0.5	10.7 $\pm$ 1.0	-38.1
	P-DOM	16.2 $\pm$ 0.6	9.8 $\pm$ 0.7	11.0 $\pm$ 2.0	10.2 $\pm$ 0.8	12.4 $\pm$ 0.3	9.6 $\pm$ 0.3	-40.5
	F-DOM	15.6 $\pm$ 0.6	14.0 $\pm$ 2.0	13.9 $\pm$ 0.9	9.3 $\pm$ 0.8	12.7 $\pm$ 0.7	9.2 $\pm$ 0.1	-41.5
	N-DOM	13.6 $\pm$ 3.6	13.1 $\pm$ 2.3	12.1 $\pm$ 3.4	13.5 $\pm$ 0.1	13.3 $\pm$ 0.1	10.4 $\pm$ 0.3	-23.6
	M-DOM	12.3 $\pm$ 1.4	12.3 $\pm$ 0.0	12.1 $\pm$ 1.0	11.0 $\pm$ 3.0	11.0 $\pm$ 1.9	11.9 $\pm$ 0.4	-18.4
Nitrite ( $\mu\text{M}$ )	Control	0.15 $\pm$ 0.00	0.13 $\pm$ 0.04	0.17 $\pm$ 0.02	0.22 $\pm$ 0.00	0.25 $\pm$ 0.01	0.22 $\pm$ 0.07	44.3
	P-DOM	0.16 $\pm$ 0.01	0.11 $\pm$ 0.01	0.16 $\pm$ 0.04	0.17 $\pm$ 0.05	0.26 $\pm$ 0.00	0.23 $\pm$ 0.01	42.4
	F-DOM	0.24 $\pm$ 0.01	0.24 $\pm$ 0.01	0.29 $\pm$ 0.01	0.28 $\pm$ 0.02	0.43 $\pm$ 0.01	0.25 $\pm$ 0.12	79.3
	N-DOM	0.14 $\pm$ 0.04	0.15 $\pm$ 0.01	0.17 $\pm$ 0.02	0.20 $\pm$ 0.01	0.33 $\pm$ 0.00	0.27 $\pm$ 0.08	99.3
	M-DOM	0.21 $\pm$ 0.00	0.21 $\pm$ 0.00	0.27 $\pm$ 0.01	0.26 $\pm$ 0.01	0.33 $\pm$ 0.01	0.36 $\pm$ 0.15	75.1
Phosphate ( $\mu\text{M}$ )	Control	2.05 $\pm$ 0.01	1.63 $\pm$ 0.41	1.84 $\pm$ 0.20	2.01 $\pm$ 0.01	1.95 $\pm$ 0.02	1.68 $\pm$ 0.25	-18.0
	P-DOM	7.08 $\pm$ 0.17	4.96 $\pm$ 0.59	5.73 $\pm$ 1.03	5.55 $\pm$ 0.43	4.64 $\pm$ 0.03	2.81 $\pm$ 1.20	-60.3
	F-DOM	2.79 $\pm$ 0.12	2.47 $\pm$ 0.25	2.23 $\pm$ 0.05	1.52 $\pm$ 0.10	1.80 $\pm$ 0.05	1.41 $\pm$ 0.29	-35.3
	N-DOM	1.69 $\pm$ 0.50	1.87 $\pm$ 0.15	1.83 $\pm$ 0.30	2.01 $\pm$ 0.00	2.58 $\pm$ 0.05	3.38 $\pm$ 1.27	100.7
	M-DOM	3.89 $\pm$ 0.35	3.37 $\pm$ 0.00	2.83 $\pm$ 0.41	2.93 $\pm$ 0.13	2.70 $\pm$ 0.05	1.72 $\pm$ 0.18	-55.8

### 4.3. Capítulo 3: “Efectos de la etoxiquina sobre el metabolismo y composición de la comunidad microbiana marina”

Manuscrito enviado a la revista “*Aquaculture*” (F.I.: 5,1):

González M. L., Fuentes M. E., Molina V. y Quiñones R.A. (*submitted*) Effects of ethoxyquin on metabolism and composition of marine microbial communities. *Aquaculture*.

#### Resumen

La salmonicultura tiene el potencial de generar impactos ambientales debido a la liberación de materia orgánica y productos químicos a la columna de agua. La etoxiquina (EQ) es un aditivo alimentario ampliamente utilizado como antioxidante en alimentos para peces, pero debido a la escasa evidencia sobre su seguridad para el ambiente, ha sido prohibido por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria. Para evaluar y comparar las respuestas de las comunidades microbianas marinas a las adiciones de EQ (10, 100 y 1000  $\mu\text{g L}^{-1}$ ), llevamos a cabo experimentos de microcosmos de agua de mar de 20 L en dos áreas distintas, Achao y Bahía Coliumo, donde la primera está influenciada por el cultivo de salmón. Se determinó la respuesta metabólica (respiración, actividad enzimática extracelular y ECOplacas) para dos fracciones de tamaño ( $<1 \mu\text{m}$  y  $<63 \mu\text{m}$ ) y se analizaron cambios en la diversidad de la comunidad microbiana activa. Los resultados revelaron diferentes respuestas asociadas con los sitios de estudio y las fracciones de tamaño. Para la fracción  $<1 \mu\text{m}$  (bacterioplancton), la adición de EQ incrementó tanto el consumo de oxígeno como la degradación de compuestos proteínicos, mientras que para toda la comunidad ( $<63 \mu\text{m}$ ), la adición de EQ disminuyó la respiración y la capacidad de degradar carbohidratos y lípidos. La utilización de sustratos de carbono fue variable, disminuyendo en los tratamientos de 100 y 1000  $\mu\text{g EQ L}^{-1}$ , lo que sugiere que altas concentraciones de EQ pueden limitar la capacidad de procesar diferentes fuentes de carbono, produciendo preferencia por aminoácidos y ácidos carboxílicos en las primeras horas de exposición en Achao. En el área sin salmonicultura (Bahía Coliumo) la utilización de sustratos fue estimulada por la adición de EQ, principalmente carbohidratos y ácidos carboxílicos. Se

observó un cambio en la composición de la comunidad microbiana activa entre tratamientos a diferentes niveles taxonómicos, especialmente asociado con Alphaproteobacteria, que presentó menor actividad cuando se expuso a EQ. Gammaproteobacteria (KI89A), Bacteroidia (clado NS10, NS3b) y MGII mostraron una mayor actividad asociada con las adiciones de EQ. En general, nuestro estudio indica que EQ puede generar tanto cambios en el metabolismo (respiración, actividad extracelular enzimática, preferencias de fuentes de carbono) como en la composición de la comunidad microbiana en la columna de agua alterando la degradación de la materia orgánica.

Palabras clave: Etoxiquina, salmonicultura, antioxidante, composición de la comunidad microbiana, metabolismo, impacto ambiental.



Journal: Aquaculture

Title: Effects of ethoxyquin on metabolism and composition of marine microbial communities

Corresponding Author: Professor Renato Quinones

Co-Authors: Maria Lorena González, M.Sc.; Marcelo E. Fuentes, PH.D.; Verónica Molina, PH.D.

Manuscript Number: AQUACULTURE-D-22-02205

Dear Maria Lorena González,

The corresponding author Professor Renato Quinones has listed you as a contributing author of the following submission via Elsevier's online submission system for Aquaculture.

Submission Title: Effects of ethoxyquin on metabolism and composition of marine microbial communities



Elsevier asks all authors to verify their co-authorship by confirming agreement to publish this article if it is accepted for publication.

Please read the following statement and confirm your agreement by clicking on this link:

<https://www.editorialmanager.com/aquaculture/1.asp?i=562889&l=Q5K3IPPI>

I irrevocably authorize and grant my full consent to the corresponding author of the manuscript to: (1) enter into an exclusive publishing agreement with Elsevier on my behalf (or, if the article is to be published under a CC BY license, a non-exclusive publishing agreement), in the relevant form set out at [www.elsevier.com/copyright](http://www.elsevier.com/copyright) ; and (2) unless I am a US government employee, to transfer my copyright or grant an exclusive license of rights (or for CC BY articles a non-exclusive license of rights) to Elsevier as part of that publishing agreement , effective on acceptance of the article for publication. If the article is a work made for hire, I am authorized to confirm this on behalf of my employer. I agree that the copyright

status selected by the corresponding author for the article if it is accepted for publication shall apply and that this agreement is subject to the governing law of the country in which the journal owner is located.

If you did not co-author this submission, please contact the corresponding author directly at [rquinone@udec.cl](mailto:rquinone@udec.cl).

Thank you,  
Aquaculture



## Effects of ethoxyquin on metabolism and composition of marine microbial communities

Maria Lorena González <sup>a, b</sup>, Marcelo E. Fuentes <sup>b</sup>, Verónica Molina <sup>c, d</sup> and

Renato A. Quiñones <sup>a, b\*</sup>

<sup>a</sup> Graduate Program in Oceanography, Department of Oceanography, Faculty of Natural Sciences and Oceanography, University of Concepción, P.O. Box 160-C, Concepción, Chile.

<sup>b</sup> Interdisciplinary Center for Aquaculture Research (INCAR), University of Concepcion, O'Higgins 1695, Concepción, Chile.

<sup>c</sup> Departamento de Ciencias y Geografía, Facultad de Ciencias Naturales y Exactas, y HUB Ambiental UPLA, Universidad de Playa Ancha, Valparaíso, Chile

<sup>d</sup> Center for Oceanographic Research COPAS COASTAL, Universidad de Concepción, Chile



\*Corresponding author at: Interdisciplinary Center for Aquaculture Research (INCAR), University of Concepcion, O'Higgins 1695, Concepción, Chile.

E-mail address: [rquinone@udec.cl](mailto:rquinone@udec.cl) (R. A. Quiñones)

## Abstract

Salmon culture has the potential to generate environmental impacts due to the release of organic matter and chemical products into the water column. Ethoxyquin (EQ) is a food additive widely used as an antioxidant in fish feed, but due to the scarce evidence on its safety for the environment it has been banned by the European Food Safety Authority. To evaluate and compare responses of marine microbial communities to EQ additions (10, 100 and 1000  $\mu\text{g L}^{-1}$ ), we carried out 20L seawater microcosm experiments in two distinct areas, Achao and Coliumo Bay, where the first is influenced by salmon farming. We estimated metabolic response (respiration, extracellular enzyme activity and ECOplates) for two size fractions ( $<1\mu\text{m}$  and  $<63\mu\text{m}$ ) and changes in the active microbial community diversity. The results revealed different responses associated with study sites and size fractions. For the  $<1\mu\text{m}$  fraction (bacterioplankton), the addition of EQ increased both oxygen consumption and the degradation of proteinaceous compounds, while for the entire community ( $<63\mu\text{m}$ ), the addition of EQ decrease respiration and the capacity to degrade carbohydrates and lipids. The carbon substrates utilization was variable, decreasing in the 100 and 1000  $\mu\text{g EQ L}^{-1}$  treatments, suggesting that high EQ concentrations may limit the capacity to process different carbon sources, producing a preference for amino acids and carboxylic acids in the first hours of exposition in Achao. In the area without salmon farming (Coliumo Bay) substrates utilization, mainly carbohydrates and carboxylic acids, was stimulated by the addition of EQ. A shift was observed in the active microbial community composition between treatments at different taxonomic levels, especially associated with Alphaproteobacteria, which presented lower activity when exposed to EQ. Gammaproteobacteria (KI89A), Bacteroidia (NS10, NS3b clade) and MGII showed higher activity associated with EQ additions. Overall, our study indicates that EQ may generate both changes in the metabolism (respiration, enzymatic extracellular activity, carbon sources preferences) and composition of the microbial community in the water column altering the degradation of organic matter.

Keywords: Ethoxyquin, salmon farming, antioxidant, microbial community composition, metabolism, environmental impact.

## 1. Introduction

Chilean Patagonia, located on the southeast border of the Pacific Ocean, has an intricate geography composed of many islands, peninsulas, fjords and channels (Silva and Palma, 2008), constantly influenced by freshwater from rivers, runoff, precipitation and glaciers (Pantoja *et al.*, 2011). The area has been of particular interest for the development of tourism, fishing and aquaculture. In fact, aquaculture, particularly salmonid cultivation, has expanded significantly, making Chile the second largest salmonid producer after Norway (FAO, 2018) with annual production of over 700 thousand tons (Avendaño-Herrera, 2018).

Salmon farming can generate strong impacts on the environment, especially due to the organic material load in the water column and sediments around the floating cages (Haya *et al.*, 2001; Soto and Norambuena, 2004; Buschmann *et al.*, 2009; Caruso *et al.*, 2014; Quiñones *et al.*, 2019; Molina and Fernandez, 2020). Salmon farming also liberates chemical products into the environment such as pesticides, antibiotics and food additives, among others (Haya *et al.*, 2001; BurrIDGE *et al.*, 2010; Quiñones *et al.*, 2019), and there is scarce information about their effects on non-target species (Rohr *et al.*, 2006; Rain-Franco *et al.*, 2018; Urbina *et al.*, 2019; Garcés *et al.*, 2020).

The food additive ethoxyquin (1,2-dihydro-6-ethoxy-2,2,4-trimethylquinoline; hereafter EQ), initially registered as a pesticide, is an aromatic amine derived from quinoline, widely used to prevent animal feed rancidity due to its ability to trap free radicals and thus avoid the spontaneous oxidation of lipids and other feed ingredients (Bohne *et al.*, 2008). It is also used in agriculture to avoid loss of color in apples and pears (Błaszczuk *et al.*, 2013). EQ and its metabolites (e.g. ethoxyquin dimer) have caused controversy due to their possible carcinogenic and cytotoxic effects on mammal cells. DNA damage in human lymphocytes induced by EQ has been reported (Błaszczuk, 2006), and EQ may also induce apoptosis (Błaszczuk and Skolimowski, 2005). EQ increases the number of aberrations in hamster ovarian cells (Gille *et al.*, 1991) and inhibits the mitochondrial electron transport chain in animals (Reyes *et al.*, 1995). Fish can accumulate this compound in organs and muscles as reported by one study that found an EQ concentration of 1.4 µg in 200 g salmon fillets (Lundebye *et al.*, 2010). Moreover,

deleterious EQ effects have been reported in zebra fish embryos, *Daphnia magna* and microalgae (Egloff *et al.*, 2018; Pradhan *et al.*, 2020). The mutagenicity of EQ was evaluated in *Salmonella* sp., but the results were ambiguous (Błaszczuk, 2006; Błaszczuk *et al.*, 2013) with both negative (Joner 1977, Zeiger 1993) and positive results (Rannung *et al.* 1984, Reddy *et al.* 1983) reported. Shah *et al.* (2005) also reported the inhibition of methanogenesis in biological treatment systems. Environmental studies related to EQ are scarce. Papadopoulou *et al.* (2016) showed the EQ produced significant inhibition of potential nitrification of soil microbiota.

Despite the wide use of EQ in the salmon aquaculture industry, knowledge about its effects on microbial metabolism and degradation of organic matter in the marine environment is very scarce. Information about the occurrence of this compound is also scarce. The relatively low concentrations of EQ in open surface waters may be due to its rapid degradation by irradiation (Bintou *et al.*, 2015). However, EQ concentrations between 0.008 and 0.29  $\mu\text{g L}^{-1}$  have been found in surface waters in Vietnam (Chau *et al.* 2015). Xu *et al.* (2018) detected EQ in deposits of drinking water and treatment plants adjacent to the Yangtze Estuary in China, with concentrations of 0.02 to 0.07  $\mu\text{g L}^{-1}$ ; they cataloged it as one of the most abundant and recalcitrant “pesticides” in the study area. It must be noted that the European Food Safety Authority (EFSA) decreased the allowed concentration of EQ in fish feed from 300 to 150  $\text{mg Kg}^{-1}$ ; they determined that there is not sufficient evidence to classify this additive as environmentally safe (EFSA Scientific Opinion, 2015). In June 2017, the European Commission suspended the authorization for the use of EQ as an additive in the feed of all animal species and categories (EU, 2017) extended until 2022 (EU, 2021). In Chile, the EQ is on the list of authorized additives for the preparation and manufacture of food and supplements for animals (SAG, 2015).

Taking into consideration the lack of information on the effects of EQ on marine microbial communities in coastal areas, the objective of this study was to evaluate the metabolic response and composition changes of the active microbial plankton community when exposed to ethoxyquin. Microcosm experiments were performed under controlled conditions of temperature and oxygen. Changes under different EQ concentrations over time were assessed

measuring respiration rates, extracellular (aminopeptidase,  $\beta$ -glucosidase and lipase) and intracellular (MDH) enzymatic activity, microbial biomass (ATP), metabolic “fingerprints” with Biolog EcoPlates, and molecular techniques (16S rRNA barcode sequencing). These measurements provided information about how the microbial communities that inhabit the water column of Chiloé’s inner sea (Achao), an area highly impacted by salmon farming, and of a contrasting area off central Chile (Coliumo Bay) without salmon farming, respond to the exposure to this antioxidant.

## **2. Materials and methods**

### **2.1 Study zones**

Sampling was conducted in two coastal zones: (i) Achao, located in the inner sea of Chiloé, (Chiloé Island, Los Lagos Region; 42.52°S 73.20°W, Fig. 1), 6 km (3.2 nm) from the closest salmon farm; and (ii) Coliumo Bay, located in south-central Chile (Biobío Region; 36.5°S 72.944°W, Fig. 1), 2 km (1.07 nm) from the coast. No salmon farming takes place in Coliumo Bay or in surrounding areas. Field sampling was done in two oceanographic cruises organized by the Interdisciplinary Center for Aquaculture Research (INCAR) in austral spring (November 2018) in Coliumo Bay and austral summer (January 2019) in Achao. Water samples were collected using an oceanographic Niskin bottle (10 L) at 3 depths (2, 10 and 50 m) in Achao and at 10 m depth in Coliumo Bay. At each depth, samples were collected for nutrient analysis, dissolved organic matter (DOM), chlorophyll-*a* (Chl-*a*) and picoplankton abundance. For the microcosm experiments, 300 L of sea water were collected at 10 m depth in each study site. Profiles of temperature and salinity were made using a CTD (Minos X, AML Oceanographic).

### **2.2 Experimental design**

To assess the effects of EQ on the metabolism and composition of the active microbial community, microcosm experiments were conducted following the experimental design of Garcés *et al.* (2020) with some modifications (Table S1). Water samples collected from a 10 m depth in Achao and Coliumo Bay were sieved through a 63- $\mu$ m mesh to remove large planktonic

organisms. The experimental design included adding three concentrations of EQ (Sigma Aldrich Pestanal® 31519, analytical standard), which were dissolved in DMSO (final concentration <0.1% v/v as solvent), to the microcosms. The concentrations of EQ used in Achao were EQ1= 10  $\mu\text{g L}^{-1}$ ; EQ2 = 100  $\mu\text{g L}^{-1}$ ; EQ3 =1000  $\mu\text{g L}^{-1}$ , while in Coliumo only EQ1 and EQ3 were evaluated. Two experimental controls were established: Control (C) without the addition of EQ and Control+Solvent (C+S) a control with the same DMSO content as the EQ treatments. The experimental EQ1 concentrations (10  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) were chosen based on a) the international dose of EQ allowed by EFSA in fish feed (150-300 mg kg<sup>-1</sup>); ii) the cultivation density recommended by FAO (13 Kg m<sup>-3</sup>), considering the mean cage dimension (25 m x 25 m x 12.5 m) and a water volume of 7813 m<sup>3</sup>, equivalent to approximately 100 T of fish; iii) the approximate amount of food given to the fish as a percentage of their biomass (3-8% per day); and iv) the approximate percentage of feed lost (uneaten pellets) and feces (20%). EQ2 (100  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) was defined using the same crop density, but with 100% feed loss, equivalent to about 3000 Kg in 1 day, which is 389 mg L<sup>-1</sup> of organic matter, and thus. EQ3 (1000  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) corresponds to the lowest concentration used in the cytotoxic assays by Gille (1991) and Reyes (1995).

Each microcosm treatment consisted of triplicate 20L high density polyethylene carboys (previously washed with HCL 5%), incubated in darkness in a cold chamber at ~12°C. Sub-sampling was performed at 0, 6, 12, 24, 48 and 72 h for Achao and at 0, 6, 12, 24 and 48 h for Coliumo Bay to measure ammonium, nutrients, DOM (only for the control) and cell abundance. Two size fractions <1  $\mu\text{m}$  (F<1 $\mu\text{m}$ ) and <63  $\mu\text{m}$  (FTotal) were used to estimate microbial biomass (i.e. ATP concentration) and the metabolic response of microbial community. The latter was measured by activity of the intracellular respiratory enzyme malate dehydrogenase (MDH), aerobic respiration rate and extracellular enzyme activity (EEA) of leucine aminopeptidase,  $\beta$ -glucosidase and lipase. Substrate utilization was determined using Biolog Ecoplates for FTotal and the active microbial community diversity with RNA samples (Table S1).

To estimate the response of each experimental variable to EQ addition, the difference between C+S and C was subtracted from the treatments values, and then compared to the C for each sub-sampling time. Although operationally the experiments were run for 72 hours, only the results obtained in the first 24 hours of incubations were analyzed because of the potential

artifacts generated by the “bottle effect.” See section 2.12 and Supplementary Information for details.

### **2.3 Ammonium, nutrients, Dissolved Organic Matter (DOM)**

Ammonium samples were taken using 50 mL Duran Schott flasks and analyzed according to the fluorometric method (Holmes *et al.*, 1999) using a Turner Designs fluorometer. Samples for the determination of nitrate, nitrite, and phosphate were filtered through a 0.7  $\mu\text{m}$  GF/F and stored in 15 mL falcon tubes ( $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) until analysis by standard colorimetric methods (Grasshoff *et al.*, 1983). The analyses were performed using a Seal AA3 segmented flow autoanalyzer at the Biogeochemistry Laboratory of the Department of Oceanography of the University of Concepción. The DOM samples were filtered through pre-combusted GF/F (Whatman, 25mm, 0.7  $\mu\text{m}$  nominal pore size). DOC samples were acidified with fuming HCl 37% and stored in pre-combusted amber glass tubes at room temperature in the dark until analysis. DOC concentration was analyzed by the high temperature catalytic oxidation technique (Benner and Strom 1993) using a Shimadzu TOC-5000 analyzer. Dissolved organic nitrogen (DON) and Dissolved organic phosphorus (DOP) were stored ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) using pre-combusted 25 mL Duran Schott flasks and analyzed by the wet oxidation procedure (Pujo-Pay and Raimbault, 1994). DON and DOP concentrations were corrected for  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NO}_2^-$ , and  $\text{PO}_4^{-3}$ , respectively.

### **2.4 Chlorophyll-*a***

Chlorophyll-*a* concentration was determined by a fluorometric method according to Holm-Hansen *et al.* (1965) from the extracts of 0.3 L of seawater filtered through GF/F (Whatman, 25mm, 0.7- $\mu\text{m}$ ). The extraction was conducted with acetone at 90%, and the fluorescence was measured using a Trilogy (Turner Designs) fluorometer.

### **2.5 Cell abundance**

Samples for determination of bacterioplankton, cyanobacteria, and picoeukaryote abundance were taken in duplicate (1,350  $\mu\text{L}$  in sterile cryovials), fixed with 150  $\mu\text{L}$  of 1% glutaraldehyde and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  prior to laboratory analysis. Samples were analyzed by flow cytometry

(InFlux, Becton Dickinson) according to Marie *et al.* (1999) and Thompson and Van de Engh (2016).

## **2.6 Adenosine triphosphate (ATP)**

ATP concentration is used as an indicator of living biomass in ecological studies of microorganisms in aquatic research (Karl, 1993). The required ATP fraction ( $<1 \mu\text{m}$  and Total) was retained by a Whatman GF/F filter. Approximately 1 L of seawater was filtered and stored in liquid nitrogen until analysis in the laboratory. ATP was quantified by a bioluminescence assay (Holm-Hansen and Booth, 1966; Bulleid, 1978; Karl, 1993) using a luminometer (GloMax, Promega). Since ATP is used as a proxy of microplankton biomass, we measured ATP concentrations fractionated by 1 and 63  $\mu\text{m}$  ( $F_{<1\mu\text{m}}$  and  $F_{\text{Total}}$ ), and we used the term “specific activity” as units of “activity/ATP units” (González and Quiñones, 2009) for malate dehydrogenase activity, extracellular enzyme activity and aerobic respiration.

## **2.7 Malate dehydrogenase (MDH) enzymatic activity**

MDH activity was assessed using a modified version of the methodology proposed by Schiedek (1997) and used as an index of water column metabolism by González and Quiñones (2009) and Garcés *et al.* (2020). MDH activity was assayed as it catalyzed the formation of malate from oxaloacetate, using a general procedure modified from Childress and Somero (1979) and Vetter *et al.* (1994).

## **2.8 Aerobic respiration rates**

Oxygen concentration was determined with a fiber optic oxygen meter (FIBOX 3, PreSens) with optode sensors, in 12 mL DBO bottles incubated in the dark with temperature controlled. Respiration rates were calculated by the slope of the oxygen concentration measured every 2 to 4 h during a 24 h period according to Fuentes *et al.* (2015).

## 2.9 Extracellular enzyme activity (EEA)

EEA was determined following the methodology of Pantoja *et al.* (2011) and Gutierrez *et al.* (2011), adapted to microplates (96-well plates). Triplicates of 200  $\mu$ L aliquots of seawater were incubated in darkness with 1-leucine-4-methylcoumarinyl-7-amide (MCA-Leu), 4-methylumbelliferyl-b-D-glucoside (MUF-Glu) and 4-methylumbelliferyl-oleate (MUF-Ole) at 100  $\mu$ M final concentrations (Hoppe, 1983). Controls were run with seawater samples previously boiled for 10 min. Fluorescence was measured every 1 h for 6 h using a Synergy<sup>TM</sup> 2 Multi-Mode Microplate Reader (Biotek; excitation 365 nm, emission 455 nm) (Hoppe, 1983). Calibration curves were constructed by measuring the fluorescence in seawater with hydrolysis products MCA and MUF at concentrations ranging between 0.1 and 2  $\mu$ M. Rates were calculated as described by Pantoja and Lee (1994).

## 2.10 Metabolic profiles of microbial communities

Biolog-Ecoplate<sup>TM</sup> microplates were used to determine differences in the metabolic potential of the bacterioplankton assemblages (Sala *et al.*, 2006). Biolog-Ecoplates are 96-well microtiter plates containing 31 carbon sources in triplicate. Each well contains the redox dye tetrazolium violet in a dry film together with the carbon source. Formazan is formed as the carbon source is oxidized, which can be quantified spectrophotometrically. Of the total water sample, 150  $\mu$ l was inoculated in each well and the microplates were incubated at 22°C for 72 h. Optical density (OD) was measured at 0, 6, 12, 24, 48 and 72 h ( $\lambda$ = 590 nm) with a microplate reader (ELx800 Epoch<sup>TM</sup>, BIO TEK<sup>®</sup>). The utilization of each carbon source was calculated by subtracting the absorbance of the control wells (without a carbon source) from the absorbance of each substrate well; negative values were set to zero. To avoid bias from selecting one point of OD measurements, we used the time-integrated OD until 72 h ( $OD_i$ ) using the trapezoidal method (Guckert *et al.*, 1996). The  $OD_i$  was then expressed as a percentage of the  $OD_i$  of each substrate over the sum of  $OD_i$  of all substrates, so as to minimize the effect of potentially different inoculum densities (Sala *et al.*, 2006; Fraç *et al.*, 2012). Average well color development (AWCD), which expresses the general use of the carbon substrate by the microbial community,

was calculated using the equation:  $AWCD = \sum (OD_i) / N$ , where N is the number of plate substrates (31).

Substrate richness (R') and substrate's Shannon diversity index were both calculated as a bacterial functional diversity index. Substrate richness (R') is the number of carbon substrates utilized. The substrate's Shannon diversity index ( $H' = -\sum p_i (\ln p_i)$ ), is related to the carbon substrates the bacterial community is able to degrade, where  $p_i$  is proportional  $OD_i$  of the well, over the total  $OD_i$  of all wells of a plate. To simplify interpretation, the substrates were grouped into six categories: carboxylic acids (CA), carbohydrates (CHO), amino acids (AA), amines (AMI), phenolic compounds (PhC) and polymers (POL) in accordance with Sala *et al.* (2006).

## 2.11 Molecular microbial community analyses

The response of the active microbial community to EQ additions was evaluated only in the Acharo study area. We use the term “active microbial community” in the sense that RNA-derived sequences represent the content of microbial ribosomes thus reflecting the active part of the total community (Baldrian *et al.*, 2012). Bacterioplankton was concentrated by filtration (100 mL seawater) onto hydrophilic PVDF filters (0.22  $\mu\text{m}$ ; GVWP02500, Millipore, 25 mm diameter); the filters were preserved with RNAlater (300  $\mu\text{L}$ ) and stored frozen ( $-20^\circ\text{C}$ ) until extraction. RNA was extracted with the mirVana miRNA Isolation Kit (Ambion, Life Technologies) following the specified protocol but with the addition of a mechanical disruption step during the cell lysis phase as described previously (Valdés *et al.*, 2017). RNA extracts were then treated to remove DNA tracers using a TURBO DNA-free Kit (Ambion) and quantified by a fluorometric method using a Qubit fluorometer (Thermo Fisher Scientific). Complementary DNA (cDNA) was generated using the ImProm II<sup>TM</sup> Reverse Transcription System (Promega Corp, Madison, WI); amplification was checked using a standard PCR of the bacterial 16S rRNA. PCR conditions were the following:  $95^\circ\text{C}$  for 5 min followed by 35 cycles of  $95^\circ\text{C}$  for 45 s,  $56^\circ\text{C}$  for 45 s, and  $72^\circ\text{C}$  for 45 s, and a final elongation step of 5 min at  $72^\circ\text{C}$  using GoTaq<sup>®</sup> DNA Polymerase (Promega Corporation). PCR products were checked using electrophoresis for 45 min at 70 volts in an agarose gel (1.5%). cDNA templates were sequenced with MiSeq (Illumina) at GenomaMayor laboratory (<http://www.genomamayor.com>, Santiago, Chile) using

in-house primers 515F (GTGYCAGCMGCCGCGGTAA) and 806R (GGACTACNVGGGTWTCTAAT) for the V4 region of the 16S rDNA gene based on Caporaso *et al.*, 2011.

Sequencing data-processing analyses were carried out using QIIME2 (v.2019.7) for sequence curation and taxonomic classification into ASVs (Amplicon Sequence Variant) (Bolyen *et al.*, 2018). First, sequences were imported to QIIME2 using Casava. The demultiplexed, poor quality and short sequences were extracted, leaving c.a. 210 bp length sequences, using *qiime dada2 denoised-paired* plugin (Callahan *et al.*, 2016). The taxonomic classification was performed using the SILVA138 database (release 132-99% OTUs, 515-806 region) with the *feature-classifier classify-consensus-vsearch* plugin (Rognes *et al.*, 2016). ASV that were taxonomically annotated as “Mitochondria”, “Chloroplast”, “Eukarya” and “Cyanobacteria” were excluded from subsequent bacterial and archaeal community analysis. The libraries were deposited in the European Nucleotide Archive under the study accession number PRJEB52033, 32 paired reads (ERS11455509-ERS11455540).



## 2.12 Statistical Analyses

### 2.12.1 Exploratory analysis:

Spearman correlation analysis was performed between nutrients and ATP concentrations in the different experimental settings.

For each experiment, a permutational multivariate analysis of variance (PERMANOVA) was performed, using PRIMER 6 and the add-on PERMANOVA+ software package, to examine the variability of rates of MDH, activity, EEA, bacterial abundance, ATP concentration and nutrients ( $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NO}_2^-$  and  $\text{PO}_4^{3-}$ ) related to treatments and incubation time. Principal Coordinate Analysis (PCoA) was performed to visualize patterns of the microbial community in response to EQ additions in different treatments and times.

### 2.12.2 Metabolic activity

Normality assumptions were checked (Kolmogorov-Smirnov test) for all variables: specific MDH activity, respiration and EEA, bacterial abundance, ATP concentration, environmental variables ( $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NO}_2^-$  and  $\text{PO}_4^{3-}$ ), EcoPlates Index (AWCD, H' and R') and grouped relative utilization of substrates (CA, CHO, AA, AMI, PhC and POL). A transformation was used for variables that were not normally distributed (see Table S2).

A t-test was performed for comparing the results of metabolic and environmental variables in the Control and treatments between the two study sites. Two-way analysis of variance (ANOVA) was applied using treatments and times as levels for each experiment. Then, a pairwise multiple comparison was performed using a Tukey test as *a posteriori* analysis. The  $\text{OD}_i$  data from EcoPlates for each treatment were ordered using joining cluster analyses.

### 2.12.3 Microbial Community Analyses

To evaluate if the sequencing depth allowed to recover the expected microbial community richness in the different treatments, rarefaction curves were generated using R statistical software (R Core Team 2020). Alpha diversity, including indexes such as richness (S), Shannon (H'), and Evenness (J') were estimated using the Primer 6 software (Anderson *et al.*, 2008) based on rarefying libraries.

To identify microbial community changes associated with EQ treatments and incubation time, sequences data were first standardized using solvent as previously described for metabolic analyses (see section 2.2). The Bray-Curtis Similarity matrix was calculated using square root transformed data. Principal Coordinate Analysis (PCoA) with Pearson correlation vectors overlaid was performed to visualize changes associated with microbial community structure at Phyla level. Vectors representing correlation  $>0.7$  were used. To determine the taxa (ASV level) with higher contribution to dissimilarity associated with the different treatments, a SIMPER analysis was performed using PRIMER software. Significant differences in ASV abundance between treatments were estimated through an ANOVA multigroup using STAMP software.

### 3. Results

#### 3.1 Environmental conditions of the sampling sites

The hydrographic conditions in Achao show a highly mixed water column with average temperature and salinity of 12.2°C and 33.1, respectively (Fig. 2a). A typical nutrient profile shows lower concentrations at the surface (e.g.  $\text{NO}_3^-$  0.5  $\mu\text{M}$  at 2 m) in comparison to deeper water strata (8.4  $\mu\text{M}$  and 9.6  $\mu\text{M}$  at 10 and 30 m, respectively, Table 1). DOC and Chl-*a* concentrations were higher at 10 m in comparison to the surface and 30 m. The picoplankton abundance was higher in the surface compared with deeper waters (Table 1).

A stratified water column was observed in Coliumo Bay, with a warmer temperature at the surface (16.5°C) and a gradual decrease towards deeper water (~11.7°C; Fig. 2b). Salinity was lower at the surface of the water column (31-32), due to the influence of freshwater input from the Litril River. At 20 m depth, salinity increased to 34.5.

The concentration of nutrients, DOM, and Chl-*a* as well as picoplankton abundance found at 10 m depth in Achao were generally lower than those found in Coliumo Bay, with the exception of  $\text{NO}_3^-$ . A lower  $\text{PO}_4^{3-}$  concentration was measured in Achao resulting in a higher N/P ratio compared with Coliumo Bay (Table 1). These environmental conditions are within those expected for both sites in the season in which each sampling took place (e.g. Garcés et al., 2020).

#### 3.2. Experimental conditions

Spearman correlations between  $\text{NH}_4^+$  and ATP showed significant ( $p < 0.05$ ) and negative correlation (coefficients -0.5 and -0.66) for all experiment treatments, the control and both size fractions (data not shown), suggesting a possible bottle effect which is difficult to separate from the potential response of the microbial community to EQ additions. The multivariate analysis of the microcosm experiments at both sites (72 h Achao and 48 h Coliumo) showed significant differences in time and treatments (PERMANOVA;  $p < 0.05$ ); time was the component with greater variation (11.9 and 11.4, respectively). In the Principal Coordinate Analysis (PCoA), the two axes explained 47 and 58% of the variance for Achao and Coliumo, respectively. In both cases the experimental times of 48 and 72 h were clearly separated from the other experimental

times (0 to 24 h), principally on axis 1 (Suppl. Info Fig. S1 a and b). Based on these results, the experiments are only analyzed until 24 h from the exposure to EQ.

### **3.3 Nutrient and DOM concentrations in microcosm incubations with EQ**

The concentrations of nutrients during the course of the experiments generally tended to increase over time (Table 2).  $\text{NH}_4^+$  increased significantly in the treatments compared to the control, especially at 24h in both sites (Table 2, ANOVA and Tukey test;  $p < 0.05$ , Suppl. Table S5).  $\text{NO}_3^-$  increased in treatments up to 12h and reversed at 24h (Table 2, ANOVA and Tukey test;  $p < 0.05$ , Suppl. Table S5).  $\text{NO}_2^-$  tended to increase in the EQ treatments, with significant peaks at 6 and 24h in Achao and at 6h in Coliumo.  $\text{PO}_4^{3-}$  decreased slightly in the treatments compared to controls in both sites (Table 2) with no clear association with EQ concentrations.

The DOM concentrations during the incubations were only recorded for the control. The DOC and DOP concentrations in Achao were relatively stable (87  $\mu\text{M}$  and 0.2  $\mu\text{M}$  respectively), while DON (Table S3). The DOC concentration in Coliumo decreased initially (6 h) and later increased until 24 h (1.5 times the initial concentration). DON and DOP increased up to 3 and 1.5 times the initial concentrations, respectively (Table S3).

### **3.4 Bacterioplankton abundance and ATP concentrations in microcosms with EQ**

There was a gradual decrease in cell abundance in the treatments and control in Achao at 24 h and a tendency to increase the number of cells in the treatments respect to the control; however, the differences were not significant ( $p > 0.05$ ). In general, cell abundances decreased in Coliumo at 12 h both in the control and EQ treatments.(Fig. S2 a and b). A slight tendency to lower values of cell abundance in the treatments with respect to the controls was observed during the course of the experiments (Fig. S2 a and b).

ATP concentrations decreased over time in the treatments and control, especially  $F_{\text{Total}}$ , with the lowest concentrations at 24 h (Fig. S3). The effect of EQ on ATP concentrations showed no clear pattern; in Achao there was a significant decrease of ATP for EQ1 at 24 h in the  $F < 1\mu\text{m}$ , and at 6 h in the  $F_{\text{Total}}$ . However, EQ3 showed a significant increase in ATP concentration at 6 and 12 h (Fig. S3 a and b; ANOVA and Tukey's test;  $p < 0.05$ , Suppl. Table

S5). There was a significant decrease in Coliumo until 12 h in the treatments and a recovery at 24 h in the  $F < 1\mu\text{m}$ ; the  $F_{\text{Total}}$  was highly variable, with a significant decrease at 6 and 24 h and an increase in ATP concentrations at 0 and 12 h (Fig. S3 c and d; ANOVA and Tukey's test;  $p < 0.05$ , Suppl. Table S5).

### 3.5 Specific malate dehydrogenase (MDH) activity in microcosms with EQ addition

The specific activity of MDH was significantly different between study sites as shown by the controls (t-test;  $p < 0.05$ ; Table S4).

In Achao the size fractions showed opposite behavior over time; the specific MDH activity decreased for  $F < 1\mu\text{m}$  (3.7 to 1 pmol NADH  $\text{pg ATP}^{-1} \text{min}^{-1}$ ) while the  $F_{\text{Total}}$  increased (3 to 12 pmol NADH  $\text{pg ATP}^{-1} \text{min}^{-1}$ ), with significant differences between the size fractions at 12 and 24 h (Fig. S4 a; ANOVA and Tukey's test;  $p < 0.05$ , Suppl. Table S6). The response of the specific MDH activity to EQ additions, expressed as changes compared to the control, was significantly negative in Achao. The specific activity of MDH in the size fraction  $F < 1\mu\text{m}$  showed a marked negative response to EQ at the beginning of the experiment (0 h); subsequently, the MDH activity increase until values over 1 pmol  $\text{pg ATP}^{-1} \text{min}^{-1}$  at 24 h (Fig. 3 a).  $F_{\text{Total}}$  showed an erratic effect at the beginning of the experiment, increasing the negative response at 12 h (Fig. 3 a, and b, ANOVA and Tukey's test;  $p < 0.05$ , Suppl. Table S5).

In Coliumo the specific MDH activity was significantly greater for  $F < 1\mu\text{m}$  than for  $F_{\text{Total}}$ , decreasing over time from 5 to 4 pmol NADH  $\text{pg ATP}^{-1} \text{min}^{-1}$ , while the  $F_{\text{Total}}$  increased from 1 to 3 pmol NADH  $\text{pg ATP}^{-1} \text{min}^{-1}$  at 24 h (Fig. S4 b; ANOVA and Tukey's test;  $p < 0.05$ , Suppl. Table S6). The specific MDH activity of  $F < 1\mu\text{m}$  in Coliumo Bay showed a significant response to EQ additions, positive for EQ1 in the first 6 h and negative from 12 h on, and mainly negative for EQ3. The response of the  $F_{\text{Total}}$  was mostly negative until 12 h for both treatments (Fig. 3 c and d; ANOVA and Tukey's test;  $p < 0.05$ , Suppl. Table S5).

### 3.6 Specific microbial respiration response to EQ addition

All incubations began in oxic conditions, above  $300 \mu\text{mol O}_2 \text{L}^{-1}$  ( $6.7 \text{ mL O}_2 \text{L}^{-1}$ ). However, the respiration rates were significantly different between sites (t-test;  $p < 0.05$ ; Table S4). In

Achao, the specific respiration rate of the  $F<1\mu\text{m}$  fraction in the experimental controls increased until 12 h compared to the  $F_{\text{Total}}$ ; however, both fractions increased oxygen consumption over time (Fig. S4 c). The response of  $F_{\text{Total}}$  to EQ additions was highly variable among treatments over time; it was negative ( $-125$  to  $-211$   $\text{pmol O}_2 \text{ pg ATP}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) and significant at 0, 12 and 24 h, changing to positive ( $86$ - $267$   $\text{pmol O}_2 \text{ pg ATP}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) at 6 and 12 h. However,  $F<1\mu\text{m}$  was positive and significant for all EQ concentrations ( $95$ - $451$   $\text{pmol O}_2 \text{ pg ATP}^{-1} \text{ h}^{-1}$  over the control). This difference between the control and treatments decreased to 14 and  $-9$   $\text{pmol O}_2 \text{ pg ATP}^{-1} \text{ h}^{-1}$  at 24 h for EQ2 and EQ3, respectively (Fig. 4 a and b; ANOVA and Tukey's test;  $p < 0.05$ , Suppl. Table S5). The specific respiration rate in Coliumo decreased over time up to 12 h for both fractions; however,  $F<1\mu\text{m}$  showed greater rates than the  $F_{\text{Total}}$  (Fig. S4 d). The responses to the EQ additions were significant and mostly negative, from  $-23$  to  $-127$   $\text{pmol O}_2 \text{ pg ATP}^{-1} \text{ h}^{-1}$  for  $F_{\text{Total}}$  and  $F<1\mu\text{m}$ , respectively (Fig. 4 c and d; ANOVA and Tukey's test;  $p < 0.05$ , Suppl. Table S5).

### 3.7 Specific Extracellular Enzyme Activity (EEA) response to EQ addition

EEA was detected for the three substrates studied in this microcosm experiment in both sites; the specific EEA in the controls was significantly greater (about an order of magnitude) in Achao compared to Coliumo (t-test;  $p < 0.05$ ; Table S4).

#### 3.7.1 Leucine aminopeptidase (LAP) activity

The  $F_{\text{Total}}$  LAP activity increased over time in Achao, reaching 11  $\text{pmol pg ATP}^{-1} \text{ h}^{-1}$  at 12 and 24 h, an order of magnitude greater than the activity of the  $F<1\mu\text{m}$  (Fig. S4 e). The response to EQ additions in Achao was significant, negative and proportional to the EQ concentration in the  $F_{\text{Total}}$  (12 and 24 h). However, the response in the  $F<1\mu\text{m}$  was positive and significant from 6 h on, but variable among concentrations (Fig. 5 a and b, ANOVA and Tukey's test;  $p < 0.05$ , Suppl. Table S5).

