



Universidad de Concepción

Dirección de Postgrado

Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas - Programa de Postgrados en Oceanografía

**MECANISMOS DE GENERACIÓN DE METANO EN LA
ZONA FÓTICA EN SISTEMAS MARINOS
ALTAMENTE PRODUCTIVOS**

POR SANDY ELIZABETH DEL ROCIO TENORIO SÁNCHEZ

Tesis presentada a la Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas
de la Universidad de Concepción para optar el grado de Magíster en
Ciencias con mención en Oceanografía

Profesor Guía: Dra. Laura Farías

Departamento de Oceanografía, Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas

Universidad de Concepción

Enero, 2021
Concepción, Chile

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento.



Universidad de Concepción

Dirección de Postgrado

La tesis de Magíster en Ciencias con mención en Oceanografía titulada “Mecanismos de generación de metano en la zona fótica en sistemas marinos altamente productivos”, de la Srta. Sandy Elizabeth del Rocío Tenorio Sánchez y realizada bajo la Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas, Universidad de Concepción, ha sido aprobada por la siguiente Comisión de evaluación.

Dra. Laura Farías

Profesor Guía

Departamento de Oceanografía

Universidad de Concepción



Dr. Silvio Pantoja

Miembro de la Comisión de Evaluación

Departamento de Oceanografía

Universidad de Concepción

Dr. Marcelo Gutiérrez

Miembro de la Comisión de Evaluación

Departamento de Oceanografía

Universidad de Concepción

Dra. María Alcamán

Evaluador externo

Centro de Ciencia del Clima y la Resiliencia (CR)²

Dr. Diego Narvárez

Director del Programa

Departamento de Oceanografía

Universidad de Concepción

AGRADECIMIENTOS

Agradecer profundamente a mi profesora guía Dra. Laura Farías, por su apoyo, confianza, motivación y paciencia durante esta etapa de magíster, especialmente por su amistad y orientación en el desarrollo de esta tesis.

Al laboratorio de biogeoquímica isotópica; a Gerardo García, por sus enseñanzas, entusiasmo y apoyo técnico en el desarrollo de los experimentos, a Karen Sanzana y Juan Faúndez por su ayuda en aspectos metodológicos, colaboración y compañerismo.

Al Dr. Silvio Pantoja, Dr. Marcelo Gutiérrez, Dra. María Estrella Alcamán, y Dr. Fabían Tapia, por sus comentarios, sugerencias y por formar parte de la comisión evaluadora. Al Dr. Rubén Escribano, por facilitarme las instalaciones del Laboratorio de Biología Marina (Dichato) para la realización de los experimentos de microcosmos.

A Juan Antón y Dixon Villena por el apoyo durante el muestro de los experimentos de microcosmos. A Oliver Alarcón, por su tiempo y enseñanzas en el uso del AULOX.

Finalmente, agradecer a la Comisión Nacional de Ciencia y Tecnología-CONICYT (116138), Centro de Ciencia del Clima y Resiliencia-(CR)² y a la Dirección de Postgrado de la Universidad de Concepción por financiar mis estudios de magíster.

CURRICULUM VITAE

Sandy Elizabeth del Rocio Tenorio Sánchez

Nacida el 13 de septiembre, 1993 en Ferreñafe, Perú

2010-2015: Biólogo pesquero, Licenciado en Biología-Pesquería, Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Perú.

2018-2021: Magíster en Ciencias con Mención en Oceanografía, Universidad de Concepción, Chile.

PUBLICACIONES

Farías, L., Tenorio, S., Sanzana, K., Faundez, J. 2020. Temporal methane variability in the water column of an area of seasonal coastal upwelling: a study based on a 12 year Time Series. *Progres in Oceanography* (aceptado).

ÁREAS DE INVESTIGACIÓN

Principal: Oceanografía química

Secundaria: Biogeoquímica

CRUCEROS OCEANOGRÁFICOS

- Serie de Tiempo (Kai-Kai II), Universidad de Concepción, Chile, 2018 - 2019.

ESTADÍAS DE INVESTIGACIÓN O ENTRENAMIENTO

- Laboratorio de Biogeoquímica Isotópica, Universidad de Concepción, Laura Farías, Chile, marzo 2018 - diciembre 2020.

- Curso Cambio climático: Carbono azul y adaptación basada en ecosistemas marinos y costeros. Ocean Teacher Global Academy. Colombia, 22 de junio - 10 de julio 2020.
- Curso Programación en R para análisis de datos. Universidad de Concepción. Chile, 6 de mayo - 7 de julio 2020.
- Curso Cambio climático. Universidad de Chile. Chile, 17 de marzo - 22 abril 2020.



TABLA DE CONTENIDOS

AGRADECIMIENTOS	iv
CURRICULUM VITAE	v
ÍNDICE DE TABLAS	x
ÍNDICE DE FIGURAS	xii
RESUMEN.....	xv
ABSTRACT.....	xviii
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. El océano como fuente de metano hacia la atmósfera.....	1
1.2. Aspectos generales	1
1.3. Posibles procesos biogeoquímicos responsables de la regeneración de metano en condiciones óxicas.....	5
1.4. Condiciones oceanográficas y biológicas en aguas superficiales de la zona de surgencia de Chile central	9
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	12
2.1. Hipótesis.....	12
2.1. Objetivo principal.....	12
2.2. Objetivos específicos.....	12
3. MATERIAL Y MÉTODOS	13
3.1. Área de estudio	13
3.2. Estación y frecuencia de muestreo	14
3.3. Variabilidad estacional de CH ₄ en la columna de agua en relación a otras variables oceanográficas/biogeoquímicas, e intercambio de CH ₄ a través de la interfaz mar-atmósfera.	16
3.3.1. Variables oceanográficas y biogeoquímicas	16

3.3.2.	Flujos de metano en la interfaz océano-atmósfera.....	17
3.4.	VARIABLES/procesos que controlan la acumulación de CH ₄ en la columna de agua.	19
3.5.	Tasa de producción de CH ₄ en la columna de agua superficial (10 m) por parte de la comunidad planctónica fraccionada (comunidad total o natural, <150, <3 y <0.2 μm).....	19
3.6.	Metanogénesis metilotrófica en aguas superficiales frente a Concepción. .	24
3.6.1.	Experimento en viales cromatográficos	24
3.6.2.	Experimentos en microcosmos	26
4.	RESULTADOS	30
4.1.	CAPÍTULO 1: VARIABILIDAD TEMPORAL DE CH ₄ EN LA COLUMNA DE AGUA EN RELACIÓN A OTRAS VARIABLES OCEANOGRÁFICAS/BIOGEOQUÍMICAS, E INTERCAMBIO DE CH ₄ A TRAVÉS DE LA INTERFAZ MAR-ATMÓSFERA.	30
4.2.	CAPÍTULO 2: TASA DE PRODUCCIÓN NETA DE CH ₄ EN LA COLUMNA DE AGUA SUPERFICIAL POR PARTE DE LA COMUNIDAD PLANCTÓNICA.	92
4.3.	CAPÍTULO 3: DISCERNIR SI PROCESOS DE METANOGENÉISIS METILOTRÓFICA ESTÁN PRESENTES EN AGUAS SUPERFICIALES FRENTE A CONCEPCIÓN.	99
4.3.1.	Tasas de reciclaje de metano enriquecido con sustratos orgánicos.....	99
4.3.2.	Tasas de reciclaje de CH ₄ en experimentos de microcosmos	106
5.	DISCUSIÓN	120
5.1.	Mecanismos biogeoquímicos que condicionan la regeneración de metano en la columna de agua.....	120
5.2.	Dinámica estacional de la generación de metano en la plataforma continental de Chile central y forzantes físicos	124
5.3.	Intercambio de metano en la interfaz mar-atmósfera.....	126