$F_{\text{Total}}$  in Coliumo showed an increase in LAP activity over time, reaching 2  $\text{pmol pg ATP}^{-1} \text{ h}^{-1}$  at 24 h, in contrast to the  $F<1\mu\text{m}$  which decreased and was not detectable after 12 h. However, the LAP activity of  $F<1\mu\text{m}$  was twice that of the  $F_{\text{Total}}$  in the first 6 h (Fig. S4 f).

LAP activity in the EQ treatments was greater than the control for both fractions and was significant for EQ3 at 0 and 24 h (Fig. 5 c and d, ANOVA and Tukey's test;  $p < 0.05$ , Suppl. Table S5).

### 3.7.2 $\beta$ -glucosidase ( $\beta$ -GLU) activity

$\beta$ -GLU activity increased over time in Achao, reaching 9 and 8 pmol pg ATP<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup> at 24 h in FTotal and F<1 $\mu$ m, respectively; the latter was twice as high as the FTotal during the first 6 h (Fig. S4 g). The response of  $\beta$ -GLU activity to the addition of EQ was generally negative during the entire incubation. FTotal showed a negative response proportional to the concentration of EQ, which was significant at 12 h and 24 h.  $\beta$ -GLU activity in the F<1 $\mu$ m was more variable; there was an initial significantly negative response (0 h) inversely proportional to the EQ concentration, which became significantly positive for EQ1 after 12 h, but negative and proportional to the concentration for EQ2 and EQ3 (Fig. 6 a and b, ANOVA and Tukey's test;  $p < 0.05$ , Suppl. Table S5).

The  $\beta$ -GLU activity rate increased over time in Coliumo, reaching 0.25 and 0.75 pmol pg ATP<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup> for FTotal and <1 $\mu$ m, respectively at 24 h. The rate for F<1 $\mu$ m was twice that of FTotal at all times (Fig. S4 h). The response to the addition of EQ was variable over time and among fractions. There was a negative tendency of FTotal in the first 6 h, but a significant positive change in EQ3 at 24 h. F<1 $\mu$ m showed an initial positive response that was significant for EQ1 but changed to significantly negative after 12 h for EQ1 and EQ3 (Fig. 6 c and d, ANOVA and Tukey's test;  $p < 0.05$ , Suppl. Table S5).

### 3.7.3. Lipase (LIP) activity

LIP activity increased over time in the control. The LIP activity of F<1 $\mu$ m was twofold higher than that of FTotal in the first 12h, reaching F<1 $\mu$ m 25 pmol pg ATP<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup>. This reversed at 24h when the FTotal reached a LIP activity of 33 pmol pg ATP<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup> (Fig. S4 i). The LIP activity response to the addition of EQ in both fractions was significant and negative during the entire incubation, except EQ1 for F<1 $\mu$ m at 24 h and for FTotal at 6 h. The decrease in LIP

activity was proportional to the EQ concentration, with greater variability in the first 6 h for  $F < 1\mu\text{m}$  (Fig. 7 a and b, ANOVA and Tukey's test;  $p < 0.05$ , Suppl. Table S5).

LIP activity increased over time for Coliumo;  $F < 1\mu\text{m}$  showed LIP activity three times that of FTot at all times, reaching 5.9 and 1.9 pmol pg ATP<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup>, respectively, at 24 h (Fig S4 j). The response of FTot to the addition of EQ showed significant negative differences for EQ3, while for EQ1 FTot decreased over time, reaching similar values than the control at 24 h.  $F < 1\mu\text{m}$  showed a significant negative response that increased over time for both concentrations (except EQ1 at 6 h). It should be noted that the magnitude of the  $F < 1\mu\text{m}$  response was up to 3 times greater than FTot (Fig. 7 c and d, ANOVA and Tukey's test;  $p < 0.05$ , Suppl. Table S5).

### **3.8. Utilization of carbon substrates by the microbial community in response to EQ addition.**

The comparison of the mean carbon substrate utilization per site and treatment is shown in Fig. 8. In general, the samples clustered in two main groups according to their sampling site. The Achao samples grouped with a smaller distance (17.5) than Coliumo (22); however, treatment EQ2 for Achao showed a distant affiliation (31.9).

The response to the addition of EQ in Achao showed significant differences in AWCD compared to the control during the entire incubation (ANOVA and Tukey's test;  $p < 0.05$ ; Suppl. Tables S7). This difference decreased over time in all treatments. EQ1 showed a higher AWCD in comparison to the control, whereas EQ2 and EQ3 showed lower AWCD (Table 3). The H' and R' indices decreased in the treatments during the incubation (except in EQ1 at 0 and 6 h) and were significant for EQ2 at 24 h (Table 3; ANOVA and Tukey's test;  $p < 0.05$ ; Table S7).

In Achao, EQ additions produced an initial (0 h) decrease of the Relative Utilization (RU) of CHO (-5%), PhC (2%), and POL (2%) in EQ2 and EQ3, whereas towards the end of the experiment an increment was observed in the utilization of CHO (5%), due mainly to acetyl glucosamine, erythritol, methyl glucoside and glycerol phosphate and POL (15%) given by Glycogen and Tween 80 (Figs. 9 and S5). The opposite occurred with the utilization of AA (serine, asparagine, threonine and glutamic acid) and CA (hydroxybutyric acid), which increased at 0 h (5% and 4%, respectively) in EQ2 and EQ3, and then decreased 6% and 8% in the

following hours; however, these differences were not significant (Figs. 9 and S5). These results suggest a switch of the microbial community from a preferential utilization of labile substrates (like AA and CA) in the EQ treatments at the beginning of the experiment to less labile substrates (CHO and POL) to the end of the experiments.

There was a significant increase of substrate utilization in Coliumo in the treatments with EQ1 and EQ3 ( $AWCD_{0h} = 6.5$  and  $7.5$ ) with respect to the control ( $AWCD_{0h} = 4.8$ ) at 0 h and EQ3 at 6 h ( $AWCD_{6h} = 13.7$  vs.  $16.1$ ; Table 3, ANOVA and Tukey's test;  $p < 0.05$ , Suppl. Table S7). In contrast, there was a decrease in  $H'$  and  $R'$  for both concentrations of EQ at 0 h, which was not significant for  $H'$  (Table 3, ANOVA and Tukey's test;  $p < 0.05$ , Suppl. Table S7). The relative utilization of grouped substrates did not show significant differences; however, there was an increase of 10% in CHO utilization at 0 h in EQ1 (Figs. 9 and S5). Furthermore, the utilization of AA, AMI, PhC and POL decreased (~4%) at 0 h and increased at 6 h in the treatments with EQ (Figs. 9 and S5). The preferences to these substrates and carbohydrates by the microbial community were generally maintained between the control and treatments (Fig. 9).

### 3.9 Active microbial community composition in response of EQ addition

Rarefaction curves indicate that most of the libraries reached a plateau, and thus the expected richness at the different treatments was retrieved (Fig. S6). The alpha diversity of the microbial community showed a similar range of values between the Control and the Solvent treatment, with slight changes associated with incubation time (Table S8). The Shannon indexes ( $H'$ ) of EQ treatments were higher during the first 6 h, and then decreased towards the end of the experiment (Table S8), reaching lower diversity values in EQ3 and EQ2 treatments than in the Controls and EQ1. The lower  $H'$  of EQ3 was associated with higher species dominance (Simpson Index) and lower richness.

The composition of the active microbial community was represented by 25 phyla consisting mainly of Proteobacteria (52-69%) followed by Bacteroidota (19-30%), Verrucomicrobiota (3-8%) and Thermoplasmatota (0.5-6%). The main classes found both *in-situ* and in the experiments are Alphaproteobacteria (Proteobacteria), Gammaproteobacteria (Proteobacteria),

Bacteroidia (Bacteroidota), Verrucomicrobiae (Verrucomicrobiota.) and Thermoplasmata (Thermoplasmata). These classes presented a differential response in EQ treatments compared with controls, based on their 16S rRNA reads counts. We found, in general, higher activity of Bacteroidia (except 12 h), Gammaproteobacteria, Verrucomicrobia (except 12 h) and Thermoplasmata (Archaea); in contrast, a lower activity of Alphaproteobacteria was observed (Fig. 10). At 12 h of incubation, the higher activity differences of EQ vs control treatments were registered mainly for EQ3 associated with a negative EQ effect on the orders Flavobacteriales and Rhodobacterales, and a positive EQ effect for the orders Thiomicrospirales (Gammaproteobacteria), KI89A clade (Gammaproteobacteria) and Marine Group II (Thermoplasmata; *Ca. Poseidionales*). The relative abundance of the active microbial communities was similar between the Control and EQ treatments at 24 h of incubation (Fig. 10).

Principal Coordinate Analysis (PCoA, Fig. S7) at Phyla level showed that the variability of the microbial community structure was associated with the incubation time and treatments (EQ addition). PCoA1 and PCoA2 accounted for 41% and 29.5% of total variation, respectively; the first was associated with a separation by treatments, including EQ3 and EQ2, particularly at 12 h. At all incubation times, the PCoA analyses showed the Control, EQ1, EQ2(24) and EQ3(24) remained close to each other (Fig. S7).

SIMPER analyses showed that 19 ASVs contributed the most to dissimilarity between EQ addition treatments and the control (Fig. 11). This dissimilarity varied between 15 and 19%, for EQ1 and EQ3, respectively. These 19 ASVs account each for at least 1.5% of the observed differences (Fig. 11). The following more representative ASVs significantly decrease their abundance (ANOVA  $p < 0.05$ ) between treatments and control: *Planktomarina* (Rhodobacteraceae), ASV150 (Rhodobacteraceae), *Ascidiehabitants* (Rhodobacteraceae), and *Tenacibaculum* (Flavobacteraceae) (Fig. 11 and S8). On the other hand, NS10 marine group (Cryomorphaceae), NS2b marine group (Flavobacteraceae), and *Formosa* (ASV42, Flavobacteraceae) increase their abundance in the treatments compared with the control (Fig. 11 and S8) (ANOVA  $p < 0.05$ ).

In addition, the ASV's contributing to dissimilarity between EQ treatments and control, which were identified by SIMPER but were not statistically significant using ANOVA ( $p > 0.05$ ), were *KI89A* (Gammaproteobacteria), *SAR86* (Gammaproteobacteria), *MGII* (Thermoplasmata/Archaea) and *SUP05* (Thioglobaceae/ Gammaproteobacteria). These groups tend to increase when exposed to EQ treatments. On the other hand, *Polaribacter* (Flavobacteriaceae), *ASV38* (Flavobacteriaceae), *Ulvibacter* (Flavobacteriaceae), *Formosa* (*ASV41*, Flavobacteriaceae) (Fig. 11) only increased their abundance at low EQ concentration (EQ1).

#### 4. Discussion

Our study seeks to identify the potential effects of ethoxyquin on the metabolic activity and biodiversity of the microbial planktonic community in two contrasting areas, Achao and Coliumo Bay where the first is influenced by salmon farming. To the best of our knowledge, this is the first time that the effects of EQ have been evaluated in marine microbial communities of the water column.

##### 4.1 Environmental conditions in the study sites

The hydrographic characteristics of both study sites were typical for spring/summer and consistent with the seasonal patterns of Coliumo Bay (Schneider *et al.*, 2017) and the inner sea of Chiloe, where it is frequent to find strong mixing driven by winds and tides (Narváez *et al.*, 2019). These hydrological parameters also coincide with the features for each site reported by Garcés *et al.* (2020) for the same season but a different year. Despite the difference in surface temperature and salinity (4°C and 2, respectively, Fig. 2) between the sites at a depth of 10 m (microcosm sampling depth), these differences were less than 1°C and 1 (Fig. 2), which are insignificant considering the natural environmental variability of the studied areas, even at daily scale.

The nutrient concentrations found in both study sites are within the ranges previously reported (Montero, 2007; Morales and Anabalón, 2012; Valdés *et al.*, 2017; Garcés *et al.*, 2020).

Nutrient concentrations in northern Patagonia (Iriarte *et al.*, 2007; Jacob *et al.*, 2014; Martínez *et al.*, 2015) are lower than those found in central Chile (Quiñones *et al.*, 2010; Morales and Anabalón, 2012), which is consistent with the results of our study. The higher N/P ratio found in Achao is a result of the lower concentration of  $\text{PO}_4^{-3}$  as compared to Coliumo Bay, which results in a “deficit” of N for central Chile (Coliumo) that may be related to denitrification and annamox processes (main pathways of N loss, Dalsgaard *et al.*, 2003) characteristic of the upwelling systems in central Chile with high nutrient and low oxygen content (Quiñones *et al.*, 2010; Galan *et al.*, 2014). These conditions are concordant with those expected for both sites in the season sampled (e.g. Garcés *et al.*, 2020).

The lower concentrations of DOM, Chl-*a* and picoplankton abundance at a depth of 10 m in Achao compared to Coliumo would be explained by the greater primary productivity in central Chile (inferred from the concentrations of DOM and Chl-*a*) and are within the ranges reported by other authors for these sites (Vargas *et al.*, 2013; González *et al.*, 2019; Rain-Franco *et al.*, 2019; Molina and Fernández, 2020).

#### **4.2 Nutrient and DOM concentrations in microcosm incubations with EQ**

The addition of EQ at the levels tested in this study showed an increase in nutrient concentrations in the microcosms compared to the control, with no clear patterns emerging as a function of EQ concentration. The increase observed in both study areas may be due to a potential accumulation of nutrients up to 12 h., since at 24h the EQ treatments tended to decrease or maintain nutrient concentration except for ammonium, which increased during the entire experiment, suggesting higher remineralization in the treatments (Table 2). Valdés-Castro and Fernández (2021) also found a reduction of ammonium uptake but when the community was exposed to anti sea lice pesticides used in salmon farming.

There was an initial accumulation of nitrate and nitrite (0-6 h), possibly related with the nitrification process occurred in the first phase of the experiment. However, in both sites the nitrate and nitrite net accumulation stop (24 h in Achao and 12 h in Coliumo; Table 2), suggesting a decrease or potential inhibition of nitrification by EQ. This agrees with the study of Papadopoulou *et al.* (2016, 2020), who found a reduction of potential nitrification in soils

induced by EQ. The raise of nitrogenous nutrients was also reflected in the N/P ratio, which generally increased in the treatments, suggesting greater re-mineralization of nitrogenized compounds.

In the control, DOM remained within the environmental ranges observed previously in the study zones by other authors (Vargas *et al.*, 2013; González *et al.*, 2019; Rain-Franco *et al.*, 2019; Molina and Fernández, 2020). However, the changes in concentration over time suggest DOC consumption by the microbial community in both sites during the first 6 h of incubation and accumulation until 24 h, especially in Coliumo where the increase at 24 h was notable, possibly due to cell division, exudates, and viral lysis, among others (Iturriaga and Zsolnay 1981; Owaga *et al.* 2001; Kawasaki and Benner 2006). The DON and DOP behaved in opposite ways, accumulating in Coliumo, which agrees with the results of Valdés *et al.* (2017) from experiments with bacterioplankton communities enriched with DOM conducted on the continental shelf adjacent to Coliumo bay.

#### **4.3 Bacterioplankton abundance and ATP concentration in microcosms with EQ**

Bacterioplankton abundance changed over time and varied in the treatments. The abundance in Achao decreased at 24 h both in the control and treatments. Bacterioplankton abundance in EQ treatments were higher than in controls, increasing in general proportionally to the EQ concentration mainly in Achao: In Coliumo a greater variability was found in response to EQ exposure. This is in line with the results reported by Papadopoulou *et al.* (2020) who tested the effects of EQ and its main two metabolites (i.e. 2,6-dihydro-2,2,4-trimethyl-6-quinone imine; QI and 2,4-dimethyl-6-ethoxyquinoline; EQNL) on the abundance and activity of ammonia and nitrite oxidizers from soil isolates. They found lower activity and abundance in higher concentrations of EQ equivalent to EQ<sub>3</sub>=1000 µg L<sup>-1</sup> and in EQ concentrations two orders of magnitude higher than those used in this study. However, Papadopoulou *et al.*, (2020) also observed an increment in abundance and activity of ammonia oxidizers in lower EQ concentrations especially on the first experimental day.

The total microbial biomass expressed as ATP concentrations (<63µm) were 0.02 and 0.04 µg ATP L<sup>-1</sup> for Achao and Coliumo, respectively, which is in the range reported by Garcés *et*

*al.* (2020) ( $<100\mu\text{m}$ ) in Achao ( $0.023 \mu\text{g ATP L}^{-1}$ ), but Coliumo had twice the biomass reported by these authors ( $0.021 \mu\text{g ATP L}^{-1}$ ). The biomass of both sites was lower than that reported by González and Quiñones (2009),  $0.2 \mu\text{g ATP L}^{-1}$  in southern central Chile and  $0.05 \mu\text{g ATP L}^{-1}$  in northern Chile. ATP concentration decreased over time in both sites, which reflects a decrease in live biomass in the experiments, which was negatively correlated with ammonium concentration. The greater total biomass in Coliumo Bay is related to the hydrobiological characteristics of each site; greater biomass is expected in Coliumo since it is a highly productive area; however, this was not reflected in the  $F<1\mu\text{m}$  since total biomass was similar between the two sites. Bacterioplankton abundance was, contrary to expectations, also greater in Achao than in Coliumo. The addition of EQ did not produce a clear response pattern in total biomass (i.e. ATP concentration). However, the  $F<1\mu\text{m}$  in Coliumo showed higher sensitivity to EQ additions evidenced by a decrease of biomass until 12 h of incubation and then recovered. In the case of  $F_{\text{Total}}$  at the two sites, EQ appeared to stimulate a biomass increment.

#### 4.4 EQ addition and specific MDH activity

The specific MDH activity in the  $F_{\text{Total}}$  was 3 and 1  $\text{pmol NADH min}^{-1} \text{pg ATP}^{-1}$  in Achao and Coliumo, respectively (Fig. S4), agreeing with ranges reported by Garcés *et al.* (2020) for both sites and greater than those reported by González and Quiñones (2009) in central Chile. This difference may be related to the lower microbial biomass (ATP) measured in our study. The specific MDH activity in the study sites showed a similar pattern in the control, with  $F_{\text{Total}}$  increasing activity over time while the size fraction  $F<1\mu\text{m}$  decreased (Fig. S4). It must be noted that the  $F<1\mu\text{m}$  in Coliumo showed higher specific MDH activity during the whole experiment than in Achao, which may be related to a response to the difference in the hydrobiological characteristics of the sites (e.g. greater DOM and Chl-*a*).

Specific MDH activity in Achao had a marked negative response to EQ addition in both fractions which decreased over time but showed an increase in MDH activity at 24 h for  $F<1\mu\text{m}$ . The  $F_{\text{Total}}$  of Coliumo also showed reduced MDH activity in response to EQ; however, the MDH activity of the  $F<1\mu\text{m}$  fraction increased with the addition of EQ1 ( $10 \mu\text{g L}^{-1}$ ) in the first 6 h of the experiment (Fig. 3). It has been reported that the increase in MDH activity generally

indicates an increase in the remineralization of organic matter in soils (Martínez *et al.*, 2002). MDH is also an indicator of microbial activity in microplankton communities of the water column in the Humboldt Current System, since MDH has the highest oxidizing activity in comparison to other catabolic enzymatic activities, correlates significantly with oxygen concentration and microplankton biomass in the water column (Quiñones *et al.*, 2006; González and Quiñones, 2009), and reflects the global oxidative metabolic reaction of the microbial community (Martinez *et al.*, 2002). Thus, these results suggest that EQ exposure may decrease the remineralization of organic matter in the water column. However, the EQ (and antioxidants in general) may be considered pro-oxidative under certain conditions (Blaszczyk *et al.*, 2013; Egloff *et al.*, 2018), which may explain the “stimulation” of the specific MDH activity of the smallest size-fraction. The microbial community may also be resilient, recovering from and even being stimulated by the addition of this antioxidant.

#### **4.5 Response of microbial respiration to EQ addition**

Detrimental effects of EQ at the cell metabolism level have been previously reported. Hernández *et al.* (1993) and Reyes *et al.* (1995) analyzed the impact of EQ on the metabolic pathways of renal and hepatic rat cells. They suggested that EQ interacted with the mitochondrial respiratory chain, and it resulted in inhibition of oxygen consumption in the mitochondria of kidney and liver in a dose-dependent manner. Although there is no previous information about changes in marine microbial respiration rates associated with EQ addition, studies of soil microbiota suggest that EQ does not produce significant changes in respiration (Papadopoulou *et al.*, 2016). However, our study found changes in the respiration rate after the addition of EQ, which were different between areas and fractions. The size-fraction  $F < 1\mu\text{m}$  in Achao showed a clear increase in respiration rate during the whole experiment (up to 2.5 times that of the control); however, the response of  $F_{\text{Total}}$  was highly variable, with a negative effect at the beginning and end of the experiment. In Coliumo Bay, where there is no salmon farming, the effect was mainly negative in both fractions, but without proportional responses to EQ concentrations or consistent temporal patterns. These responses differentiated by areas and fractions suggest that EQ would have a negative effect on the communities in areas that have

not been exposed to this type of compound, while the microbial communities of areas near salmon farms may be stimulated as a response to possible stress or degradation of the compound. A possible explanation for increased respiration is that microorganisms oxidize EQ, as has been reported for quinolines (Brockman *et al.*, 1989; Aislabie *et al.*, 1990; Kaiser *et al.*, 1996) and other chemical compounds such as insecticides (Tu, 1970; Jones and Ananyeva, 2001; Eisenhauer *et al.*, 2009; Jail *et al.*, 2014).

#### **4.6 Response of Extracellular Enzyme Activity (EEA) to EQ addition**

We assessed the response of microbial metabolism by the specific EEA of three key enzymes: leucine aminopeptidase (LAP),  $\beta$ -glucosidase ( $\beta$ -GLU) and lipase (LIP), as indicators of the degradation of protein, carbohydrate and lipid compounds, respectively. We detected the specific EEA on the three substrates used in both sites and fractions. The specific EEA of the  $F < 1\mu\text{m}$  was greater than the  $F_{\text{Total}}$  (except for LAP) in the first hours of the experiment in Achao, while in Coliumo this occurred for the three enzymes (Figs. 5,6,7). This may be because the  $F < 1\mu\text{m}$  “benefits” from the absence of predators during the incubation and from the greater biomass (ATP) in the  $F_{\text{Total}}$ , resulting in greater specific EEA for the  $F < 1\mu\text{m}$ .

It should be noted that the non-specific EEA rates (data not shown) agreed with the ranges reported by Pantoja *et al.* (2011); LAP: 1.2 to 182  $\text{nmol L}^{-1} \text{h}^{-1}$ ,  $\beta$ -GLU: 0.08-61  $\text{nmol L}^{-1} \text{h}^{-1}$  and by Gutiérrez *et al.* (2011); LAP: 10 to 229  $\text{nmol L}^{-1} \text{h}^{-1}$  in central Chile, and other coastal regions (LAP: 15-80  $\text{nmol L}^{-1} \text{h}^{-1}$ ; Obayashi *et al.*, 2005). However, the non-specific rates of  $\beta$ -GLU in this study for the control (22-69  $\text{nmol L}^{-1} \text{h}^{-1}$ ) are lower than those reported by Garcés *et al.* (2020), who reported values of 114-142  $\text{nmol L}^{-1} \text{h}^{-1}$  in the control for the same sites studied here. The non-specific rates for LIP (data not shown) were four times those reported by Yamada *et al.* (2010) for surface waters of Tokyo.

The specific EEA was affected by EQ addition, generating changes in the rates of the three enzymes evaluated. Specific LAP activity generally increased in response to the addition of EQ, especially in the  $F < 1\mu\text{m}$  of Achao, but with no clear pattern over time and not in proportion to the EQ concentration added. In contrast, the  $F_{\text{Total}}$  in Achao was affected, decreasing the

specific LAP rate, apparently proportional to the concentration of EQ. LAP activity was also stimulated by EQ in Coliumo, but the changes were less than those observed in Achao. The stimulation of specific LAP activity by the addition of EQ may be related to the N content in the EQ molecule, which may be a potential organic substrate for degradation. A possible hypothesis is that the higher EEA rates found in Achao in response to EQ are due to the community having some adaptation to EQ because of frequent exposure given the presence of salmon farming in the area.

The specific  $\beta$ -GLU activity decreased with the addition of EQ; however, the response was different between sites and fractions. In Achao, the  $F < 1\mu\text{m}$  showed an effect of EQ related to the concentration used, especially after 12 h; EQ1 (lowest concentration) showed an acute initial effect, which decreased over time and finally stimulated the specific  $\beta$ -GLU activity. The higher concentrations had a permanent negative effect, which was proportional to the EQ concentration from 12 h onwards. The  $F_{\text{Total}}$  showed a similar behavior, but without stimulating  $\beta$ -GLU activity towards the end of experiment. The effect was also generally negative in Coliumo, but with lower magnitude. These differences may respond to the different community compositions of the sites. The negative effect of EQ on the specific  $\beta$ -GLU activity coincides with the report of Papadopoulou *et al.* (2016) for soil microbiota, where they found a negative effect of EQ on  $\beta$ -GLU activity, but without a clear temporal pattern. However,  $\beta$ -GLU in aquatic microbial communities can be stimulated by other chemical compounds derived from salmon farming like the pesticide Azamethiphos used in the control of sea lice in salmon farming (Garcés *et al.* (2020). Microbial planktonic communities may even be adapted to the presence of Azamethiphos in zones with a high presence of salmon farming (Garcés *et al.*, 2020).

The specific LIP activity was the most affected by EQ addition, which is expected given the antioxidant nature of the molecule, which is used to avoid lipid oxidation (Bohne *et al.*, 2008). A negative response to the concentration was observed in both sites and fractions (Fig. 7); however, the magnitude of the effect was considerably greater in Achao than in Coliumo. This magnitude difference may also be explained by possible differences in the communities present in the two sites that may differ in their sensitivity to EQ exposure and/or in their capacity to degrade it.

The lowest EQ concentration (EQ1= 10  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) showed a highly variable response in the specific EEA of the enzymes studied (Figs. 5, 6 and 7), which may be related to the lability of ethoxyquin (Bintou, 2015), suggesting that the lowest concentration may be degraded by irradiation and/or hydrolysis (Bintou, 2015; EFSA, 2015). The different responses to the addition of EQ, for example the stimulation of the specific LAP activity for F<1 $\mu\text{m}$  in Achao vs. the decrease of the specific  $\beta$ -GLU and LIP activity, may be related to the impossibility of evaluating the effect of the metabolites or transformation products in this study (Karas *et al.*, 2018). It is now well documented that transformation products or metabolites can occasionally exert higher toxicity on non-target organisms than the parent compound (Pappola *et al.*, 2014; Wu *et al.*, 2014). Papadopoulou *et al.* (2016, 2020) showed that the quinone imine and ethoxy quinoline, oxidation products of EQ, were responsible for the toxicity observed on ammonia-oxidizing microorganisms in soil. On the other hand, several bacteria (Itoh *et al.*, 2014) and fungi (Pandey and Singh, 2004) groups increase their metabolic rates in soil when exposed to chemical compounds such as pesticides.

#### **4.7. Utilization of carbon substrates by microbial community in response to EQ addition.**

We found different responses in Achao and Coliumo Bay in the utilization of carbon substrates by microbial communities exposed to EQ (Fig. 8) suggesting that the communities of each site are different. It has been shown that changes in diversity can impact the emergence of resistance to chemical treatments (Becker and Liess, 2015). There was a decrease in the utilization of carbon substrates (AWCD) when exposed to higher concentrations of ethoxyquin (EQ2:100 and EQ3:1000  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) in Achao but an increase in substrate utilization for EQ1 (10  $\mu\text{g L}^{-1}$ ), while in Coliumo both concentrations used — EQ1 and EQ3 — stimulated substrate use (Fig. 9 and Table 3).

Because there is no previous information about EQ effects on marine microbial communities, in what follows we discuss our results in the context of the effect of other chemical compounds such as pesticides and antibiotics. Mishra and Pandey (1989) and Murage *et al.* (2007) suggested that the toxic effects of pesticides on microorganisms in the environment are influenced by the type of organic matter available, since the addition of carbon sources such

as glucose, acetate and amino acids increases the resistance of some fungal species to pesticide toxicity. Garcés *et al.* (2020) found an increase in the utilization of carboxylic acids and amino acids in treatments with a pesticide (Azamethiphos) in the marine environment, agreeing with our results which found greater utilization of amino acids and carboxylic acids (Achao), and carbohydrates (Coliumo) especially at the beginning of the experiment with the EQ treatments. Carboxylic acids and amino acids are part of the labile pool of organic matter and are important as carbon and nitrogen sources for bacterioplankton (Obernosterer *et al.*, 1999; Pullin *et al.*, 2004). Previous studies using Biolog Ecoplates in soil detected changes in the functional diversity of bacteria and increased use of N-acetyl-D-glucosamine (NAG) with the application of the antibiotic sulfamethoxazole (Liu *et al.* 2012) and the pesticides vinclozolin (fungicide) and  $\lambda$ -cyhalothrin (insecticide) (Lupwayi *et al.*, 2009). This concurs with our results since NAG was one of the five most utilized substrates in the treatment with EQ, and its utilization increased over time (Fig. 9). NAG has been shown to be an important source for bacterial growth in aquatic systems (Riemann and Azam, 2002; Sala and Güde, 2004). NAG is also a major component of structural polymers in bacteria, algae, zooplankton and fungi (Sala *et al.*, 2006), which suggests that NAG use increased because the bacterial community can catabolize it from dead biomass (Lupwayi *et al.*, 2009). In Achao, EQ treatments also increased the use of polymers, specifically glycogen, Tween 80 (24 h) and Tween 40 (6 h). However, this was not observed in Coliumo, where the use of CHO such as cellobiose and NAG was important, which may be increased by the high nutrient concentration, especially phosphorous, in coastal waters (Sala *et al.*, 2006). The presence of complex molecules in the water column from sources such as boat waste and sewage may favor bacteria capable of using polymeric carbon sources (Sala *et al.*, 2006), which may be analogous to the presence of EQ. Although differences were observed in the response of the two sites to EQ and that substrate utilization may sometimes be stimulated (AWCD) by EQ, samples from both sites evidenced a decrease in richness and diversity, suggesting that this antioxidant may limit the capacity of the microbial community to use carbon sources. The lower functional richness in Coliumo exposed to EQ may be because the community in this area has less plasticity of its metabolic pathways to adapt to perturbations.

#### **4.8 Changes in the composition of the active microbial community in response to EQ addition**

Microbial community composition evidenced changes during our experiments associated with EQ addition over time. Higher EQ additions resulted in loss of some active microbial taxa after 6 h of experimental incubation. Alpha, Gammaproteobacteria and Bacteroidia presented a greater contribution to our libraries (up to 80%) and were the classes showing significant differences between treatments and control. These are typically active marine bacteria classes in both study areas (Chilean Patagonia, Molina and Fernández, 2020; surface waters off central Chile, Valdés *et al.*, 2017). In our experiments, we found that Alphaproteobacteria was negatively affected in EQ treatments, whereas Bacteroidia and Gammaproteobacteria were favored. Bacteroidia, which includes the Flavobacteriales order, presented a positive and faster response to the addition of EQ than the other bacteria classes, i.e., incrementing its relative activity at the beginning of the experiment. However, this response was not permanent but changed during the time course of the experiment showing an activity reduction in EQ treatments at 12 h.

Alpha, Gammaproteobacteria and Bacteroidia are known for their ability to take advantage of DOM availability as opportunistic heterotrophic marine microbes, which usually follow algal blooms in the ocean (Teeling *et al.*, 2012). These key heterotrophic bacteria were recently reported to have DOM selective responses to the  $\delta^{13}\text{C}$ -DOM enrichment derived from different phytoplankton sources (Kieft *et al.*, 2021). For instance, Bacteroidia presented higher relative abundance, growth rates and C/N biomass content in response to high molecular weight DOM from diatom lysate, while Alphaproteobacteria to low molecular weight DOM derived from cyanobacteria exudate but with N-rich biomass content (Kieft *et al.*, 2021). Additionally, Bacteroidia was found to respond to copepod excretion products, showing higher specific activity (16S rRNA/rDNA) in treatments with DOM derived from higher size fraction diets (Valdés *et al.*, 2017).

Bacteroidota is one the most abundant phylum in coastal areas, reaching between 10 and 30% of the total relative abundance of the bacterial community (Alonso-Sáez and Gasol, 2007). This group is able to degrade complex organic matter and is specialized in the degradation of biopolymers, such as proteins (Pinhassi *et al.*, 1999; Teeling *et al.*, 2012; Fernández-Gómez *et*

*al.*, 2013). Specifically, ASVs related to the *NS10 marine group* (Cryomorphaceae/ Bacteroidia) and the *NS2b marine group* (Flavobacteriaceae/Bacteroidia) were favored by EQ addition. These clades were reported to be fast responders to the organic matter derived from phytoplankton blooms (Buchan *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2019). The Cryomorphaceae family also plays a relevant role in secondary production of coastal regions (Bowman, 2020). The *NS2b* marine group is a large marine clade which is characterized by a complex suite of specialists adapted to narrower niches, such as different depths and thus different DOM quality (Diez-Vives *et al.*, 2019). It was noted that ASV38, Formosa and *Ulvibacter* (Flavobacteriaceae) were favored under lower EQ concentration (Figs. 11 and S8).

It is important to mention other groups that were predominant and which respond positively to EQ addition like Gammaproteobacteria (*KI89A*, *SAR86* and *SUP05*) and archaea MGII (Thermoplasmata, *Ca. Poseidionales*). Several studies have suggested that enrichment experiments enhance the activity and abundance of low-abundant but frequent microorganisms that have copiotrophic lifestyles, which allow them to rapidly adapt to changes in their environmental conditions and substrate availability outcompeting abundant groups in the field (Nelson and Wear, 2014; Pedler *et al.*, 2014; Logue *et al.*, 2016). For example, *KI89A* was the second most frequent group in having a rapid response in DOM remineralization experiments in the Ocean Station Papa (North Pacific, Stephens *et al.*, 2020) and to  $\text{NH}_4^+$  enriched experiment in North Pacific Subtropical Gyre (Goldberg *et al.*, 2017), probably associated with its elevated protein utilization compared with other groups (Orsi *et al.*, 2016). MGII archaea represent the most abundant planktonic archaeal group in ocean surface waters (Rinke, 2019), with a wide range of ecological niches including photo and chemoheterotrophic lifestyles (Deschamps *et al.*, 2014). Metabolic reconstruction predicts an exclusively heterotrophic lifestyle and ancestral phototrophy (Rinke *et al.*, 2019). A proteolytic lifestyle appears to be common to all genera of MGII archaea as evidenced by a variety of di- and oligo peptidases, and a high number of genes encoding proteins involved in amino acid degradation pathways (Rinke *et al.*, 2019).

In contrast, the potential activity of *Planktomarina*, ASV 150 and *Asciidiaceihabitants* all from the Rhodobacteraceae family (Alphaproteobacteria) was negatively affected by EQ

addition. *Planktomarina* was a predominant genus associated with observed differences between treatments found during our incubation (Fig. 11). It is a photoheterotrophic bacteria belonging to the Roseobacter clade which constitute up to 35% of coastal marine bacterioplankton (Marques *et al.*, 2020) and play an important role in the degradation of organic matter derived from phytoplankton (Selje *et al.*, 2004; Zhou *et al.*, 2018). The decrease in potential activity may be related to EQ's capability to inhibit the specific  $\beta$ -GLU and LIP activity (Figs. 6 a and 7 a).

Active bacteria and archaea shifts in response to EQ addition were consistent with metabolic profiling capabilities such as higher respiration rates (Fig. 4 a), LAP activity rates (Fig. 5 a),  $\text{NH}_4^+$  and  $\text{NO}_3^-$  net accumulation changes (Table 2). As discussed above, heterotrophic taxa opportunistic or specific-DOM fast-responders were evident during the first incubation hours. In a lower proportion but showing high activity in our experiments, chemoautotrophic microbes with different metabolic capabilities were both negatively affected or favored in EQ treatments like the SUP05 clade, especially at 12 h (Figs. 10 and 11). For instance, *Nitrosopumilus* sp., and Nitrospinales, which showed higher activity at lower EQ were negatively affected at higher EQ concentrations. SUP05 clade is associated with sulfide-oxidation, whereas both *Nitrosopumilus* sp. and Nitrospinales, respectively, participate in ammonia and nitrite oxidation, and therefore potentially actively contributed to nutrient recycling during our experiments. These findings are consistent with other microcosm experiments where pesticides have been tested. Widenfalk *et al.* (2008) reported treatment-induced changes in community composition from a freshwater sediment. Muturi *et al.* (2017) showed that five pesticides and their mixtures could reduce microbial diversity and alter aquatic community structure.

Several pesticides have been detected near salmon farms in southern Chile (Tucca *et al.*, 2018; Quiñones *et al.*, 2019). Knowledge of the effects of chemical compounds used in salmon farming on non-target organisms has increased in recent years, and variable responses have been reported. Rain-Franco *et al.* (2018) and Valdés-Castro and Fernández (2021) reported the effects of pesticides on primary production (C and N assimilation) showing high variability associated with the season and sampling site. Garcés *et al.* (2020) analyzed the effects of azamethiphos on

microbial metabolism showing high degradation of pesticides, a stimulation of organic matter remineralization, and high utilization of carbohydrates, amino acids and carboxylic acids.

Although different responses of the microbial communities from Achao and Coliumo were found in the 10 to 1000  $\mu\text{g L}^{-1}$  treatments, it is important to note that the highest concentration of EQ used (i.e. 1000  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) is greater than the environmental concentration reported for aquatic ecosystems (Chau *et al.*, 2015; Xu *et al.*, 2018). However, the use of experimental EQ concentrations higher than those found in aquatic environments can be used to explore what would happen if natural communities were exposed to higher concentrations of EQ, for example during fish feeding processes or accidental dumping of fish feed into the marine environment.

The metabolic response of the microbial community exposed to EQ addition varies depending on the EQ concentration, the original environmental conditions and potential inherent microbial community composition of the study site. In some cases, the effect may be indirect by metabolites or transformation products which are substrates for other microbial groups, or may be superimposed by top-down factors such as predation. Despite of the variability observed associated with the exposure to different EQ treatment concentrations, EQ was found to influence organic matter degradation capability of the microbial community producing changes in the active heterotrophic and chemoautotrophic functional groups. Accordingly, we hypothesize that chronic EQ addition to the marine environment through salmon feed may produce long-term effects in the metabolism and microbial diversity of microbial communities in areas where salmon farming takes place.

## 5. Conclusions

The use of EQ in the feed of farmed salmon in seawater may generate changes in the metabolism of the microbial community, producing effects on the degradation of organic matter.

Our study indicates that the addition of EQ increases both oxygen consumption and the degradation of nitrogenous compounds by the  $<1\mu\text{m}$  size fraction (bacterioplankton), while respiration and the capacity to degrade carbohydrates and lipids of the entire community

(<63µm) decreases, suggesting differential degradation of the organic matter, leaving more nitrogen available in the environment.

The use of the carbon substrate was variable, decreasing in the 100 and 1000 µg L<sup>-1</sup> EQ treatments. This suggests that at high concentrations, EQ may limit the capacity to process different carbon sources, producing a preference for amino acids and carboxylic acids in the first hours of exposure and then over time the use of polymers and carbohydrates. In areas not affected by salmon farming, EQ may stimulate the use of substrates, especially carbohydrates and carboxylic acids.

The composition of the active microbial community evidenced changes with the addition of EQ over time, including loss of diversity. The addition of EQ generated shifts in predominant microbial marine taxa stimulating the activity of microorganisms associated with N compounds like *NS10*, *NS2*, *KI89A* and the archaea *MGII*, and in contrast, negatively impacted key naturally abundant groups such as *Planktomarina* and potentially key functional groups associated with nitrogen regeneration.

#### **Declaration of competing interest**

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

#### **Credit authorship contribution statement**

**Maria Lorena Gonzalez:** Conceptualization, methodology, validation, formal analysis, investigation, resources, data curation, writing-original draft, writing-review and editing, visualization. **Marcelo Fuentes:** methodology, validation, formal analysis, investigation, writing-review and editing. **Verónica Molina:** molecular data analysis; validation, data curation, investigation, writing-review and editing. **Renato Quiñones:** Conceptualization, methodology, resources, investigation, writing-review and editing, funding acquisition, project administration.

## Acknowledgements

This study was funded by the Interdisciplinary Center for Aquaculture Research (INCAR, FONDAP-ANID, Grant N°15110027). We thank Wilfredo Alarcon, Luis Montecinos and Alejandro Avila for their support in field sampling. We acknowledge Jeanette Vera and Makarena Vergara for their help in carrying out the experiments. We also thank Angel Rain for his help in the analysis of molecular data. M.L. González was funded by a National Doctorate Scholarship (ANID-Chile/2014-21140478) and INCAR.

## References

- Aislabie, J., Bej, A. K., Hurst, H., Rothenburger, S., & Atlas, R. M. (1990). Microbial degradation of quinoline and methylquinolines. *Applied and environmental microbiology*, *56*(2), 345-351. doi:doi:10.1128/aem.56.2.345-351.1990.
- Alonso-Sáez, L., & Gasol, J. M. (2007). Seasonal variations in the contributions of different bacterial groups to the uptake of low-molecular-weight compounds in northwestern Mediterranean coastal waters. *Applied and environmental microbiology*, *73*(11), 3528-3535.
- Anderson, M., Gorley, R., & Clarke, K. P. (2008). PRIMER: guide to software and statistical methods. *Primer-e, Plymouth, UK*, 32.
- Avendaño-Herrera, R. (2018). Proper antibiotics use in the Chilean salmon industry: policy and technology bottlenecks. *Aquaculture*, *495*, 803-805.
- Baldrian, P., Kolařík, M., Štursová, M., Kopecký, J., Valášková, V., Větrovský, T., Žižňáková, L., Šnajdr, J., Rídl, J., Vlček, Č. and Voříšková, J. (2012). Active and total microbial communities in forest soil are largely different and highly stratified during decomposition. *The ISME journal*, *6*(2), 248-258.
- Becker, J. M., & Liess, M. (2015). Biotic interactions govern genetic adaptation to toxicants. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, *282*(1806), 20150071.
- Benner, R., & Strom, M. (1993). A critical evaluation of the analytical blank associated with DOC measurements by high-temperature catalytic oxidation. *Marine Chemistry*, *41*(1-3), 153-160.
- Bintou, A. T., Bianco, A., Mailhot, G., & Brigante, M. (2015). A new insight into ethoxyquin fate in surface waters: Stability, direct and indirect photochemical behaviour and the identification of main products. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, *311*, 118-126.
- Błaszczuk, A. (2006). DNA damage induced by ethoxyquin in human peripheral lymphocytes. *Toxicology letters*, *163*(1), 77-83.
- Błaszczuk, A., Augustyniak, A., & Skolimowski, J. (2013). Ethoxyquin: an antioxidant used in animal feed. *International journal of food science*, *2013*.

- Błaszczuk, A., & Skolimowski, J. (2005). Apoptosis and cytotoxicity caused by ethoxyquin and two of its salts. *Cell Mol Biol Lett*, *10*(1), 15-21.
- Bohne, V. J. B., Lundebye, A.-K., & Hamre, K. (2008). Accumulation and depuration of the synthetic antioxidant ethoxyquin in the muscle of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Food and Chemical Toxicology*, *46*(5), 1834-1843.
- Bolyen E, Rideout JR, Dillon MR, Bokulich NA, Abnet CC, Al-Ghalith GA, Alexander H, Alm EJ, Arumugam M, Asnicar F, Bai Y, Bisanz JE, Bittinger K, Brejnrod A, Brislawn CJ, Brown CT, Callahan BJ, Caraballo-Rodríguez AM, Chase J, Cope EK, Da Silva R, Diener C, Dorrestein PC, Douglas GM, Durall DM, Duvallet C, Edwardson CF, Ernst M, Estaki M, Fouquier J, Gauglitz JM, Gibbons SM, Gibson DL, Gonzalez A, Gorlick K, Guo J, Hillmann B, Holmes S, Holste H, Huttenhower C, Huttley GA, Janssen S, Jarmusch AK, Jiang L, Kaehler BD, Kang KB, Keefe CR, Keim P, Kelley ST, Knights D, Koester I, Kosciulek T, Kreps J, Langille MGI, Lee J, Ley R, Liu YX, Loftfield E, Lozupone C, Maher M, Marotz C, Martin BD, McDonald D, McIver LJ, Melnik AV, Metcalf JL, Morgan SC, Morton JT, Naimey AT, Navas-Molina JA, Nothias LF, Orchanian SB, Pearson T, Peoples SL, Petras D, Preuss ML, Priesse E, Rasmussen LB, Rivers A, Robeson MS 2nd, Rosenthal P, Segata N, Shaffer M, Shiffer A, Sinha R, Song SJ, Spear JR, Swafford AD, Thompson LR, Torres PJ, Trinh P, Tripathi A, Turnbaugh PJ, Ul-Hasan S, van der Hoft JJJ, Vargas F, Vázquez-Baeza Y, Vogtmann E, von Hippel M, Walters W, Wan Y, Wang M, Warren J, Weber KC, Williamson CHD, Willis AD, Xu ZZ, Zaneveld JR, Zhang Y, Zhu Q, Knight R, Caporaso JG Asnicar, F. (2018). *QIIME 2: Reproducible, interactive, scalable, and extensible microbiome data science* (2167-9843). Retrieved from
- Bowman J.P. (2014) The Family *Cryomorphaceae*. In: Rosenberg E., DeLong E.F., Lory S., Stackebrandt E., Thompson F. (eds) *The Prokaryotes*. Springer, Berlin, Heidelberg. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-38954-2\\_135](https://doi.org/10.1007/978-3-642-38954-2_135).
- Brockman, F. J., Denovan, B. A., Hicks, R. J., & Fredrickson, J. K. (1989). Isolation and characterization of quinoline-degrading bacteria from subsurface sediments. *Applied and environmental microbiology*, *55*(4), 1029-1032. doi:10.1128/aem.55.4.1029-1032.1989.
- Buchan, A., LeCleir, G. R., Gulvik, C. A., & González, J. M. (2014). Master recyclers: features and functions of bacteria associated with phytoplankton blooms. *Nature Reviews Microbiology*, *12*(10), 686-698.
- Bulleid, N. (1978). An improved method for the extraction of adenosine triphosphate from marine sediment and seawater. *Limnology and Oceanography*, *23*(1), 174-178.
- Burridge, L., Weis, J. S., Cabello, F., Pizarro, J., & Bostick, K. (2010). Chemical use in salmon aquaculture: a review of current practices and possible environmental effects. *Aquaculture*, *306*(1-4), 7-23.
- Buschmann, A. H., Cabello, F., Young, K., Carvajal, J., Varela, D. A., & Henríquez, L. (2009). Salmon aquaculture and coastal ecosystem health in Chile: analysis of regulations, environmental impacts and bioremediation systems. *Ocean & Coastal Management*, *52*(5), 243-249.

- Callahan, B. J., McMurdie, P. J., Rosen, M. J., Han, A. W., Johnson, A. J. A., & Holmes, S. P. (2016). DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature methods*, 13(7), 581-583.
- Caporaso, J. G., Lauber, C. L., Walters, W. A., Berg-Lyons, D., Lozupone, C. A., Turnbaugh, P. J., Fierer, N., Knight, R. (2011). Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. *Proceedings of the national academy of sciences*, 108(Supplement 1), 4516-4522.
- Caruso, G. (2014). Effects of aquaculture activities on microbial assemblages. *Oceanography*, 2(02).
- Chau, H., Kadokami, K., Duong, H., Kong, L., Nguyen, T., Nguyen, T., & Ito, Y. (2018). Occurrence of 1153 organic micropollutants in the aquatic environment of Vietnam. *Environmental Science and Pollution Research*, 25(8), 7147-7156.
- Childress, J., & Somero, G. (1979). Depth-related enzymic activities in muscle, brain and heart of deep-living pelagic marine teleosts. *Marine Biology*, 52(3), 273-283.
- Dalsgaard, T., Canfield, D. E., Petersen, J., Thamdrup, B., & Acuña-González, J. (2003). N<sub>2</sub> production by the anammox reaction in the anoxic water column of Golfo Dulce, Costa Rica. *Nature*, 422(6932), 606-608.
- Deschamps, P., Zivanovic, Y., Moreira, D., Rodriguez-Valera, F., & López-García, P. (2014). Pangenome evidence for extensive interdomain horizontal transfer affecting lineage core and shell genes in uncultured planktonic thaumarchaeota and euryarchaeota. *Genome biology and evolution*, 6(7), 1549-1563.
- Díez-Vives, C., Nielsen, S., Sánchez, P., Palenzuela, O., Ferrera, I., Sebastián, M., Pedrós-Alió C., Gasol J.M., Acinas, S. G. (2019). Delineation of ecologically distinct units of marine Bacteroidetes in the Northwestern Mediterranean Sea. *Molecular Ecology*, 28(11), 2846-2859.
- EFSA Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed. (2015). Safety and efficacy of ethoxyquin (6-ethoxy-1, 2-dihydro-2, 2, 4-trimethylquinoline) for all animal species. *EFSA journal*, 13(11), 4272, 58 pp. doi:10.2903/j.efsa.2015.4272
- Egloff, S., & Pietsch, C. (2018). Ethoxyquin: a feed additive that poses a risk for aquatic life. *Diseases of Aquatic Organisms*, 131(1), 39-48.
- Eisenhauer, N., Klier, M., Partsch, S., Sabais, A. C., Scherber, C., Weisser, W. W., & Scheu, S. (2009). No interactive effects of pesticides and plant diversity on soil microbial biomass and respiration. *Applied Soil Ecology*, 42(1), 31-36.
- EU (2017). Commission Implementing Regulation (EU) 2017/962 of 7 June 2017 suspending the authorisation of ethoxyquin as a feed additive for all animal species and categories (OJ L 145, 8.6.2017, p. 13).
- EU (2021). Commission Implementing Regulation (EU) 2021/412 of 8 March 2021 amending Implementing Regulation (EU) 2017/962 as regards the review of the suspension of the authorisation of ethoxyquin as a feed additive (OJ L 81, 9.3.2021, p. 30–31)
- FAO. (2018). The State of World Fisheries and Aquaculture 2018-Meeting the sustainable development goals. Rome. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
- Fernández-Gomez, B., Richter, M., Schüler, M., Pinhassi, J., Acinas, S. G., González, J. M., & Pedros-Alió, C. (2013). Ecology of marine Bacteroidetes: a comparative genomics approach. *The ISME journal*, 7(5), 1026-1037.

- Fraç, M., Oszust, K., & Lipiec, J. (2012). Community level physiological profiles (CLPP), characterization and microbial activity of soil amended with dairy sewage sludge. *Sensors*, *12*(3), 3253-3268.
- Fuentes, M. E., Quinones, R. A., Gutierrez, M. H., & Pantoja, S. (2015). Effects of temperature and glucose concentration on the growth and respiration of fungal species isolated from a highly productive coastal upwelling ecosystem. *fungal ecology*, *13*, 135-149.
- Galán, A., Faúndez, J., Thamdrup, B., Santibáñez, J. F., & Farías, L. (2014). Temporal dynamics of nitrogen loss in the coastal upwelling ecosystem off central Chile: Evidence of autotrophic denitrification through sulfide oxidation. *Limnology and Oceanography*, *59*(6), 1865-1878.
- Garcés, D. V., Fuentes, M. E., & Quiñones, R. A. (2020). Effect of Azamethiphos on enzymatic activity and metabolic fingerprints of marine microbial communities from the water column. *Aquaculture*, *529*, 735650.
- Gille, J., Pasman, P., Van Berkel, C., & Joenje, H. (1991). Effect of antioxidants on hyperoxia-induced chromosomal breakage in Chinese hamster ovary cells: protection by carnosine. *Mutagenesis*, *6*(4), 313-318.
- Goldberg, S., Nelson, C., Viviani, D., Shulse, C., & Church, M. (2017). Cascading influence of inorganic nitrogen sources on DOM production, composition, lability and microbial community structure in the open ocean. *Environmental microbiology*, *19*(9), 3450-3464.
- González, H. E., Nimptsch, J., Giesecke, R., & Silva, N. (2019). Organic matter distribution, composition and its possible fate in the Chilean North-Patagonian estuarine system. *Science of the Total Environment*, *657*, 1419-1431.
- González, R., & Quiñones, R. (2009). Common catabolic enzyme patterns in a microplankton community of the Humboldt Current System off northern and central-south Chile: Malate dehydrogenase activity as an index of water-column metabolism in an oxygen minimum zone. *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography*, *56*(16), 1095-1104.
- Guckert, J. B., Carr, G. J., Johnson, T. D., Hamm, B. G., Davidson, D. H., & Kumagai, Y. (1996). Community analysis by Biolog: curve integration for statistical analysis of activated sludge microbial habitats. *Journal of microbiological methods*, *27*(2-3), 183-197.
- Gutiérrez, M., Pantoja, S., Tejos, E., & Quiñones, R. (2011). The role of fungi in processing marine organic matter in the upwelling ecosystem off Chile. *Marine Biology*, *158*(1), 205-219.
- Haya, K., Burrige, L., & Chang, B. (2001). Environmental impact of chemical wastes produced by the salmon aquaculture industry. *ICES Journal of Marine Science*, *58*(2), 492-496.
- Hernández, M. E., Reyes, J. L., Gómez-Lojero, C., Sayavedra, M. S., & Meléndez, E. (1993). Inhibition of the renal uptake of p-aminohippurate and tetraethylammonium by the antioxidant ethoxyquin in the rat. *Food and Chemical Toxicology*, *31*(5), 363-367. doi:[https://doi.org/10.1016/0278-6915\(93\)90192-2](https://doi.org/10.1016/0278-6915(93)90192-2).
- Holm-Hansen, O., Lorenzen, C. J., Holmes, R. W., & Strickland, J. D. (1965). Fluorometric determination of chlorophyll. *ICES Journal of Marine Science*, *30*(1), 3-15.
- Holm-Hansen, O., & Booth, C. R. (1966). The measurement of adenosine triphosphate in the ocean and its ecological significance 1. *Limnology and Oceanography*, *11*(4), 510-519.

- Holmes, R. M., Aminot, A., K erouel, R., Hooker, B. A., & Peterson, B. J. (1999). A simple and precise method for measuring ammonium in marine and freshwater ecosystems. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 56(10), 1801-1808.
- Hoppe, H.-G. (1983). Significance of exoenzymatic activities in the ecology of brackish water: measurements by means of methylumbelliferyl-substrates. *Marine ecology progress series*, 299-308.
- Iriarte, J., Gonz alez, H., Liu, K., Rivas, C., & Valenzuela, C. (2007). Spatial and temporal variability of chlorophyll and primary productivity in surface waters of southern Chile (41.5–43 S). *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 74(3), 471-480.
- Itoh, H., Navarro, R., Takeshita, K., Tago, K., Hayatsu, M., Hori, T., & Kikuchi, Y. (2014). Bacterial population succession and adaptation affected by insecticide application and soil spraying history. *Frontiers in microbiology*, 5, 457.
- Iturriaga, R., & Zsolnay, A. (1981). Transformation of some dissolved organic compounds by a natural heterotrophic population. *Marine Biology*, 62(2), 125-129.
- Jacob, B. G., Tapia, F. J., Daneri, G., Iriarte, J. L., Montero, P., Sobarzo, M., & Qui ones, R. A. (2014). Springtime size-fractionated primary production across hydrographic and PAR-light gradients in Chilean Patagonia (41–50 S). *Progress in Oceanography*, 129, 75-84.
- Jail, M., Urkude, R., Deshmukh, L., 2014. (2014). Studies on the impact of pesticides on soil microbial respiration. *Int. J. Plant Anim. Environ. Sci.*, 5(1), 43-49.
- Joner, P. E. (1977). Butylhydroxyanisol (BHA), butylhydroxytoluene (BHT) and ethoxyquin (EMQ) tested for mutagenicity. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 18(2), 187-193.
- Jones, W. J., & Ananyeva, N. D. (2001). Correlations between pesticide transformation rate and microbial respiration activity in soil of different ecosystems. *Biology and Fertility of Soils*, 33(6), 477-483.
- Kaiser, J. P., Feng, Y., & Bollag, J. M. (1996). Microbial metabolism of pyridine, quinoline, acridine, and their derivatives under aerobic and anaerobic conditions. *Microbiol Rev*, 60(3), 483-498. doi:10.1128/mr.60.3.483-498.1996.
- Karas, P., Baguelin, C., Pertile, G., Papadopoulou, E., Nikolaki, S., Storck, V., Ferrari, F., Trevisan, M., Ferrarini, A., Fornasier, F., Vasileiadis, S., Tsiamis, G., Martin-Laurent, F., Karpouzias, D. G. (2018). Assessment of the impact of three pesticides on microbial dynamics and functions in a lab-to-field experimental approach. *Science of the Total Environment*, 637, 636-646.
- Karl, D. M. (1993). Total microbial biomass estimation derived from the measurement of particulate adenosine-5'-triphosphate. *Handbook of methods in aquatic microbial ecology*, 359-368.
- Kawasaki, N., & Benner, R. (2006). Bacterial release of dissolved organic matter during cell growth and decline: molecular origin and composition. *Limnology and Oceanography*, 51(5), 2170-2180.
- Kieft, B., Li, Z., Bryson, S., Hettich, R. L., Pan, C., Mayali, X., & Mueller, R. S. (2021). Phytoplankton exudates and lysates support distinct microbial consortia with specialized metabolic and ecophysiological traits. *Proceedings of the national academy of sciences*, 118(41).

- Liu, F., Wu, J., Ying, G.-G., Luo, Z., & Feng, H. (2012). Changes in functional diversity of soil microbial community with addition of antibiotics sulfamethoxazole and chlortetracycline. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 95(6), 1615-1623.
- Liu, Y., Debeljak, P., Rembauville, M., Blain, S., & Obernosterer, I. (2019). Diatoms shape the biogeography of heterotrophic prokaryotes in early spring in the Southern Ocean. *Environmental microbiology*, 21(4), 1452-1465.
- Logue, J. B., Stedmon, C. A., Kellerman, A. M., Nielsen, N. J., Andersson, A. F., Laudon, H., Lindstrom E.S. & Kritzberg, E. S. (2016). Experimental insights into the importance of aquatic bacterial community composition to the degradation of dissolved organic matter. *The ISME journal*, 10(3), 533-545.
- Lundebye, A.-K., Hove, H., Måge, A., Bohne, V., & Hamre, K. (2010). Levels of synthetic antioxidants (ethoxyquin, butylated hydroxytoluene and butylated hydroxyanisole) in fish feed and commercially farmed fish. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 27(12), 1652-1657.
- Lupwayi, N. Z., Harker, K. N., Dossdall, L. M., Turkington, T. K., Blackshaw, R. E., O'Donovan, J. T., Cárcamo H. A., Otani, J.K., Clayton, G. W. (2009). Changes in functional structure of soil bacterial communities due to fungicide and insecticide applications in canola. *Agriculture, ecosystems & environment*, 130(3-4), 109-114.
- Marie, D., Partensky, F., Vaulot, D., & Brussaard, C. (1999). Enumeration of phytoplankton, bacteria, and viruses in marine samples. *Current protocols in cytometry*, 10(1), 11.11. 11-11.11. 15.
- Marques, M., Borges, N., Silva, S. G., da Rocha, U. N., Lago-Lestón, A., Keller-Costa, T., & Costa, R. (2020). Metagenome-Assembled Genome Sequences of Three Uncultured Planktomarina sp. Strains from the Northeast Atlantic Ocean. *Microbiology Resource Announcements*, 9(12), e00127-20.
- Martínez, V., Lara, C., Silva, N., Gudiño, V., & Montecino, V. (2015). Variability of environmental heterogeneity in northern Patagonia, Chile: effects on the spatial distribution, size structure and abundance of chlorophyll-a. *Revista de biología marina y oceanografía*, 50(1), 39-52.
- Mishra, A., & Pandey, A. (1989). Toxicity of three herbicides to some nitrogen-fixing cyanobacteria. *Ecotoxicology and environmental safety*, 17(2), 236-246.
- Molina, V., & Fernández, C. (2020). Bacterioplankton response to nitrogen and dissolved organic matter produced from salmon mucus. *MicrobiologyOpen*, 9(12), e1132.
- Montero, P., Daneri, G., Cuevas, L. A., González, H. E., Jacob, B., Lizárraga, L., & Menschel, E. (2007). Productivity cycles in the coastal upwelling area off Concepción: the importance of diatoms and bacterioplankton in the organic carbon flux. *Progress in Oceanography*, 75(3), 518-530.
- Morales, C. E., & Anabalón, V. (2012). Phytoplankton biomass and microbial abundances during the spring upwelling season in the coastal area off Concepción, central-southern Chile: Variability around a time series station. *Progress in Oceanography*, 92, 81-91.
- Murage, E. W., Voroney, P. R., Kay, B. D., Deen, B., & Beyaert, R. P. (2007). Dynamics and turnover of soil organic matter as affected by tillage. *Soil Science Society of America Journal*, 71(4), 1363-1370.

- Muturi, E. J., Donthu, R. K., Fields, C. J., Moise, I. K., & Kim, C. H. (2017). Effect of pesticides on microbial communities in container aquatic habitats. *Scientific reports*, 7(1), 1-10.
- Narváez, D. A., Vargas, C. A., Cuevas, L. A., García-Loyola, S. A., Lara, C., Segura, C., Tapia F. J., Broitman, B. R. (2019). Dominant scales of subtidal variability in coastal hydrography of the Northern Chilean Patagonia. *Journal of Marine Systems*, 193, 59-73.
- Nelson, C. E., & Wear, E. K. (2014). Microbial diversity and the lability of dissolved organic carbon. *Proceedings of the national academy of sciences*, 111(20), 7166-7167.
- Obayashi, Y., & Suzuki, S. (2005). Proteolytic enzymes in coastal surface seawater: significant activity of endopeptidases and exopeptidases. *Limnology and oceanography*, 50(2), 722-726
- Obernosterer, I., Kraay, G., de Ranitz, E., & Herndl, G. J. (1999). Concentrations of low molecular weight carboxylic acids and carbonyl compounds in the Aegean Sea (Eastern Mediterranean) and the turnover of pyruvate. *Aquatic Microbial Ecology*, 20(2), 147-156.
- Orsi, W. D., Smith, J. M., Liu, S., Liu, Z., Sakamoto, C. M., Wilken, S., Poirier, C., Richards, T.A., Keeling, P. J., Worden, A. Z. & Santoro, A. E. (2016). Diverse, uncultivated bacteria and archaea underlying the cycling of dissolved protein in the ocean. *The ISME journal*, 10(9), 2158-2173
- Ogawa, H., Amagai, Y., Koike, I., Kaiser, K., & Benner, R. (2001). Production of refractory dissolved organic matter by bacteria. *Science*, 292(5518), 917-920.
- Pampulha, M., & Oliveira, A. (2006). Impact of an herbicide combination of bromoxynil and prosulfuron on soil microorganisms. *Current Microbiology*, 53(3), 238-243.
- Pandey, S., & Singh, D. K. (2004). Total bacterial and fungal population after chlorpyrifos and quinalphos treatments in groundnut (*Arachis hypogaea* L.) soil. *Chemosphere*, 55(2), 197-205.
- Pantoja, S., Gutiérrez, M., Ampuero, P., & Tejos, E. (2011). Degradation capability of the coastal environment adjacent to the Itata River in central Chile (36.5 S). *Biogeosciences*, 8(8), 2063-2074.
- Pantoja, S., Iriarte, J. L., & Daneri, G. (2011). Oceanography of the Chilean Patagonia. *Continental shelf research*, 31(3-4), 149-153.
- Pantoja, S., & Lee, C. (1994). Cell-surface oxidation of amino acids in seawater. *Limnology and Oceanography*, 39(7), 1718-1726.
- Papadopoulou, E. S., Bachtsevani, E., Lampronikou, E., Adamou, E., Katsaouni, A., Vasileiadis, S., Thion, C., Menkissoglu-Spiroudi, U., Nicol, G. W., Karpouzas, D. G. (2020). Comparison of Novel and Established Nitrification Inhibitors Relevant to Agriculture on Soil Ammonia- and Nitrite-Oxidizing Isolates. *Front Microbiol*, 11, 581283. doi:10.3389/fmicb.2020.581283.
- Papadopoulou, E. S., Tsachidou, B., Sułowicz, S., Menkissoglu-Spiroudi, U., & Karpouzas, D. G. (2016). Land spreading of wastewaters from the fruit-packaging industry and potential effects on soil microbes: effects of the antioxidant ethoxyquin and its metabolites on ammonia oxidizers. *Applied and environmental microbiology*, 82(2), 747-755.
- Pappolla, A. R., Ferrarini, A., Pertile, G., Puglisi, E., Suci, N., Lamastra, L., Vasileiadis, S., Karpouzas, D., Trevisan, M. (2014). Assessing the soil microbial toxicity of iprodione

- using advanced biochemical and molecular tools: Put the blame on the metabolite 3, 5 dichloroaniline. Paper presented at the 13th IUPAC International Congress of Pesticide Chemistry Crop, Environment, and Public Health Protection Technologies for a Changing World.
- Pedler, B. E., Aluwihare, L. I., & Azam, F. (2014). Single bacterial strain capable of significant contribution to carbon cycling in the surface ocean. *Proceedings of the national academy of sciences*, *111*(20), 7202-7207.
- Pinhassi, J., Azam, F., Hemphälä, J., Long, R. A., Martinez, J., Zweifel, U. L., & Hagström, Å. (1999). Coupling between bacterioplankton species composition, population dynamics, and organic matter degradation. *Aquatic Microbial Ecology*, *17*(1), 13-26.
- Pradhan, A., Bereketoglu, C., Martin, L., Duhagon, J., & Olsson, P.-E. (2020). The food preservative ethoxyquin impairs zebrafish development, behavior and alters gene expression profile. *Food and Chemical Toxicology*, *135*, 110926.
- Pullin, M. J., Bertilsson, S., Goldstone, J. V., & Voelker, B. M. (2004). Effects of sunlight and hydroxyl radical on dissolved organic matter: Bacterial growth efficiency and production of carboxylic acids and other substrates. *Limnology and Oceanography*, *49*(6), 2011-2022.
- Quiñones, R. A., Fuentes, M., Montes, R. M., Soto, D., & León-Muñoz, J. (2019). Environmental issues in Chilean salmon farming: a review. *Reviews in Aquaculture*, *11*(2), 375-402.
- Quiñones, R., Gutiérrez, M., Daneri, G., Gutiérrez, D., González, H., & Chávez, F. (2010). Pelagic carbon fluxes in the Humboldt Current System Pag 44–64. *Carbon and nutrient fluxes in global continental margins: A global synthesis*. Liu KK, Atkinson L, Quiñones RA, Talaue-McManus L (eds.), *IGBP Series Book*, Springer-Verlag, New York.
- Quiñones, R. A., González, R. R., Levipan, H., Jessen, G., & Gutiérrez, M. H. (2006). Living in the oxygen minimum zone: A metabolic perspective. *Gayana*, *70*(SUPPL. 1), 68-72.
- Rain-Franco, A., Rojas, C., & Fernandez, C. (2018). Potential effect of pesticides currently used in salmon farming on photo and chemoautotrophic carbon uptake in central–southern Chile. *Aquaculture*, *486*, 271-284.
- Rain-Franco, A., Sobarzo, M., Caparros, J., & Fernandez, C. (2019). Variability of chromophoric dissolved organic matter in three freshwater-influenced systems along central-southern Chile. *Progress in Oceanography*, *174*, 154-161.
- Rannug, A., Rannug, U., & Ramel, C. (1984). Genotoxic effects of additives in synthetic elastomers with special consideration to the mechanism of action of thiurams and dithiocarbamates. *Progress in clinical and biological research*, *141*, 407-419.
- Reddy, B., Hanson, D., Mathews, L., & Sharma, C. (1983). Effect of micronutrients, antioxidants and related compounds on the mutagenicity of 3, 2'-dimethyl-4-aminobiphenyl, a colon and breast carcinogen. *Food and Chemical Toxicology*, *21*(2), 129-132.
- Reyes, J., Hernández, M. E., Meléndez, E., & Gómez-Lojero, C. (1995). Inhibitory effect of the antioxidant ethoxyquin on electron transport in the mitochondrial respiratory chain. *Biochemical pharmacology*, *49*(3), 283-289.

- Riemann, L., & Azam, F. (2002). Widespread N-acetyl-D-glucosamine uptake among pelagic marine bacteria and its ecological implications. *Applied and environmental microbiology*, 68(11), 5554-5562.
- Rinke, C., Rubino, F., Messer, L. F., Youssef, N., Parks, D. H., Chuvochina, M., ... & Hugenholtz, P. (2019). A phylogenomic and ecological analysis of the globally abundant Marine Group II archaea (Ca. Poseidoniales ord. nov.). *The ISME journal*, 13(3), 663-675.
- Rognes, T., Flouri, T., Nichols, B., Quince, C., & Mahé, F. (2016). VSEARCH: a versatile open source tool for metagenomics. *PeerJ*, 4, e2584.
- Rohr, J. R., Kerby, J. L., & Sih, A. (2006). Community ecology as a framework for predicting contaminant effects. *Trends in Ecology & Evolution*, 21(11), 606-613.
- SAG (2015). Resolución 1992 exenta. Nomina de aditivos autorizados para la elaboración y fabricación de alimentos y suplementos para animales. Normativa Servicio Agrícola y Ganadero, Ministerio de Agricultura, Chile. <https://normativa.sag.gob.cl/Publico/Normas/DetalleNorma.aspx?id=249643>
- Sala, M. M., Estrada, M., & Gasol, J. M. (2006). Seasonal changes in the functional diversity of bacterioplankton in contrasting coastal environments of the NW Mediterranean. *Aquatic Microbial Ecology*, 44(1), 1-9.
- Sala, M. M., & Güde, H. (2004). Ectoenzymatic activities and heterotrophic bacteria decomposing detritus. *Archiv für Hydrobiologie*, 160(3), 289-304.
- Selje, N., Simon, M., & Brinkhoff, T. (2004). A newly discovered Roseobacter cluster in temperate and polar oceans. *Nature*, 427(6973), 445-448
- Schiedek, D. (1997). *Marenzelleria* cf. *viridis* (Polychaeta: Spionidae)—ecophysiological adaptations to a life in the coastal waters of the Baltic Sea. *Aquatic Ecology*, 31(2), 199-210.
- Schneider, W., Donoso, D., Garcés-Vargas, J., & Escribano, R. (2017). Water-column cooling and sea surface salinity increase in the upwelling region off central-south Chile driven by a poleward displacement of the South Pacific High. *Progress in Oceanography*, 151, 38-48.
- Shah, A. G., Pierson, J. A., & Pavlostathis, S. G. (2005). Fate and effect of the antioxidant ethoxyquin on a mixed methanogenic culture. *Water research*, 39(17), 4251-4263.
- Silva, N., & Palma, S. (2008). 1.1 The CIMAR Program in the austral Chilean channels and fjords. *Progress in the oceanographic knowledge of Chilean interior waters, from Puerto Montt to Cape Horn. Comité Oceanográfico Nacional-Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, Valparaíso, Chile*, 11-15.
- Soto, D., & Norambuena, F. (2004). Evaluation of salmon farming effects on marine systems in the inner seas of southern Chile: a large-scale mensurative experiment. *Journal of Applied Ichthyology*, 20(6), 493-501.
- Stephens, B. M., Opalk, K., Petras, D., Liu, S., Comstock, J., Aluwihare, L. I., Hansell D.A., & Carlson, C. A. (2020). Organic matter composition at ocean station papa affects its bioavailability, bacterioplankton growth efficiency and the responding taxa. *Frontiers in Marine Science*, 1077.
- Teeling, H., Fuchs, B. M., Becher, D., Klockow, C., Gardebrecht, A., Bennis, C. M., Kassabgy M., Huang, S., Mann, A.J., Waldmann, J. (2012). Substrate-controlled succession of

- marine bacterioplankton populations induced by a phytoplankton bloom. *Science*, 336(6081), 608-611.
- Thompson, A. W., & van den Engh, G. (2016). A multi-laser flow cytometry method to measure single cell and population-level relative fluorescence action spectra for the targeted study and isolation of phytoplankton in complex assemblages. *Limnology and Oceanography: Methods*, 14(1), 39-49.
- Tu, C. (1970). Effect of four organophosphorus insecticides on microbial activities in soil. *Applied microbiology*, 19(3), 479-484.
- Tucca, F., Moya, H., Pozo, K., Borghini, F., Focardi, S., & Barra, R. (2017). Occurrence of antiparasitic pesticides in sediments near salmon farms in the northern Chilean Patagonia. *Marine pollution bulletin*, 115(1-2), 465-468.
- Urbina, M., Cumillaf, J., Paschke, K., & Gebauer, P. (2019). Effects of pharmaceuticals used to treat salmon lice on non-target species: Evidence from a systematic review. *Science of the Total Environment*, 649, 1124-1136.
- Valdés-Castro, V., & Fernandez, C. (2021). Effect of three pesticides used in salmon farming on ammonium uptake in central-southern and northern Patagonia, Chile. *Frontiers in Marine Science*, 7, 1257.
- Valdés, V. P., Fernandez, C., Molina, V., Escribano, R., & Joux, F. (2017). Dissolved compounds excreted by copepods reshape the active marine bacterioplankton community composition. *Frontiers in Marine Science*, 4, 343.
- Vargas, C. A., Arriagada, L., Sobarzo, M., & Contreras, P. Y. (2013). Bacterial production along a river-to-ocean continuum in central Chile: implications for organic matter cycling. *Aquatic Microbial Ecology*, 68(3), 195-213.
- Vetter, R., Lynn, E., Garza, M., & Costa, A. (1994). Depth zonation and metabolic adaptation in Dover sole, *Microstomus pacificus*, and other deep-living flatfishes: factors that affect the sole. *Marine Biology*, 120(1), 145-159.
- Widenfalk, A., Bertilsson, S., Sundh, I., & Goedkoop, W. (2008). Effects of pesticides on community composition and activity of sediment microbes—responses at various levels of microbial community organization. *Environmental Pollution*, 152(3), 576-584.
- Wu, X., Yin, Y., Wang, S., & Yu, Y. (2014). Accumulation of chlorothalonil and its metabolite, 4-hydroxychlorothalonil, in soil after repeated applications and its effects on soil microbial activities under greenhouse conditions. *Environmental Science and Pollution Research*, 21(5), 3452-3459.
- Xu, C., Chen, L., You, L., Xu, Z., Ren, L.-F., Gin, K. Y.-H., He, Y., Kai, W. (2018). Occurrence, impact variables and potential risk of PPCPs and pesticides in a drinking water reservoir and related drinking water treatment plants in the Yangtze Estuary. *Environmental Science: Processes & Impacts*, 20(7), 1030-1045.
- Yamada, N., & Suzumura, M. (2010). Effects of seawater acidification on hydrolytic enzyme activities. *Journal of Oceanography*, 66(2), 233-241.
- Zeiger, E. (1993). Mutagenicity of chemicals added to foods. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 290(1), 53-61.
- Zhou, Y., Liu, W., & Ye, H. (2006). Effects of pesticides metolachlor and S-metolachlor on soil microorganisms in aquisols. II. Soil respiration. *Ying Yong Sheng tai xue bao= The Journal of Applied Ecology*, 17(7), 1305-1309.

Zhou, J., Richlen, M. L., Sehein, T. R., Kulis, D. M., Anderson, D. M., & Cai, Z. (2018). Microbial community structure and associations during a marine dinoflagellate bloom. *Frontiers in microbiology*, 9, 1201

### Figure captions

Fig. 1 Location of the sampling sites. (a) Achao located in the inner sea of Chiloe Island, Southern Chile (42.52°S 73.20°W). The control sampling station was located at 6 km from the closest salmon farm. (b) Coliumo Bay in central-southern (36. 5°S 72.944°W), a bay without salmon farming.

Fig. 2 Temperature and salinity profiles of both sampling sites: (a) Achao: maximum depth 100m, sampling conducted in January 2019; (b) Coliumo Bay: maximum depth 30m, sampling conducted in November 2018. Segmented lines indicate collecting depth (10m) for the microcosm experiments.

Fig. 3 Specific MDH activity (pmol NADH pg ATP<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup>) in (a and b) Achao, and (c and d) Coliumo Bay. Left and right panels correspond to F<1µm and FTotal respectively. The response of the microbial community to EQ exposure is expressed as change in relation to the control at each time. The symbol \* Indicates significant differences (p<0.05 Tukey's test) between Control and Treatments (EQ) at each sampling time.

Fig. 4 Specific Respiration rates (pmol O<sub>2</sub> pg ATP<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>) in (a and b) Achao and (c and d) Coliumo Bay. Left and right panels correspond to F<1µm and FTotal, respectively. The response of the microbial community is expressed as change in relation to the control at each time. The symbol \* indicates significant differences (p<0.05 Tukey's test) between Control and Treatments (EQ) at each sampling time.

Fig. 5 Specific Extracellular Enzyme Activity (EEA; pmol pg ATP<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup>) of Leucine aminopeptidase (LAP) in Achao (a and b) and Coliumo Bay (c and d). Left and right panels correspond to F<1µm and FTotal, respectively. The response of microbial community is expressed as change in relation to the control at each time. The arrow indicates LAP activity not detected. The symbol \* indicates significant differences (p<0.05 Tukey's test) between Control and Treatments (EQ) at each sampling time.

Fig. 6 Specific Extracellular Enzyme Activity (EEA; pmol pg ATP<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>) of β-glucosidase in Achao(a and b) and Coliumo Bay (c and d). Left and right panels correspond to F<1µm and FTotal respectively. The response of microbial community is expressed as change in relation to the control for each time. The symbol \* indicates significant differences (p<0.05 Tukey's test) between Control and Treatments (EQ) at each sampling time

Fig. 7 Specific Extracellular Enzyme Activity (EEA ; pmol pg ATP<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>) of Lipase in Achao (a and b) and Coliumo Bay (c and d). Left and right panels correspond to F<1µm and FTotal respectively. The response of microbial community is expressed as change in relation to the control for each time. The symbol \* indicates significant differences (p<0.05 Tukey's test) between Control and Treatments (EQ) at each sampling time.

Fig. 8 Hierarchical cluster analysis of the mean utilization for each substrate, treatment and study site. C: control (without EQ). EQ1: ethoxyquin 10  $\mu\text{g L}^{-1}$ . EQ2: ethoxyquin 100  $\mu\text{g L}^{-1}$ . EQ3: ethoxyquin 1000  $\mu\text{g L}^{-1}$ ; Col: Coliumo

Fig. 9 Heat map representing the relative utilization (UR) of substrates with respect to the total of each plate (%). The substrates indicated with \* correspond to the 5 preferred substrates, which accumulate between 30 and 50% of the relative utilization.

Fig.10 Contribution of active bacterioplankton (bacteria and archaea) in each treatment at Class level over time.

Fig.11 Comparison of ASVs showing >1.5% contribution based on SIMPER analyses in the different treatments and control.

### Tables titles

Table 1. Initial chemical and biological conditions at the sampling sites Achao and Coliumo. Chl-a: Chlorophyll-a, Syn: Synechococcus, Peuk: Picoeukaryotes

Table 2. Nutrients concentrations ( $\mu\text{M}$ ) for each treatment, incubation time and experiment. Bold values indicate significant differences compared to the control.

Table 3. Metabolic profiles of microbial communities using Biolog-Ecoplate™. Average well color development (AWCD), Substrate Shannon Index ( $H'$ ) and Substrate Richness ( $R'$ ) for each treatment during the microcosms incubation. Substrate utilization using Biolog-Ecoplate was measured in four times (0, 6, 12 and 24h) in Achao and two times (0 and 6h) in Coliumo. Bold numbers indicate significant differences compared to the control for each time.