5.4. Mecanismos de generación de metano en la capa superficial del océano costero de Chile central.....	130
5.4.1. El rol del fitoplancton en la generación de metano.....	131
5.4.2. El rol del bacterioplancton en el reciclaje de metano	134
5.5. Potenciales fuentes orgánicas que estimulan la regeneración heterotrófica de metano en la capa superficial	136
5.6. Perspectivas	141
5.7. Contratación de hipótesis.....	143
6. CONCLUSIONES.....	144
7. BIBLIOGRAFÍA.....	146



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1. Tipo de metanogénesis según el sustrato utilizado. Modificado de Madigan et al., 2004 y Lyu et al., 2018.....	2
Tabla 1.2. Recopilación bibliográfica de estudios en ambientes marino sobre generación de metano en condiciones óxicas. MPn (ácido metilfosfónico), DMSP (dimetil sulfopropionato), DMS (dimetilsulfuro), COP (Carbono Orgánico Particulado), MOD (Materia Orgánica Disuelta).....	8
Tabla 3.1. Resumen de diferentes fechas de experimentos realizados en viales de cromatografía y microcosmos.....	20
Tabla 3.2. Diseño Experimental de reciclaje de metano en comunidades planctónicas fraccionadas, en viales GC (triplicado). Diciembre 2018 – enero 2019.	21
Tabla 3.3. Diseño Experimental de reciclaje de metano en la comunidad del bacterioplancton, en viales GC (triplicado). Marzo y mayo 2019.....	25
Tabla 3.4. Diseño experimental de incubación en microcosmos, con adición de sustratos metilados, ácido metil fosfónico (A) y trimetilamina (B), a tres comunidades planctónicas diferentes.....	26
Tabla 4.1. Concentraciones iniciales de diferentes variables en los experimentos de plancton fraccionado (CN: Comunidad Natural, <150 µm: microplancton, <3 µm: picoplancton y la <0.2 µm: fentoplancton) en viales cromatográficos, en diciembre 2018 y enero 2019.	93
Tabla 4.2. Tasas netas de acumulación y/o consumo de CH ₄ (nmol L ⁻¹ h ⁻¹) en experimentos de plancton fraccionado (CN: Comunidad Natural, <150 µm: microplancton, <3 µm: picoplancton) en viales cromatográficos, en diciembre 2018 y enero 2019.....	98
Tabla 4.3. Concentraciones iniciales de diferentes variables en los experimentos de plancton fraccionado (<3 µm: picoplancton y CC: Comunidad Concentrada) en viales cromatográficos con adición de sustratos	

metilados (MPn: Ácido metilfosfónico y TMA: Trimetilamina) en marzo y mayo 2019.....	100
Tabla 4.4. Concentraciones iniciales de diferentes variables en los experimentos de plancton fraccionado (<3 µm: picoplancton y CC: Comunidad Concentrada) en viales cromatográficos con adición de sustratos metilados (MPn: Ácido metilfosfónico y TMA: Trimetilamina) en marzo y mayo 2019.....	103
Tabla 4.5. Tasas netas de producción y/o consumo de CH ₄ (nmol L ⁻¹ h ⁻¹) en experimentos de plancton fraccionado (<3 µm: picoplancton y CC: Comunidad Concentrada) en viales cromatográficos con adición de sustratos metilados (MPn: Ácido metilfosfónico y TMA: Trimetilamina) en marzo y mayo 2019.....	104
Tabla 4.6. Concentraciones iniciales de diferentes variables en los experimentos de microcosmos en tres comunidades planctónicas (CN: Comunidad Natural, <3 µm: picoplancton y CC: Comunidad Concentrada) bajo condiciones oxigenadas y con adición de sustratos metilados (MPn: Ácido metilfosfónico y TMA: Trimetilamina), abril 2019.....	107
Tabla 4.7. Concentraciones iniciales de diferentes variables en los experimentos de microcosmos en tres comunidades planctónicas (CN: Comunidad Natural, <3 µm: picoplancton y CC: Comunidad Concentrada) bajo condiciones oxigenadas y con adición de sustratos metilados (MPn: Ácido metilfosfónico y TMA: Trimetilamina), septiembre 2019.....	114
Tabla 4.8. Tasas de producción y/o consumo de CH ₄ (nmol L ⁻¹ h ⁻¹) en experimentos en microcosmos en tres comunidades planctónicas (CN: Comunidad Natural, <3 µm: bacterioplancton y CC: Comunidad Concentrada) bajo condiciones oxigenadas y con adición de sustratos metilados (MPn: Ácido metilfosfónico y TMA: Trimetilamina), en abril y septiembre 2019.	116
Tabla 5.1. Recopilación de flujos de metano hacia la atmósfera en diferentes sistemas del océano.	129

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.1.** Perfiles típicos de CH₄ en el A. océano costero: Surgencia costera de Chile central. Tomado de Farías et al. (2009) y en el B. océano abierto: Mar de los Sargazos; modificado de Holmes et al. (2000). 5
- Figura 1.2.** Clivaje del enlace C-P es catalizado por la subunidad PhnJ del complejo enzimático C-P liasa. Esta reacción permite que las bacterias liberen compuesto de fósforo para su asimilación. Y a través de la transferencia de un hidrógeno PhnJ, el grupo metilo, se convierte en CH₄. Tomado de Taenzer (2019). 7
- Figura 3.1.** Localización geográfica de la estación 18 (ST18), situada sobre la plataforma continental de Chile central, influenciada por los ríos Itata y Biobío. 15
- Figura 3.2.** A. Distribución del agua de mar en los frascos de 8 L. B. Recolección de muestras para obtener condiciones iniciales de los diferentes tratamientos. 22
- Figura 3.3.** A. Grupo de 27 viales esterilizados puestos en una rejilla plástica. B. Toma de muestra de agua y posterior sellado. C. Incubación de viales con inhibición de luz. D. Envenenamiento de viales con HgCl₂ E. headspace generado al agregar 5 mL de He y posterior análisis en el GC. 24
- Figura 3.4.** Filtrado de flujo tangencial. 25
- Figura 3.5.** A. Diseño del microcosmos y B. Experimento en funcionamiento. 28
- Figura 4.1.** Evolución temporal de experimentos de plancton fraccionado (CN: Comunidad Natural, <150 µm: microplancton, <3 µm: picoplancton, <0,2 µm: fentoplancton) en viales cromatográficos en condiciones oxigenadas en diciembre 2019. A. metano B. nitrato, C. nitrito y D. fosfato. El fotoperiodo está representado en blanco (luz) y gris (oscuridad). 95