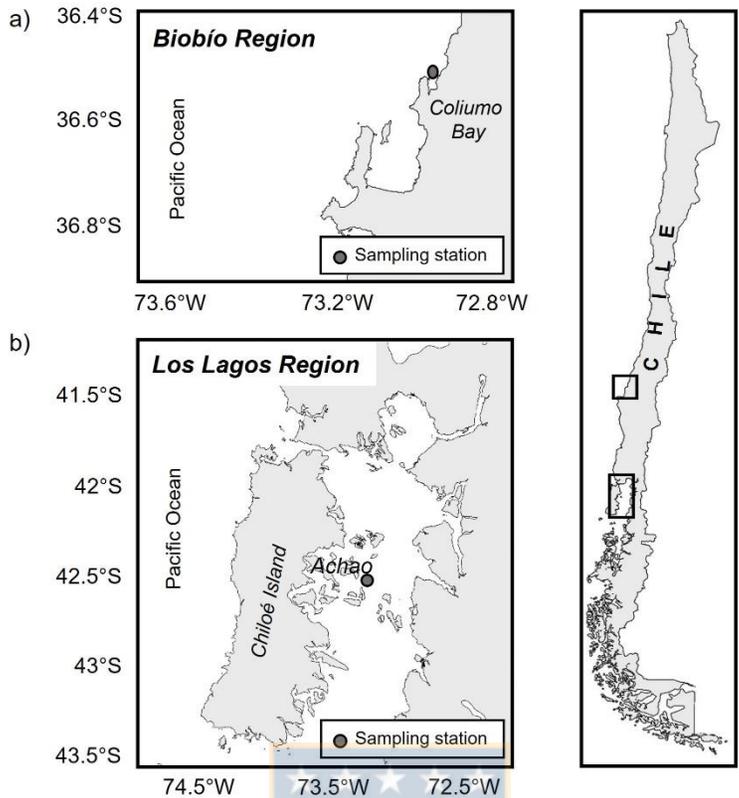


Fig. 1

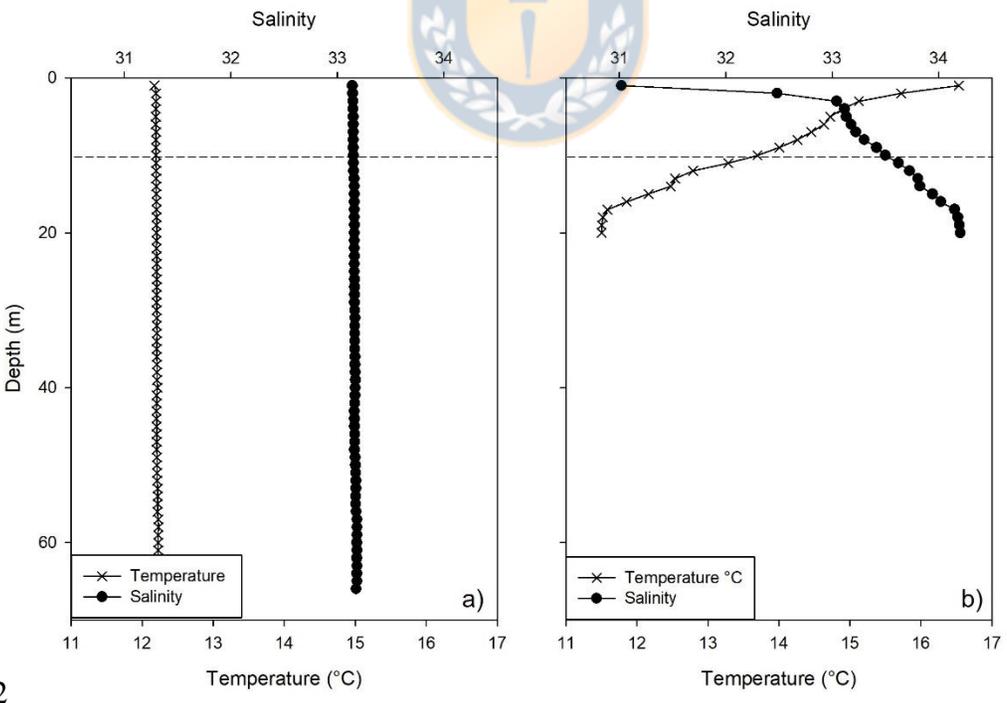


Fig.2

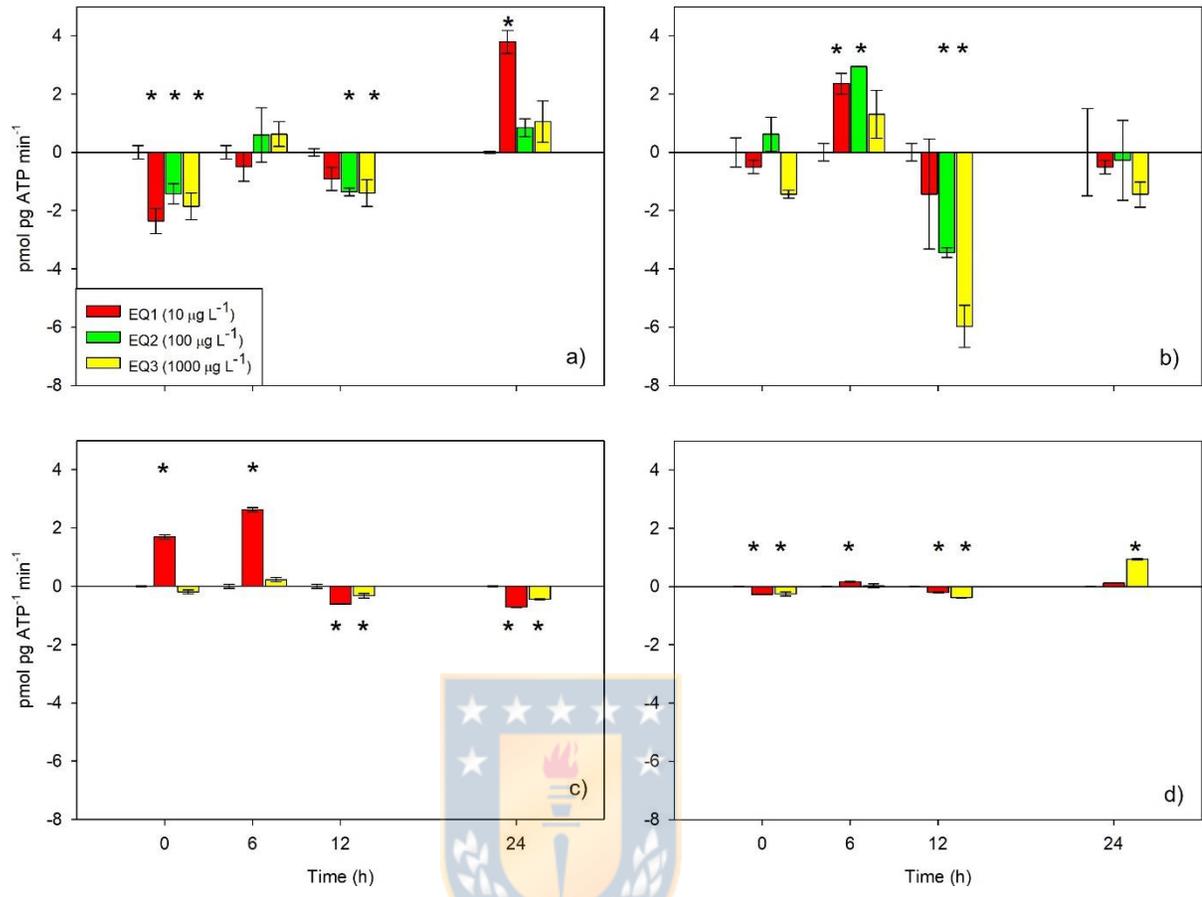


Fig. 3

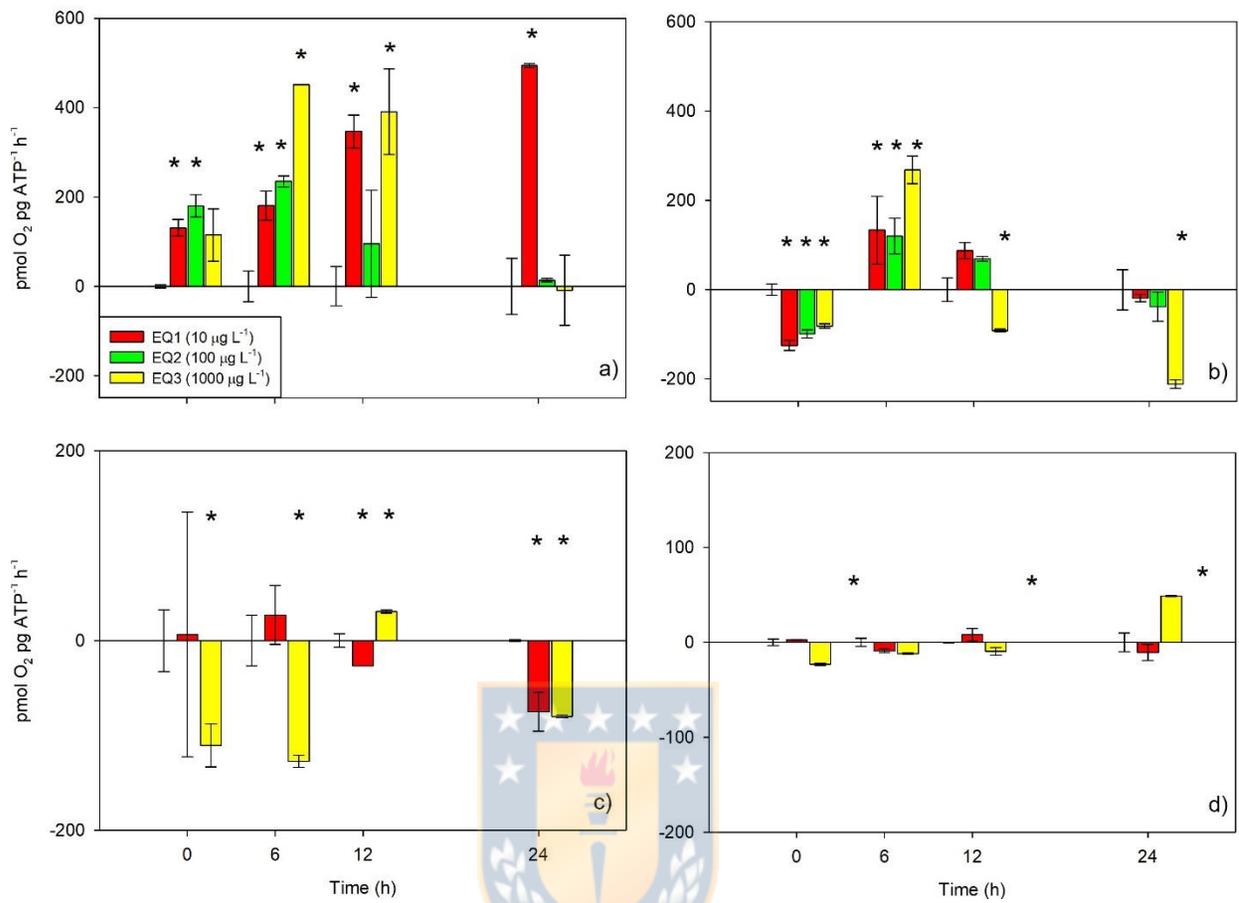


Fig. 4

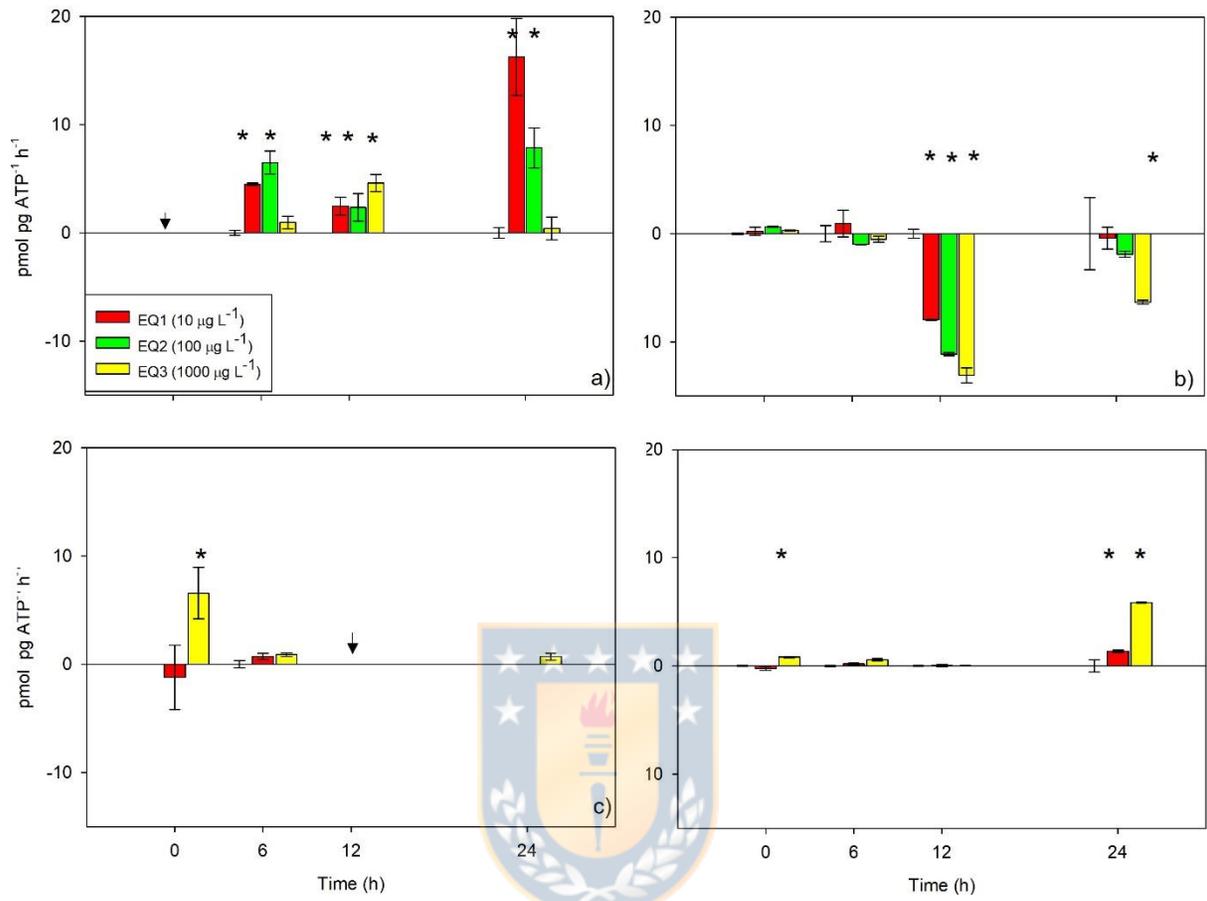


Fig. 5

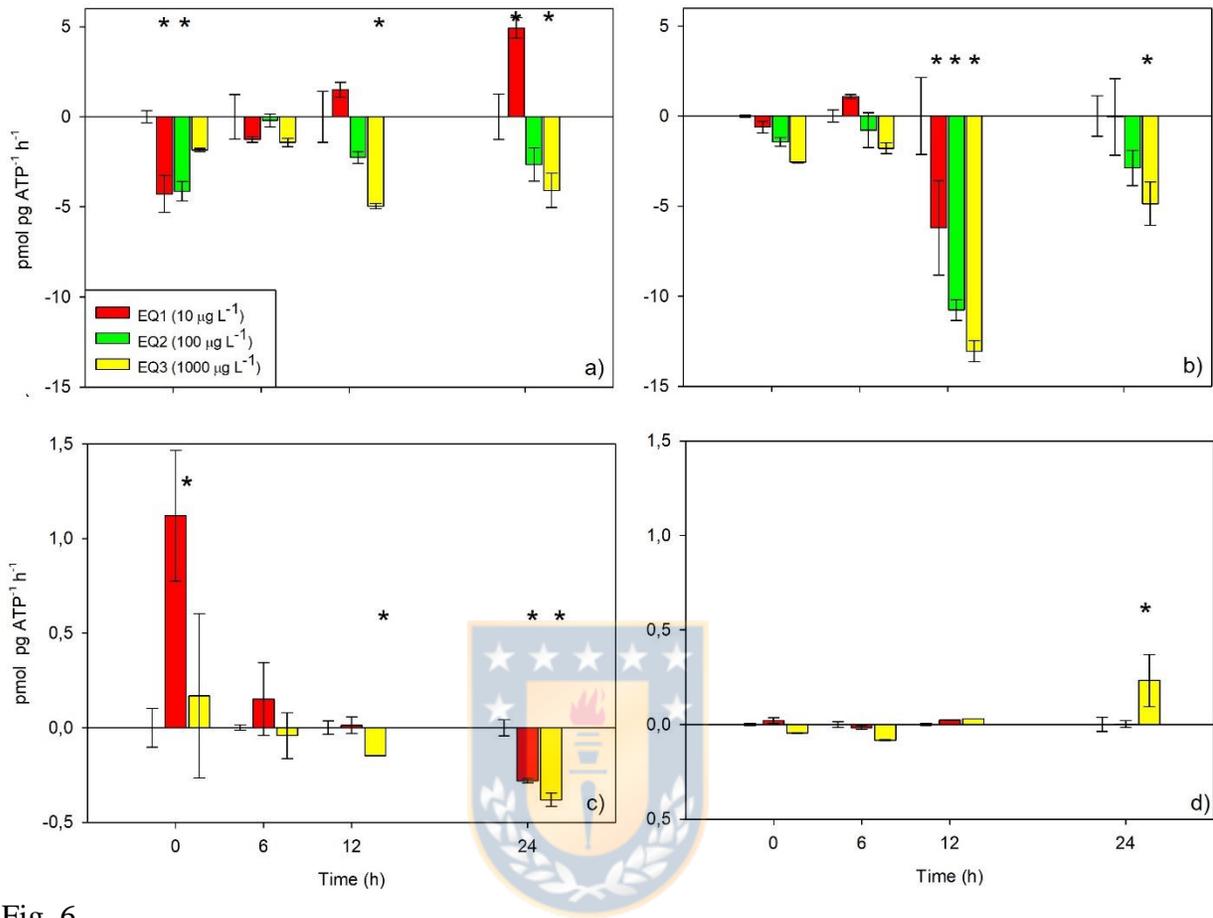


Fig. 6

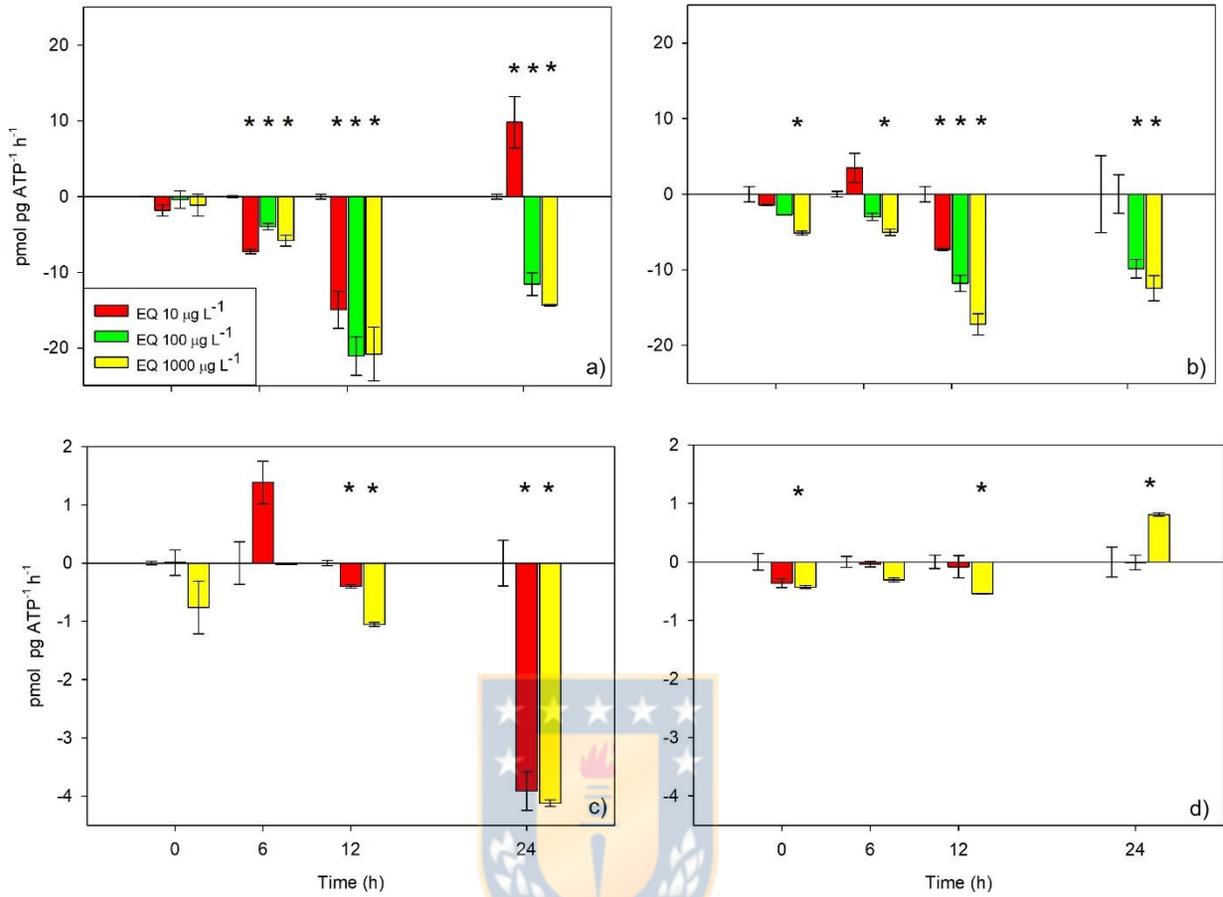
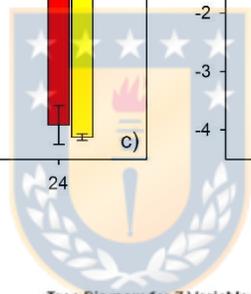


Fig. 7



Tree Diagram for 7 Variables  
Single Linkage  
Euclidean Distance

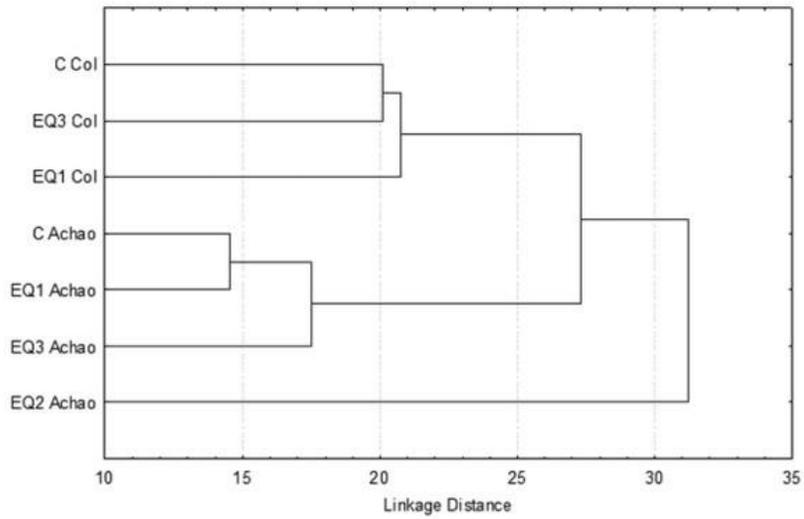


Fig. 8



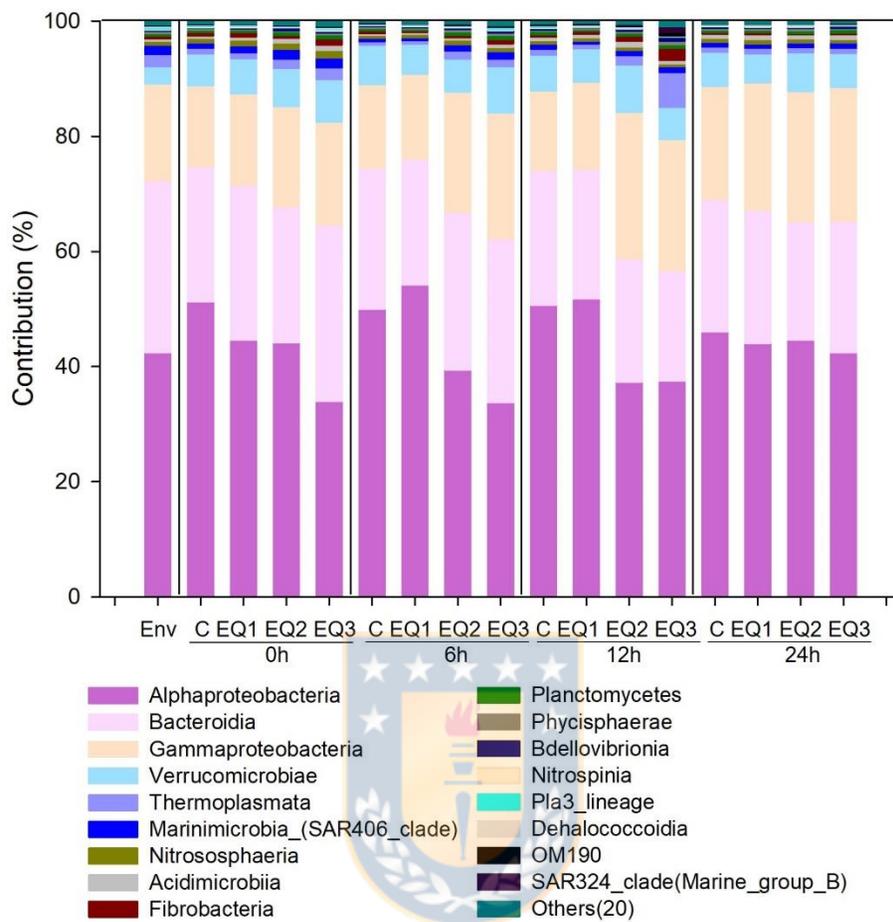


Fig. 10

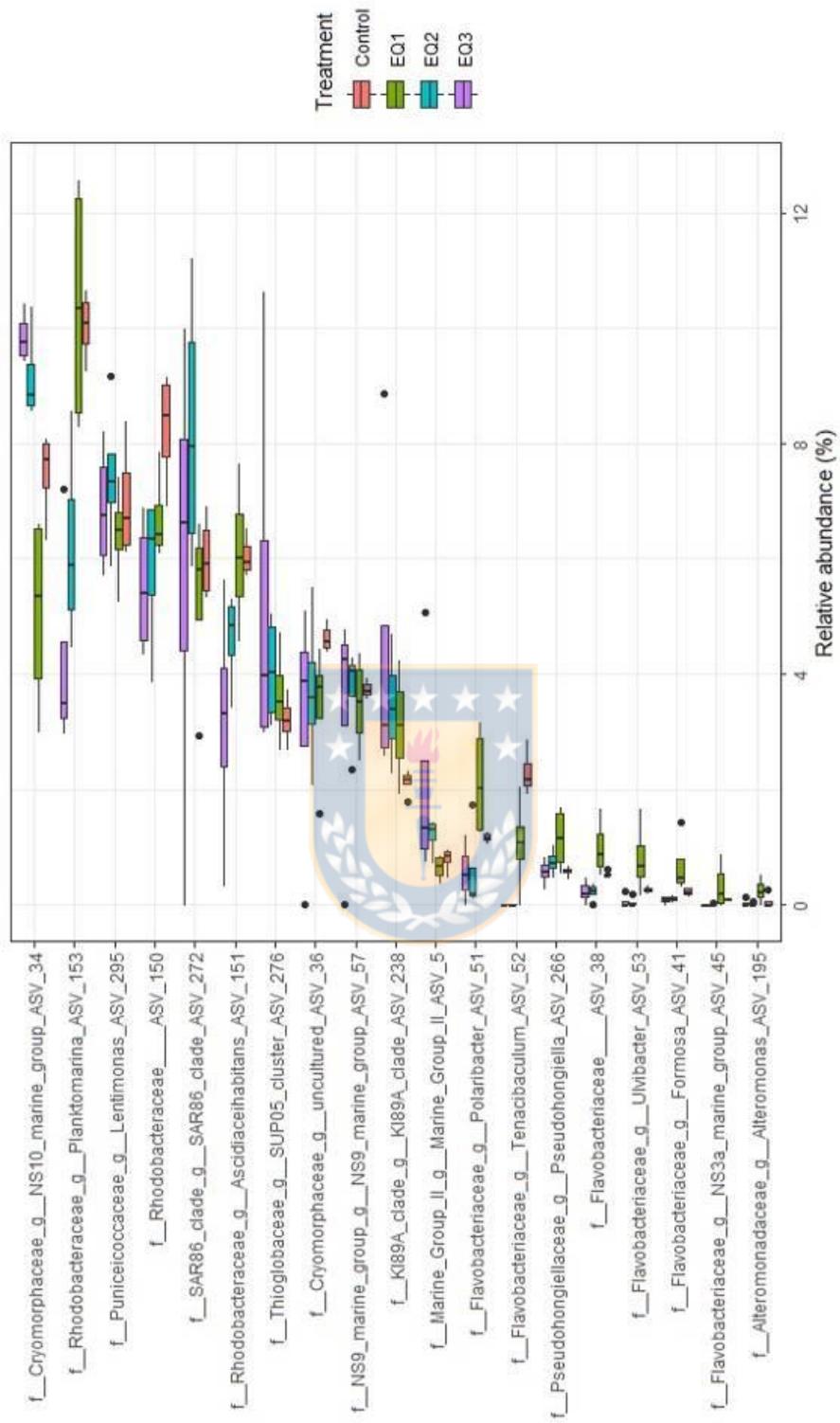


Fig. 11

Table 1

Site	Depth (m)	NO <sub>x</sub> (μM)	NO <sub>2</sub> (μM)	PO <sub>4</sub> <sup>-3</sup> (μM)	N/P	DOC (μM)	DON (μM)	DOP (μM)	Chl-a (ug L <sup>-1</sup> )	Bact(10 <sup>6</sup> cel mL <sup>-1</sup> )	Syn(10 <sup>6</sup> cel mL <sup>-1</sup> )	Peuk(10 <sup>6</sup> cel mL <sup>-1</sup> )
Achao	2	0.49 ± 0.05	0.09 ± 0.00	0.3 ± 0.002	1.74 ± 0.20	84.37 ± 11.53	9.07 ± 0.87	0.41 ± 0.02	3.57 ± 0.11	1.335	0.052	0.011
	10	8.43 ± 0.05	0.26 ± 0.002	0.99 ± 0.00	8.78 ± 0.04	90.09 ± 0.07	8.38 ± 0.64	0.31 ± 0.05	4.54 ± 0.17	0.785	0.038	0.011
	30	9.63 ± 0.01	0.32 ± 0.01	1.22 ± 0.01	8.19 ± 0.08	63.07 ± 0.94	5.89 ± 0.61	0.2 ± 0.02	1.21 ± 0.01	0.885	0.033	0.012
Coliumo	10	7.80 ± 0.91	0.36 ± 0.07	1.83 ± 0.5	4.6 ± 0.88	101.12 ± 3.00	10.8 ± 0.4	n.d.	12.53 ± 0.91	0.976	0.052	0.010

n.d. not data

Table 2

Site	Nutrient	Treatment	0h	6h	12h	24h
Achao	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	C	0.36±0.001	0.36±0.03	0.48±0.02	0.77±0.03
		EQ1	0.37±0.06	0.39±0.007	<b>0.63±0.01</b>	<b>0.88±0.01</b>
		EQ2	0.32±0.03	0.39±0.005	0.53±0.01	<b>1.05±0.01</b>
		EQ3	<b>0.52±0.07</b>	0.37±0.005	<b>0.69±0.002</b>	<b>1.26±0.01</b>
	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	C	3.75 ± 0.95	5.63 ± 0.01	5.64 ± 0.05	4.52 ± 0.33
		EQ1	3.28 ± 0.02	5.16 ± 0.62	<b>7.33 ± 0.14</b>	<b>3.39 ± 0.03</b>
		EQ2	4.06 ± 0.00	5.60 ± 0.14	<b>6.36 ± 0.15</b>	4.00 ± 0.09
		EQ3	3.93 ± 0.10	5.9 ± 0.82	5.84 ± 0.36	3.42 ± 0.36
	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	C	0.18 ± 0.04	0.25 ± 0.00	0.24 ± 0.02	0.27 ± 0.01
		EQ1	0.16 ± 0.01	<b>0.23 ± 0.00</b>	0.25 ± 0.01	<b>0.21 ± 0.01</b>
		EQ2	0.22 ± 0.01	<b>0.31 ± 0.01</b>	0.21 ± 0.03	<b>0.30 ± 0.01</b>
		EQ3	0.20 ± 0.02	<b>0.31 ± 0.05</b>	0.22 ± 0.02	0.29 ± 0.05
PO <sub>4</sub> <sup>-3</sup>	C	0.69 ± 0.19	0.92 ± 0.01	0.99 ± 0.01	0.90 ± 0.08	
	EQ1	0.57 ± 0.02	0.88 ± 0.01	0.94 ± 0.05	0.92 ± 0.00	
	EQ2	0.66 ± 0.05	0.95 ± 0.06	<b>0.92 ± 0.01</b>	0.94 ± 0.03	
	EQ3	0.67 ± 0.03	0.95 ± 0.04	0.88 ± 0.06	0.83 ± 0.11	
Coliumo	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	C	2.62 ± 0.05	2.17 ± 0.04	2.81 ± 0.07	2.98 ± 0.08
		EQ1	2.63 ± 0.01	2.13 ± 0.05	2.77 ± 0.08	2.81 ± 0.06
		EQ3	2.65 ± 0.01	2.10 ± 0.03	2.86 ± 0.04	<b>3.21 ± 0.03</b>
	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	C	5.96 ± 0.55	7.91 ± 0.09	7.46 ± 0.40	7.86 ± 0.16
		EQ1	6.29 ± 0.10	8.12 ± 0.13	7.51 ± 0.02	6.88 ± 1.48
		EQ3	6.56 ± 0.07	<b>8.31 ± 0.02</b>	7.48 ± 0.04	7.24 ± 0.7
	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	C	0.39 ± 0.00	0.41 ± 0.00	0.40 ± 0.01	0.40 ± 0.02
		EQ1	<b>0.43 ± 0.00</b>	<b>0.45 ± 0.01</b>	0.44 ± 0.02	0.39 ± 0.11
		EQ3	<b>0.44 ± 0.01</b>	<b>0.47 ± 0.01</b>	0.44 ± 0.02	0.46 ± 0.01
	PO <sub>4</sub> <sup>-3</sup>	C	1.37 ± 0.07	1.42 ± 0.21	1.26 ± 0.03	1.20 ± 0.00
		EQ1	1.27 ± 0.03	1.46 ± 0.11	1.21 ± 0.02	1.06 ± 0.15
		EQ3	1.30 ± 0.02	1.40 ± 0.07	<b>1.15 ± 0.01</b>	1.20 ± 0.06

Table 3

Site	Index	Treatment	0h	6h	12h	24h
Achao	AWCD	C	13.11 ± 1.03	9.11 ± 0.41	2.30 ± 0.18	1.00 ± 0.03
		EQ1	<b>19.39 ± 0.36</b>	<b>12.72 ± 0.34</b>	2.29 ± 0.31	<b>1.85 ± 0.20</b>
		EQ2	<b>10.04 ± 0.05</b>	10.92 ± 11.4	<b>1.63 ± 0.00</b>	0.78 ± 0.04
		EQ3	<b>10.27 ± 0.45</b>	9.64 ± 0.27	2.10 ± 0.14	0.85 ± 0.07
	H'	C	3.22 ± 0.19	3.01 ± 0.04	3.10 ± 0.19	2.85 ± 0.05
		EQ1	3.28 ± 0.06	3.09 ± 0.09	3.01 ± 0.22	2.78 ± 0.23
		EQ2	3.03 ± 0.04	2.81 ± 2.4	2.97 ± 0.04	<b>2.54 ± .03</b>
		EQ3	3.04 ± 0.08	2.98 ± 0.09	3.06 ± 0.12	2.56 ± 0.12
	Richness	C	30 ± 0	28.5 ± 0.7	27 ± 0	25.5 ± 0.7
		EQ1	30 ± 0	26.5 ± 0.7	26 ± 1.4	25.5 ± 2.1
		EQ2	27 ± 0	25 ± 4.2	26 ± 1.4	<b>21.5 ± 0.7</b>
		EQ3	27 ± 0	26 ± 0	27.5 ± 0.7	22 ± 1.4
Coliumo	AWCD	C	4.87 ± 0.23	13.71 ± 0.79	N.D.	N.D.
		EQ1	<b>6.51 ± 0.36</b>	12.55 ± 0.27	N.D.	N.D.
		EQ3	<b>7.46 ± 0.30</b>	<b>16.13 ± 1.20</b>	N.D.	N.D.
	H'	C	2.84 ± 0.23	3.25 ± 0.006	N.D.	N.D.
		EQ1	2.63 ± 0.06	3.24 ± 0.007	N.D.	N.D.
		EQ3	2.79 ± 0.09	3.24 ± 0.01	N.D.	N.D.
	Richness	C	26.5 ± 0.70	29 ± 0	N.D.	N.D.
		EQ1	<b>21 ± 1.41</b>	29 ± 0	N.D.	N.D.
		EQ3	<b>21.5 ± 2.12</b>	29 ± 0	N.D.	N.D.

N.D. not data



## 5.- DISCUSION

La materia orgánica disuelta marina es el mayor reservorio intercambiable de carbono en el planeta (Hansell y Carlson 2015), y el principal sustrato que alimenta la actividad heterotrófica de los microorganismos marinos (Cole *et al.*, 1982; Azam 1983; Azam 2015). La mayor fuente del *pool* autóctono de DOM es la producción primaria, por lo que se considera como un importante forzante de la abundancia, actividad y diversidad de los microorganismos (Azam y Malfatti, 2007; Buchan *et al.*, 2014). Los microorganismos marinos cumplen un rol ecológico crucial en el *loop* microbiano facilitando la transformación de DOM a POM (Azam *et al.*, 1983; Pomeroy *et al.*, 2007) y/o remineralizando la DOM a componentes inorgánicos (Ducklow *et al.*, 1986; Golsdman y Denmet, 2000). Sin embargo, DOM proveniente de otras fuentes llega al océano (DOM alóctona), la cual puede ser de origen natural o antrópico, con potenciales efectos en la disponibilidad de sustratos orgánicos para su utilización por parte de microorganismos heterótrofos (e.g. Hedges *et al.*, 1997, Hansell *et al.*, 2009, Montero *et al.*, 2022) y en consecuencia en su actividad. Por ejemplo, de la DOM derivada de ríos se ha reportado que el 75% es exportada desde cuencas hidrográficas llegando al océano (Lauerwald *et al.* 2012), mientras que al considerar los 30 ríos con mayores descargas, exportan alrededor del 36% del flujo global de DOC al océano (250 Tg DOC-C año<sup>-1</sup>; Hedgest *et al.*, 1997). También las actividades humanas como la acuicultura intensiva pueden ser fuentes importantes de DOM, donde se ha estimado, por ejemplo, que la pérdida de alimento total alcanza alrededor de un 20%, a través de alimento no consumido (Beveridge *et al.*, 1997; Cromey *et al.*, 2002; Reid *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2012) y fecas (Reid *et al.*, 2009; Amirkolaie *et al.*, 2011) Es así, como cambios en el suministro de sustratos orgánicos disueltos, pueden influenciar tanto la diversidad de la comunidad microbiana, como la actividad metabólica (Hansell y Carlson 2002; Buchan *et al.*, 2014; Blanchet *et al.*, 2016). Además, diversos compuestos químicos son utilizados en actividades humanas como la acuicultura, siendo liberados al océano y se conoce muy poco su efecto o interacción con las comunidades microbianas presentes en el ambiente, lo cual es de importancia dado el rol de los microorganismos en el procesamiento de la DOM y su enlace con los niveles tróficos superiores (*loop* microbiano). A pesar de los avances en el entendimiento

del comportamiento biogeoquímico de la DOM, este aún se encuentra en una “fase de crecimiento” y por lo tanto preguntas fundamentales respecto a la naturaleza y fuentes de la DOM, así como los mecanismos de producción, transformación y respiración permanecen sin respuesta (Azam 2015).

En esta tesis doctoral se abordó la problemática de la interacción entre la calidad y disponibilidad de la materia orgánica disuelta alóctona y las comunidades microbianas planctónicas, en tres distintos escenarios:

- (i) Se investigó si aguas de baja salinidad (LSW) derivadas de la descarga del Río Rhone muestran una señal biogeoquímica específica en la estación MOLA en el mar Mediterráneo NO, comparando perfiles de actividad microbiana heterotrófica y características de la DOM durante un periodo de 2 años.
- (ii) En un canal de la isla de Chiloé (Patagonia Norte), lugar fuertemente influenciado por la acuicultura, se investigó si existe una señal biogeoquímica asociada a esta, comparando características de la DOM a distintas distancias de los centros de cultivo, y evaluamos el efecto de la DOM derivada pellets y fecas de salmónidos en la actividad metabólica de microorganismos.
- (iii) Se evaluó el potencial efecto del aditivo alimentario EQ, usado ampliamente en la industria salmonicultora, sobre el metabolismo y composición de la comunidad microbiana de la columna de agua, a través de experimentos de microcosmos.

A continuación, se analiza cada una de estas tres áreas en las que se focalizó la presente Tesis de grado.

### **5.1. Materia orgánica disuelta alóctona derivada del Río Rhone en el mar Mediterráneo.**

El Mar Mediterráneo se caracteriza por ser un mar semi cerrado, de latitud media y oligotrófico (Krom *et al.*, 1991; McGill, 1965). El Río Rhone por su parte representa la fuente de agua dulce más importante hacia el Mar Mediterráneo (Naudin y Cauwet, 1997), así como de nutrientes inorgánicos y orgánicos de origen continental (de Madron *et al.*, 2011). Desde su pluma se separan estructuras diluidas de baja salinidad (LSW), las que pueden ser transferidas hacia la plataforma continental y a aguas abiertas (Barrier *et al.*, 2016; Diaz *et al.*, 2008; Nencioli

*et al.*, 2011; Petrenko *et al.*, 2017). Estas estructuras se han observado en la estación MOLA durante la primavera tardía y verano temprano (Laghdass *et al.*, 2010). En esta investigación (Capítulo 1), durante la presencia de LSW en el sitio de estudio, las tasas de respiración comunitaria (CR) y producción bacteriana (BP) fueron 3 y 2 a 4 veces mayores, respectivamente, que las medianas anuales sobre los 40 m. Adicionalmente, se observaron las mayores tasas de crecimiento bacteriano (BGR) durante la presencia de LSW en ambos años de estudio. Esto indica una señal de incremento en la actividad microbiana heterotrófica dentro de LSW. Al analizar las características de la DOM, las concentraciones de DOC no mostraron diferencias pronunciadas entre las medianas anuales y LSW, lo que coincide con lo sugerido anteriormente por Laghdass *et al.* (2010) para el mismo periodo de tiempo, posiblemente porque durante el verano también es factible encontrar altas concentraciones de DOC acumulado en aguas superficiales estratificadas (Laghdass *et al.*, 2010; Romera-Castillo *et al.*, 2010; Sanchez-Perez *et al.*, 2016). Esta acumulación de DOC se debe posiblemente a la limitación por nutrientes inorgánicos para los microorganismos heterótrofos (Thingstad y Rassoulzadegan, 1999), así como por limitación de carbono orgánico lábil (Laghdass *et al.*, 2012) y en consecuencia una posible acumulación de DOC de carácter más refractario. A pesar de no encontrar mayores diferencias en la concentración de DOC, observamos un aumento en la concentración de THAA durante LSW, siendo 2 veces la mediana anual en los primeros 40 m en el 2008, mientras que en 2007 se mantuvo en el límite superior, y su contribución al DOC (%DOC<sub>THAA</sub>) mostró un patrón similar al observado para la concentración de THAA. Junto con ello, el indicador del estado de la degradación de la materia orgánica (DI; Dauwe y Middelburg, 1998; Dauwe *et al.*, 1999), mostró una mediana anual positiva en los perfiles verticales de la columna de agua, indicando en general la presencia de DOM fresca diagenéticamente (Davis *et al.*, 2009; Kaiser y Benner, 2009; Peter *et al.*, 2012). Además, durante la presencia de LSW el DI fue notablemente mayor que la media anual en la superficie (20m) en ambos años (Fig. 2; sección resultados, Capítulo1 y Fig.S5; material suplementario Capítulo1, anexo1). Estas observaciones muestran que la LSW en la capa superior tiene una señal química indicativa de DOM más biodisponible respecto al fondo y a otros periodos del año donde no se observa LSW. El análisis de estas variables en conjunto, a través del análisis multivariado, indicó que la

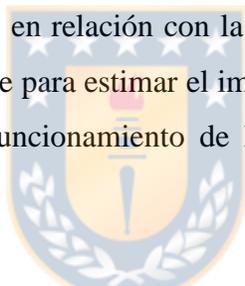
actividad microbiana heterótrofa junto con las características de la DOM se relaciona con las fechas de la presencia de LSW (mayo y junio) de ambos años, sugiriendo que la LSW contiene DOM biodisponible que puede mantener el aumento de la actividad microbiana heterótrofa observado en esta zona del Mediterráneo NO.

Luego de estas observaciones, surgió la interrogante en cuanto al origen de la DOM contenida en LSW con señales de mayor biodisponibilidad, dado que la actividad heterótrofa observada en ella podría derivar del enriquecimiento de MO desde la PP *in situ* que ocurre en la pluma cerca del estuario reportada en otros estudios (e.g. Diaz *et al.*, 2008), así como desde la DOM terrígena derivada del río. Para resolver esta pregunta seguimos el patrón de los flujos de la producción comunitaria neta (NCP) y respiración comunitaria (CR) integrada en la columna de agua correspondiente a la capa fótica. Durante la presencia de LSW más intensa, en mayo-junio 2007 y junio-julio 2008, la NCP fue negativa o de valores muy bajos y asociada con altos flujos integrados de CR, mostrando un cambio desde la autotrofia a la heterotrofia en estos periodos (Fig. 3; sección resultados, Capítulo 1). Lo que es indicativo de una baja producción primaria *in situ* en LSW, lo que se explicaría por la baja concentración de nutrientes observada (Tabla S1, anexo 1) que podría limitar la actividad autotrófica en estas aguas. En consecuencia, estos resultados sostienen la idea que los procesos microbianos heterotróficos son favorecidos al compararlos con los procesos autotróficos dentro de estas masas de agua flotantes, sugiriendo entonces un aporte de DOM externo (DOM alóctona) que mantendría la actividad heterotrófica observada.

Tanto la producción primaria como la exportación de DOC terrígeno son fuentes potenciales de carbono orgánico para los océanos oligotróficos y se han propuestos mecanismos de transporte como *eddies* de mesoescala, ondas internas o corrientes (Smith y Mackenzie, 1987; Bauer y Druffel, 1998; Medeiros *et al.*, 2015). Es así como la LSW podría representar un enlace entre el desacople espacio-temporal entre el origen de la materia orgánica en la zona costera y la respiración en agua abiertas en el Mar Mediterráneo NO. Estos resultados muestran que la DOM derivada de ríos puede ser material lábil sustentando la actividad heterotrófica, cualidad que se atribuye en general a la DOM derivada de la PP, por ejemplo, Søndergaard y Middelboe (1995) a través de experimentos de biodegradación muestra que el DOM de ríos es mínimamente

reactivo, sin embargo estudios de campo muestran que la 50% de la materia orgánica proveniente de ríos es completamente remineralizada (Hedges y Benner 1997). Por otra parte, procesos como las transformaciones fotoquímicas de la DOM pueden ser un mecanismo generador de sustratos biodisponibles en estas masas de aguas boyantes superficiales, en particular cuando están presentes compuestos de origen terrígeno (Abboudi *et al.*, 2008; Amon y Benner, 1996; Obernosterer y Herndl, 2000), y otros procesos como el *Priming Effect* (PE) dado por la interacción de materia orgánica “recalcitrante” (e.g. proveniente de ríos) con materia orgánica “lábil” (e.g. proveniente de la PP), lo que modifica (generalmente incrementa) la degradación de DOM recalcitrante (Blagodatskaya y Kuzyakov 2008), hipotetizándose que las plumas de ríos son estructuras que favorecen la ocurrencia de este proceso (Bianchi 2011).

La presente investigación muestra el potencial de estas masas de aguas de origen estuarino para afectar la actividad biológica en el océano oligotrófico costa afuera, por lo que el estudio de la dinámica de este tipo de masa de agua boyante en el Mar Mediterráneo, así como su potencial ocurrencia en otros sitios, en relación con la extensión, duración e influencia en la diversidad microbiana, es importante para estimar el impacto en la biogeoquímica marina y así comprender de mejor manera el funcionamiento de los ecosistemas a diferentes escalas y distancia de la costa.



## **5.2. Materia orgánica disuelta alóctona deriva de la acuicultura**

La acuicultura se ha expandido rápidamente en las últimas 3 décadas, sosteniendo la alta demanda de peces como fuente de alimento, mientras la contribución relativa de la captura de peces ha decaído (Quiñones *et al.*, 2019; FAO 2020). Junto con este rápido crecimiento, la salmonicultura ha tenido que enfrentar significativos problemas ambientales, en particular por prácticas insostenibles y su potencial impacto negativo en el ecosistema (Maroni 2000; Tacon *et al.*, 2010; Klinger y Naylor 2012). Uno de los impactos ambientales más importantes de la acuicultura es el incremento de la carga orgánica hacia el sedimento y la columna de agua, tanto desde los cultivos de peces como de los cultivos de mitílidos, introduciendo materia orgánica alóctona al sistema (Hargrave *et al.*, 2010; Quiñones *et al.*, 2019). Algunos estudios se han enfocado en el impacto de la DOM derivada de la acuicultura en el ambiente acuático (e.g.

Nimptsh *et al.*, 2015; Kamjunke *et al.*, 2017; Molina y Fernández, 2020; Montero *et al.*, 2022), sin embargo, la información respecto a las características y biodisponibilidad de la DOM derivada de actividades acuícolas aun es escasa, especialmente en el medio marino y más aún su efecto en la actividad metabólica de la comunidad microbiana de la columna de agua.

La zona de estudio, canal Caucahué, se caracterizó por presentar menor temperatura y salinidad en superficie y hacia el interior del canal, asociadas a Aguas Subantárticas Modificadas (MSAW), lo que concuerda con lo observado por Sobarzo *et al.* (2018). Varios de los parámetros estimados como  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_2$ , clorofila-a, DON, DOP, picoplancton (auto y heterótrofo), aminoácidos (disueltos libres y proteínas disueltas) e índice de degradación Dauwe, mostraron valores significativamente mayores en las cercanías de ambos tipos de cultivo, pero fue particularmente pronunciado en las cercanías de la salmonicultura. Esto sugiere que la acuicultura en el Canal Caucahué puede modificar tanto las concentraciones naturales de compuestos orgánicos e inorgánicos, así como la calidad de la MO. Estas observaciones coinciden con estudios previos en las cercanías de cultivo de salmónidos (e.g. Pitta *et al.*, 1999; Wu *et al.*, 1994 y Navarro *et al.*, 2008) y de mitílidos (Nozzoli *et al.*, 2005), pero difieren de lo reportado por Soto y Norambuena (2004) quienes no encontraron efectos significativos de los cultivos de salmónes en la columna de agua asociadas a estas variables. Esta diferencia puede deberse a la escala y estrategia de muestreo utilizados por Soto y Norambuena (2004) (e.g. sitio control a 1000m de distancia, 42 centros de cultivo (24 activos) en 9 localidades en un periodo de 1 año aprox.), utilizando una muestra por centro (cada centro una réplica), lo que implica un mayor coeficiente de variación lo que puede suavizar el efecto local. Sin embargo, estos autores observaron diferencias marginales en los valores de amonio de los centros de cultivo respecto a los sitios control. Además, los sedimentos asociados a los centros de cultivos si fueron afectados, aludiendo estas diferencias a una posible rápida dilución en la columna de agua, debido a las corrientes (amplitud de marea) y también a la rápida utilización de nutrientes por el fitoplancton (Soto y Norambuena 2004).