- Figura 4.2.** A. Evolución temporal de experimentos de plancton fraccionado (CN: Comunidad Natural, <150 μm : microplancton, <3 μm : picoplancton, <0,2 μm : fentoplancton) en viales cromatográficos en condiciones oxigenadas en enero 2019. A. metano B. nitrato, C. nitrito y D. fosfato. El fotoperiodo está representado en blanco (luz) y gris (oscuridad). ... 97
- Figura 4.3.** Evolución temporal de A. Metano (nM), B. Nitritos (μM), C. Nitratos (μM) y D. Fosfatos (μM) durante experimentos de plancton fraccionado (<3 μm : picoplancton, CC: Comunidad Concentrada) con adición de sustratos metilados (MPn: Ácido metil fosfónico y TMA: Trimetilamina) en viales cromatográficos bajo condiciones oxigenadas, en marzo 2019. Se indica el fotoperiodo en blanco (luz) y gris (oscuridad)...... 102
- Figura 4.4.** Evolución temporal de A. Metano (nM), B. Nitritos (μM), C. Nitratos (μM) y D. Fosfatos (μM) durante experimentos de plancton fraccionado (<3 μm : picoplancton, CC: Comunidad Concentrada) con adición de sustratos metilados (MPn: Ácido metilfosfónico y TMA: Trimetilamina) en viales cromatográficos bajo condiciones oxigenadas, en mayo 2019. Se indica el fotoperiodo en blanco (luz) y gris (oscuridad)...... 105
- Figura 4.5.** Evolución temporal de incubaciones en microcosmos en tres comunidades planctónicas (CN: Comunidad Natural, <3 μm : bacterioplancton y CC: Comunidad Concentrada) bajo condiciones oxigenadas y con adición de sustratos metilados (MPn: Ácido metilfosfónico y TMA: Trimetilamina), en abril 2019. A. Producción neta de metano (nM), B. Nitritos (μM), C. Nitratos (μM) y D. Fosfatos (μM). El fotoperiodo está representado en blanco (luz) y gris (oscuridad)...... 110
- Figura 4.6.** Evolución temporal de incubaciones en microcosmos en tres comunidades planctónicas (CN: Comunidad Natural, <3 μm : bacterioplancton y CC: Comunidad Concentrada) en microcosmos bajo condiciones oxigenadas y con adición de sustratos metilados (MPn: Ácido metilfosfónico y TMA: Trimetilamina), en abril 2019. A. Oxígeno (μM), B. Clorofila-a (mg m⁻³) y C. Carbono Orgánico Disuelto (μM)...... 111

- Figura 4.7.** Abundancia de A. *Synechococcus*, B. Pico + nanoeucariontes y C. Bacterias en incubaciones de microcosmos en tres comunidades planctónicas (CN: Comunidad Natural, <3 μm : bacterioplancton y CC: Comunidad Concentrada) en microcosmos bajo condiciones oxigenadas y con adición de sustratos metilados (MPn: Ácido metilfosfónico y TMA: Trimetilamina), en abril 2019. 112
- Figura 4.8.** Evolución temporal de incubaciones en microcosmos en tres comunidades planctónicas (CN: Comunidad Natural, <3 μm : bacterioplancton y CC: Comunidad Concentrada) en microcosmos bajo condiciones oxigenadas y con adición de sustratos metilados (MPn: Ácido metilfosfónico y TMA: Trimetilamina), en septiembre 2019. A. Producción neta de metano (nM), B. Nitritos (μM), C. Nitratos (μM) y D. Fosfatos (μM). El fotoperiodo está representado en blanco (luz) y gris (oscuridad). 117
- Figura 4.9.** Evolución temporal de incubaciones en microcosmos en tres comunidades planctónicas (CN: Comunidad Natural, <3 μm : bacterioplancton y CC: Comunidad Concentrada) en microcosmos bajo condiciones oxigenadas y con adición de sustratos metilados (MPn: Ácido metilfosfónico y TMA: Trimetilamina), en septiembre 2019. A. Oxígeno (μM), B. Clorofila-a (mg m^{-3}) y C. Carbono Orgánico Disuelto (μM). 118
- Figura 4.10.** Abundancia de A. *Synechococcus*, B. Pico + nanoeucariontes y C. Bacterias en incubaciones de microcosmos en tres comunidades planctónicas (CN: Comunidad Natural, <3 μm : bacterioplancton y CC: Comunidad Concentrada) en microcosmos bajo condiciones oxigenadas y con adición de sustratos metilados (MPn: Ácido metilfosfónico y TMA: Trimetilamina), en septiembre 2019. 119
- Figura 5.1.** Línea de tiempo de los diferentes estudios y procesos que han ido surgiendo para analizar el origen superficial del metano. 122
- Figura 5.2.** Distribución vertical del Carbono Orgánico Disuelto en una estación fija (ST18) sobre la plataforma continental de la zona de surgencia de Chile Central (Tenorio et al. data no publicada) 137

RESUMEN

Mecanismos de generación de metano en la zona fótica en sistemas marinos
altamente productivos

Sandy Tenorio

Programa de Magíster en Ciencias mención Oceanografía

Universidad de Concepción, 2020

Dra. Laura Farías, Profesor Guía

El metano (CH_4) es el gas traza orgánico más abundante en la atmósfera con un potente efecto invernadero y tiene un tiempo de vida media de 10 años. Su concentración en este reservorio ha aumentado por un factor de 2.6 desde la era pre industrial, impactando la composición química de la atmósfera y el clima del planeta. La paradoja del CH_4 , i.e., la generación de CH_4 en condiciones oxigenadas en el océano, ha incrementado el interés por su estudio en las últimas dos décadas, cuestionando la metanogénesis anaeróbica como la principal vía biológica de producción de CH_4 y abriendo nuevos horizontes para el estudio de mecanismos de reciclaje de CH_4 y los microorganismos involucrados en este proceso.

Las zonas de surgencia costera, como la de Chile Central (36°S), se caracterizan por ser un sistema altamente productivo al que se le asocia altas tasas de sedimentación de materia orgánica principalmente en períodos de suboxia que conllevan a la mineralización anaeróbica y producción de CH_4 en sedimentos y aguas de fondo. Esto es fundamental al analizar la magnitud de flujos de este gas hacia la atmósfera, además del origen de este gas y el rol de las comunidades planctónicas; cuyos mecanismos de generación pueden ser variados y muchos de ellos asociados al reciclaje del carbono orgánico disuelto (COD) por el bacterioplancton heterótrofo o procesos mediado por la interacción entre el fito y bacterioplancton, generando CH_4 en la capa superficial, principalmente en los periodos favorables a la surgencia.

El presente estudio analizó la distribución temporal de CH₄ durante 12 años en una estación fija (ST18) localizada en la zona de surgencia de Chile Central (36° 0.802' S 73° 07.750' W) además de la tasa de producción neta de CH₄ en la capa superficial oxigenada con diferentes comunidades planctónicas fraccionadas y adicionando sustratos metilados, tales como trimetilamina (TMA) y ácido metil fosfónico (MPn) bajo condiciones de luz y oscuridad, y temperatura controlados. Esto con el objeto de discernir mecanismos de acoplamiento entre fitoplancton y bacterioplancton asociados al reciclaje de este gas y sustratos orgánicos que favorecen dicho proceso.

Los resultados indicaron que las mayores concentraciones de CH₄ se encontraron en la capa de fondo con rangos de 4.81 a 100.86 nM ($\bar{x} \pm DS = 30.65 \pm 15.44$ nM). No obstante, en la capa superficial oxigenada se registró concentraciones entre 1.75 y 54.64 nM ($\bar{x} \pm DS = 14.64 \pm 7.94$ nM), equivalente al 6.97 y 1508.95 % de saturación a lo largo del periodo de estudio, con mayores concentraciones en periodo de surgencia, aunque no mostraron diferencias significativas ($p < 0.05$) con el periodo no favorable a la surgencia. La zona se constituye como una fuente de CH₄ hacia la atmósfera con flujos que variaron entre 1.27 y 47.02 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{ día}^{-1}$ ($\bar{x} \pm DS = 10.94 \pm 7.48$ $\mu\text{mol m}^{-2} \text{ día}^{-1}$), siendo dos órdenes de magnitud mayor que el océano abierto. No se encontró una correlación positiva con la clorofila-a, no obstante, correlaciones negativas entre el CH₄, y temperatura y oxígeno disuelto indican que la acumulación de CH₄ puede estar asociado a las Aguas Ecuatoriales Sub Superficiales.

Los experimentos de reciclaje de CH₄ con aguas superficiales mostraron una tasa de producción (acumulación) neta de CH₄ entre 0,02 y 0,1 $\text{nmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$; la mayor producción de CH₄ se observó en la fracción del bacterioplancton ($0,59 \pm 0,13$ $\text{nmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$) bajo condiciones de oscuridad seguida por el microplancton ($0,22 \pm 0,58$ $\text{nmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$) en condiciones de luz, indicando mecanismos de competencia probablemente asociados al consumo de COD. La adición de sustratos metilados como TMA y MPn estimuló levemente la acumulación de CH₄ en experimentos de microcosmos. Los resultados apoyan la existencia de una metanogénesis metilotrófica en la capa superficial oxigenada, la cual se intercambia con la atmósfera, pero la mayor parte del

CH₄ se acumula en aguas de fondo y es posteriormente advectado e intercambiado con la atmosfera por medio de la surgencia costera, corroborando la importancia de las regiones costeras en el ciclo global del CH₄.

Palabras claves: metano, surgencia costera, serie de tiempo, microcosmos, Chile central.



ABSTRACT

Mechanisms of methane generation in the photic zone in highly productive marine systems

Sandy Tenorio

Master of Science Program in Oceanography

University of Concepción, 2020

Dr. Laura Farias, Advisor

Methane (CH₄), the most abundant organic trace gas in the atmosphere, exerts a powerful greenhouse effect and has an average atmospheric lifetime of 10 years. CH₄ concentrations in this reservoir have increased by a factor of 2.6 since the pre-industrial era, impacting the chemical composition of the atmosphere and the climate of the planet. Interest in the CH₄ paradox, i.e., CH₄ generation under oxygenated ocean conditions, has increased over the last two decades, questioning anaerobic methanogenesis as the main biological pathway for CH₄ production and opening new horizons for the study of CH₄ cycling mechanisms and microorganisms involved in this process.

Coastal upwelling, such as that found in central Chile (36 °S), is characterized by a highly productive system associated with high rates of organic matter sedimentation, mainly during suboxic periods, leading to anaerobic mineralization and CH₄ production in sediments and groundwater. This is fundamental when analyzing the magnitude of gas flow into the atmosphere, as well as when studying the origin of this gas and the role of planktonic communities. Furthermore, the mechanisms of generation by these microbial communities are varied, many of which are associated with the recycling of dissolved organic carbon (DOC) by heterotrophic bacterioplankton, and can be mediated by interactions between phytoplankton and bacterioplankton. Subsequently, these processes regenerate CH₄ in the surface layer, mainly during upwelling-favorable periods.

This study analyzed the temporal distribution of CH₄ over 12 years at a fixed station (ST18) located in the upwelling of central Chile (36° 0.802' S 73° 07.750' W). In addition, the rate of net CH₄ production in the oxygenated photic layer was studied using different fractionated planktonic communities and the addition of methylated substrates, namely trimethylamine (TMA) and methyl phosphonic acid (MPn), under controlled light/dark and temperature conditions. This was done in order to elucidate the coupling mechanisms between phytoplankton and bacterioplankton associated with CH₄ recycling and the organic substrates that favor this process.

The results indicate that the highest CH₄ concentrations, ranging from 4.81 to 100.86 nM ($\bar{x} \pm DS = 30.65 \pm 15.44$ nM), were found in the bottom layer. The superficial oxygenated layer exhibited concentrations between 1.75 - 54.64 nM ($\bar{x} \pm DS = 14.64 \pm 7.94$ nM), which is equivalent to 6.97 - 1508.95 % of the saturation throughout the study period. Higher concentrations were observed during the upwelling period, although there was no significant difference ($p < 0.05$) with periods not favorable to upwelling. Thus, this zone is a source of CH₄ to the atmosphere with flows varying between 1.27 and 47.02 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{ day}^{-1}$ ($\bar{x} \pm DS = 10.94 \pm 7.48$ $\mu\text{mol m}^{-2} \text{ day}^{-1}$), which is 2 orders of magnitude greater than that of the open ocean. No positive correlation was found with chlorophyll-a, however, negative correlations between CH₄, and temperature and dissolved oxygen indicate that CH₄ accumulation may be associated with Equatorial Sub Surface Waters.