En nuestro estudio, las altas concentraciones de  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_2$ , y DON, asociadas a los centros de cultivo se explicarían por los aportes desde el alimento de peces no consumido, fecas, excreción, mucus y a la mortalidad de ambos tipos de organismos cultivados. Estas fuentes de

MO, a su vez son una fuente de nutrientes inorgánicos, como el amonio, para ensamblajes microbianos que lo utilizan rápidamente (Fernández *et al.*, 2019; Molina y Fernández, 2020). Es así como las menores concentraciones de  $\text{NO}_3$  y  $\text{PO}_4^{3-}$  observadas en la superficie de las cercanías de los centros de cultivo coinciden con las mayores concentraciones de clorofila y abundancia picoplanctónica, sugiriendo la utilización de estos compuestos por parte del fitoplancton. Sin embargo, esto contrasta con lo reportado por Navarro *et al.*, (2008) quienes no encontraron diferencias significativas en la concentración de pigmentos fotosintéticos en las cercanías de las balsas jaulas, pero si un aumento de la abundancia y biomasa de microorganismos heterótrofos, lo que coincide con nuestros hallazgos, especialmente en el cultivo de mitílidos (Tabla 1; sección resultados, Capítulo 2). Estas diferencias observadas entre estudios, esté posiblemente sujeta a factores hidrodinámicos a nivel local de los fiordos y canales donde se practica la acuicultura. Por ejemplo, Soto y Norambuena (2004) postulan que la extensión del impacto de la salmonicultura depende de la operación del sitio (e.g. especie cultivada, alimento usado, tamaño, densidades, etc.) y de las características del ambiente adyacente (línea de costa, batimetría, mareas, entre otros), donde la dirección y velocidad de las corrientes son un factor clave para determinar el intercambio de agua (Venayagamoorthy *et al.*, 2011). Adicionalmente, las mismas balsas jaulas pueden generar cambios en la hidrodinámica local (Cornejo *et al.*, 2014), afectando el campo de velocidad en dirección y magnitud, reduciendo hasta en un 50% la velocidad de la corriente detrás de ellas (Herrera *et al.*, 2018).

Las concentraciones de DON y DOP también se asociaron a los centros de cultivos (salmones y mitílidos) en ambas transectas y la disminución de ambos en el fondo coincide con los máximos de  $\text{NH}_4^+$  lo que sugiere remineralización de MO en esta zona. Sin embargo, la concentración de DOC fue menor respecto a los sitios control y esto coincide con una mayor abundancia picoplanctónica y actividad de MDH, sugiriendo una posible utilización por parte de la comunidad microbiana en las cercanías de los cultivos y /o la presencia de DOM con más contenido de nitrógeno y fosforo en estas zonas. A pesar de estas diferencias entre los sitios estudiados, la concentración de C, N y DOP se encuentran en los rangos reportados para el Mar Interior de Chiloé (González *et al.*, 2019 y González *et al. submitted*; Capítulo 3 de esta tesis).

Las características de la DOM abarcadas a través del análisis de aminoácidos por ser una parte importante cuantitativa y biológicamente lábil de la DOM, (Davis *et al.*, 2009; Kaiser y Benner, 2012) variaron principalmente en relación a la distancia de los cultivos. La concentración de DFAA y proteínas disueltas están en los rangos reportados previamente para sitios costeros (Pantoja *et al.*, 2009; Valdés *et al.*, 2017; Coffin, 1989; Pantoja *et al.*, 2011). Sin embargo, la contribución al DOC de las proteínas disueltas (%DOC<sub>DCAA</sub>) y de los DFAA (%DOC<sub>DFAA</sub>) estuvo sobre los valores reportados para otras zonas costeras (Pantoja *et al.*, 2009; Garzón-Cardona *et al.*, 2021), en particular en las cercanías a los cultivos (Fig. 4 y S3, sección resultados, Capítulo 2). Las mayores concentraciones de DFAA, proteínas disueltas y su contribución al DOC se asociaron a los centros de cultivos, no obstante, en la transecta TM (mitílidos) se observó un aumento considerable asociado a la estación control (Cm). Estos patrones fueron consistentes con los valores observados del Índice de Degradación Dauwe (DI), utilizado como indicador químico del estado de degradación de la materia orgánica (Dauwe y Middelburg, 1998). En ambas transectas observamos un DI positivo y congruente con la distribución de proteínas disueltas, reflejando una DOM fresca diagenéticamente (Kaiser y Benner, 2009; Peter *et al.*, 2012). Los valores DI asociados a los cultivos en ambas transectas fueron significativamente mayores, especialmente en las cercanías al cultivo de salmones (TS), el cual fue casi 4 veces el DI del sitio control en superficie (Fig. 4 c; sección resultados, capítulo 2). Mientras que en TM la estación M3, bajo los 10m de profundidad, el DI fue 2 veces lo observado en superficie y en las estaciones aledañas, posiblemente asociado a la DOM liberada de las cuelgas de mitílidos (biodepostación). Sin embargo, en TM el mayor DI se observó en el sitio control (Cm) y fue consistente con %DOC<sub>DCAA</sub>, sugiriendo un posible mecanismo de acumulación y/o preservación de la DOM por una menor (o más lenta) actividad microbiana (Tremblay, 2015), incluso posiblemente atribuible a algún co-limitante de la actividad heterotrófica (i.e Fe, Obernosterer *et al.*, 2014). Otra posibilidad es que exista una fuente de DOM fresca en ese sitio que no haya sido registrada en esta investigación, fuera del canal Caucahué (Mar interior de Chiloé). Por lo tanto, las características de la DOM (distribución de AA, %DOC<sub>DCAA</sub>, %DOC<sub>DFAA</sub> y DI) en el canal Caucahué, sugieren que existe una señal químicamente diferente indicativa de DOM más biodisponible (Davis *et al.*, 2009; Kaiser y

Benner, 2009; Benner y Kaiser, 2011; Peter *et al.*, 2012; Tremblay *et al.*, 2015; González *et al.*, 2019; Shen *et al.*, 2016) asociada a ambos tipos de cultivos.

La actividad de MDH se ha propuesto como un indicador de actividad microbiana en comunidades microplañctónicas en la columna de agua del Sistema de Corrientes de Humboldt (Quiñones *et al.*, 2006; González y Quiñones, 2009). Por lo tanto, la mayor y significativa actividad específica de la MDH observada en las cercanías a los centros de cultivo (S3 y S2) y en la estación M1, sugiere una mayor remineralización asociada a estos lugares, posiblemente por la concentración y biodisponibilidad de materia orgánica (Figs. 3 y 4). Por otra parte, la Citrato Sintasa (CS) se asoció principalmente a comunidades microbianas de la superficie (2 y 10m) en ambas transectas, lo que es consistente ya que la CS está vinculada al metabolismo aeróbico (Lehninger, 1975). Mientras que la actividad de MPOR se asoció a profundidades mayores (10 m y 40/50m), lo cual también es consistente dada su función relacionada al metabolismo anaeróbico y fermentativo (González y Quiñones, 2009). Esto en conjunto sugiere una estructuración de la columna de agua, con un metabolismo principalmente aeróbico asociado a superficie, un metabolismo hipóxico asociado al fondo, y un metabolismo intermedio indicador de una mayor remineralización de materia orgánica asociado a los centros de cultivo.

Los resultados obtenidos en el estudio de transectas del canal Caucahué, reflejan que a través de los cultivos de salmónidos y mitílicos se introduce materia orgánica disuelta biodisponible (lábil) alóctona, donde, las proteínas disueltas pueden llegar a contribuir cerca del 50% de DOC en las cercanías del cultivo (Fig. 4; sección resultados, Capítulo 2), la cual puede sustentar el incremento de la actividad de la comunidad microbiana (e.g. MDH). Esto concuerda con estudios previos que reportan que el material proteínico representa una fracción mayor de la MO derivada de la salmonicultura, lo que sugiere que es de alto valor para la actividad heterotrófica (Nimptsh *et al.*, 2015; Kamjunke *et al.*, 2017). No obstante, en el presente estudio se observó la posibilidad de otras fuentes de DOM biodisponible (i.e. DI en estación control Cm; Fig. 5b; sección resultados, Capítulo 2), lo que puede relacionarse a cambios o aportes desde la circulación por el lado sur del mar interior de Chiloé, como lo describe González *et al.* (2019) quienes reportaron mayor DOM lábil de origen autóctono en el mar interior de Chiloé.

Por otra parte, la MO derivada de la salmonicultura es una mezcla de fuentes (diferentes pellets de alimento, fecas, mucus, etc.) por lo tanto, pueden existir diferencias en su labilidad y en consecuencia en la respuesta metabólica de la comunidad microbiana. Para abordar esta pregunta evaluamos la respuesta metabólica a través de la estimación de tasas específicas de respiración, de actividad enzimática extracelular y de MDH en un experimento de microcosmos con adición de DOM proveniente de pellets de alimento de peces (P), de fecas de salmón (F), de plancton natural (N) y una mezcla de todas ellas (M).

La adición de F y M-DOM aumentaron sobre un 400% la actividad de MDH promedio en el tiempo, con un incremento notable desde el inicio del experimento en ambas fracciones. Mientras que P-DOM generó un estímulo de menor magnitud y más tardío (después de las 12h, Fig. 6 a y b; sección resultados, Capítulo 2). Como se discutió en la sección previa, el incremento de la actividad de la MDH se ha utilizado como indicador de remineralización (Martínez *et al.*, 2002) y de la actividad microbiana planctónica en la columna de agua (González y Quiñones, 2009), en este caso dada por la adición de DOM, en particular de F y M-DOM. Esto concuerda con el incremento de la actividad de MDH observado en las cercanías de los centros de salmonicultura durante el estudio de transectas en Caucahué (Capítulo 2 de esta tesis). Sin embargo, las tasas específicas de respiración de la comunidad microbiana coinciden parcialmente con la actividad de la MDH, en los tratamientos de F Y M-DOM. Las tasas de respiración para P-DOM fueron notablemente altas, pero solo entre las 12 y 24h para luego disminuir a valores incluso bajo el control. Esta diferencia, puede deberse a que P-DOM generó una alta biomasa desde las 48h, disminuyendo entonces las tasas específicas en comparación a los otros tratamientos hacia el final del experimento. Además, la MDH si bien cataliza reacciones en el ciclo del ácido cítrico y actúan como indicador del potencial aeróbico, también desempeña otras funciones como el transporte de electrones y podría representar mejor el metabolismo general (Lehninger, 1982).

Por otra parte, la adición de F y M-DOM generaron el mayor estímulo en la actividad enzimática extracelular específica de las tres enzimas estudiadas, sugiriendo que estas fuentes de MO generan un mayor impacto que la impulsada por el alimento (P-DOM) y es consistente con lo observado para la actividad de MDH y el consumo de oxígeno en este experimento. Si bien la

respuesta específica de LIP, al igual que LAP y GLU, fue rápida y significativa a la adición de F-DOM en ambas fracciones, la adición de M-DOM generó el máximo estímulo en esta enzima (LIP) durante el experimento. La alta actividad registrada en M-DOM para LIP, y F-DOM para LAP y GLU, refleja que la mezcla de compuestos orgánicos puede resultar en una mayor actividad metabólica como posible resultado de, por ejemplo, el “*priming effect*” (PE), el cual es un proceso donde la adición de materia orgánica lábil modifica la degradación microbiana de DOM recalcitrante o menos lábil (Blagodatskaya y Kuzyakov 2008). Estas diferencias entre las respuestas de las enzimas, nos permite visualizar las preferencias y/o capacidades nutricionales de la comunidad microbiana planctónica marina.

Los resultados del presente estudio (ver Capítulo 2 de esta tesis) asociados a la actividad metabólica microbiana pueden estar relacionados al nivel de “procesamiento” que tienen ambos sustratos principales (fecas y alimento) y es consistente con lo observado por Fernández-Jover *et al.*, (2007) y Piedecausa *et al.*, (2010) quienes reportaron que la liberación de DOM es más rápida y alta en las fecas de peces en comparación con el pellet (alimento). Nuestros resultados reflejan que la DOM derivada de la salmonicultura tiene efectos diferenciales, donde la F y M-DOM generan la mayor actividad metabólica, dejando a P-DOM con valores muy cercanos al control y a N-DOM durante las primeras horas 12h del experimento. Esto concuerda con lo reportado por Montero *et al.*, (2022), quienes observaron las máximas tasas de EEA de aminopeptidasa (en el bacterioplancton) después de 24h-48h, en respuesta a la adición de DOM derivado de alimento de peces. El aumento “tardío” de la actividad en P-DOM concuerda con el alza de la biomasa en ambas fracciones y de la abundancia bacterioplanctónica desde las 48h en nuestro experimento, sugiriendo un potencial uso de la DOM en la producción de biomasa respecto de la respiración. Por otra parte, la menor y tardía actividad en los tratamientos con P-DOM podría estar ligada a la presencia de etoxiquina (González *et al.*, *submitted*; sección resultados, Capítulo 3 de esta tesis) y sus metabolitos, así como de otros aditivos utilizados en la fabricación de alimento de peces de los cuales aún no se conoce el efecto en el metabolismo de la comunidad microbiana planctónica marina.

La alta reactividad de los sustratos utilizados en el experimento (reflejados en la alta actividad metabólica) fue consistente con las características de la DOM. La concentración de proteínas

disueltas y DFAA en el control fueron congruentes con las mediciones *in situ* en la columna de agua en este estudio (Figs. 4 a y S3 a) y para otros sitios costeros (Coffin, 1989; Pantoja *et al.*, 2009; 2011; Valdés *et al.*, 2017). La F y P-DOM fueron los sustratos con mayor concentración de DFAA y proteínas disueltas respectivamente, al inicio del experimento (Fig. 8), a pesar de que la concentración inicial de N, P y C orgánico disuelto fue mayor en P-DOM (Tabla 2; sección resultados, Capítulo 2). Esto coincide con Wang *et al.*, (2013) quienes reportan un mayor contenido de C y N en el alimento respecto al de fecas de salmones en Noruega. La concentración de DFAA y proteínas disueltas disminuyeron drásticamente en los tratamientos F y M-DOM desde el inicio del experimento (0h), mientras P-DOM disminuyó desde las 48h (Fig. 8; sección resultados, Capítulo 2), lo que es congruente con lo observado en las tasas metabólicas. La mayor %DOC<sub>DCAA</sub> y %DOC<sub>DFAA</sub> fue desde F-DOM, y la variación en el tiempo fue similar a lo observado para DCAA y DFAA. Por su parte, el DI fue variable en el tiempo y entre tratamientos, esta variabilidad podría deberse a la alta actividad microbiana generada con el enriquecimiento, que paralelamente va modificando la calidad de la DOM (Davis *et al.*, 2009; Owaga *et al.*, 2001). En general, observamos un mayor DI de F-DOM, seguido por N, M-DOM y finalmente P-DOM, con los valores incluso menores que el control, lo que es consistente con lo observado para la actividad metabólica y podría explicar el menor efecto o más lenta reacción de la P-DOM. La congruencia del valor DI en F-DOM (DI = 6-9) con los valores DI observados en la estación más cercana a las balsas jaulas (S3; Fig. 4b sección resultados, Capítulo 2), sugiere que las fecas de los peces cultivados aportan mayormente a la labilidad de la MO en estas zonas.

Los resultados del experimento de microcosmos con adición de DOM, reflejaron en su conjunto, una variación principalmente dada por los tratamientos y secundariamente por el factor tiempo. La variación asociada a los tratamientos caracteriza a P-DOM como una fuente de DOM y nutrientes inorgánicos, posiblemente por la concentración resultante en el experimento (Tabla 2; sección resultados, Capítulo 2). No obstante, los tratamientos F y M-DOM se caracterizaron por su mayor actividad metabólica (MDH, respiración y AEE) y DI, concordando con lo reportado por Gonzalez *et al.* (2019) (ver sección Resultados, Capítulo 1), quienes relacionan la biodisponibilidad de la DOM a través del análisis de aminoácidos y el

aumento de la actividad microbiana heterotrófica. Esta concordancia también se aprecia con los resultados de Kamjunke *et al.* (2017) y Montero *et al.* (2022), quienes reportan una alta producción bacteriana y AEE asociada a DOM potencialmente lábil derivado de la acuicultura.

Los resultados del Capítulo 2 de esta Tesis reflejan que no solo la concentración de DOM, sino que también la calidad de la DOM es un factor fundamental para el metabolismo de la comunidad microbiana planctónica y que la actividad acuícola (salmonicultora y mitilicultora) es un factor importante a la hora de considerar las fuentes de materia orgánica lábil disponibles para los procesos microbianos. Por ejemplo, la disminución de DOC entre inicio y final del experimento fueron mayores para P-DOM (-49%) respecto a F (-30%) y M-DOM (-45%) (Tabla 2, Capítulo 2, sección resultados), sin embargo, la disminución de la concentración de proteínas disueltas y DFAA fue mayor y más rápida en F-DOM (66 y 94%, respectivamente) al compararla con P-DOM (-27 y -80%, respectivamente), y finalmente las mayores tasas metabólicas fueron observadas en el tratamiento de F y M-DOM. En consecuencia, una perspectiva del presente trabajo de grado es que la estimación de la actividad microbiana estimulada por la adición de DOM alóctona derivada de actividades humanas como la acuicultura, puede ser ampliada considerando, por ejemplo, la producción y respiración bacteriana *in situ*, lo que permitiría tener estimaciones de los flujos de C (cuanto C es utilizado para la generación de biomasa y cuanto es respirado), así como los flujos de producción a nivel comunitario *in situ* (ej. producción comunitaria neta y respiración) para obtener información respecto a si los procesos heterotróficos son beneficiados frente a los autotróficos, en las cercanías de los centros de cultivo de organismos.

### **5.3. Compuestos químicos en la acuicultura, el caso de la etoxiquina y su efecto en la degradación de materia orgánica por microorganismos planctónicos marinos.**

Otro riesgo importante de la actividad salmonicultora, es el potencial impacto de compuestos químicos liberados al ambiente marino sobre los microorganismos, quienes cumplen un rol clave en los ciclos biogeoquímicos participando de los procesos de degradación de materia orgánica (Azam *et al.*, 1983; Azam y Malfatti, 2007). Se ha reportado que la acuicultura puede liberar antibióticos y pesticidas afectando las comunidades biológicas en la columna de agua (Rain-

Franco *et al.*, 2018; Garces *et al.*, 2020; Valdés-Castro y Fernández, 2021), donde estos efectos son observados en organismos-no objetivos y a concentraciones más bajas que aquellas concentraciones que causan respuestas toxicológicas (Jara 2021).

El tercer Capítulo de esta Tesis de grado se enfocó en identificar efectos potenciales de la etoxiquina (EQ) en la actividad metabólica y biodiversidad de la comunidad planctónica marina en dos áreas contrastantes: Achao, zona influenciada por la acuicultura y Coliumo, sin actividad salmonicultora. Según nuestro conocimiento, es la primera vez que se evalúan los efectos de EQ en las comunidades microbianas marinas de la columna de agua a nivel global.

Durante nuestra investigación, ambas zonas de estudio se caracterizaron por presentar condiciones hidrográficas típicas de primavera/verano, las cuales fueron consistentes con los patrones estacionales de Bahía Coliumo (Schneider *et al.*, 2017) y con los del mar interior de Chiloé, donde es frecuente encontrar una fuerte mezcla inducida por vientos y mareas (Narváez *et al.*, 2019).

Dado que no existe información previa respecto al efecto de EQ en comunidades microbianas marinas, nuestra discusión en general se basa en lo reportado para otros compuestos químicos como pesticidas y antibióticos y/o en otras matrices como el suelo. Al evaluar la actividad metabólica de la comunidad microbiana sometida a diferentes concentraciones de EQ, la actividad específica de MDH en Achao tuvo una marcada respuesta negativa en ambas fracciones, la cual decrece en el tiempo. Similarmente, en Coliumo, se observó una reducción de la actividad de MDH en respuesta a EQ en F<sub>Total</sub>, no obstante, la F<sub><1μm</sub> incrementó las primeras 6 h en EQ1 (Fig. 3, sección resultados, Capítulo 3). Como ya hemos discutido previamente, un incremento en la actividad de MDH, en general, indica un incremento en la remineralización (Martínez *et al.*, 2002). Por lo tanto, los resultados de esta Tesis (Capítulo 3) indican que la exposición a EQ puede disminuir la remineralización de la MO en la columna de agua. Sin embargo, la estimulación de la actividad de MDH en la fracción menor (i.e. F<sub><1μm</sub>) podría deberse a que la EQ y los antioxidantes en general, pueden ser considerados a su vez pro-oxidantes bajo ciertas condiciones (Blaszczyk *et al.*, 2013; Egloff *et al.*, 2018). Estudios previos han reportado efectos deletéreos de EQ a nivel de metabolismo celular. Por ejemplo, Hernández *et al.* (1993) y Reyes *et al.* (1995) sugieren que EQ afecta la cadena respiratoria mitocondrial,

inhibiendo el consumo de oxígeno en células hepáticas y renales de ratas. Sin embargo, estudios en el microbiota de suelos sugieren que EQ no produciría cambios significativos en el consumo de oxígeno (Papadopoulou *et al.*, 2016). No existe información previa relacionada con tasas de respiración de comunidades microbianas marinas expuestas a EQ, y nuestras observaciones indican que existen cambios en las tasas de respiración luego de la adición este antioxidante, las cuales difieren entre áreas y fracciones de tamaño. La fracción de tamaño menor en Achao mostró un claro incremento (2.5 veces el control) durante todo el experimento (Fig. 4, sección resultados, Capítulo 3), pero la FTtotal fue altamente variable. En Coliumo hubo un efecto principalmente negativo en ambas fracciones, lo que sugiere que EQ podría afectar negativamente a las comunidades microbianas en áreas que no han sido expuestas al compuesto, mientras que las comunidades de zonas cercanas al cultivo de salmones podrían ser estimuladas como una respuesta al estrés o a la degradación de EQ, como se ha reportado para quinoleínas (Brockman *et al.*, 1989; Aislabie *et al.*, 1990; Kaiser *et al.*, 1996) y otros compuestos químicos como insecticidas (Tu, 1970; Jones y Ananyeva, 2001; Eisenhauer *et al.*, 2009; Jail *et al.*, 2014).

Por otra parte, la actividad enzimática extracelular específica de las tres enzimas evaluadas fue afectada por la adición de EQ, donde LAP en general mostró un incremento, especialmente en la fracción menor de ambas áreas de estudio, pero en Coliumo en menor magnitud. Esta estimulación de LAP podría relacionarse con el contenido de N en la molécula, actuando como un potencial sustrato orgánico para la degradación. En ese contexto, en esta investigación planteamos como posible hipótesis que las mayores tasas de EEA observadas en Achao en respuesta a la EQ se deben a que la comunidad poseería algunas adaptaciones debido a la presencia del cultivo de salmones en el área y en consecuencia a la exposición frecuente a EQ. En contraste, la actividad específica de  $\beta$ -GLU disminuyó en general con la adición de EQ. En Achao observamos un efecto relacionado a la concentración, donde EQ1 tuvo un efecto agudo inicial, pero disminuyó en el tiempo hasta estimular la  $\beta$ -GLU, mientras EQ3 tuvo un efecto negativo permanente. En Coliumo, el efecto también fue negativo en general, pero en menor magnitud. Este efecto negativo en la actividad específica de  $\beta$ -GLU coincide con lo reportado por Papadopoulou *et al.* (2016) para la microbiota de suelo. La actividad específica de LIP fue la más afectada por la adición de EQ, lo cual es esperable dado la naturaleza antioxidante de

esta molécula, utilizada para evitar la oxidación de lípidos (Bohne *et al.*, 2008). Se observó una respuesta negativa de LIP en relación con las concentraciones de EQ, en ambos sitios y fracciones, pero con una magnitud considerablemente mayor en Achao. Esta diferencia podría ser explicada por las posibles distintas en las comunidades presentes en ambos sitios, pudiendo diferir en la sensibilidad a la exposición a EQ y/o en la capacidad de degradar esta molécula.

Cabe señalar, que la menor concentración de EQ mostró una respuesta altamente variable en la EEA específica de las enzimas estudiadas (Fig. 5, 6 y 7, sección resultados, Capítulo 3), lo que puede relacionarse con la labilidad de esta molécula y la baja concentración utilizada, pudiendo ser degradada por irradiación y/o hidrólisis (Bintou, 2015; EFSA, 2015). Además, las diferentes respuestas de EEA a la adición de EQ (estimulación de LAP vs disminución de  $\beta$ -GLU y LIP), podría estar asociada al efecto de metabolitos o productos de transformación de las moléculas (Karas *et al.*, 2018). Por ejemplo, Papadopoulou *et al.* (2016; 2020) muestran que la quinona imina y la etoxy-quinolina (productos de oxidación de EQ), afectaron negativamente procesos como la amonio-oxidación en la microbiota de suelo. Además, se debe tener en cuenta que los microorganismos tienen un potencial metabólico amplio en su calidad de degradadores, por ejemplo, se ha reportado que varios grupos de bacterias (Itoh *et al.*, 2014) y hongos (Pandey y Singh, 2004) pueden incrementar sus tasas metabólicas en suelos, cuando son expuestos a compuestos químicos como pesticidas, sugiriendo una potencial utilización de estos compuestos. Esto también nos sugiere que la EQ podría afectar la batería enzimática de la comunidad, teniendo efectos diferenciales en la “preferencia nutricional” de la comunidad.

La utilización de fuentes de carbono por parte de la comunidad microbiana expuesta a EQ, también mostró diferencias entre ambos sitios, sugiriendo que las comunidades de cada sitio son diferentes. En Achao, la utilización de sustratos (AWCD) disminuyó en las concentraciones mayores de EQ (EQ2 y EQ3), pero en la concentración menor (EQ1) se observó un incremento, mientras que en Coliumo ambas concentraciones usadas (EQ1 y EQ3) estimularon la utilización de sustrato. Junto con esto, observamos un aumento en la utilización de aminoácidos y ácidos carboxílicos en Achao, y de carbohidratos en Coliumo. Esto concuerda con lo reportado por Garces *et al.* 2020 al exponer a la comunidad microbiana planctónica a azametifos. Los aminoácidos y ácidos carboxílicos son parte del *pool* lábil de materia orgánica y son fuentes

importantes de C y N para el bacterioplancton (Obornosterer *et al.*, 1999; Pullin *et al.*, 2004), lo que sugiere que la exposición a compuestos químicos como la EQ puede influir en la utilización de sustratos “más fáciles” de incorporar para la comunidad. Además, se observó una disminución de la riqueza y diversidad de sustratos utilizados cuando la comunidad fue expuesta EQ, indicando que puede limitar el espectro de sustratos de C utilizados por la comunidad microbiana.

Es importante tener en cuenta que diversos compuestos químicos pueden afectar la composición de la comunidad microbiana, generando la prevalencia de ciertos grupos que puedan adaptarse o eventualmente beneficiarse de la presencia del compuesto, y la reducción de otros, afectando la diversidad de la comunidad y en consecuencia la función del ecosistema (Joye *et al.*, 2014; Johnston *et al.* 2015; Pringault *et al.* 2016 y 2021). Nuestro estudio comprobó que la comunidad microbiana activa en Achao cambia en respuesta a la adición de EQ, afectando negativamente a Alphaproteobacteria, mientras que Bacteroidia y Gammaproteobacterias fueron favorecidas, con diferencias en el tiempo. *NS10 marine group* (Cryomorpaceae/ Bacteroidia) y *NS2b marine group* (Flavobacteriaceae/Bacteroidia) fueron favorecidos por la adición de EQ, ambos se conocen por responder rápido a materia orgánica derivada de *blooms* (Buchan *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2019). Así como se observó que la menor concentración de EQ genero estímulos en la actividad metabólica (respiración, LAP) y en la utilización de sustratos (AWCD), también observamos que algunos ASV como ASV38, Formosa y *Ulvibacter* (Flavobacteriaceae) fueron favorecidas en la concentración más baja de EQ, lo que podría estar relacionado. Otros grupos predominantes que respondieron positivamente a la adición de EQ fueron Gammaproteobacteria (*KI89A*) y la archaea MGII (Thermoplasmata, *Ca. Poseidionales*). Se ha reportado que *KI89A* responde rápidamente en experimentos de remineralización de DOM y de enriquecimiento con amonio (Stephens *et al.*, 2020; Goldberg *et al.*, 2017), posiblemente asociado con su elevada utilización de proteínas (Orsi *et al.*, 2016). Mientras que MGII representa al grupo de arqueas más abundante en aguas superficiales del océano (Rinke *et al.*, 2019) y se le atribuye en general un estilo de vida proteolítico, dado por una variedad de peptidasas y de genes involucrados en las vías de degradación de aminoácidos (Rinke *et al.*, 2019), lo que se condice con la mayor actividad de LAP y la utilización de sustratos (aminoácidos) en presencia de EQ. En contraste,

la actividad potencial de *Planktomarina* (Alphaproteobacteria) fue afectada negativamente por la adición de EQ. *Planktomarina* es una bacteria fotoheterótrofa del grupo Roseobacter, el cual constituye sobre un 35% del bacterioplancton marino (Marques *et al.*, 2020) y juegan un rol importante en la degradación de materia orgánica derivada del fitoplancton (Selje *et al.*, 2004; Zhou *et al.*, 2018). La disminución en la actividad potencial de este taxon podría relacionarse a la capacidad de EQ de inhibir la actividad específica de  $\beta$ -GLU y LIP (Figs. 6 a y 7 a, sección Resultados, Capítulo 3).

Los cambios positivos en bacterias y arqueas activas en respuesta a EQ fueron consistentes con los cambios metabólicos observados, como la tasa de respiración (Fig. 4 a; sección resultados, Capítulo 3), la actividad específica de LAP (Fig. 5 a; sección Resultados, Capítulo 3) y la acumulación de amonio y nitrato (Tabla 2; sección Resultados, Capítulo 3). Los taxones heterotróficos oportunistas o aquellos que responden rápido a DOM fueron evidentes durante las primeras horas de incubación. Estos cambios en la composición de la comunidad activa son consistentes con lo reportado para otros experimentos de microcosmos donde se han evaluado pesticidas. Por ejemplo, Widenfalk *et al.* (2008) reportó cambios en la composición comunitaria inducidos por los tratamientos de pesticidas en sedimentos de agua dulce, mientras que Muturi *et al.* (2017) observó que 5 pesticidas y sus mezclas pueden reducir la diversidad y alterar la estructura comunitaria acuática.

En el sur de Chile se han detectado varios pesticidas en las cercanías de los centros de cultivo de salmones (Tucca *et al.*, 2018; Quiñones *et al.*, 2019) y en general los ensayos ecotoxicológicos se realizan utilizando organismos estandarizados, de niveles superiores (metazoa; e.g. *Daphnia*, pez cebra) a la microbiota natural y que no necesariamente habitan en el ecosistema de fiordos y canales de la Patagonia. El conocimiento de los efectos de compuestos químicos usados en la salmonicultura sobre organismos no objetivos ha incrementado en los últimos años con respuestas variables. Rain-Franco *et al.* (2018) y Valdés-Castro y Fernández (2021) evaluaron el efecto de pesticidas en la producción primaria (asimilación de C y N), encontrando variabilidad estacional y espacial. Garces *et al.* (2020) analizó el efecto de azametifos en el metabolismo microbiano observando alta degradación del pesticida, una estimulación de la remineralización de materia orgánica y una alta utilización de carbohidratos,

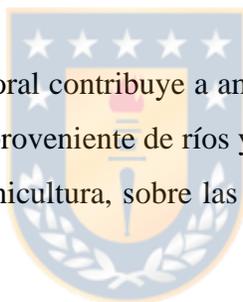
aminoácidos y ácidos carboxílicos. Nuestro estudio muestra que la respuesta metabólica de la comunidad microbiana expuesta a la adición de EQ varía dependiendo de la concentración, del sitio de estudio y del potencial inherente de la composición comunitaria de la zona de estudio. En algunos casos, el efecto incluso puede ser indirecto, a través de metabolitos o productos de transformación, los que a su vez pueden ser potenciales sustratos para los grupos microbianos. En consecuencia, la importancia de evaluar el impacto de los distintos compuestos químicos utilizados en las actividades humanas sobre la comunidad microbiana natural queda en evidencia, ya que estos efectos no necesariamente implican muerte/disminución del potencial metabólico directamente, sino la eventual utilización de los compuestos y/o la estimulación de procesos, dada la plasticidad metabólica de los microorganismos como componentes claves de los ciclos biogeoquímicos globales.

Finalmente, en el océano los aminoácidos y proteínas se consideran sustratos altamente lábiles que sostienen una alta proporción de la producción microbiana (Nagata 2008), así como de AEE (Hoppe *et al.*, 2002). La producción primaria es considerada la principal fuente de DOM lábil de origen autóctono (Azam *et al.*, 1983; Duclow *et al.*, 1995; Aristegui *et al.*, 2005; Azam y Malfatti, 2007) y en sistemas costeros se ha observado una mayor tasa de AEE asociada a *blooms* fitoplanctónicos (Gutiérrez *et al.*, 2011; Pantoja *et al.*, 2011; Li *et al.* 2019). En esta tesis doctoral se ha observado que en sistemas oligotróficos la influencia de DOM alóctona proveniente de ríos es un sustrato lábil, caracterizado por un mayor DI, sosteniendo una alta producción bacteriana y respiración comunitaria (González *et al.*, 2019: sección Resultados, Capítulo 1). Por otra parte, nuestros resultados reflejan que la DOM derivada de la acuicultura, genera una señal biogeoquímica en las cercanías de los cultivos de salmones y mitílicos, indicando que, en particular la salmonicultura, es una fuente de DOM biodisponible, especialmente proveniente de fecas de salmónidos, sosteniendo altas tasas metabólicas de la comunidad microbiana en la columna de agua. Esto puede tener implicancias en el ciclo de C, N y P a nivel local, por ejemplo, mayores tasas de respiración generan un mayor consumo de oxígeno en la columna de agua, lo cual puede resultar en un aumento de riesgo de hipoxia asociado a la salmonicultura, como se ha sugerido para otras zonas influenciadas por la

acuicultura como el fiordo Puyuhuapi (Schneider *et al.*, 2014; Silva y Vargas, 2014; Pérez-Santos, 2017). Estos resultados sustentan y amplían lo observado por otros autores como Nimptsch *et al.* (2015), Kamjunke *et al.* (2017) y Montero *et al.* (2022) sugiriendo una excepción respecto a la visión tradicional de la producción fitoplanctónica como fuente primaria de DOM lábil (del Giorgia y Davis 2003) y principal sustento de la actividad heterotrófica microbiana (Cole *et al.* 1982; Azam *et al.*, 1983) para áreas oligotróficas influenciadas por ríos (González *et al.* 2019; Capítulo 1 de esta Tesis) y para sistemas fuertemente influenciados por la acuicultura (Montero *et al.* 2022; González *et al. in prep.*; Capítulo 2 de esta Tesis)

La presente investigación demuestra por primera vez que EQ puede influir en la capacidad de degradación de materia orgánica de la comunidad microbiana, produciendo cambios en la actividad de algunos grupos funcionales, por lo que hipotetizamos que la adición crónica de EQ podría generar efectos a largo plazo en el metabolismo y diversidad de las comunidades microbianas en áreas con significativa presencia de salmonicultura (González *et al.*, submitted; Capítulo 3 de esta tesis).

En consecuencia, esta tesis doctoral contribuye a ampliar la comprensión del impacto de la materia orgánica disuelta alóctona proveniente de ríos y de la acuicultura, así como de aditivos alimentarios utilizados en la salmonicultura, sobre las comunidades microbianas planctónicas en ecosistemas marinos.



## 6.- CONCLUSIONES

1.- Una alta producción bacteriana y respiración comunitaria, junto a características específicas de la materia orgánica disuelta en aguas de baja salinidad (LSW), ocurren paralelamente a una baja producción comunitaria neta en el Mar Mediterráneo NO. Esto sugiere que LSW contiene materia orgánica disuelta biodisponible alóctona, representando un mecanismo de suministro de DOM lábil que sostiene una alta actividad heterotrófica costa afuera del Mar Mediterráneo NO. **(Objetivo 1: se acepta Hipótesis 1).**

2.- Las áreas cercanas al cultivo de salmónidos y mitílidos presentan una señal biogeoquímica en la columna de agua, caracterizada por mayores concentraciones de nitrógeno y fósforo orgánico disueltos, amonio, mayor abundancia picoplanctónica y mayor actividad metabólica microbiana (MDH). Estas características son más acentuadas en las cercanías de los centros de cultivo de salmónidos.

3.- La materia orgánica disuelta en las cercanías de los centros de cultivo, particularmente de salmónes, se caracterizó por ser más biodisponible que el de las áreas circundantes **(Objetivo 2: se acepta Hipótesis 1)**; sin embargo, este estudio no discriminó otras posibles fuentes de materia orgánica lábil en áreas lejanas a los centros de cultivo.

4.- La DOM derivada de la salmonicultura incrementa las tasas de actividad específica de la MDH, respiración específica y actividad enzimática extracelular específica (especialmente la de leucina-aminopeptidasa) de la comunidad microbiana, con efectos diferenciales en el metabolismo según su origen, sugiriendo que la materia orgánica disuelta de fecas es más biodisponible, generando respuestas más rápidas y de mayor magnitud en las tasas metabólicas de la comunidad microbiana planctónica marina. **(Objetivo 2; se rechaza las Hipótesis 2 y 3)**

5.- La adición de Etoxiquina incrementa el consumo de oxígeno en la fracción de tamaño <1µm, mientras que la respiración de la comunidad total disminuye. La respuesta de la actividad

específica de MDH fue variable, con un efecto negativo general, pero con una estimulación de la fracción menor hacia el final del experimento o con la concentración menor de EQ. Sugiriendo un efecto diferencial según la fracción de la comunidad evaluada. **(Objetivo 3: se acepta Hipótesis 1** tomando en cuenta la comunidad total. Sin embargo, la comunidad bacterioplanctónica (fracción  $<1\mu\text{m}$ ) no sigue este patrón, sino que por el contrario es estimulada).

6.- La degradación de compuestos nitrogenados en la fracción de tamaño  $<1\mu\text{m}$  incrementa en presencia de EQ, mientras que la capacidad de degradar carbohidratos y lípidos de la comunidad total disminuye, sugiriendo una degradación diferencial de la materia orgánica y dejando potencialmente mayor nitrógeno disponible en el ambiente.

7.- La utilización de sustratos fue variable, disminuyendo en los tratamientos de 100 y 1000  $\mu\text{g L}^{-1}$  EQ, lo que sugiere que altas concentraciones de EQ puede limitar la capacidad de procesar distintas fuentes de carbono, generando una preferencia por aminoácidos y ácidos carboxílicos en una etapa temprana del experimento. En áreas sin influencia de la acuicultura, EQ puede estimular el uso de carbohidratos. **(Objetivo 3: se rechaza Hipótesis 2)**

8.- La composición de la comunidad microbiana evidencia cambios con la adición de EQ, incluyendo la pérdida de diversidad. La adición de EQ generó cambios en taxones marinos predominantes, estimulando la actividad de microorganismos asociados con compuestos nitrogenados como *KI89A* y la archaea *MGII*. **(Objetivo 3: se acepta Hipótesis 3)**

## 7.-REFERENCIAS

- Alef, K. (1995). "Dehydrogenase activity." *Methods in applied soil microbiology and biochemistry*: 228-231.
- Amon, R. M. and R. Benner (1994). "Rapid cycling of high-molecular-weight dissolved organic matter in the ocean." *Nature* 369(6481): 549.
- Arnosti, C. (2011). "Microbial extracellular enzymes and the marine carbon cycle." *Annual review of marine science* 3: 401-425
- Biddanda, B., M. Ogdahl and J. Cotner (2001). "Dominance of bacterial metabolism in oligotrophic relative to eutrophic waters." *Limnology and Oceanography* 46(3): 730-739.
- Codispoti, L. A. (2005). "Suboxic respiration in the oceanic water column." *Respiration in aquatic ecosystems*: 225-247.
- Cole, J. J., Findlay, S., and Pace, M. L. (1988). Bacterial production in fresh and saltwater ecosystems: a cross-system overview. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 43, 1–10.
- Cornejo, P., Sepúlveda, H.H., Gutiérrez, M.H., Olivares, G., 2014. Numerical studies on the hydrodynamic effects of a salmon farm in an idealized environment. *Aquaculture* 430, 195–206. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.04.015>
- Cowie, G. L. and J. I. Hedges (1994). "Biochemical indicators of diagenetic alteration in natural organic matter mixtures." *Nature* 369(6478): 304.
- del Giorgio, P. A. and C. M. Duarte (2002). "Respiration in the open ocean." *Nature* 420(6914): 379-384.
- del Giorgio, P. A., and Davis, J. (2003). "Patterns in dissolved organic matter lability and consumption across aquatic ecosystems," in *Aquatic Ecosystems*, eds S. E. G. Finlay and R. L. Sinsabaugh (San Diego, CA: Academic Press), 399–424. doi: 10.1016/b978-012256371-3/50018-4
- del Giorgio, P. A. and P. J. I. B. Williams (2005). *Respiration in aquatic ecosystems*, Oxford University Press, USA.
- Duursma, E. K. (1963). "The production of dissolved organic matter in the sea, as related to the primary gross production of organic matter." *Netherlands Journal of Sea Research* 2(1): 85-94.
- Eissler, Y., & R. A. Quiñones. 1999. Microplanktonic respiration off northern Chile during El Niño 1997-1998. *J. Plankton Res.* 21: 2263-2283
- Eppley, R., E. Stewart, M. Abbott and R. Owen (1987). "Estimating ocean production from satellite-derived chlorophyll: insights from the Eastropac data set." *Oceanologica Acta*, Special issue.
- Fasham, M., B. Balino and M. Bowles (2001). "A new vision of ocean biogeochemistry after a decade of the Joint Global Ocean Flux Study (JGOFS)."
- FAO. 2020. El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2020. La sostenibilidad en acción. Roma. <https://doi.org/10.4060/ca9229es>
- Hansell, D.A., and C.A. Carlson. 2002. *Biogeochemistry of Marine Dissolved Organic Matter*. Academic Press, San Diego, 774 pp.
- Hansell, D.A., C.A. Carlson, D.J. Repeta, and R. Schlitzer. 2009. Dissolved organic matter in the ocean: A controversy stimulates new insights. *Oceanography* 22(4):202–211, <https://doi.org/10.5670/oceanog.2009.109>.