The CH₄ recycling experiments using surface waters showed a net CH₄ production rate (accumulation) between 0.02 - 0.1 nmol L⁻¹ h⁻¹. The highest CH₄ production was observed in the bacterioplankton fraction under dark conditions (0.59 \pm 0.13 nmol L⁻¹ h⁻¹) followed by microplankton under light conditions (0.22 \pm 0.58 nmol L⁻¹ h⁻¹). This indicates that mechanisms of competition were probably associated with DOC consumption. The addition of methylated substrates, namely TMA and MPn, slightly stimulated CH₄ accumulation in the microcosms. These results support the existence of methylotrophic methanogenesis in the superficial oxygenated layer, the product of which is exchanged with the atmosphere. However, most of the CH₄ accumulates in bottom waters and is subsequently advected and exchanged with the

atmosphere by means of coastal upwelling, corroborating the importance of coastal regions in global CH₄ cycling.

Keywords: methane, coastal upwelling, time series, microcosm, central Chile.



1. INTRODUCCIÓN

1.1. Aspectos generales

El CH₄, es un gas traza orgánico muy abundante del planeta Tierra y se encuentra en todos los reservorios de éste; ya sea en forma gaseosa en la atmósfera, disuelto en el agua continental y marina o en el agua de poro de los sedimentos y en estado sólido como hidrato o clatrato de CH₄ en sedimentos y permafrost en suelos (Reeburgh, 2007). Debido a su espectro de absorción de rayos infrarrojos, el CH₄ es un importante gas con efecto invernadero en el sistema climático, con un poder de calentamiento 28 a 34 veces mayor que el CO₂ (Cicerone y Oremland, 1988; IPCC, 2013; Wuebbles y Hayhoe, 2002, 2000). Este gas, dado su efecto invernadero sumado a los cambios que provoca en la química de la atmósfera, repercuten en el balance radiativo de la Tierra (Cicerone y Oremland, 1988; Fung et al., 1991; Wuebbles y Hayhoe, 2002).

El balance entre sus fuentes y sumideros (naturales y antropogénicas), determinan un tiempo de residencia en la atmósfera de 10 a 12 años (Denman et al., 2007). La concentración de este gas en este reservorio ha aumentado en forma sostenida por un factor de 2,6 (Saunois et al., 2020), desde una concentración de 715 ppbv en la época pre industrial hasta valores actuales de 1872 ppbv (Dlugokencky, 2020), indicando que a pesar su constante oxidación por los radicales hidroxilos (OH) de la tropósfera (sumidero atmosférico de CH₄), la fuentes antropogénicas son cada vez mayores (Saunois et al., 2020).

Existen tres tipos de mecanismos de generación de CH₄ en el sistema Tierra, procesos biogénicos (mediado por microorganismos), termogénicos (asociada a la transformación de la materia orgánica por procesos geológicos) y pirogénicos (mediante la quema de materia orgánica o biomasa) (Liu and Whitman, 2008; Lyu et

al., 2018; Thauer et al., 2008). Los procesos biogénicos comprenden la descomposición de la materia orgánica por respiración anaeróbica, llevada a cabo por arqueas en condiciones anóxicas, características que sugieren un metabolismo muy antiguo (Bakker et al., 2014; Liu and Whitman, 2008; Lyu et al., 2018; Madigan et al., 2004; Thauer et al., 2008).

Los microorganismos metanogénicos utilizan diferentes compuestos orgánicos y se clasifican en: metanogénesis hidrogenotrófica, acetoclástica y metilotrófica (Ferry, 1999; Liu and Whitman, 2008; Lyu et al., 2018; Madigan et al., 2004) (Tabla 1.1).

Tabla 1.1. Tipo de metanogénesis según el sustrato utilizado. Modificado de Madigan et al., 2004 y Lyu et al., 2018.

Metanogénesis	Sustrato	Ambiente / Reacción
Hidrogenotrófica	CO ₂	Sedimentos marinos, intestinos de terminas, tracto digestivo de animales y humanos. $CO_2 + 4H_2 \rightarrow CH_4 + 2H_2O$
Acetoclástica	Acetato	Digestores anaeróbicos, arrozales y humedales $CH_3COO^- + H_2O \rightarrow CH_4 + HCO_3^-$
Metilotrófica	Compuestos metilados de C1	Rumen bovino, sedimentos marinos e hipersalinos, ricos en sulfatos $CH_3OH + H_2 \rightarrow CH_4 + 2H_2O$

1.2. El océano como fuente de metano hacia la atmósfera

Los ecosistemas marinos costeros actúan como fuente de CH₄, especialmente las zonas altamente productivas como estuarios (Upstill-goddard et al., 2000), humedales (Saunois et al., 2020), manglares (Chang et al., 1999; Konnerup et al., 2014; Rosentreter et al., 2018) y surgencia costera (Florez-Leiva et al., 2013; Kock et al., 2008; Naqvi et al., 2010). A pesar de que estas áreas costeras sólo cubren el 15% de la superficie del océano, representan el 75 % de las emisiones globales marinas (Bange et al., 1994).

En este sentido, existen numerosos balances de CH₄ en el océano (Bakker et al., 2014; Bates et al., 1996; Rhee et al., 2009; Saunois et al., 2020; Weber et al., 2019), que entregan un rango muy amplio de emisiones. Por ejemplo Bakker et al. (2014) estimaron entre 8,3 -45,9 Tg C al año, mientras que Weber et al. (2019), a través de una compilación global de datos, redujeron el rango a 6 - 12 Tg CH₄ año⁻¹, poniendo de manifiesto la incertidumbre acerca de las emisiones globales. Las fluctuaciones en las concentraciones de CH₄ en la atmósfera desde el 2000 hasta el 2017 estiman que el tanto el océano abierto y el océano costero (incluyendo estuarios) contribuyen entre 4 – 10 Tg CH₄ año⁻¹ (Saunois et al., 2020). Por lo tanto, los desafíos para evaluar estas incertidumbres aún son persistentes, sobre todo al analizar los ecosistemas con dinámicas espaciales y temporales propias, donde la extrapolación de datos podría (sub)sobrestimar el rol del océano en el balance global (Saunois et al., 2020).

Las principales fuentes de CH₄ hacia el océano provienen de la degradación de la materia orgánica en sedimentos (Reeburgh, 2007), aguas deficientes en oxígeno (de fondo, zonas de mínima de oxígeno y picnoclinas) (Naqvi et al., 2010; Scranton y Brewer, 1977), escorrentías continentales (Rao y Sarma, 2017), sistemas hidrotermales (Welhan y Craig, 1979), hidratos de CH₄ (Milkov, 2004) y “cold seep”, aunque los aportes de este último no son significativos (Boetius y Wenzhöfer, 2013).

En general, la distribución vertical del CH₄ está controlada por un balance entre fuentes externas, procesos de metanogénesis y su remoción por oxidación

(metanotrofia aeróbica y anaeróbica) (Reeburgh, 2007; Scranton and Brewer, 1977). Este gas se acumula principalmente en sedimentos y aguas de fondo y/o intermedias (Zona de mínimo oxígeno) y puede llegar a la superficie e intercambiarse con la atmósfera a través de procesos difusivos, advectivos y ebullición (Weber et al., 2019). El proceso de metanotrofia actúa como un filtro o tapón para el intercambio de CH₄ con la atmósfera, ya que consumen/oxidan parte del CH₄ regenerado (Hanson y Hanson, 1996; James et al., 2016), reduciendo las emisiones hacia la atmósfera en un 1 a 3% (Saunio et al., 2020).