- Hansell, D. A. and C. A. Carlson (2015). *Biogeochemistry of marine dissolved organic matter*, Academic Press.
- Hargrave BT, Duplisea DE, Pfeiffer E, Wildish DJ (1993) Seasonal changes in benthic fluxes of dissolved oxygen and ammonium associated with marine cultured Atlantic salmon. *Marine Ecology Progress Series* 96: 249–257.
- Hedges J. I., R.G. Keil, R. Benner. 1997. What happens to terrestrial organic matter in the ocean? *Organic Geochemistry* 27, Issues 5–6:195-212.
- Hobbie, J. E., R. J. Daley and S. Jasper (1977). "Use of nuclepore filters for counting bacteria by fluorescence microscopy." *Applied and environmental microbiology* 33(5): 1225-1228.
- Hodson, A., Anesio, A. M., Tranter, M., Fountain, A., Osborn, M., Prisco, J., et al. (2008). Glacial ecosystems. *Ecol. Monogr.* 78, 41–67.
- Hood, E., Fellman, J., Spencer, R. G. M., Hernes, P. J., Edwards, R., D'Amore, D., et al. (2009). Glaciers as a source of ancient and labile organic matter to the marine environment. *Nature* 462, 1044–1104. doi: 10.1038/nature08580
- Hoppe, H. G. (1991). Microbial extracellular enzyme activity: a new key parameter in aquatic ecology. In *Microbial enzymes in aquatic environments* (pp. 60-83). Springer, New York, NY.
- Herrera, J., Cornejo, P., Sepúlveda, H. H., Artal, O., & Quiñones, R. A. (2018). A novel approach to assess the hydrodynamic effects of a salmon farm in a Patagonian channel: coupling between regional ocean modeling and high resolution les simulation. *Aquaculture*, 495, 115-129.
- Jahnsen-Guzmán, N., Lagos, N. A., Lardies, M. A., Vargas, C. A., Fernández, C., San Martín, V. A., ... & Duarte, C. (2021). Environmental refuges increase performance of juvenile mussels *Mytilus chilensis*: implications for mussel seedling and farming strategies. *Science of The Total Environment*, 751, 141723.
- Jara B. (2021). Fate and impact of antibiotics and pesticides used in marine aquaculture: an emergent threat to the coastal ocean. Doctoral thesis, Sorbonne Université (France); Universidad de Concepción (Chile).
- Johnston, E. L., Mayer-Pinto, M., & Crowe, T. P. (2015). Chemical contaminant effects on marine ecosystem functioning. *Journal of Applied Ecology*, 52(1), 140-149.
- Joye, S. B., Teske, A. P., & Kostka, J. E. (2014). Microbial dynamics following the Macondo oil well blowout across Gulf of Mexico environments. *Bioscience*, 64(9), 766-777.
- Kirchman, D. (2008). "Microbial ecology of the oceans."
- Kirchman, D. L. (2012). *Processes in microbial ecology*, Oxford University Press.
- Klinger, D., & Naylor, R. (2012). Searching for solutions in aquaculture: charting a sustainable course. *Annual Review of Environment and Resources*, 37(1), 247-276.
- Li, Y., Sun, L. L., Sun, Y. Y., Cha, Q. Q., Li, C. Y., Zhao, D. L., ... & Qin, Q. L. (2019). Extracellular enzyme activity and its implications for organic matter cycling in northern Chinese marginal seas. *Frontiers in microbiology*, 10, 2137.
- Longhurst, A. R. (2010). *Ecological geography of the sea*, Elsevier.
- Martin, A. P., M. V. Zubkov, P. H. Burkill and R. J. Holland (2005). "Extreme spatial variability in marine picoplankton and its consequences for interpreting Eulerian time-series." *Biology Letters* 1(3): 366-369.

- Maroni, K. (2000). Monitoring and regulation of marine aquaculture in Norway. *Journal of Applied Ichthyology*, 16(4-5), 192-195.
- Middelboe, M. and N. O. Jørgensen (2006). "Viral lysis of bacteria: an important source of dissolved amino acids and cell wall compounds." *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 86(03): 605-612.
- Montero, P., Daneri, G., Cuevas, L. A., González, H. E., Jacob, B., Lizárraga, L., et al. (2007). Productivity cycles in the coastal upwelling area of Concepción: the importance of diatoms and bacterioplankton in the organic carbon flux. *Prog. Oceanogr.* 75, 518–530. doi: 10.1016/j.pocean.2007.08.013
- Mopper, K. and P. Lindroth (1982). "Diel and depth variations in dissolved free amino acids and ammonium in the Baltic Sea determined by shipboard HPLC analysis1." *Limnology and Oceanography* 27(2): 336-347.
- Owens, T. G. and King, F. D. (1975) The measurement of respiratory electron transport system activity in marine zooplankton. *Mar. Biol.*, 30, 27–36.
- Packard, T. T. (1971) The measurement of respiratory electron-transport activity in marine phytoplankton. *J. Mar. Res.*, 29, 235–244.
- Parinkina, O., N. Klyuyuva and L. Petrova (1994). "Biological activity and effective fertility of soil." *Eurasian soil science* 26(4): 73-82.
- Pringault, O., Lafabrie, C., Avezac, M., Bancon-Montigny, C., Carre, C., Chalghaf, M., ... & Bouvy, M. (2016). Consequences of contaminant mixture on the dynamics and functional diversity of bacterioplankton in a southwestern Mediterranean coastal ecosystem. *Chemosphere*, 144, 1060-1073.
- Pringault, O., Bouvy, M., Carre, C., Mejri, K., Bancon-Montigny, C., Gonzalez, C., ... & Goni-Urriza, M. (2021). Chemical contamination alters the interactions between bacteria and phytoplankton. *Chemosphere*, 278, 130457.
- Robinson, C. (2008). Heterotrophic bacterial respiration. *Microbial Ecology of the Oceans*, Second Edition. D. L. Kirchman, John Wiley & Sons, nc.: 299-334.
- Rodehutsord, M., Gregus, Z., & Pfeffer, E. (2000). Effect of phosphorus intake on faecal and non-faecal phosphorus excretion in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and the consequences for comparative phosphorus availability studies. *Aquaculture*, 188(3-4), 383-398
- Salazar, L., & Dresdner, J. (2022). Do Chilean imports lead prices in the EU mussel market? *Aquaculture Economics & Management*, 1-1
- Sakami, T., Abo, K., Takayanagi, K., & Toda, S. (2003). Effects of water mass exchange on bacterial communities in an aquaculture area during summer. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 56(1), 111-118.
- Sipler, R. and D. Bronk (2015). Dynamics of Dissolved Organic Nitrogen. *Biogeochemistry of Marine Dissolved Organic Matter*, Second Edition, Academic Press Boston: 127-232.
- Skujinš, J. (1973). "Dehydrogenase: an indicator of biological activities in arid soils." *Bulletins from the Ecological Research Committee* (17): 235-241.
- Staehr, P. A., J. M. Testa, W. M. Kemp, J. J. Cole, K. Sand-Jensen and S. V. Smith (2012). "The metabolism of aquatic ecosystems: history, applications, and future challenges." *Aquatic Sciences* 74(1): 15-29.

- Steinberg, D. and G. Saba (2008). "Nitrogen consumption and metabolism in marine zooplankton." *Nitrogen in the marine environment* 2: 1135-1196.
- Søndergaard, M., & Middelboe, M. (1995). A cross-system analysis of labile dissolved organic carbon. *Marine ecology progress series*. Oldendorf, 118(1), 283-294.
- Tacon, A. G. J., Hasan, M. R., Allan, G., El-Sayed, A. F., Jackson, A., Kaushik, S. J., ... & Viana, M. T. (2010, September). Aquaculture feeds: addressing the long-term sustainability of the sector. In *Proceedings of the global conference on aquaculture* (pp. 193-231).
- Valdés-Castro Valentina and Camila Fernandez (2021). Effect of three pesticides used in salmon farming on ammonium uptake in central-southern and northern Patagonia, Chile. *Frontiers in Marine Science*, *Frontiers Media*, 2021, 10.3389/fmars.2020.602002
- Venayagamoorthy, S.K., Ku, H., Fringer, O.B., Chiu, A., Naylor, R.L., Koseff, J.R., 2011. Numerical modeling of aquaculture dissolved waste transport in a coastal embayment. *Environ. Fluid Mech.* 11, 329–352. <http://dx.doi.org/10.1007/s10652-011-9209-0>.
- Williams, P. J. L. (1984). "A review of measurements of respiration rates of marine plankton populations." *Heterotrophic activity in the sea*: 357-389.
- Whitman, W. B., D. C. Coleman and W. J. Wiebe (1998). "Prokaryotes: the unseen majority." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95(12): 6578-6583.
- Winkler, L. W. and R. C. Whaley (1888). The determination of dissolved oxygen in water.



## 8.- ANEXOS

### 8.1 Anexo 1

Supplementary material for

## **Seasonal freshening of NW Mediterranean surface water impacts heterotrophic microbial activity and dissolved organic matter**

**Maria-Lorena Gonzalez<sup>a,b</sup>, Stéphane Blain<sup>c</sup> and Ingrid Obernosterer<sup>c</sup>**

<sup>a</sup> Graduate Program in Oceanography, Department of Oceanography, Faculty of Natural Sciences and Oceanography, University of Concepcion, P.O. Box 160-C, Concepcion, Chile.

<sup>b</sup> Interdisciplinary Center for Aquaculture Research (INCAR), University of Concepcion, O'Higgins 1695, Concepcion, Chile

<sup>c</sup> CNRS. Sorbonne Université, Laboratoire d'Océanographie Microbienne (LOMIC), Observatoire Océanologique. F-66650, Banyuls/mer, France

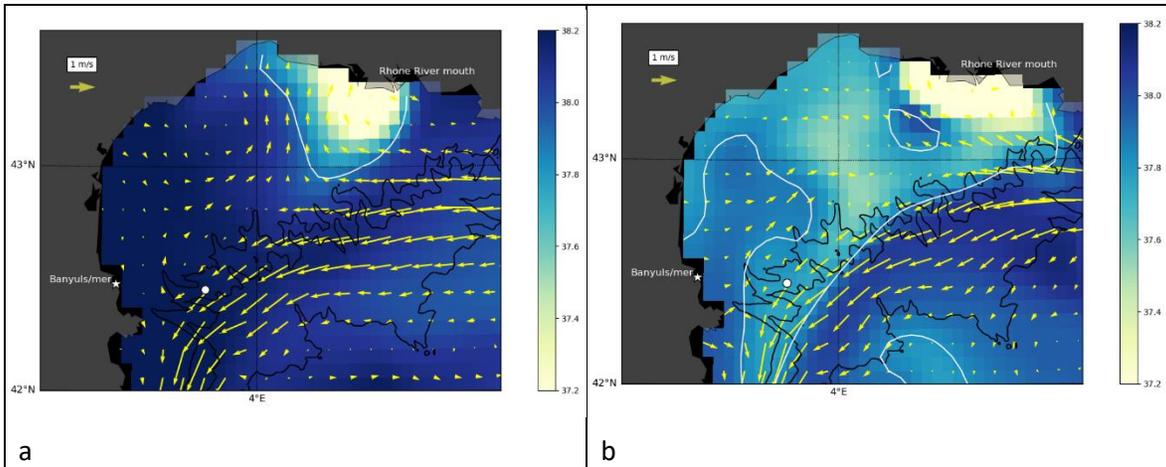
### **Contents of this file**

Figures S1 to S6

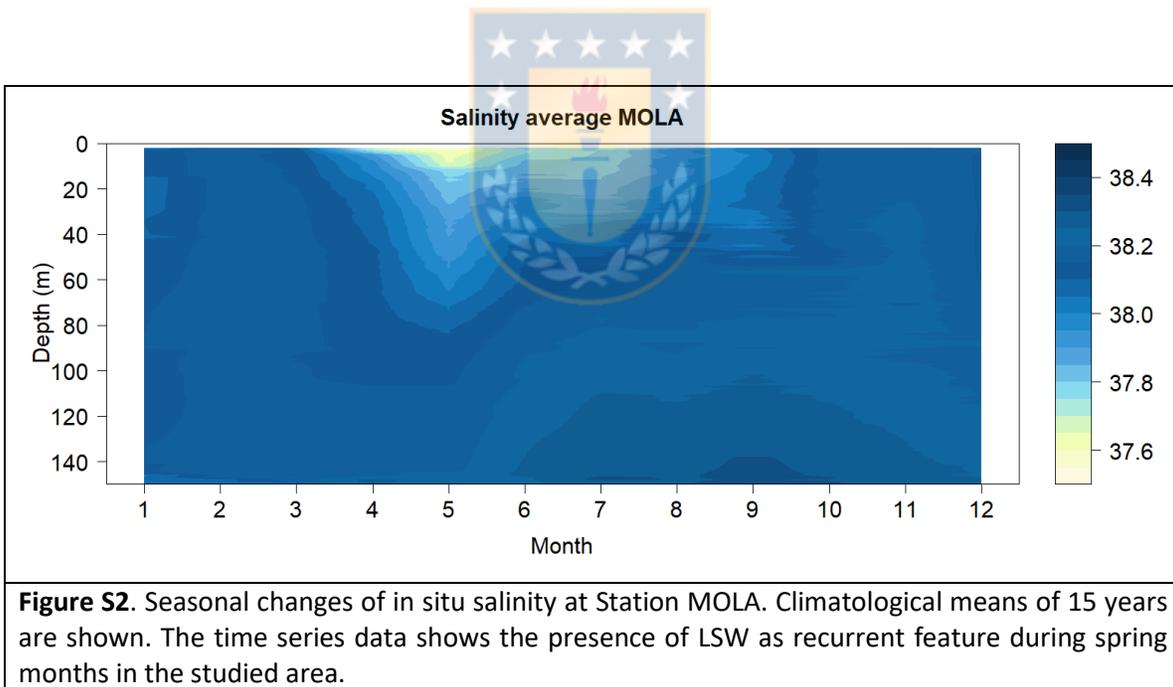
Tables S1

### **Introduction**

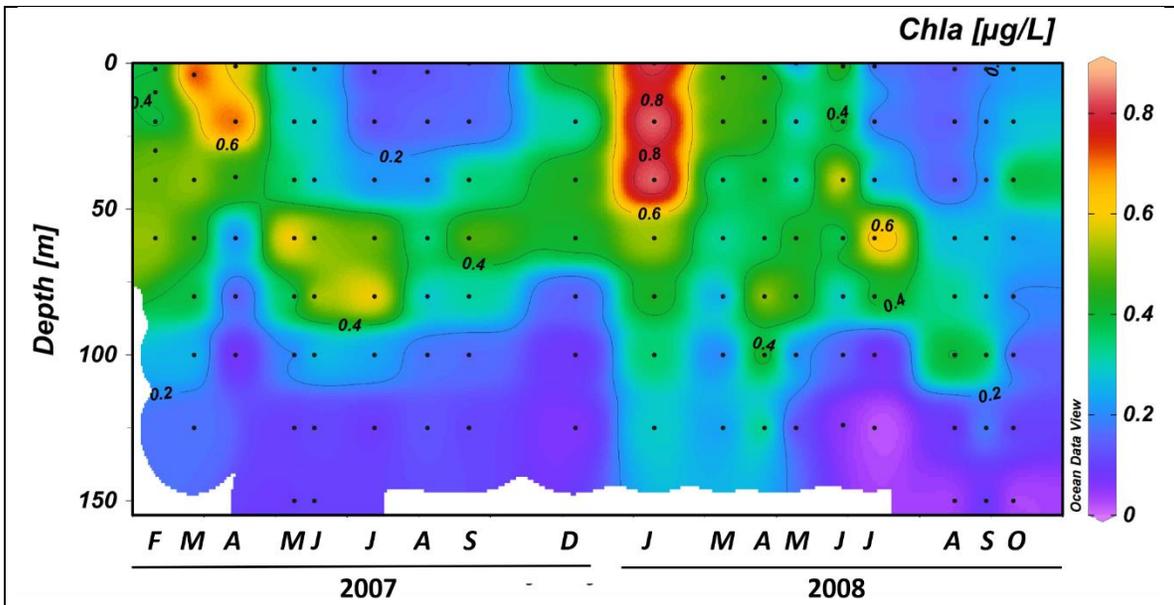
This supporting information provides figures as seen in the main article but for the 2007 year of this study (Fig. S1 and S5), also provides an overview of salinity during 15 years at the site of study (Fig. S2), the monthly values for Chlorophyll-a (Fig. S3) and Density (Fig. S4), a Principal Component Analysis of the oceanographic variables, characteristics of DOM and microbial activity during the two years survey (Fig. S6), and a table with the features of water column within and below of mixed layer for each date of sampling (Table S1).



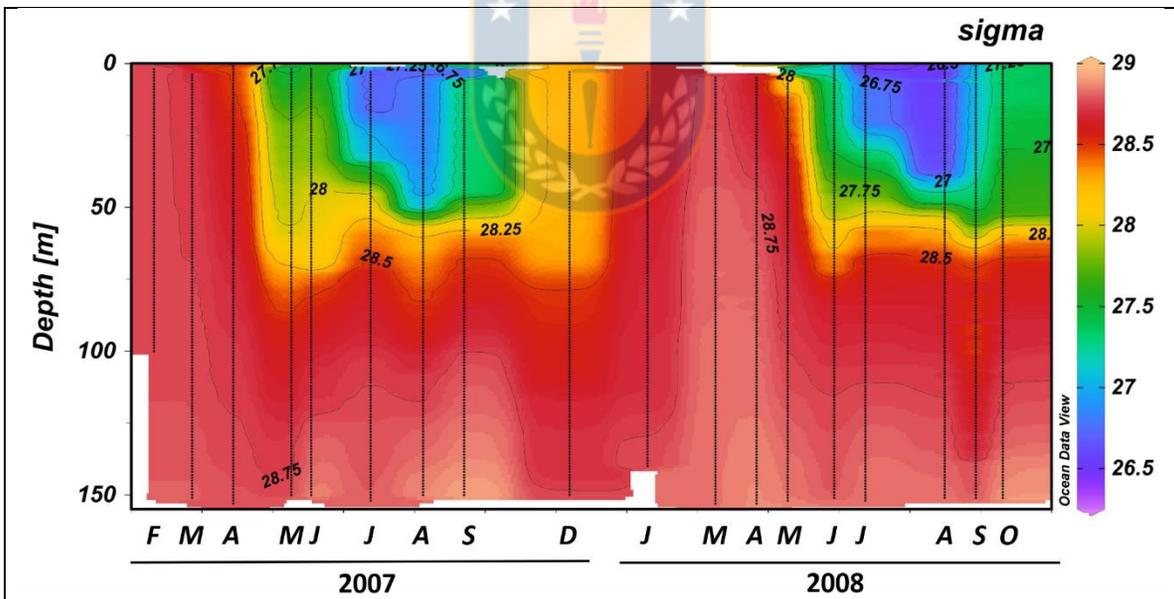
**Figure S1.** Spatial and temporal distribution of salinity in the Gulf of Lion (NW Mediterranean Sea). Mean monthly surface salinity (4 km x 4 km) for February 2007 (left panel/a) and May 2007 (right panel/b). Surface salinity distributions are provided by a circulation model overlaid with current speed and directions (yellow arrows), derived from altimetry for the date of sampling at Station MOLA (indicated by a white dot). Black lines represent isobaths (500 m, 1000 m and 2000 m). The white line denotes salinity of 37.85.



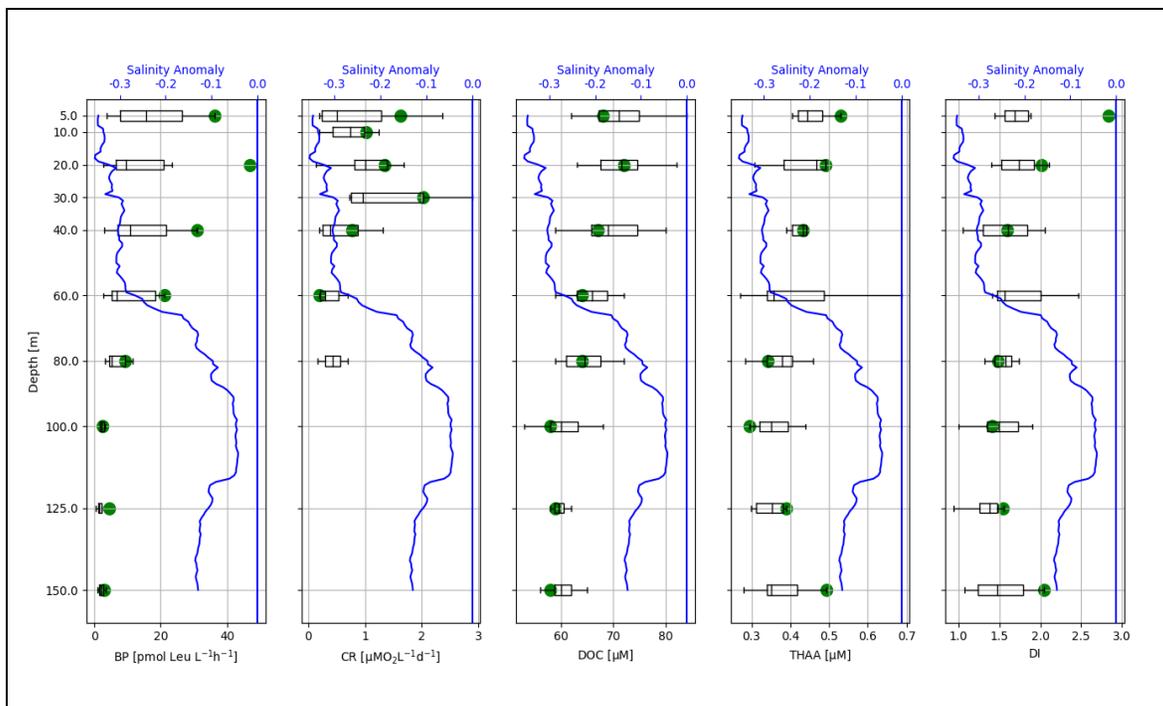
**Figure S2.** Seasonal changes of in situ salinity at Station MOLA. Climatological means of 15 years are shown. The time series data shows the presence of LSW as recurrent feature during spring months in the studied area.



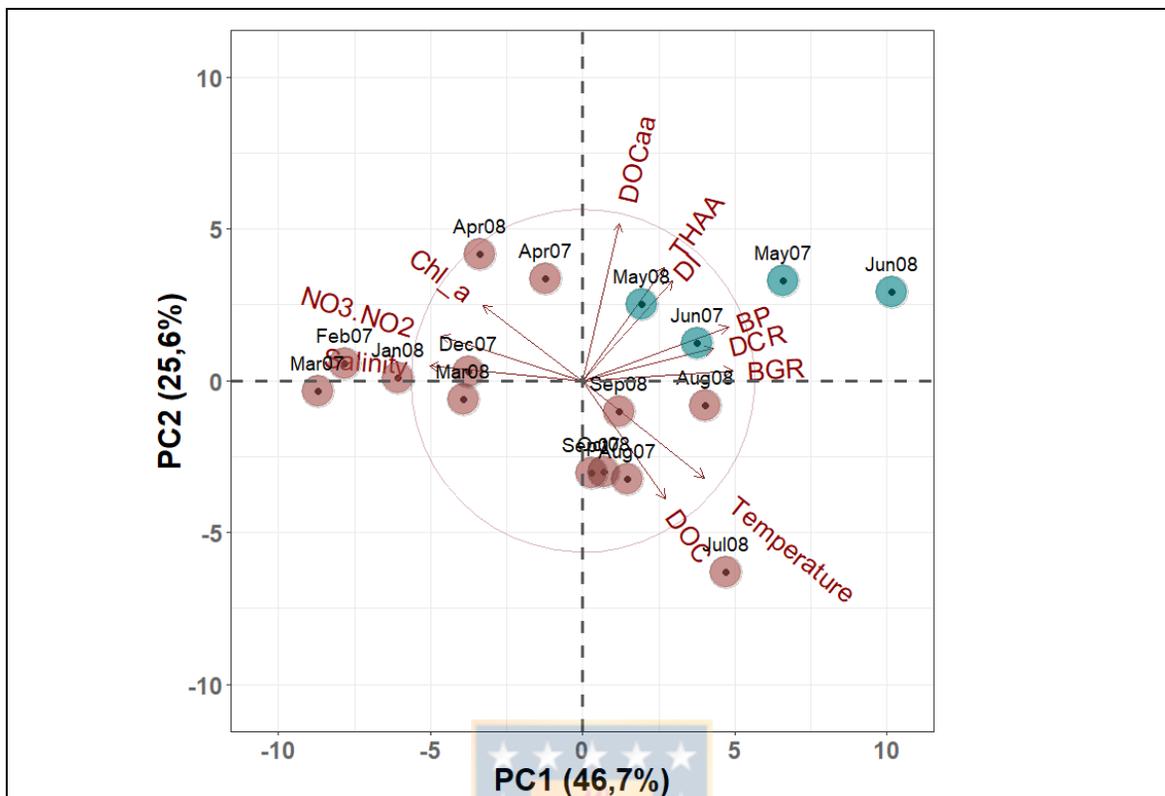
**Figure S3.** Seasonal changes of Chlorophyll-a concentration at Station MOLA. The time series data shows monthly values for the 2 year survey.



**Figure S4.** Seasonal changes of density (sigma) at Station MOLA. The time series data shows monthly values for the 2 year survey.



**Figure S5.** Depth profiles of salinity anomaly (blue line), microbial activity and DOM characteristics (box plots) at Station MOLA for the year 2007. The black lines across the boxes represent the median annual values. The ends of the boxes define the 25<sup>th</sup> and 75<sup>th</sup> percentile and the error bars represent the 10<sup>th</sup> and 90<sup>th</sup> percentiles. Dots represent the individual value for the date for which the salinity anomaly is shown (May 22 2007). BP: Bacterial heterotrophic production ( $\text{pmol Leu L}^{-1} \text{h}^{-1}$ ), CR: Community Respiration ( $\mu\text{M O}_2 \text{L}^{-1} \text{d}^{-1}$ ), DOC: Dissolved Organic Carbon ( $\mu\text{M}$ ), THAA: Total Hydrolyzable Amino Acids ( $\mu\text{M}$ ), DI: Dauwe Degradation Index.



**Figure S6.** Principal Component Analysis (PCA) of environmental variables, features of DOM and microbial activity from surface waters at MOLA station. Dots represent each date of sampling during the 2 years survey, blue circles represent intense LSW for both years and vectors shows the variables that drives the ordination of dates. NO<sub>3</sub>.NO<sub>2</sub>: NO<sub>3</sub><sup>-</sup>+NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, Chl<sub>a</sub>: Chlorophyll-a, DOC<sub>aa</sub>: amino acid yields in percentage of DOC, THAA: Total Hydrolysable Amino Acids, DI: Dauwe Degradation Index, BP: Bacterial production, BGR – Bacterial growth rate, DCR: Dark Community Respiration, DOC: Dissolved Organic Carbon.

**Table S1.** Summary of environmental parameters during the monthly sampling at Station MOLA. Mean values  $\pm$ SD for the Mixed Layer (ML) and the depth layer below the ML are given. PLD - Photic Layer Depth (1% of surface PAR), BGR - Bacterial Growth Rate, N - number of depths considered for each depth layer, nd-not determined, bd- below detection.

Date	MLD (m)	PLD (m)		N	Temperature (°C)	Salinity	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> +NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (µM)	PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> (µM)	Chl a (µg L <sup>-1</sup> )	BGR (d <sup>-1</sup> )
Feb 14 2007	>100	61	Within MLD	6	13.57 $\pm$ 0.02	38.21 $\pm$ 0.001	1.29 $\pm$ 0.36	0.05 $\pm$ 0.01	0.45 $\pm$ 0.07	0.003 $\pm$ 0.001
			Below MLD	nd	Nd	nd	nd	nd	nd	n.d.
Mar 13 2007	70	56	Within MLD	4	13.63 $\pm$ 0.04	38.19 $\pm$ 0.003	1.41 $\pm$ 0.2	0.02 $\pm$ 0.01	0.58 $\pm$ 0.15	0.017 $\pm$ 0.003
			Below MLD	4	13.54 $\pm$ 0.02	38.22 $\pm$ 0.02	2.27 $\pm$ 0.77	0.06 $\pm$ 0.03	0.27 $\pm$ 0.12	0.036 $\pm$ 0.044
Apr 14 2007	19	56	Within MLD	2	14.28 $\pm$ 0.19	38.11 $\pm$ 0.004	0.1 $\pm$ 0.06	0.02 $\pm$ 0.007	0.65 $\pm$ 0.09	0.064 $\pm$ 0.015
			Below MLD	6	13.71 $\pm$ 0.12	38.18 $\pm$ 0.03	1.25 $\pm$ 0.45	0.01 $\pm$ 0.01	0.21 $\pm$ 0.17	0.023 $\pm$ 0.011
May 25 2007	17	63	Within MLD	2	17.16 $\pm$ 1.30	37.63 $\pm$ 0.01	0	0.04 $\pm$ 0-02	0.29 $\pm$ 0.01	0.172 $\pm$ 0.035
			Below MLD	6	14.56 $\pm$ 0.98	37.99 $\pm$ 0.20	1.39 $\pm$ 1.41	0.05 $\pm$ 0.02	0.28 $\pm$ 0.21	0.046 $\pm$ 0.032
Jun 5 2007	8	67	Within MLD	1	16.95	37.82	bd	bd	0.25	0.092
			Below MLD	7	14.71 $\pm$ 1.26	38.07 $\pm$ 0.20	2.12 $\pm$ 2.32	0.06 $\pm$ 0.06	0.30 $\pm$ 0.18	0.059 $\pm$ 0.045
Jul 17 2007	13	82	Within MLD	1	20.75	37.76	0.35	0.01	0.12	n.d.
			Below MLD	7	15.32 $\pm$ 2.54	38.09 $\pm$ 0.18	1.23 $\pm$ 1.51	0.02 $\pm$ 0.03	0.3 $\pm$ 0.21	n.d.
Aug 23 2007	30	80	Within MLD	2	20.75 $\pm$ 0.01	37.86 $\pm$ 0.001	0	0	0.14 $\pm$ 0.01	0.054 $\pm$ 0.021
			Below MLD	6	15.24 $\pm$ 2.68	38.12 $\pm$ 0.17	1.34 $\pm$ 2.1	0.04 $\pm$ 0.05	0.22 $\pm$ 0.08	0.042 $\pm$ 0.034
Sep 21 2007	45	74	Within MLD	3	18.58 $\pm$ 0.01	37.94 $\pm$ 0.01	0	0	0.22 $\pm$ 0.11	0.053 $\pm$ 0.006
			Below MLD	5	13.91 $\pm$ 0.63	38.22 $\pm$ 0.12	1.85 $\pm$ 2.56	0.003 $\pm$ 0.008	0.27 $\pm$ 0.17	0.036 $\pm$ 0.012
Dec 5 2007	68	66	Within MLD	4	15.27 $\pm$ 0.01	38.06 $\pm$ 0.01	0.50 $\pm$ 0.05	0	0.39 $\pm$ 0.06	0.026 $\pm$ 0.005
			Below MLD	4	14.15 $\pm$ 0.31	38.20 $\pm$ 0.06	3.38 $\pm$ 1.49	0.005 $\pm$ 0.01	0.1 $\pm$ 0.04	0.019 $\pm$ 0.006
Jan 29 2008	42	52	Within MLD	3	13.29 $\pm$ 0.02	37.93 $\pm$ 0.02	1.25 $\pm$ 0.04	0	0.84 $\pm$ 0.02	0.037 $\pm$ 0.004
			Below MLD	5	13.52 $\pm$ 0.06	38.13 $\pm$ 0.07	1.59 $\pm$ 0.8	0.02 $\pm$ 0.03	0.4 $\pm$ 0.1	0.024 $\pm$ 0.008
	38	62	Within MLD	3	12.98 $\pm$ 0.05	38.08 $\pm$ 0.03	1.16 $\pm$ 0.29	0.01 $\pm$ 0.01	0.42 $\pm$ 0.07	0.063 $\pm$ 0.022

Mar 17 2008			Below MLD	5	12.86 ± 0.10	38.11 ± 0.03	1.74 ± 0.13	0	0.24 ± 0.06	0.030 ± 0.005
Apr 16 2008	23	59	Within MLD	2	13.25 ± 0.04	38.03 ± 0.002	1.29 ± 0.07	0	0.47 ± 0.01	0.065 ± 0.014
			Below MLD	6	12.94 ± 0.03	38.13 ± 0.06	2.06 ± 0.63	0.02 ± 0.02	0.44 ± 0.08	0.079 ± 0.037
May 7 2008	10	72	Within MLD	1	14.91	37.70	0.65	0	0.22	0.077
			Below MLD	7	13.43 ± 0.31	38.10 ± 0.06	1.57 ± 0.63	0.01 ± 0.01	0.29 ± 0.14	0.039 ± 0.019
Jun 9 2008	8	59	Within MLD	1	17.74	37.51	0	0.03	0.48	0.260
			Below MLD	7	14.82 ± 1.78	37.96 ± 0.22	1.21 ± 1.21	0.04 ± 0.02	0.32 ± 0.2	0.104 ± 0.091
Jul 1 2008	8	80	Within MLD	1	21.22	37.55	0.01	0.02	0.14	0.158
			Below MLD	7	15.29 ± 2.67	38.06 ± 0.21	1.78 ± 2.09	0.06 ± 0.05	0.26 ± 0.25	0.053 ± 0.035
Aug 26 2008	12	83	Within MLD	1	21.73	37.85	0.04	0.02	0.14	0.070
			Below MLD	7	15.92 ± 3.52	38.10 ± 0.16	2.21 ± 2.37	0.07 ± 0.06	0.2 ± 0.14	0.052 ± 0.027
Sep 18 2008	30	76	Within MLD	2	19.72 ± 0.001	37.95 ± 0.07	0	0	0.2 ± 0.01	0.084 ± 0.001
			Below MLD	6	15.57 ± 2.27	38.10 ± 0.09	1.38 ± 1.75	0.02 ± 0.03	0.25 ± 0.11	0.049 ± 0.023
Oct 16 2008	15	69	Within MLD	1	18.37	37.92	0.1	0.03	0.40	0.095
			Below MLD	7	14.92 ± 1.81	38.10 ± 0.20	2.6 ± 2.59	0.08 ± 0.06	0.19 ± 0.14	0.046 ± 0.033

## 8.2. Anexo 2: Información suplementaria Capítulo 2

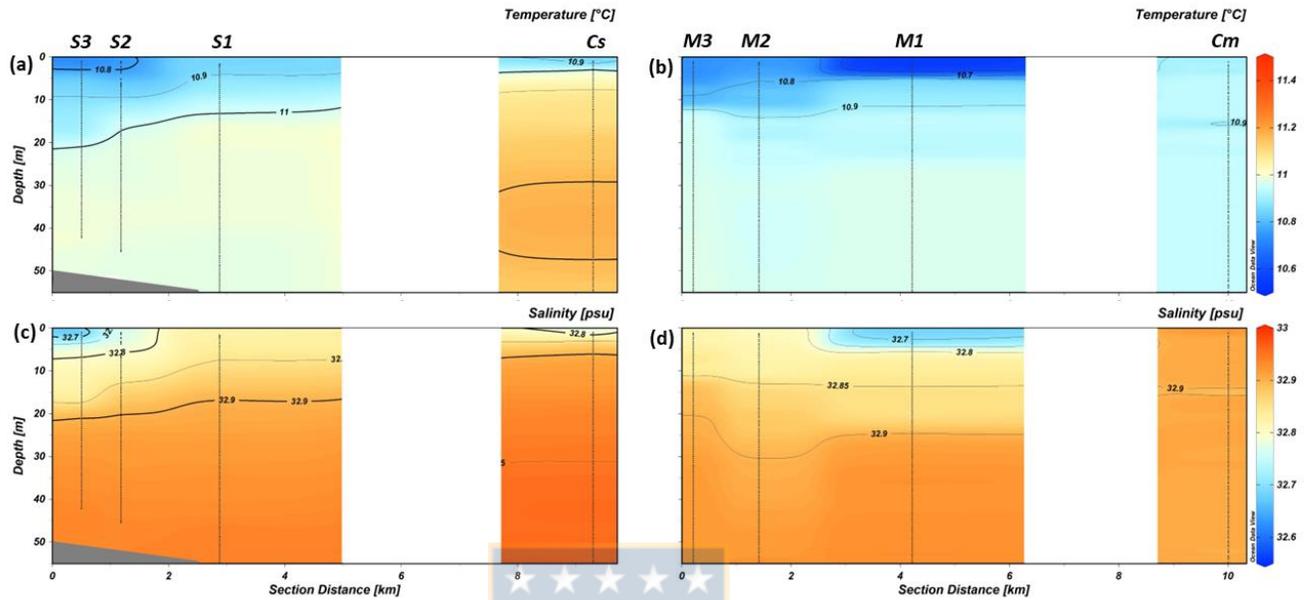


Fig. S1 Distribución de (a y b) temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ) y (c y d) salinidad a lo largo de ambas transectas en el canal Caucahué. Paneles izquierdos corresponden a transecta salmones (TS) y derechos a transecta mitílidos (TM).

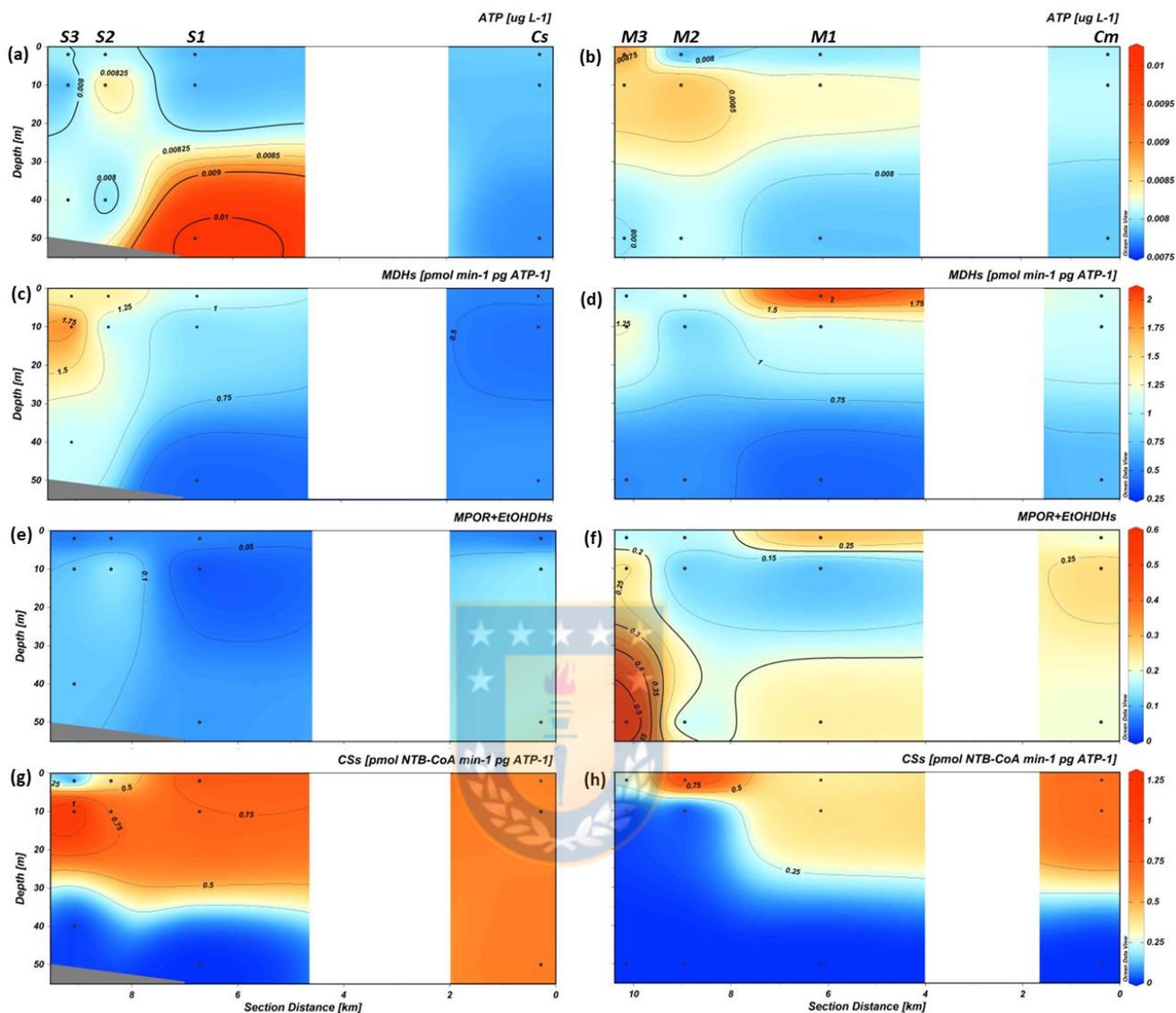


Fig. S2 Distribución de (a y b) biomasa (ATP;  $\mu\text{g L}^{-1}$ ), actividad específica de (c y d) MDH ( $\text{pmol min}^{-1} \text{pg ATP}^{-1}$ ), (e y f) MPOR ( $\text{pmol min}^{-1} \text{pg ATP}^{-1}$ ) y (g y h) CS ( $\text{pmol NTB-CoA min}^{-1} \text{pg ATP}^{-1}$ ) lo largo de ambas transectas. Paneles izquierdos corresponden a Transecta Salmones (TS) y derechos a Transecta Mitíldos (TM).

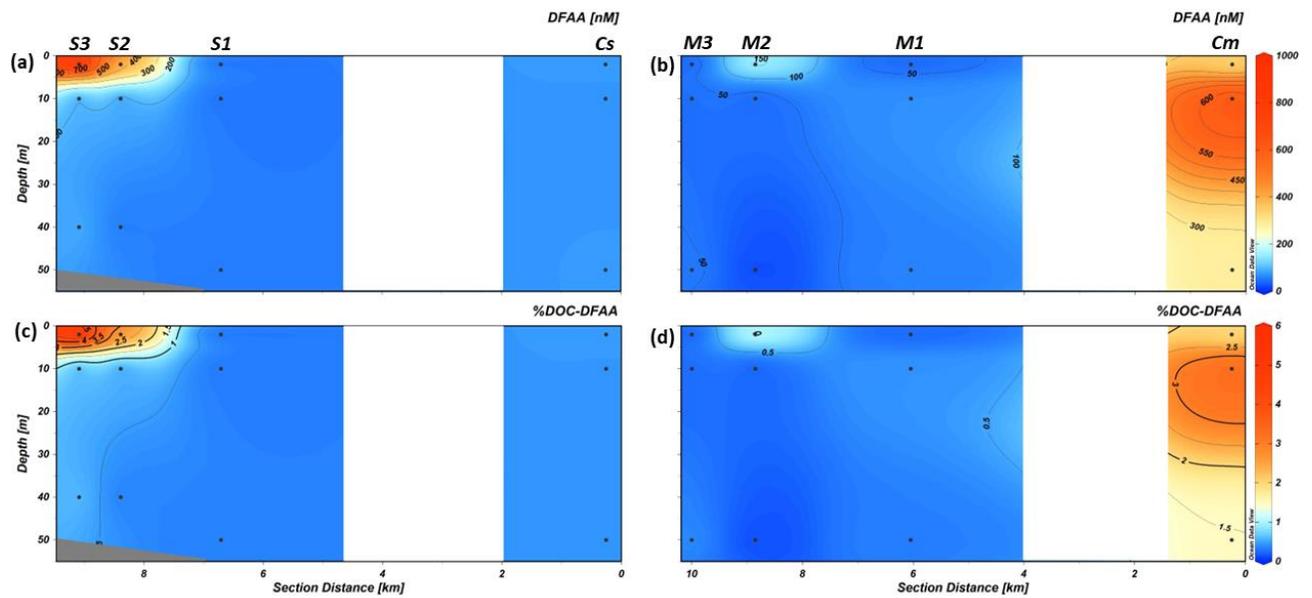
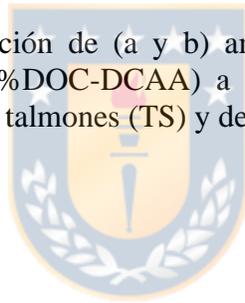


Fig. S3 Distribución de concentración de (a y b) aminoácidos disueltos libres (DFAA) y contribución de DFAA al DOC (%DOC-DCAA) a lo largo de ambas transectas. Paneles izquierdos corresponden a transecta talmones (TS) y derechos a transecta mitílidos (TM).