En la Figura 1.1 se muestran perfiles típicos de CH₄ en océanos costeros y abiertos; si bien gran parte del CH₄ se acumula en áreas cercanas a las fuentes, delineando perfiles donde la concentración aumenta con la profundidad (Fig. 1.1A), se han observado en aguas superficiales oxigenadas, niveles de CH₄ por sobre el equilibrio con la atmósfera (sobresaturación; Fig. 1.1B) (Bogard et al., 2014; Florez-Leiva et al., 2013; Holmes et al., 2000; Kock et al., 2008; Lamontagne et al., 1973; Scranton and Brewer, 1977).

Esto sugiere una asociación entre la producción de materia orgánica y la actividad microbiana asociada, dando lugar a procesos de producción de CH₄ *in situ* en la superficie del océano (Cicerone y Oremland, 1988). Este fenómeno ha sido denominado “la paradoja del metano” (Lamontagne et al., 1973), y ha motivado al estudio de este gas a los investigadores por más de 40 años (Karl et al., 2008; Del Valle y Karl, 2014; Repeta et al. 2016; Scranton y Brewer, 1977).

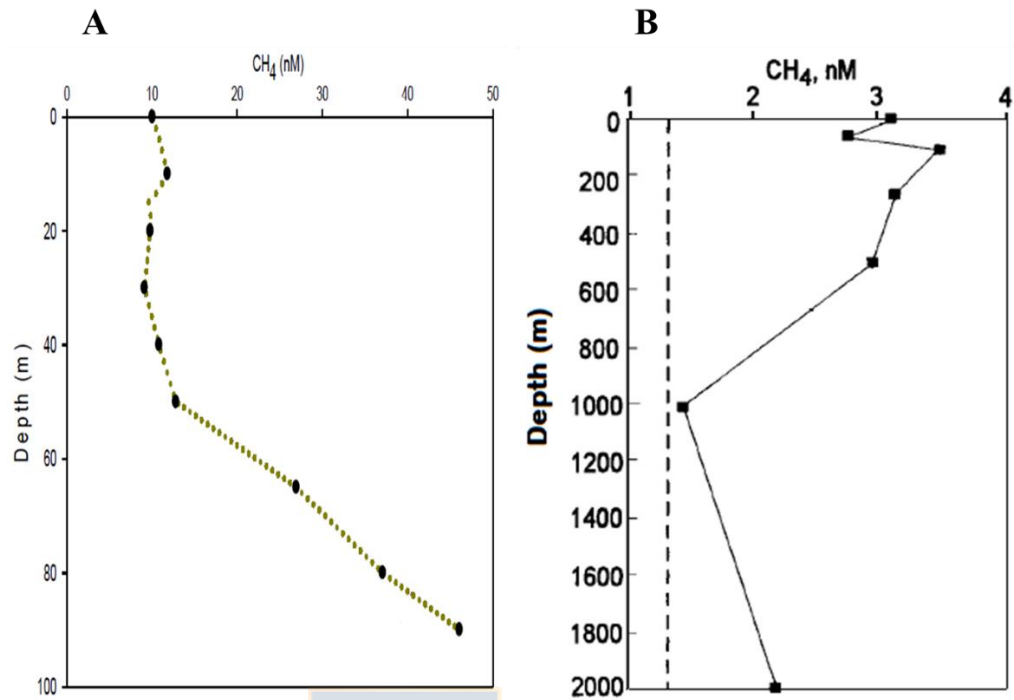


Figura 1.1. Perfiles típicos de CH₄ en el A. océano costero: Surgencia costera de Chile central. Tomado de Farías et al. (2009) y en el B. océano abierto: Mar de los Sargazos; modificado de Holmes et al. (2000).

1.3. Posibles procesos biogeoquímicos responsables de la regeneración de metano en condiciones óxicas.

Las principales fuentes de CH₄ que explican su sobresaturación en la capa superficial oxigenada es la producción de CH₄ por microorganismos que viven en micro-ambientes anóxicos como el tracto digestivo del zooplancton (De Angelis y Lee, 1994), peces (Oremland, 1979), en el interior de partículas suspendidas que sedimentan (Karl and Tilbrook, 1994; Marty et al., 1997; Sasakawa et al., 2008); además de la producción directa por micro-organismos fitoplanctónicos como *Emiliana huexleyi* (Klitzsch et al., 2020; Lenhart et al., 2016) y otras algas no calcificantes (Klitzsch et al., 2020, 2019). Recientemente se han reportado la

producción directa de CH₄ por algunas cianobacterias (Beversdorf et al., 2010; Bižić et al., 2020; Hartmann et al., 2020; Yao et al., 2016) y por asociación de cianobacterias con arqueas metanogénicas (Berg et al., 2014; Grossart et al., 2011), sugiriendo que existe un vínculo en las diversas vías metabólicas de bacterias y eucariontes que degradan compuestos metilados (Carini et al., 2014; Dinasquet et al., 2018; Florez-Leiva et al., 2013; León-Palmero et al., 2020; Repeta et al., 2016).

Además, se ha sugerido la formación de CH₄ por el bacterioplancton a partir de la degradación de precursores metilados como monometilamina, dimetilamina y trimetilamina (De Angelis y Lee, 1994); metilfosfonato (MPn) bajo condiciones limitantes de fosfato (Beversdorf et al., 2010; Carini et al., 2014; Del Valle y Karl, 2014; Karl et al., 2008; Repeta et al., 2016) y dimetilsulfopropionato (DMSP) bajo condiciones limitantes de nitrato y concomitante disponibilidad de fósforo (Damm et al., 2010; Florez-Leiva et al., 2013).

El bacterioplancton heterótrofo utiliza compuestos orgánicos como fuente de carbono y nutrientes. Este proceso, dependiendo de los compuestos orgánicos disueltos presentes, conlleva a procesos de desmetilación, generando secundariamente compuestos como CH₄. Esta vía ha sido bien descrita a partir de la desmetilación del metilfosfonato (Karl et al., 2008; Metcalf et al., 2012; Repeta et al., 2016), DMS (Florez-leiva et al., 2013, Klintzsch et al 2019) y trimetilamina (De Angelis y Lee, 1994). En esta vía metabólica, genéricamente conocida como metanogénesis metilotrófica (Damm et al., 2010; Karl et al., 2008; Repeta et al., 2016), intervienen bacterias heterótrofa (Carini et al., 2014; Kamat et al., 2013; Karl et al., 2008; Repeta et al., 2016; Sosa et al., 2017; Sun et al., 2011) e involucran el uso de compuestos orgánicos que contienen algún grupo metil como fuente de carbono (sustratos metilados) (Dinasquet et al., 2018), dejando intacto un grupo metilo (-CH₃) que capta un hidrógeno, transferido por el complejo enzimático C-P liasa (Fig. 1.2) (Taenzer, 2019) y se convierte en CH₄, (Liu y Whitman, 2008).

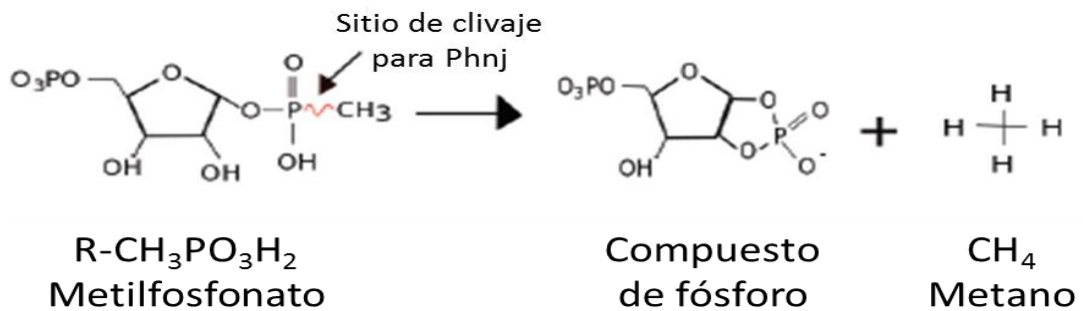


Figura 1.2. Clivaje del enlace C-P es catalizado por la subunidad PhnJ del complejo enzimático C-P liasa. Esta reacción permite que las bacterias liberen compuesto de fósforo para su asimilación. Y a través de la transferencia de un hidrógeno PhnJ, el grupo metilo, se convierte en CH_4 . Tomado de Taenzer (2019).

Ejemplo de ello es el ácido metilfosfónico (MPn) (Fig. 1.2) (Carini et al., 2014; Del Valle and Karl, 2014; Karl et al., 2008; Repeta et al., 2016) metanol y el N-óxido de Trimetilamina (TMAO) (Dinasquet et al., 2018); incluso arqueas y bacterias utilizan como precursores al acetato o piruvato, DMSP y DMS, respectivamente (Florez-Leiva et al., 2013; Neufeld et al., 2008; San Martín, 2014). Por otra parte, experimentos realizados por Zheng et al. (2017), relacionan el ciclo del nitrógeno con la generación de CH_4 y señalan que la enzima nitrogenasa de la bacteria *Rhodospseudomonas palustris* puede reducir N_2 a NH_3 y simultáneamente CO_2 a CH_4 , en un solo paso, siendo el CH_4 un producto secundario.

En general, los metanógenos metilótrofos forman CH_4 a través de varias vías, de acuerdo al tipo de precursor de carbono utilizado (Dinasquet et al., 2018; Neufeld et al., 2008; Sun et al., 2011). En la Tabla 1.2 se sintetizan algunas vías metabólicas hasta ahora descritas y los organismos que intervienen en el proceso de formación de CH_4 .

Por otra parte, la relación existente entre la concentración de clorofila-*a* y el CH_4 en aguas superficiales (Bogard et al., 2014; Lamontagne et al., 1973; Yoshikawa et al., 2014), evidencian que la producción de CH_4 está relacionada positivamente con

la producción primaria, por cuanto proveen sustratos orgánicos necesarios que son metabolizados por micro-organismos metanógenos primeramente asociados al bacterioplancton heterótrofo, (Kittredge et al., 1969), produciendo CH₄ en la capa superficial oxigenada que no parece provenir de aguas más profundas, dada la distribución vertical de este gas y la ausencia de procesos advectivos en zonas de mayor estratificación como los giros subtropicales (Carini et al., 2014; Holmes et al., 2000; Karl et al., 2008; Repeta et al., 2016; Weber et al., 2019).

Tabla 1.2. Recopilación bibliográfica de estudios en ambientes marino sobre generación de metano en condiciones óxicas. MPn (ácido metilfosfónico), DMSP (dimetil sulfopropionato), DMS (dimetilsulfuro), COP (Carbono Orgánico Particulado), MOD (Materia Orgánica Disuelta).

Autor/año	Lugar	Organismo	Enzima y/o proceso	Sustrato
De Angelis y Lee (1994)	Puerto de Stony Brook y el Estrecho de Long Island	Zooplancton	Pastoreo Desmetilación	Fitoplancton Metilaminas
Karl et al. (2008) ³	ALOHA	<i>Trichodesmium</i>	Desmetilación	MPn
Damm et al. (2010)	Océano central Ártico	Gamma y Proteobacterias	Metanogénesis metilotrófica	DMSP
Florez-Leiva et al. (2013)	Surgencia centro de Chile	Proteobacterias y Rodobacterias	Desmetilación	DMS
Carini et al. (2014)	Mar de los Sargazos	SAR 11: <i>Candidatus Pelagibacter</i>	Hidrólisis del metil fosfonato / C-Liasa	MPn
Del Valle y Karl (2014) ⁴	ALOHA	<i>Trichodesmium</i>	-	MPn / COP
Repeta et al. (2016)	ALOHA	<i>Pseudomonas</i> * <i>Pelagibacter</i> * <i>Trichodesmium</i>	C-Liasa	MOD semi-lábil
Zheng et al. (2017)	-	<i>Rhodopseudomonas palustris</i>	Nitrogenasa solo Fe / Fijación del N y CO ₂	CO ₂

* Posibles organismos productores de CH₄, mencionado por el autor.

1.4. Condiciones oceanográficas y biológicas en aguas superficiales de la zona de surgencia de Chile central

En áreas de alta productividad como la surgencia costera frente a Concepción, la advección de aguas sub superficiales fertilizan la capa superficial con nutrientes provenientes de las Aguas Ecuatoriales Sub Superficiales (AESS) (Sobarzo y Djurfeldt, 2004). Este proceso físico, denominado surgencia costera es impulsado por vientos del sur (S) y suroeste (SO), y convierten a esta zona en un ecosistema único en términos de productividad biológica (Cuevas et al., 2004; Testa et al., 2018). Este proceso se mantiene con pulsos de actividad biológica durante todo el año, siendo más intensos y frecuentes durante la época de primavera-verano (González et al., 2007; Vargas et al., 2016). Esto se traduce en una alta abundancia y diversidad de la comunidad de fitoplancton y bacterioplancton (Anabalón et al., 2016; González et al., 2007; Montero et al., 2007; Testa et al., 2018; Aldunate et al 2018).