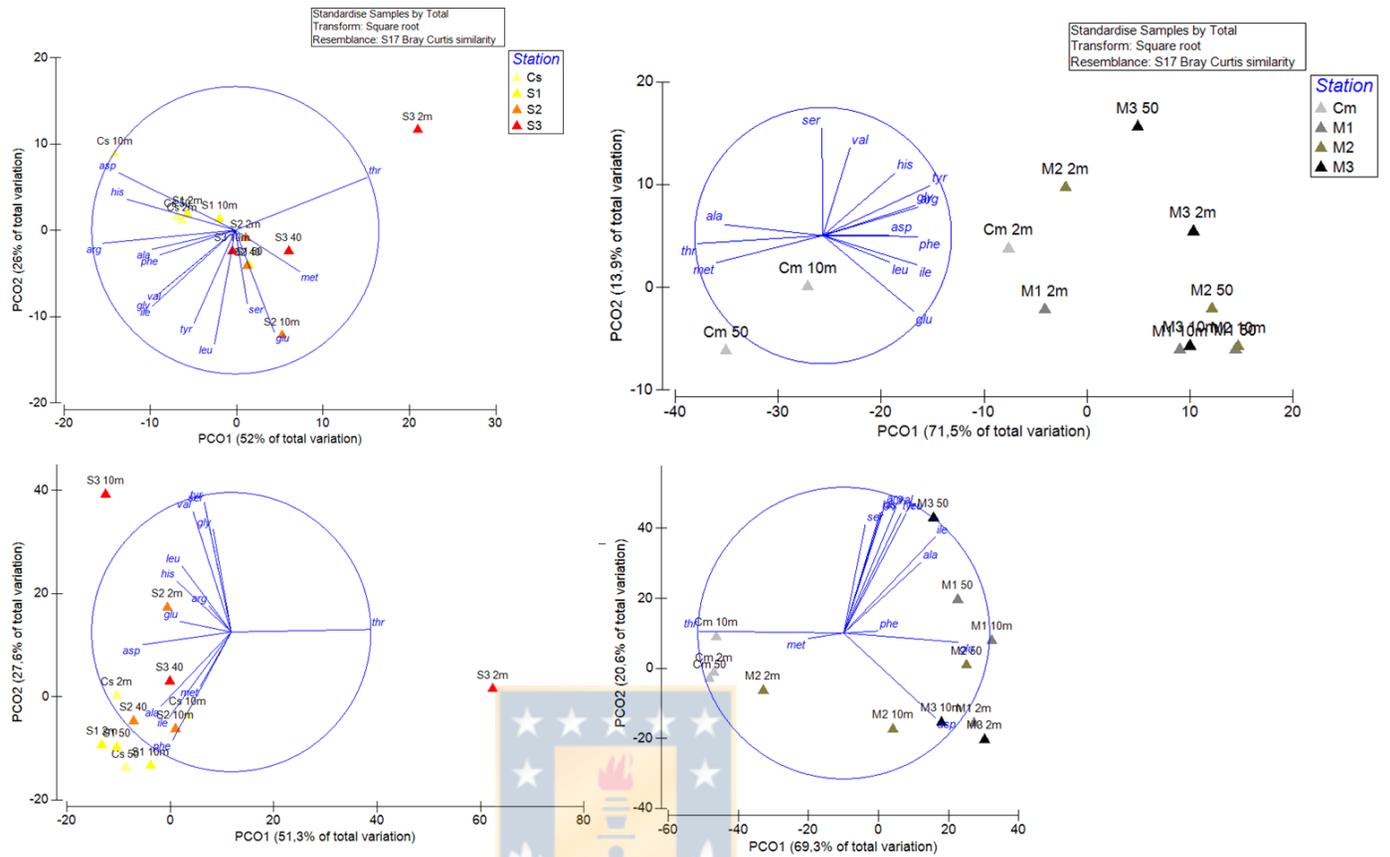


Fig. S4 Análisis de Coordenadas Principales a nivel de transecta de proteínas disueltas (paneles superiores) y DFAA (paneles inferiores). Paneles izquierdos corresponden a TS (transecta talmones) y derechos a TM (transecta mitílidos). Cada color corresponde a una estación diferente y los vectores corresponde a cada aminoácido cuantificado.

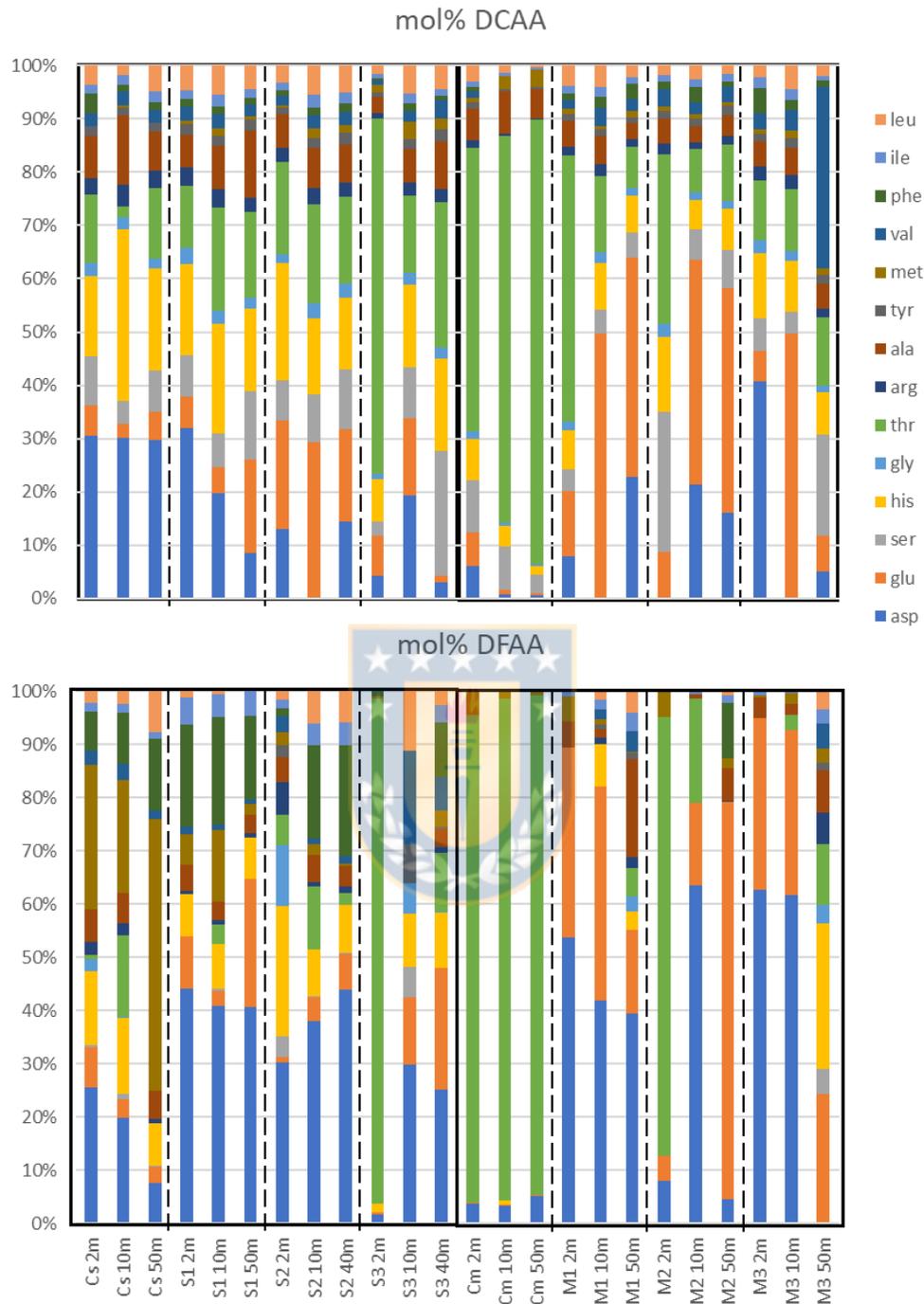


Fig. S5 Porcentaje molar de aminoácidos de proteínas disueltas (DCAA) y aminoácidos disueltos libres (DFAA) en cada profundidad de muestreo de ambas transectas en el canal Cauchaú

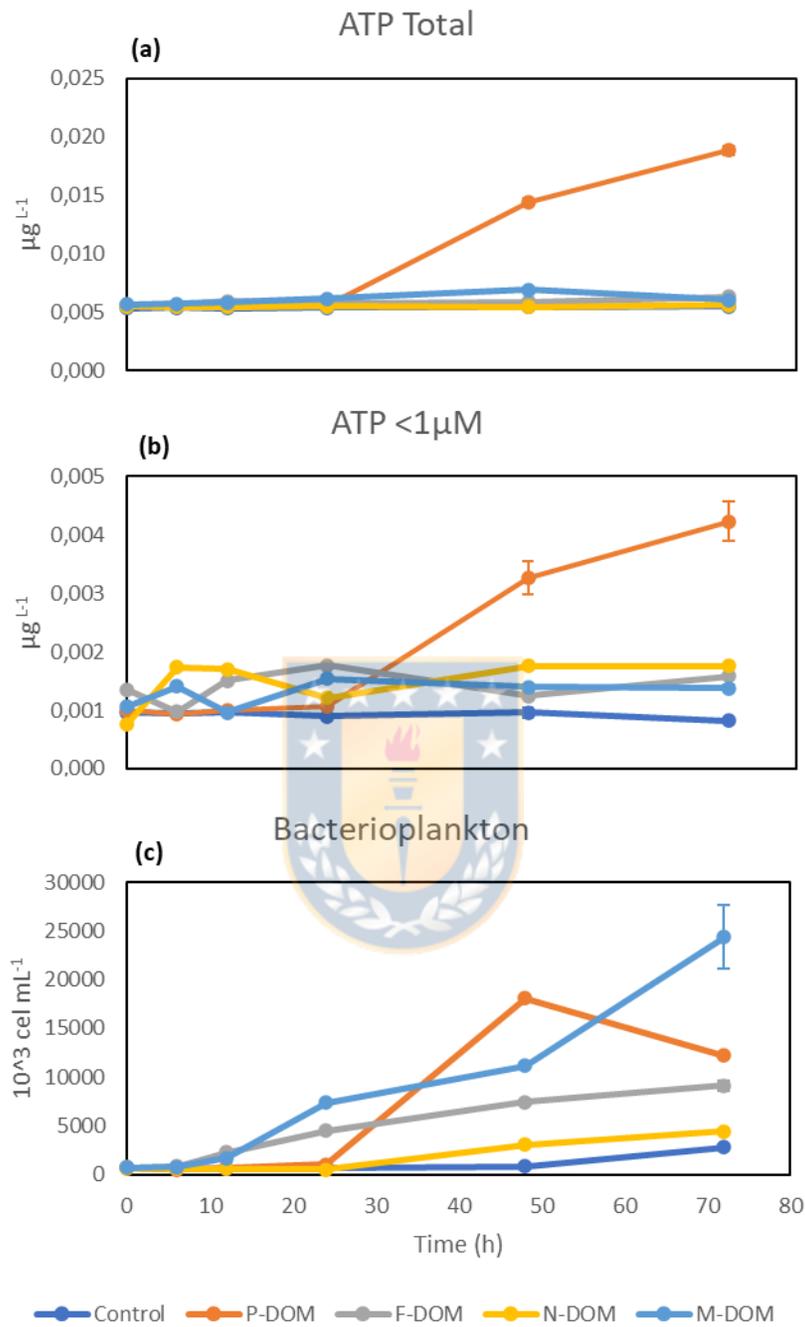


Fig. S6 Concentración de biomasa (ATP;  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) de (a) fracción total y (b) fracción  $>1\mu\text{m}$ , y (c) abundancia bacteriopláctónica ( $10^3 \text{ cell mL}^{-1}$ ) durante el experimento de microcosmo.

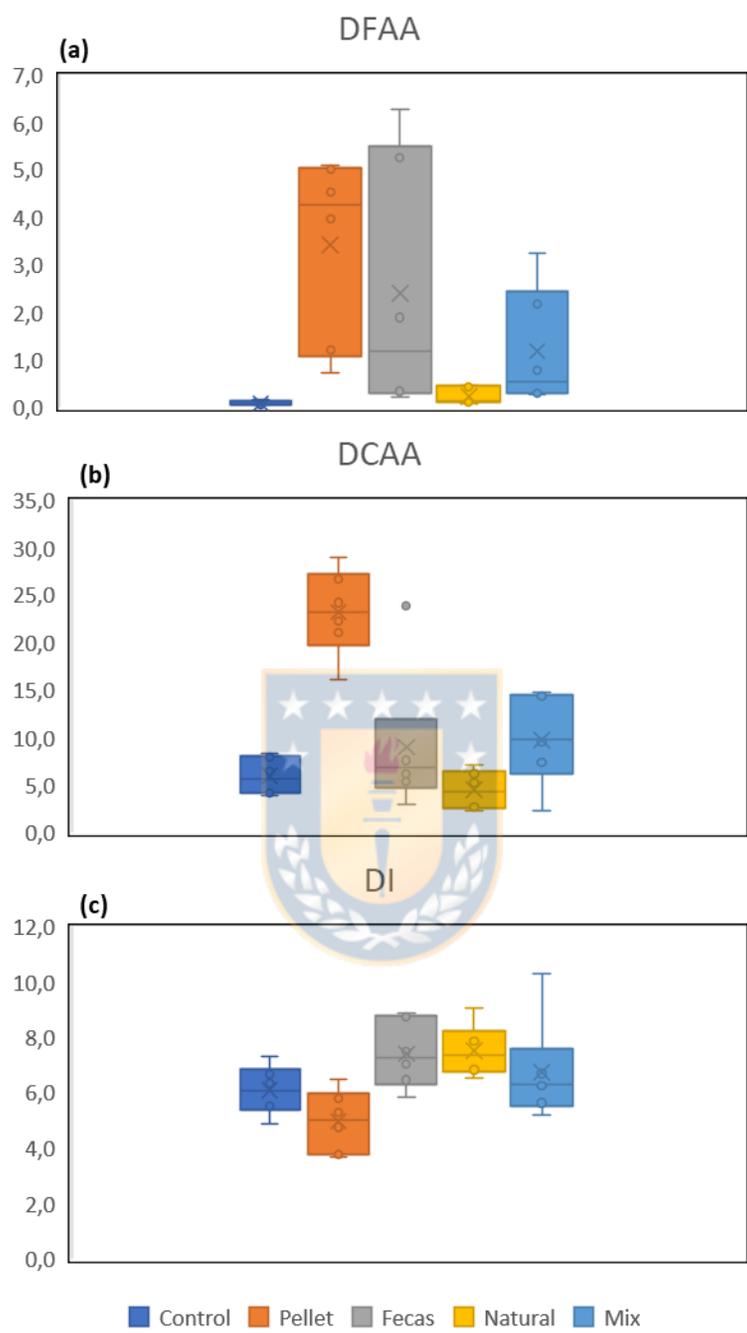


Fig. S7 Box plot en base a la media en el tiempo (0-72h). de (a) DFAA ( $\mu\text{M}$ ), (b) proteínas disueltas ( $\mu\text{M}$ ) e (c) Índice Dauwe, durante el experimento de microcosmo (0-72h).

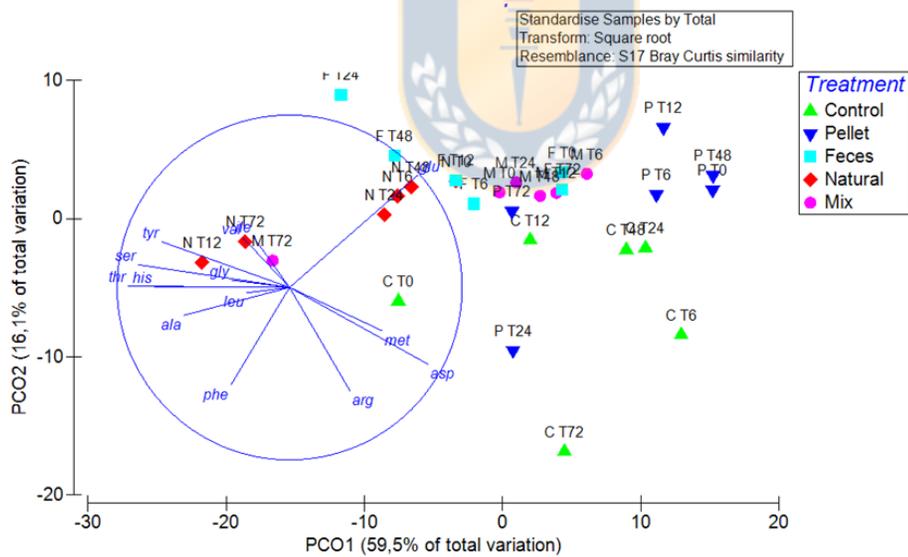
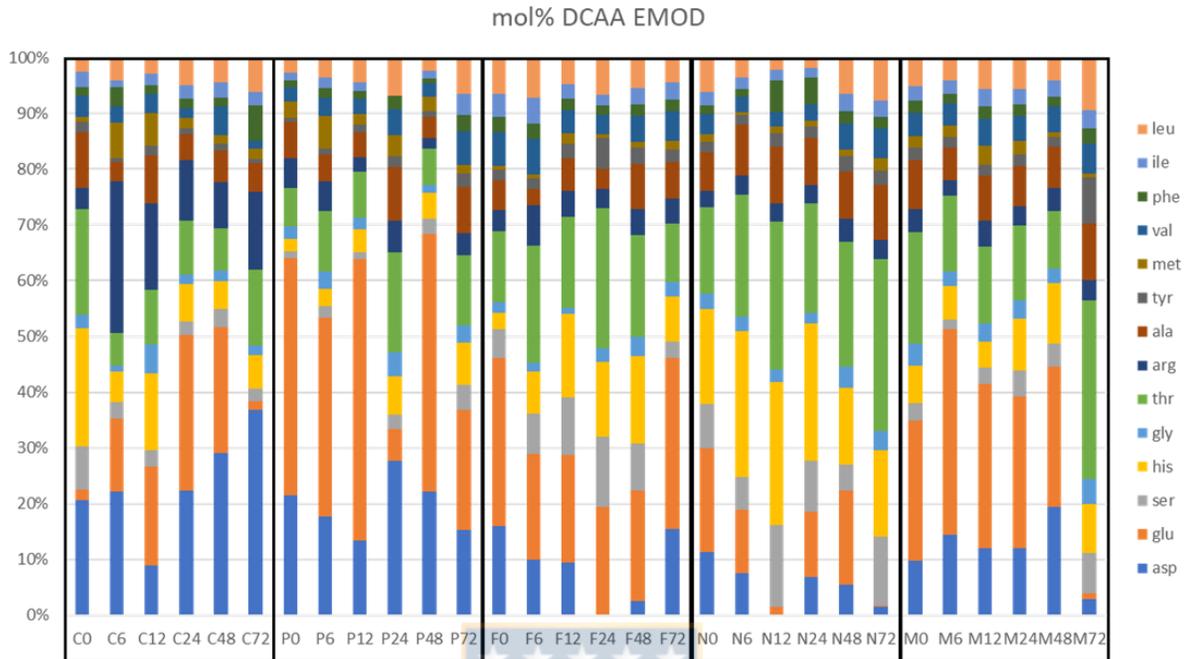


Fig.S8 Porcentaje molar de aminoácidos de proteínas disueltas (DCAA; panel superior) y Análisis de Coordenadas principales (panel inferior) en base a aminoácidos de DCAA durante el experimento de microcosmos. Cada color corresponde a un tratamiento diferente y los vectores corresponde a cada aminoácido cuantificado.

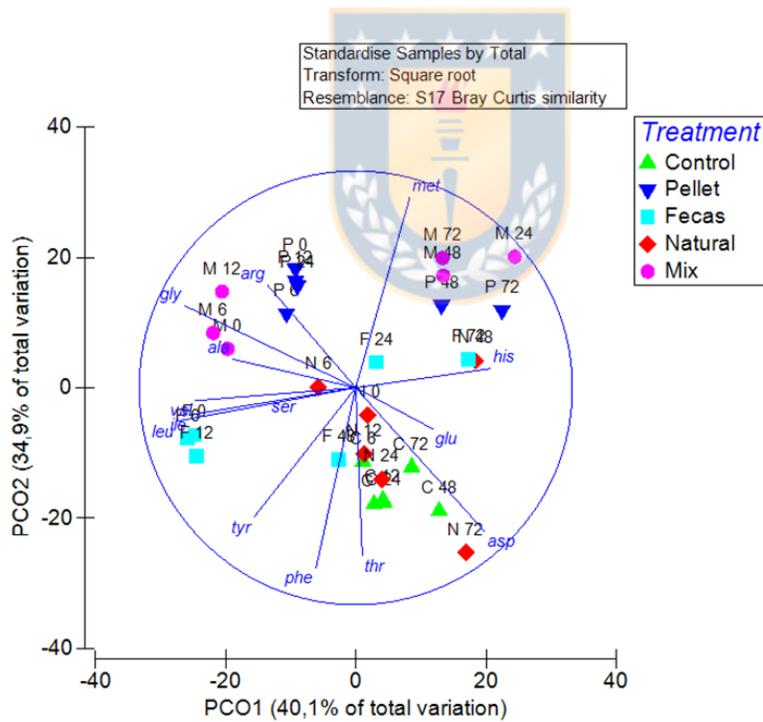
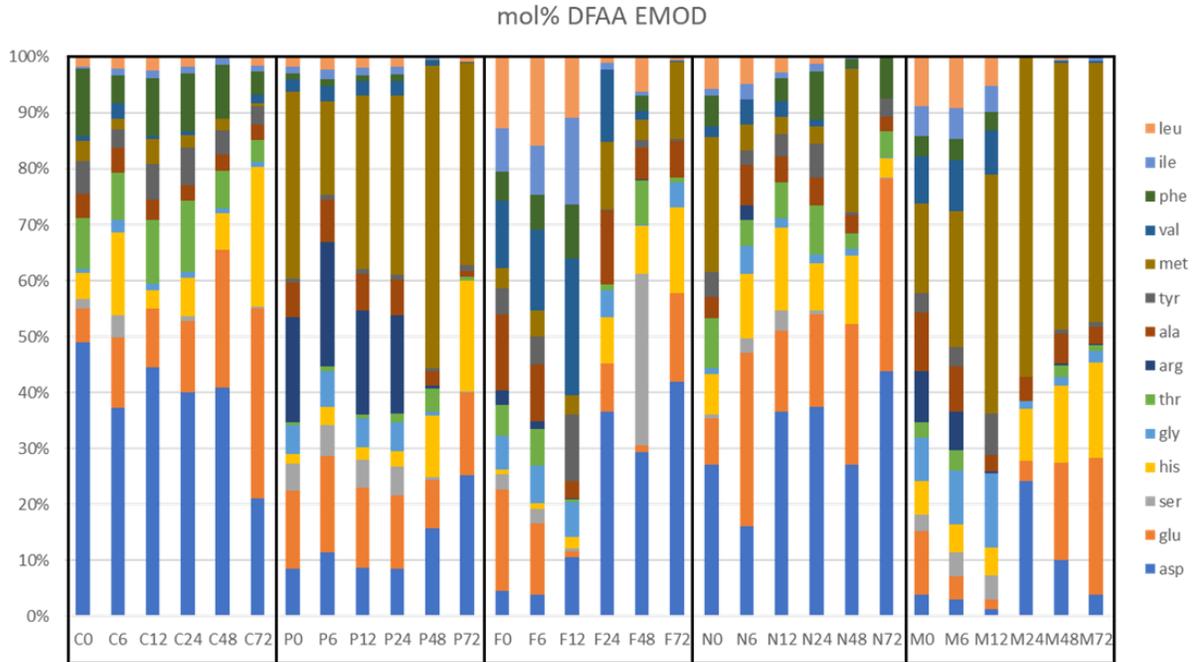


Fig. S8 Porcentaje molar de aminoácidos disueltos libres (DFAA; panel superior) y Análisis de Coordenadas principales (panel inferior) en base a DFAA durante el experimento de microcosmos. Cada color corresponde a un tratamiento diferente y los vectores corresponde a cada aminoácido cuantificado.

Tabla S1 Resumen de experimento de microcosmos con adición de materia orgánica disuelta deriva de la salmonicultura.

Microcosm experiment information								
Site	Station	Latitude	Longitude	Depth (m)	Date	Subsampling (h)	Size Fractions	
Caucahué	Cs	-42,05	-73,38	10	August 2019	0-6-12-24-48-72	<1um; Ftotal	
Treatments	ATP	MDH	Re	EEA	BA	DOM	AA	IN
Control	+	+	+	+	+	+	+	+
P-DOM	+	+	+	+	+	+	+	+
F-DOM	+	+	+	+	+	+	+	+
N-DOM	+	+	+	+	+	+	+	+
M-DOM	+	+	+	+	+	+	+	+

*P*, DOM from pellet; *F*, DOM from feces; *N*, natural DOM; *M*, DOM from mix; *ATP*, Adenosin triphosphate; *EEA*, extracellular enzymatic activity; *BA*, Bacterioplankton abundance; *DOM*, Dissolved Organic Mater (Carbon, Nitrogen and Phosphate); *AA*, Aminoacids (DFAA, DCAA); *IN*, inorganic nutrients ( $NH_4^+$ ,  $NO_3^-$ ,  $NO_2^-$ ,  $PO_4^{3-}$ )

Tabla S2 Test pos hoc Tukey entre estación control (CS-Cm) y estaciones dentro del canal para cada transecta. Valor significativo  $p < 0.05$  en negrita.

Tukey HDS test (p)													
Station	NH4	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	PO <sub>3</sub> <sup>-4</sup>	N/P	Chla	DON	DOP	DOC	Bact	Syn	Peuk	ATP
S1	0,9583	<b>0,0106</b>	0,6283	0,9804	0,3327	0,9973	0,8411	0,9958	0,3559	<b>0,0002</b>	0,9460	<b>0,0002</b>	<b>0,0003</b>
S2	0,9828	<b>0,0037</b>	<b>0,0202</b>	0,1716	0,1833	<b>0,0002</b>	0,2998	0,3398	0,3954	<b>0,0002</b>	<b>0,0049</b>	<b>0,0002</b>	<b>0,0296</b>
S3	<b>0,0258</b>	<b>0,0003</b>	0,7911	1,0000	0,3146	<b>0,0003</b>	0,2019	0,3953	<b>0,0099</b>	<b>0,0002</b>	<b>0,0157</b>	<b>0,0002</b>	0,5264
M1	0,0922	<b>0,0002</b>	0,9907	0,9943	0,9308	<b>0,0013</b>	0,8355	0,8984	0,6795	<b>0,0032</b>	<b>0,0032</b>	<b>0,0002</b>	0,9973
M2	0,9951	<b>0,0008</b>	0,5992	0,7563	0,9449	0,4251	0,0519	0,0767	0,0473	0,8215	0,2545	<b>0,0002</b>	0,6112
M3	<b>0,0002</b>	<b>0,0003</b>	0,8901	0,8188	0,5194	0,1690	0,9466	0,9724	0,2325	0,8589	<b>0,0393</b>	<b>0,0002</b>	0,0701

Tabla S3 Test Mann-Whitney entre estación control (CS-Cm) y estaciones dentro del canal para cada transecta. Valor significativo  $p < 0.05$  en negrita.

Mann-Whitney U Test: Grouping: Station (TS)															
	Rank Sum Cs	Rank Sum S1	U	Z	p-level	Rank Sum Cs	Rank Sum S2	U	Z	p-level	Rank Sum Cs	Rank Sum S3	U	Z	p-level
DCAA	14,0	7,0	1,0	1,53	0,1266	11,0	10,0	4,0	0,22	0,8273	12,0	9,0	3,0	0,65	0,5127
%DOC-DCAA	14,0	7,0	1,0	1,53	0,1266	11,0	10,0	4,0	0,22	0,8273	11,0	10,0	4,0	0,22	0,8273
DI	7,0	14,0	1,0	-1,53	0,1266	6,0	15,0	0,0	-1,96	<b>0,0495</b>	6,0	15,0	0,0	-1,96	<b>0,0495</b>
DFAA	15,0	6,0	0,0	1,96	<b>0,0495</b>	12,0	9,0	3,0	0,65	0,5127	9,0	12,0	3,0	-0,65	0,5127
%DOC-DFAA	15,0	6,0	0,0	1,96	<b>0,0495</b>	12,0	9,0	3,0	0,65	0,5127	9,0	12,0	3,0	-0,65	0,5127
MDH	9,0	12,0	3,0	-0,65	0,5127	9,0	12,0	3,0	-0,65	0,5127	6,0	15,0	0,0	-1,96	<b>0,0495</b>
CS	9,0	12,0	3,0	-0,65	0,5127	12,0	9,0	3,0	0,65	0,5127	12,0	9,0	3,0	0,65	0,5127
MPOR+EtOHDH	13,0	8,0	2,0	1,09	0,2752	11,0	10,0	4,0	0,22	0,8273	13,0	8,0	2,0	1,09	0,2752
Mann-Whitney U Test: Grouping: Station (TM)															
	Rank Sum Cm	Rank Sum M1	U	Z	p-level	Rank Sum Cm	Rank Sum M2	U	Z	p-level	Rank Sum Cm	Rank Sum M3	U	Z	p-level
DCAA	9,0	12,0	3,0	-0,65	0,5127	12,0	9,0	3,0	0,65	0,5127	13,0	8,0	2,0	1,09	0,2752
%DOC-DCAA	9,0	12,0	3,0	-0,65	0,5127	10,0	11,0	4,0	-0,22	0,8273	11,0	10,0	4,0	0,22	0,8273
DI	14,0	7,0	1,0	1,53	0,1266	15,0	6,0	0,0	1,96	<b>0,0495</b>	15,0	6,0	0,0	1,96	<b>0,0495</b>
DFAA	15,0	6,0	0,0	1,96	<b>0,0495</b>	15,0	6,0	0,0	1,96	<b>0,0495</b>	15,0	6,0	0,0	1,96	<b>0,0495</b>
%DOC-DFAA	15,0	6,0	0,0	1,96	<b>0,0495</b>	15,0	6,0	0,0	1,96	<b>0,0495</b>	15,0	6,0	0,0	1,96	<b>0,0495</b>
MDH	11,0	10,0	4,0	0,22	0,8273	12,0	9,0	3,0	0,65	0,5127	11,0	10,0	4,0	0,22	0,8273
CS	12,5	8,5	2,5	0,87	0,3827	11,0	10,0	4,0	0,22	0,8273	13,0	8,0	2,0	1,09	0,2752
MPOR+EtOHDH	10,0	11,0	4,0	-0,22	0,8273	15,0	6,0	0,0	1,96	0,0495	10,0	11,0	4,0	-0,22	0,8273



Tabla S4. Test pos hoc Tukey entre Control y tratamientos para cada tiempo del experimento de microcosmo. Valor significativo  $p < 0.05$  en negrita.

Tukey HSD test (p)										F<1um						FTotal						
Time (h)	Control Treatment	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	PO <sub>4</sub> <sup>-3</sup>	DOC	DON	DOP	BA	ATP	MDH	R	LAP	GLU	LIP	ATP	MDH	R	LAP	GLU	LIP	
0	P-DOM	<b>0,0002</b>	1,0000	1,0000	<b>0,0105</b>	<b>0,0002</b>	<b>0,0002</b>	0,1634	1,0000	1,0000	<b>0,0019</b>	<b>0,0207</b>	1,0000	0,7392	0,9902	<b>0,0002</b>	<b>0,0031</b>	1,0000	1,0000	<b>0,0284</b>	<b>0,0002</b>	
	F-DOM	<b>0,0002</b>	1,0000	0,9398	0,9882	<b>0,0002</b>	<b>0,0002</b>	1,0000	1,0000	0,9990	<b>0,0039</b>	<b>0,0011</b>	0,5102	1,0000	<b>0,0002</b>	<b>0,0002</b>	<b>0,0002</b>	<b>0,0002</b>	<b>0,0002</b>	<b>0,0031</b>	<b>0,0002</b>	
	N-DOM	<b>0,0006</b>	0,8409	1,0000	0,9855	1,0000	1,0000	0,9999	1,0000	0,9970	0,0632	0,0583	1,0000	0,6906	0,8606	<b>0,0053</b>	1,0000	1,0000	1,0000	0,2854	<b>0,0023</b>	
	M-DOM	<b>0,0002</b>	0,9943	0,9999	0,3361	<b>0,0002</b>	<b>0,0002</b>	0,9631	1,0000	1,0000	<b>0,0645</b>	0,6562	1,0000	1,0000	0,2507	<b>0,0002</b>	<b>0,0002</b>	<b>0,0002</b>	<b>0,0002</b>	<b>0,0002</b>	0,3590	<b>0,0002</b>
6	P-DOM	<b>0,0002</b>	0,9727	1,0000	<b>0,0007</b>	<b>0,0002</b>	<b>0,0002</b>	<b>0,0002</b>	0,0590	1,0000	0,2126	<b>0,0045</b>	1,0000	0,7695	0,2166	<b>0,0002</b>	0,9846	NaN	1,0000	1,0000	<b>0,0002</b>	
	F-DOM	<b>0,0002</b>	1,0000	0,7658	0,3567	<b>0,0002</b>	<b>0,0004</b>	1,0000	0,9553	1,0000	<b>0,0004</b>	<b>0,0002</b>	0,1782	0,9532	<b>0,0002</b>	<b>0,0002</b>	<b>0,0002</b>	NaN	<b>0,0002</b>	<b>0,0242</b>	<b>0,0002</b>	
	N-DOM	0,3434	1,0000	1,0000	0,9998	1,0000	1,0000	1,0000	0,9464	0,6109	1,0000	1,0000	0,8293	<b>0,0008</b>	<b>0,0154</b>	0,9999	0,9998	NaN	1,0000	1,0000	<b>0,0002</b>	
	M-DOM	<b>0,0002</b>	1,0000	0,9955	<b>0,0147</b>	<b>0,0002</b>	<b>0,0009</b>	1,0000	0,9761	0,9956	<b>0,3860</b>	0,9819	0,2228	<b>0,0191</b>	1,0000	<b>0,0002</b>	<b>0,0002</b>	NaN	<b>0,0002</b>	<b>0,2751</b>	<b>0,0002</b>	
12	P-DOM	<b>0,0002</b>	0,9996	1,0000	<b>0,0048</b>	<b>0,0002</b>	<b>0,0002</b>	<b>0,0005</b>	0,9873	1,0000	0,9733	<b>0,0002</b>	1,0000	1,0000	<b>0,0002</b>	<b>0,0002</b>	0,1150	<b>0,0002</b>	1,0000	0,9989	<b>0,0002</b>	
	F-DOM	<b>0,0002</b>	1,0000	0,5539	0,9997	<b>0,0002</b>	<b>0,0065</b>	1,0000	<b>0,0002</b>	0,9882	<b>0,0002</b>	1,0000	0,0775	0,7877	<b>0,0002</b>	<b>0,0002</b>	<b>0,0002</b>	<b>0,0002</b>	<b>0,0002</b>	<b>0,0325</b>	<b>0,0002</b>	
	N-DOM	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	0,8015	0,1841	<b>0,0305</b>	1,0000	<b>0,0007</b>	<b>0,0376</b>	0,3330	0,9997	0,7986	1,0000	1,0000	0,0000	0,7786
	M-DOM	<b>0,0002</b>	1,0000	0,8612	0,6822	<b>0,0002</b>	<b>0,0049</b>	0,9355	<b>0,0002</b>	1,0000	<b>0,0013</b>	<b>0,0002</b>	0,0842	0,7998	0,3641	<b>0,0002</b>	<b>0,0002</b>	<b>0,0002</b>	<b>0,0002</b>	<b>0,0002</b>	0,1357	<b>0,0002</b>
24	P-DOM	<b>0,0002</b>	0,6744	1,0000	<b>0,0304</b>	<b>0,0002</b>	<b>0,0002</b>	<b>0,0002</b>	0,1045	1,0000	<b>0,0113</b>	0,9998	1,0000	0,0549	0,0929	<b>0,0002</b>	<b>0,0002</b>	<b>0,0002</b>	<b>0,0035</b>	<b>0,0002</b>	<b>0,0002</b>	
	F-DOM	<b>0,0002</b>	0,3431	0,9987	0,8830	<b>0,0002</b>	<b>0,0002</b>	0,4879	<b>0,0002</b>	0,6511	<b>0,0002</b>	<b>0,0002</b>	0,0625	1,0000	<b>0,0002</b>	<b>0,0002</b>	<b>0,0002</b>	<b>0,0011</b>	<b>0,0002</b>	<b>0,0002</b>	<b>0,0002</b>	
	N-DOM	0,5588	1,0000	1,0000	1,0000	0,9957	1,0000	1,0000	<b>0,0426</b>	1,0000	0,9999	1,0000	1,0000	0,9877	<b>0,0002</b>	<b>0,0033</b>	0,9974	<b>0,0024</b>	<b>0,0425</b>	0,0671	<b>0,0395</b>	
	M-DOM	<b>0,0002</b>	0,9213	1,0000	0,9263	<b>0,0002</b>	<b>0,0034</b>	0,9994	<b>0,0002</b>	0,7430	<b>0,0002</b>	0,4469	0,0912	0,5781	<b>0,0002</b>	<b>0,0002</b>	<b>0,0002</b>	<b>0,0003</b>	<b>0,0002</b>	<b>0,0002</b>	<b>0,0002</b>	<b>0,0002</b>
48	P-DOM	<b>0,0002</b>	1,0000	1,0000	0,0561	<b>0,0002</b>	0,0740	1,0000	<b>0,0002</b>	0,0669	0,4868	<b>0,0002</b>	<b>0,0002</b>	0,0847	<b>0,0002</b>	<b>0,0002</b>	0,9997	<b>0,0124</b>	<b>0,0002</b>	<b>0,0002</b>	<b>0,0002</b>	
	F-DOM	<b>0,0002</b>	1,0000	0,0606	1,0000	<b>0,0002</b>	<b>0,0348</b>	1,0000	<b>0,0002</b>	0,9999	<b>0,0004</b>	1,0000	<b>0,0002</b>	<b>0,0002</b>	<b>0,0002</b>	<b>0,0002</b>	<b>0,0002</b>	<b>0,7763</b>	<b>0,0002</b>	<b>0,0002</b>	<b>0,0002</b>	
	N-DOM	<b>0,0002</b>	1,0000	0,9910	0,9926	<b>0,0002</b>	0,8146	1,0000	<b>0,0007</b>	0,5936	1,0000	<b>0,0020</b>	<b>0,0002</b>	0,9291	0,2156	1,0000	1,0000	<b>0,0196</b>	<b>0,0002</b>	<b>0,0002</b>	<b>0,0002</b>	
	M-DOM	<b>0,0002</b>	1,0000	0,9876	0,9675	<b>0,0002</b>	0,0561	1,0000	<b>0,0002</b>	0,9747	<b>0,0007</b>	0,0604	<b>0,0002</b>	<b>0,0002</b>	<b>0,0002</b>	<b>0,0002</b>	<b>0,0002</b>	<b>0,0002</b>	<b>0,0101</b>	<b>0,0002</b>	<b>0,0002</b>	
72	P-DOM	<b>0,0002</b>	1,0000	1,0000	0,4920	<b>0,0002</b>	<b>0,0015</b>	<b>0,0048</b>	0,9588	<b>0,0010</b>	0,9563	<b>0,0002</b>	<b>0,0004</b>	<b>0,0005</b>	<b>0,0002</b>	<b>0,0002</b>	<b>0,0005</b>	<b>0,0024</b>	0,8490	<b>0,0073</b>	<b>0,0002</b>	
	F-DOM	<b>0,0002</b>	1,0000	1,0000	0,9954	<b>0,0002</b>	<b>0,0298</b>	1,0000	0,9868	0,2287	<b>0,0023</b>	0,9678	<b>0,0002</b>	1,0000	<b>0,0002</b>	<b>0,0002</b>	<b>0,0002</b>	1,0000	<b>0,0002</b>	<b>0,0007</b>	<b>0,0002</b>	
	N-DOM	0,9996	1,0000	0,9999	0,0806	1,0000	1,0000	0,1388	1,0000	0,4300	1,0000	<b>0,0002</b>	0,9995	<b>0,0003</b>	<b>0,0451</b>	<b>0,0085</b>	1,0000	0,2047	1,0000	0,3642	<b>0,0193</b>	
	M-DOM	<b>0,0002</b>	1,0000	0,2418	1,0000	<b>0,0002</b>	0,9176	0,5802	0,8654	0,4975	<b>0,0007</b>	1,0000	<b>0,0002</b>	0,0683	<b>0,0002</b>	<b>0,0002</b>	<b>0,0002</b>	1,0000	<b>0,0002</b>	<b>0,0002</b>	<b>0,0005</b>	<b>0,0002</b>



Tabla S5. ANOVA de una vía (factor tratamiento) y Test pos hoc Tukey entre tratamientos del experimento de microcosmo. Valor significativo  $p < 0.05$  en negrita.

One way ANOVA (Treatment)	Tukey HSD test (p)				
	Treatment	Control	Pellet	Feces	Natural
Variable: DFAA F=12.35 p=0.0000	Pellet	<b>0,000148</b>			
	Feces	<b>0,000971</b>	0,534449		
	Natural	0,617958	<b>0,000726</b>	<b>0,027969</b>	
	Mix	<b>0,006660</b>	0,155927	0,924500	0,151875
Variable: DCAA F=96.667 p=0.0000	Pellet	<b>0,000773</b>			
	Feces	0,927156	<b>0,005040</b>		
	Natural	0,807856	<b>0,000168</b>	0,344466	
	Mix	0,685129	<b>0,016982</b>	0,985540	0,146094
Variable: DI F=42.937 p=0.0088	Pellet	0,5388			
	Feces	0,3734	<b>0,0178</b>		
	Natural	0,2954	<b>0,0123</b>	0,9999	
	Mix	0,8922	0,1326	0,8800	0,8081

Tabla S6. Análisis SIMPER (porcentaje de disimilitud) basado en la concentración de aminoácidos de proteínas disueltas (DCAA) y DFAA de cada transecta y experimento de microcosmos. Comparación entre sitios control (Cs - Cm) y estaciones dentro del canal (Transectas), y entre control (C) y tratamientos de adición de DOM.

Station	DCAA % dissimilarity	DCAA 50% acumulate contribution	DFAA % dissimilarity	DFAA 50% acumulate contribution
Cs vs S1	10.7	Asp, Thr, Glu, his	26.8	Met, Asp, Thr, Glu
Cs vs S2	17.0	Asp, Glu, Thr	27.2	Met, Asp, Thr, Phe
Cs vs S3	21.8	Thr, Asp, Ser	48.8	Met, Thr, Phe, Ala
Cm vs M1	31.7	Glu, Thr, Asp	77.2	Thr, Glu, Asp
Cm vs M2	34.0	Thr, Glu, Asp	50.6	Thr, Glu, Asp
Cm vs M3	35.7	Thr, Val, Glu, Asp	74.7	Thr, Glu, Asp
C vs P-DOM	17.6	Glu, Arg, His, Asp	34.9	Met, Arg, Asp, Phe
C vs F-DOM	18.6	Asp, Glu, Arg, Thr	31.7	Asp, Val, Glu, Leu, Ser, Phe
C vs N-DOM	21.4	Asp, Arg, His, Thr	16.8	Met, Asp, His, Phe
C vs M-DOM	15.3	Arg, Asp, Glu, His	37.7	Met, Asp, Phe, Thr

Table S7. Transformaciones estadísticas utilizadas para cada variable en estudio de transectas y experimento de microcosmos.

	<b>Transect</b>	<b>Experiment</b>
<b>NH4+</b>	1/x	1/x
<b>PO43</b>		1/x
<b>DOC</b>		1/x
<b>DOP</b>		square root (x)
<b>Bact</b>		1/x
<b>ATP</b>	1/x	1/x
<b>MDH</b>		ln(x)
<b>Re</b>		square root (x)
<b>LAP</b>		ln(x)
<b>GLU</b>		ln(x)
<b>LIP</b>		ln(x)



### 8.3. Anexo 3: Información suplementaria Capítulo 3

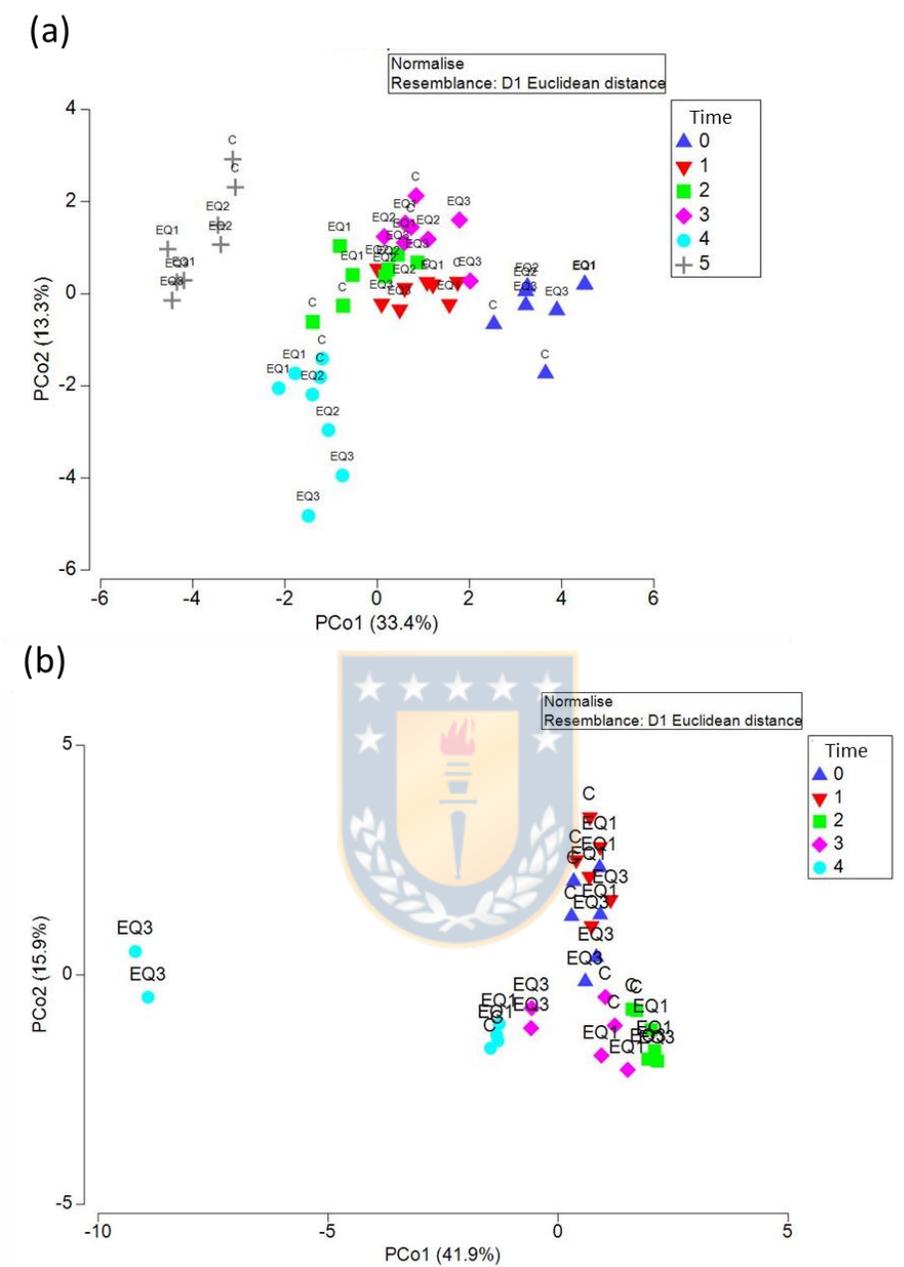


Fig. S1. Principal coordinate analysis (PCo1 vs PCo2) with all dependent variables (nutrients, metabolic activity, bacterioplankton abundance, ATP concentration). Both size fractions are included in the analyses. (a) Achao, (b) Coliumo. Time categories: 0=0h, 1=6h, 2=12h, 3=24h, 4=48h and 5=72h.

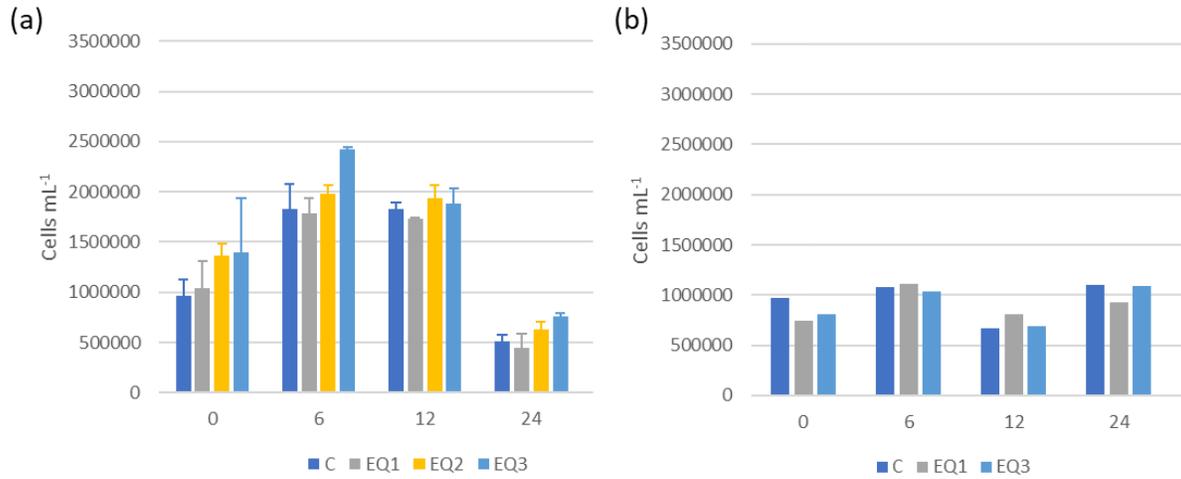


Fig. S2 Bacterioplankton abundance (cell mL<sup>-1</sup>) during microcosm incubations in (a) Achao and (b) Coliumo.

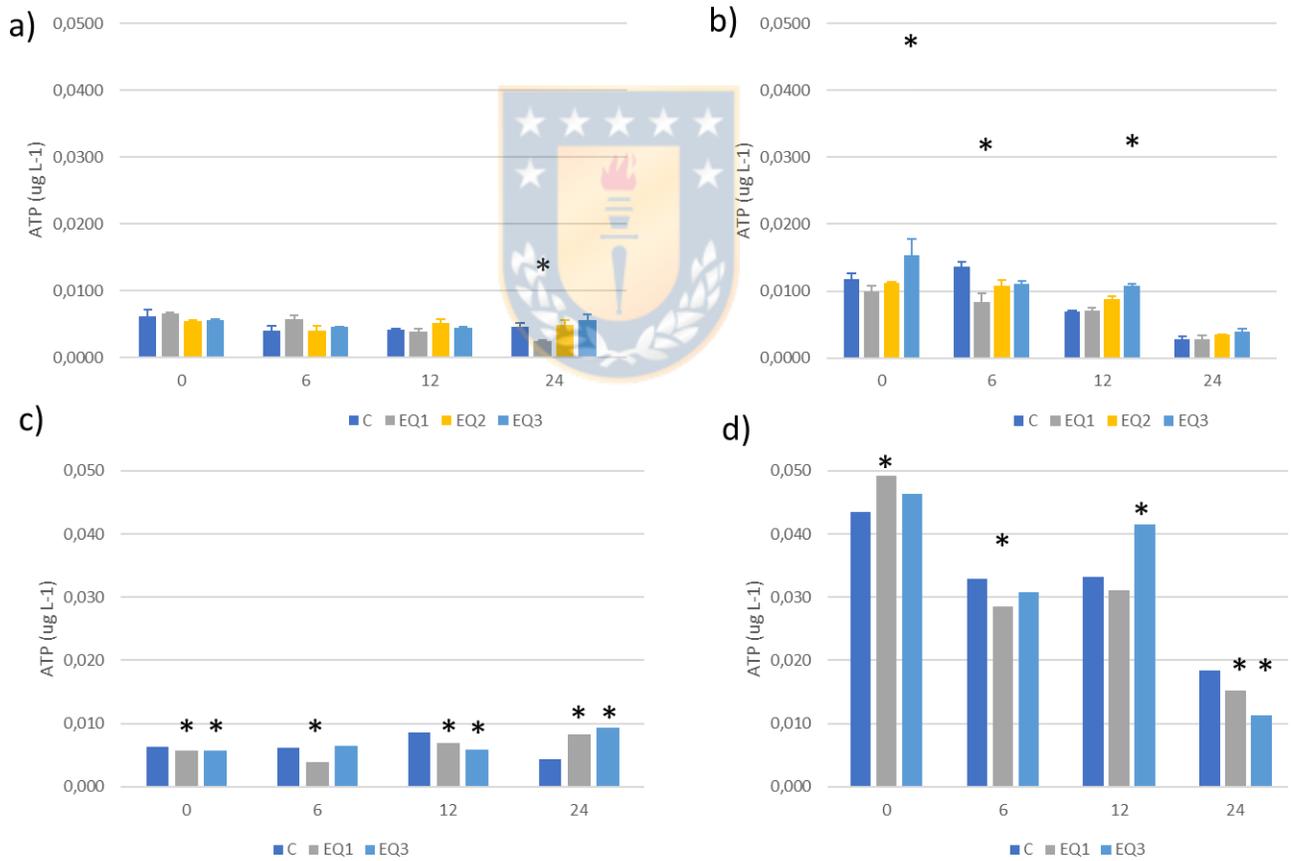


Fig. S3. ATP concentration (µg L<sup>-1</sup>) during microcosms incubation in Achao (a and b) and Coliumo (c and d). Left panels correspond to F<1µm ATP concentration and right panels to FTotal ATP concentrations.

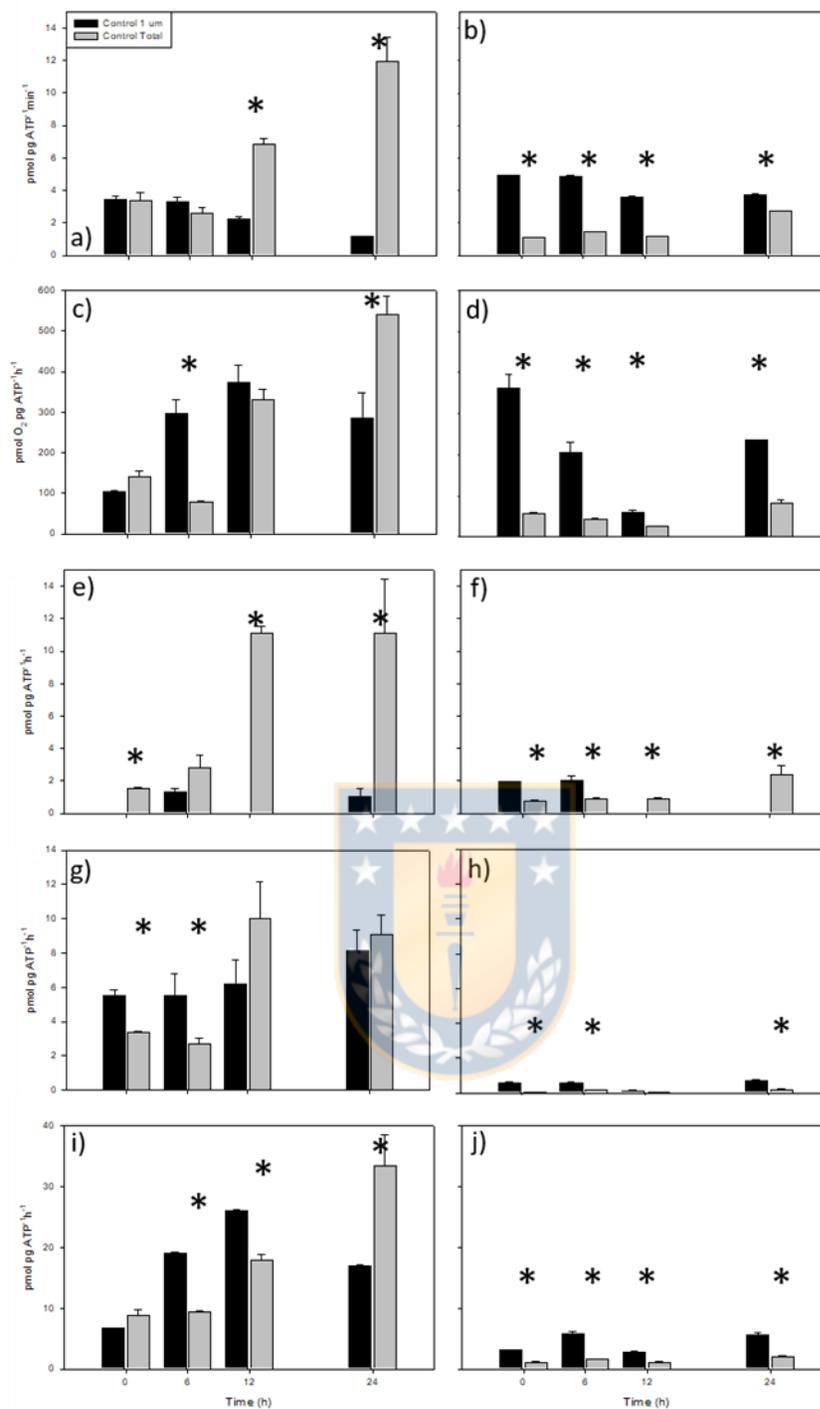


Fig. S4. Specific activities at control during microcosmos incubation in Achao (Left panels) and Coliumo Bay (Right panels) for both fractions (Black bars = F<1um; Grey bars= Ftotal). a) and b) Specific Malate dehydrogenase (MDH) activity (pmol NADH pg ATP<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup>), c) and d) Specific Respiration rates (pmol O<sub>2</sub> pg ATP<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>), e) and f) Specific Extracellular Enzyme Activity (EEA ; pmol pg ATP<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>) of Leucine aminopeptidase, g) and h) Specific Extracellular Enzyme Activity (EEA ; pmol pg ATP<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>) of B-Glucosidase, i) and j) Specific Extracellular Enzyme Activity (EEA ; pmol pg ATP<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>) of Lipase.

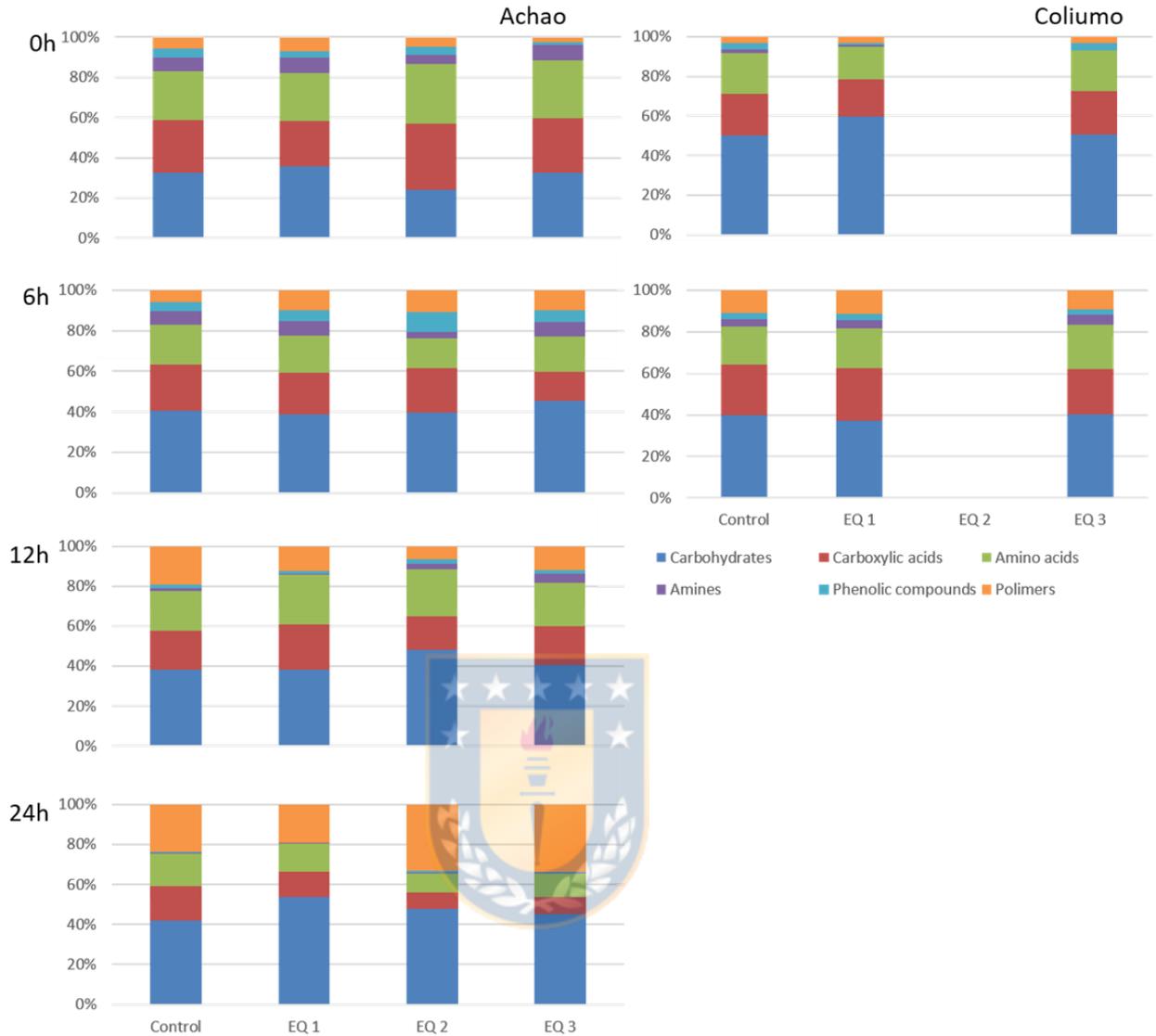


Fig. S5 Relative utilization (UR) of substrates grouped into 6 categories according to Sala et al. (2006): Carboxylic Acids (CA), Carbohydrates (CHO), Amino acids (AA), Amines (AMI), Phenolic Compounds (PhC) and Polimers (POL). Achao = Left panels; Coliumo = Right panels.

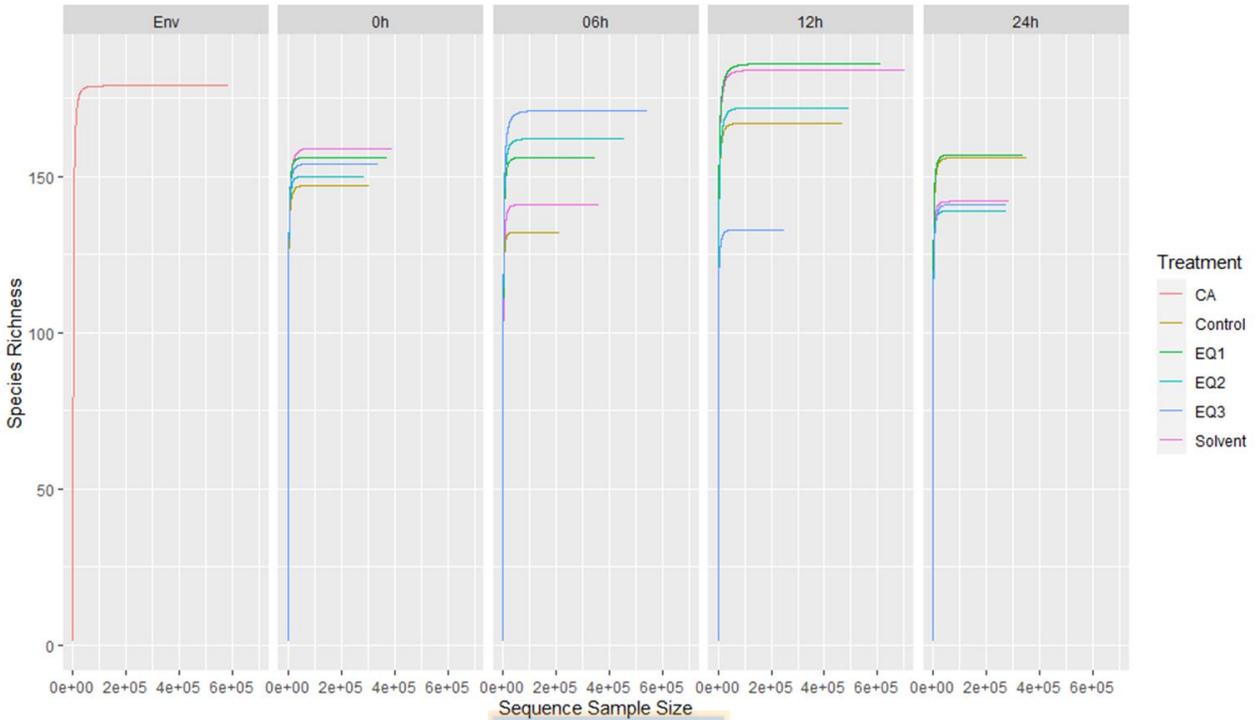


Fig. S6. Rarefaction curves from all treatments and times during EQ incubations at Achao. CA corresponds to environmental control (i.e. initial conditions during *in situ* water collection).

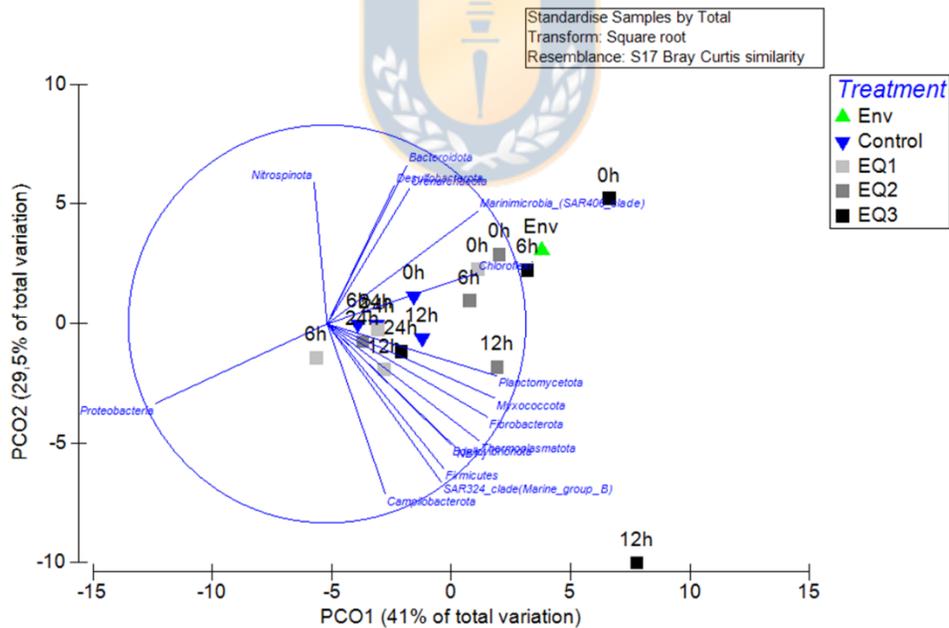


Fig. S7 Principal Coordinate Analysis (PCoA) at Phyla level showing active microbial community variability associated with the different treatments (control and EQ's) through time. Phyla having correlations ( $R > 0.7$ ) were also plotted

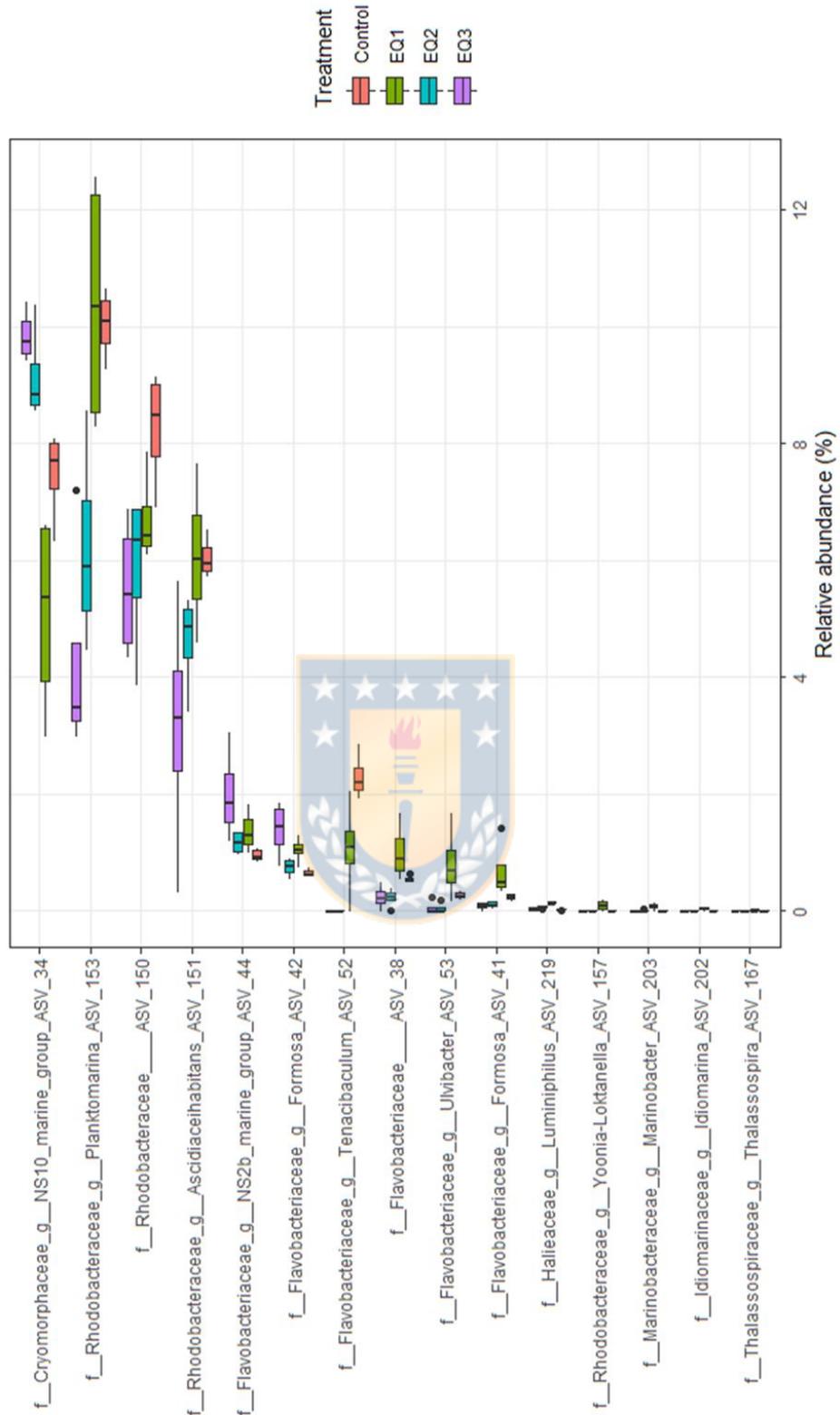


Fig. S8 ASV's contribution based in STAMP  $p < 0,05$  (ANOVA multigroup).

Table S1. Background information and variables measured during microcosm experiments for Achao and Coliumo bay. The subsampling at both sites were at 0, 6, 12, 24, 48 and 72 h. \* Substrate utilization (Biolog-EcoPlates™) in the experiments carried out in Coliumo were measured at 0 and 6 h only.

<b>Microcosm experiments information</b>		
<b>Site</b>	Achao	Coliumo
<b>Date</b>	Jan 2019	Dec 2018
<b>Latitude</b>	42.52°S	36.50°S
<b>Longitude</b>	73.20°W	72.94°W
<b>Length experiment (h)</b>	72	48
<b>Treatments</b>		
<b>Control</b>	+	+
<b>C+S</b>	+	+
<b>EQ1 (10 µg L<sup>-1</sup>)</b>	+	+
<b>EQ2 (100 µg L<sup>-1</sup>)</b>	+	
<b>EQ3 (1000 µg L<sup>-1</sup>)</b>	+	+
<b>Variables</b>		
<b>ATP</b>	+	+
<b>MDHe</b>	+	+
<b>Re</b>	+	+
<b>EEAe</b>	+	+
<b>EcoPlates*</b>	+	+
<b>RNA</b>	+	
<b>Cell abundance</b>	+	+
<b>Nutrients</b>	+	+
<b>DOC</b>	+	+

Table S2. Variable transformations

	<b>MDH</b>	<b>Respiration</b>	<b>EEA</b>	<b>ATP</b>
<b>Achao</b>	LOG(x)	square root	LOG(x)	
<b>Coliumo</b>	square root	LN(x)	LOG(x)	square root

Table S3. Dissolved organic carbon ( $\mu\text{M}$ ), nitrogen ( $\mu\text{M}$ ) and phosphorous concentrations ( $\mu\text{M}$ ) in the control over time for both experiments.

Site	Time (h)	0	6	12	24
Achao	DOC	87,1 $\pm$ 12,7	89,8 $\pm$ 1,0	84,5 $\pm$ 1,4	87,9 $\pm$ 1,3
	DON	12,6 $\pm$ 2,8	12,7 $\pm$ 0,2	12,3 $\pm$ 0,4	12,2 $\pm$ 0,3
	DOP	0,3 $\pm$ 0,08	0,1 $\pm$ 0,02	0,1 $\pm$ 0,01	0,2 $\pm$ 0,004
Coliumo	DOC	102,5 $\pm$ 11,8	93,5 $\pm$ 1,9	94,8 $\pm$ 1,5	144,8 $\pm$ 12,3
	DON	10,8 $\pm$ 0,4	14,2 $\pm$ 1,3	15,5 $\pm$ 1,3	27,6 $\pm$ 5,6
	DOP	0 $\pm$ 0	0,016 $\pm$ 0,02	0,26 $\pm$ 0,1	0,25 $\pm$ 0

Table S4. T test results. Comparison of the experimental variables between sites. Bold p-value indicates significant differences ( $p < 0.05$ )

T-tests; Grouping: Sitio (Achao y Coliumo)  
 Group 1: 1 Achao  
 Group 2: 2 Coliumo

	Mean 1	Mean 2	t-value	df	p	Valid N 1	Valid N 2	Std.Dev. 1	Std.Dev. 2	F-ratio Variances	p Variances
ATP1	0.06906	0.07992	-3.98436	46	<b>0.000239</b>	24	24	0.00888	0.009979	1.262	0.580893
ATP63	0.00874	0.03182	-8.98161	46	<b>0.000000</b>	24	24	0.00411	0.011899	8.388	0.000003
MDHe1	2.41666	4.45554	-5.20364	46	<b>0.000004</b>	24	24	1.29622	1.415744	1.193	0.675818
MDHe63	0.74474	0.39683	5.76058	46	<b>0.000001</b>	24	24	0.26304	0.135466	3.770	0.002335
Re1	6.12761	5.47463	4.71966	46	<b>0.000022</b>	24	24	0.50570	0.451302	1.256	0.589689
Re63	5.24146	3.77596	5.95913	46	<b>0.000000</b>	24	24	1.06790	0.557752	3.666	0.002851
LAPe1	1.60857	1.42662	1.23309	46	0.223806	24	24	0.56334	0.452970	1.547	0.302811
LAPe63	1.99527	1.73918	2.00939	46	<b>0.050384</b>	24	24	0.55957	0.276940	4.083	0.001309
GLUe1	0.83031	0.40260	10.25410	46	<b>0.000000</b>	24	24	0.19223	0.069311	7.692	0.000007
GLUe63	3.95929	0.14664	4.85972	46	<b>0.000014</b>	24	24	3.84183	0.111642	1184.200	0.000000
LIPe1	2.59748	1.85275	5.90970	46	<b>0.000000</b>	24	24	0.55231	0.275830	4.009	0.001495
LIPe63	2.35752	0.83732	7.71279	46	<b>0.000000</b>	24	24	0.93106	0.255910	13.237	0.000000
NH4	0.590800	2.646048	-23.0852	46	<b>0.000000</b>	24	24	0.270502	0.342134	1.59975	0.267228
NO3	4.870042	7.299250	-7.5837	46	<b>0.000000</b>	24	24	1.348292	0.802874	2.82016	0.016046
NO2	0.233417	0.427125	-16.3343	46	<b>0.000000</b>	24	24	0.045130	0.036586	1.52156	0.321177
PO43	0.846792	1.275708	-10.8244	46	<b>0.000000</b>	24	24	0.140518	0.133934	1.10074	0.819933
N/P	6.020525	8.196558	-7.0557	46	<b>0.000000</b>	24	24	1.128911	1.004153	1.26392	0.578938
Bact	1.140952	0.956344	2.9977	46	<b>0.004376</b>	24	24	0.288996	0.086599	11.13677	0.000000

Table S5. Tukey's Honest Significant Difference (HSD) for nutrients, ATP and specific variables between the different concentrations of EQ and control during the experiments for both sites. p <0.05 of significance in bold.

		Tukey HSD test (p)	F<1um															
Site	Time (h)	Control Treatment	FTotal															
			NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	PO <sub>4</sub> <sup>-3</sup>	ATP	MDHe	Re	LAPe	GLUe	LIPe	ATP	MDHe	Re	LAPe	GLUe	LIPe
Achao	0	EQ1	1,0000	0,9683	0,9999	0,9915	<b>0,0208</b>	<b>0,0103</b>	1,0000	<b>0,0299</b>	0,9907	0,9907	0,7125	0,9999	<b>0,0006</b>	1,0000	1,0000	0,9986
		EQ2	0,9723	0,9994	0,9779	1,0000	<b>0,0399</b>	<b>0,0095</b>	1,0000	<b>0,0115</b>	1,0000	1,0000	1,0000	0,9998	<b>0,0092</b>	1,0000	0,9989	0,7080
		EQ3	<b>0,0042</b>	1,0000	1,0000	1,0000	<b>0,0359</b>	0,2266	1,0000	<b>0,0176</b>	0,9999	0,9999	<b>0,0221</b>	0,3957	<b>0,0144</b>	1,0000	0,7675	<b>0,0125</b>
	6	EQ1	0,9994	0,9713	<b>0,0151</b>	1,0000	0,9998	<b>0,0327</b>	<b>0,0015</b>	0,9607	<b>0,0009</b>	<b>0,0009</b>	<b>0,0008</b>	<b>0,0190</b>	<b>0,0024</b>	1,0000	1,0000	0,7896
		EQ2	0,9998	1,0000	<b>0,0105</b>	0,9997	0,9999	<b>0,0120</b>	<b>0,0138</b>	1,0000	<b>0,0061</b>	<b>0,0061</b>	0,1148	<b>0,0453</b>	<b>0,0051</b>	0,9998	1,0000	0,6220
		EQ3	1,0000	<b>0,0006</b>	0,5484	1,0000	0,9995	<b>0,0029</b>	0,9471	0,8987	<b>0,0080</b>	<b>0,0080</b>	0,2418	0,7633	<b>0,0002</b>	1,0000	0,9671	<b>0,0277</b>
	12	EQ1	<b>0,0037</b>	<b>0,0038</b>	1,0000	0,9901	0,5836	<b>0,0134</b>	<b>0,0112</b>	0,9500	<b>0,0133</b>	<b>0,0133</b>	1,0000	0,9640	0,4433	<b>0,0493</b>	0,3001	<b>0,0095</b>
		EQ2	0,8942	<b>0,0231</b>	0,9923	<b>0,0175</b>	<b>0,0090</b>	0,9082	<b>0,0174</b>	0,3809	<b>0,0072</b>	<b>0,0072</b>	0,6666	<b>0,0049</b>	0,7428	<b>0,0002</b>	<b>0,0003</b>	<b>0,0004</b>
		EQ3	<b>0,0003</b>	<b>0,0377</b>	0,9994	0,9050	<b>0,0450</b>	<b>0,0343</b>	<b>0,0143</b>	<b>0,0388</b>	<b>0,0145</b>	<b>0,0144</b>	<b>0,0135</b>	<b>0,0002</b>	<b>0,0391</b>	<b>0,0002</b>	<b>0,0002</b>	<b>0,0002</b>
	24	EQ1	0,0395	<b>0,0402</b>	<b>0,0201</b>	1,0000	<b>0,0056</b>	<b>0,0080</b>	<b>0,0235</b>	<b>0,0369</b>	0,0558	0,0557	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
		EQ2	<b>0,0002</b>	0,9328	<b>0,0238</b>	1,0000	0,5990	1,0000	<b>0,0286</b>	0,3701	<b>0,0088</b>	<b>0,0088</b>	0,9999	1,0000	0,9993	1,0000	0,9950	0,4680
		EQ3	<b>0,0002</b>	0,1282	0,9998	0,9999	0,3710	1,0000	1,0000	<b>0,0162</b>	<b>0,0003</b>	<b>0,0002</b>	0,9737	1,0000	<b>0,0014</b>	<b>0,0020</b>	0,6524	0,1354
Coliumo	0	EQ1	1,0000	1,0000	<b>0,0014</b>	0,9882	<b>0,0004</b>	<b>0,0002</b>	1,0000	0,8241	<b>0,0014</b>	1,0000	<b>0,0008</b>	<b>0,0002</b>	1,0000	0,7456	1,0000	0,0681
		EQ3	0,9998	0,9854	<b>0,0109</b>	0,9987	<b>0,0004</b>	<b>0,0905</b>	0,3280	0,1807	0,9962	0,1237	0,0618	<b>0,0002</b>	<b>0,0153</b>	<b>0,0062</b>	0,9903	<b>0,0199</b>
	6	EQ1	0,9986	1,0000	<b>0,0490</b>	1,0000	<b>0,0002</b>	<b>0,0002</b>	0,9972	0,8241	0,9985	0,2064	<b>0,0008</b>	<b>0,0196</b>	0,6289	0,9770	1,0000	1,0000
		EQ3	0,9602	<b>0,0268</b>	<b>0,0240</b>	1,0000	0,6227	<b>0,0399</b>	<b>0,0005</b>	0,1807	1,0000	<b>0,0088</b>	0,1598	0,9996	0,2402	0,0767	0,7089	0,4000
	12	EQ1	0,9989	1,0000	0,9399	1,0000	<b>0,0002</b>	<b>0,0002</b>	<b>0,0232</b>	1,0000	1,0000	<b>0,0015</b>	0,1353	<b>0,0008</b>	0,5017	0,9770	1,0000	0,9989
		EQ3	0,9922	1,0000	0,9859	<b>0,0369</b>	<b>0,0002</b>	<b>0,0007</b>	<b>0,0275</b>	1,0000	<b>0,0277</b>	<b>0,0073</b>	<b>0,0002</b>	<b>0,0002</b>	<b>0,0428</b>	0,0767	0,9997	<b>0,0023</b>
	24	EQ1	0,1333	0,6747	1,0000	0,8899	<b>0,0002</b>	<b>0,0002</b>	<b>0,0358</b>	1,0000	<b>0,0124</b>	<b>0,0002</b>	<b>0,0131</b>	0,3742	0,9734	<b>0,0020</b>	1,0000	1,0000
		EQ3	<b>0,0231</b>	0,0640	0,8241	1,0000	<b>0,0002</b>	<b>0,0002</b>	<b>0,0003</b>	0,9993	<b>0,0106</b>	<b>0,0002</b>	<b>0,0002</b>	<b>0,0002</b>	<b>0,0002</b>	<b>0,0312</b>	<b>0,0002</b>	<b>0,0047</b>



Table S6. Tukey's Honest Significant Difference (HSD) for specific variables from the controls of the two different size fractions in the experiments carried out Achao and Coliumo Bay. p <0.05 of significance in bold

Tukey HSD test (p)							
Site	Time (h)	Treatment	MDHe	Re	LAPe	GLUe	LIPe
Achao	0	Control	0.999977	0.755506	0.058343	0.307597	0.163951
	6	Control	0.345713	<b>0.000909</b>	0.258155	0.090271	<b>0.000389</b>
	12	Control	<b>0.000244</b>	0.921246	<b>0.000237</b>	0.142397	<b>0.009960</b>
	24	Control	<b>0.000236</b>	<b>0.002202</b>	<b>0.000253</b>	0.990780	<b>0.000353</b>
Coliumo	0	Control	<b>0.000236</b>	<b>0.000236</b>	<b>0.003641</b>	<b>0.000263</b>	<b>0.000241</b>
	6	Control	<b>0.000236</b>	<b>0.000236</b>	<b>0.006873</b>	<b>0.000398</b>	<b>0.000236</b>
	12	Control	<b>0.000236</b>	<b>0.000541</b>	<b>0.005162</b>	0.600256	<b>0.000258</b>
	24	Control	<b>0.000236</b>	<b>0.000252</b>	<b>0.000240</b>	<b>0.000244</b>	<b>0.000237</b>

Table S7. Tukey's Honest Significant Difference (HSD) for functional diversity index between treatments and control in Achao and Coliumo.  $p < 0.05$  of significance in bold

Sample	S	N	J'	H'(loge)	1-Lambda'
Env	179	215160	0,7466	3,873	0,9649
C_0h	147	215160	0,7386	3,686	0,9557
CS_0h	159	215160	0,7234	3,667	0,9554
EQ1_0h	156	215160	0,7459	<b>3,767</b>	0,961
EQ2_0h	150	215160	0,746	<b>3,738</b>	0,9592
EQ3_0h0	154	215160	0,7603	<b>3,829</b>	0,9631
C_6h	132	215160	0,7293	3,561	0,9502
CS_6h	141	215160	0,7246	3,586	0,9521
EQ1_6h	156	215160	0,7241	<b>3,657</b>	0,9532
EQ2_6h	162	215160	0,7406	<b>3,768</b>	0,9614
EQ3_6h	171	215160	0,7405	<b>3,807</b>	0,9613
C_12h	167	215160	0,7255	3,713	0,9555
CS_12h	184	215160	0,7166	3,737	0,9577
EQ1_12h	186	215160	0,7226	3,776	0,9599
EQ2_12h	172	215160	0,7262	3,738	0,9579
EQ3_12h	133	215160	<b>0,754</b>	<b>3,687</b>	0,9588
C_24h	156	215160	0,7348	3,71	0,9574
CS_24h	142	215160	0,7515	3,724	0,96
EQ1_24h	157	215160	0,7616	3,851	0,966
EQ2_24h	139	215160	0,7489	<b>3,696</b>	0,9585
EQ3_24h	141	215160	0,7374	<b>3,649</b>	0,9554

Table S8. Diversity indexes of the active microbial community during the experiments. S= richness, N= Sp number, J'= Pielou index, H'= Shannon index, 1-Lambda = 1-Simpson

Tukey HSD test (p)					
Control					
Site	Time (h)	Treatment	AWCD	H'	R
Achao	0	EQ1	<b>0,002</b>	0,949	na
		EQ2	<b>0,023</b>	0,452	na
		EQ3	<b>0,029</b>	0,463	na
	6	EQ1	<b>0,011</b>	1,000	0,799
		EQ2	0,988	0,998	0,467
		EQ3	1,000	1,000	<b>0,038</b>
	12	EQ1	1,000	0,940	0,787
		EQ2	<b>0,037</b>	0,840	0,787
		EQ3	0,752	0,992	0,962
	24	EQ1	<b>0,006</b>	0,944	1,000
		EQ2	<b>0,028</b>	<b>0,020</b>	<b>0,030</b>
		EQ3	0,560	0,283	0,189
Coliumo	0	EQ1	<b>0,026</b>	0,470	<b>0,017</b>
		EQ3	<b>0,045</b>	0,997	<b>0,026</b>
	6	EQ1	0,520	1,000	1,000
		EQ3	0,050	1,000	1,000

## 8.4. Anexo 4

### Características fisicoquímicas e información ecotoxicológica de etoxiquina

<b>Compuesto</b>		<b>Etoxiquina</b>
Nombre químico		1,2-dihydro-6-ethoxy-2,2,4-trimethylquinoline
Formula química		C <sub>14</sub> H <sub>19</sub> NO
Peso molecular (g mol <sup>-1</sup> ) <sup>a</sup>		217,31
Coeficiente de partición octanol/agua <sup>a</sup>		3,39
Solubilidad de agua (mg mL <sup>-1</sup> ) <sup>a</sup>		< 1
LOEC (Lowest effect concentration; mg L <sup>-1</sup> ) <sup>b</sup>	Alga	4,31 (48h)
	Invertebrado	0,52 (48h)
	Pez	0,31 (48h)
LC50 (Lethal concentration; mg L <sup>-1</sup> ) <sup>b</sup>	Alga	23,84 (48h)
	Invertebrado	5,72 (24h)
	Pez	10-20 (48h)
EC50 (Half maximal effective concentration; mg L <sup>-1</sup> ) <sup>b</sup>	Alga	27,03 (48h)
	Invertebrado	2,65 (48h)
	Pez	6,81 (48h)
PNEC (Predicted no-effect concentration; µg L <sup>-1</sup> ) <sup>*b</sup>		1
BCF (Bioconcentration factor; L kg <sup>-1</sup> ) <sup>a</sup>		nd
Otros <sup>a,b</sup>		toxico para la vida acuática

<sup>a</sup> <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Ethoxyquin#section>

<sup>b</sup> Egglof y Pietsch 2018; \*factor de seguridad de 300