El fitoplancton que compone el sistema de surgencia de Chile ha sido descrita por diversos autores (Anabalón et al., 2007; González et al., 2007; Morales et al., 2007; Morales and Anabalón, 2012). En este sentido la comunidad fitoplanctónica presenta diversos cambios temporales en su composición y biomasa. Durante el periodo favorable a la surgencia costera (primavera - verano), la comunidad está dominada principalmente por diatomeas de mayor tamaño, tintínidos y dinoflagelados microplanctónicos (Morales y Anabalón, 2012), destacando los géneros *Skeletonema*, *Chaetoceros* y *Thalassiosira* (González et al., 2007), que posteriormente experimentan cambios sucesionales hacia pequeños flagelados a fines del verano (Anabalón et al., 2007). Por otro lado, en el periodo menos favorable a la surgencia (otoño - invierno) predominan el nanoplancton (nano-dinoflagelados) y picoplancton de menor tamaño acompañado de pequeños ciliados (Anabalón et al., 2007; Collado-Fabbri et al., 2011; Morales et al., 2007; Morales y Anabalón, 2012).

Paralelo al desarrollo de fitoplancton y los distintos estados sucesionales, se observa un aumento en abundancia de bacterioplancton heterótrofo (Cuevas et al.,

2004), debido a la disponibilidad de nutrientes que son asimilados por el fitoplancton y conlleva a la formación de la Materia Orgánica Particulada (MOP) que es hidrolizada y mineralizada por el bacterioplancton heterótrofo a COD como aminoácidos y carbohidratos de bajo peso molecular y otros tantos compuestos orgánicos con diversos grados de labilidad.

En la costa de Chile central, Cuevas et al. (2004) reportan una correlación positiva entre la Productividad Primaria (PP) y la Productividad Bacteriana (PB), como también entre la abundancia bacteriana y la clorofila-*a*, COD y nanoflagelados heterotróficos. Esto indica un fuerte acoplamiento entre la síntesis de materia orgánica y su utilización por bacterias (Montero et al., 2007). En este sentido, el porcentaje de productividad primaria bruta que es canalizado hacia el bacterioplancton varía de 17 a 61 % en periodo favorable a la surgencia, disminuyendo a 34% en periodos menos favorables a la surgencia costera (Montero et al., 2007). Por lo tanto, la disponibilidad de sustrato puede ser un factor clave en la actividad bacteriana en este sistema de afloramiento costero.

En este sentido, Aldunate et al. (2018) reportan una marcada estacionalidad en la composición de la comunidad bacteriana frente a Concepción, predominando Flavobacteriaceae (SAR 11 Sub clado IA y AB) y Gammaproteobacteriales, durante la época favorable a la surgencia y Actinobacteriales y Flavobacteriaceae (SAR 11 sub clado II) y Alfaproteobacterias durante la época menos favorable a la surgencia. De acuerdo a esto, SAR11 es uno de los candidatos para la producción de CH₄, debido a que es capaz de remineralizar compuestos como metilaminas, metanol y DMSP (Sun et al., 2011). No obstante, *Syneccoccus* (Collado-Fabbri et al., 2011), en época no favorable a la surgencia, también podría estar aportando Materia Orgánica Disuelta (MOD) para la producción de CH₄ (Repetta et al., 2016), además la presencia de *Emiliana huxleyi* en las costas de Concepción (Menschel et al., 2016) también es buen indicativo de que procesos de generación de CH₄ están ocurriendo en la capa superficial oxigenada (Lenhart et al., 2016); finalmente las lluvias de invierno y la descarga de ríos podrían estar transportando materia orgánica hacia la zona costera

por escorrentías (Testa et al., 2018; Vargas et al., 2016), durante el periodo menos favorable a la surgencia.

En zonas de surgencia existen pocos estudios acerca de generación de CH₄ (Florez-Leiva et al., 2013; Naqvi et al., 2010) y series de tiempo relacionados a este gas (Capelle and Tortell, 2016; Ma et al., 2020; Sudheesh et al., 2020; Wilson et al., 2017). Por lo general, en estas áreas se observan altas concentraciones de CH₄ acumulado en aguas de fondo que son advectadas hacia la superficie por la surgencia costera (Capelle and Tortell, 2016; Schneider et al., 2014), pero existen indicios de generación en aguas superficiales, donde se observan focos locales de acumulación (Florez-Leiva et al., 2013).

No obstante, a pesar de los esfuerzos y avances realizados para comprender las fuentes que ocasionan una sobresaturación de CH₄ en la capa superficial, sigue siendo una paradoja que aún necesita comprenderse con profundidad. Esto releva importancia cuando se conoce que las áreas costeras contribuyen con aproximadamente 75% en las emisiones naturales de CH₄ (Bange et al., 1994), regiones sujetas a procesos de cambio global y climático como aumento de la temperatura superficial, la desoxigenación, la acidificación, eutrofización, entre algunos. Sumado a esto, se prevé aumento de la intensidad de vientos favorables a la surgencia (Aguirre et al., 2018) que en el caso de Chile está ligado a la intensificación y movimiento del anticiclón del Pacífico sur oriental (Aguirre et al., 2018; Ancapichun and Garcés-Vargas, 2015, Winckler et al., 2020).

En este contexto y considerando la importancia que las zonas de surgencia tienen en las emisiones de CH₄ hacia la atmósfera en esta región, este trabajo analiza la distribución temporal del CH₄ en la columna de agua, los flujos hacia la atmósfera, la correlación con distintas variables ambientales y potenciales mecanismos de producción biológica en aguas superficiales en una estación fija ubicada en Chile central muestreada desde el 2007 hasta el 2019.

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1. Hipótesis

1. El contenido de CH₄ en la capa superficial y su intercambio con la atmósfera en la zona de surgencia frente a Concepción responden parcialmente a un mecanismo de regeneración biológica *in situ* mediado por el bacterioplancton heterótrofo.
2. La presencia de compuestos orgánicos disueltos como trimetilamina y ácido metilfosfónico y otros, estimulan la producción de CH₄ *in situ* por parte del bacterioplancton heterótrofo.

2.1. Objetivo principal

Caracterizar la distribución temporal de CH₄ en la columna de agua y su intercambio con la atmósfera, y determinar las tasas de producción neta de CH₄ y las posibles vías metabólicas de regeneración de dicho gas en aguas superficiales de un sistema de surgencia costera frente a Concepción.

2.2. Objetivos específicos

1. Determinar la variabilidad estacional de CH₄ en la columna de agua en relación a otras variables oceanográficas/biogeoquímicas, y estimar tasas de intercambio de CH₄ a través de la interfaz mar-atmósfera.
2. Inferir qué variables/procesos controlan la acumulación de CH₄ en la columna de agua.
3. Evaluar la tasa de producción de CH₄ en la columna de agua superficial (10 m) por parte de la comunidad planctónica fraccionada (comunidad total o natural, <150, <3 y <0.2 μm).
4. Discernir si procesos de metanogénesis metilotrófica están presentes en aguas superficiales frente a Concepción.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Área de estudio

Este estudio se realizó en uno de los ecosistemas marinos de la Corriente de Humboldt, perteneciente a uno de los cuatro grandes sistemas de surgencia costera de borde oriental (EBUS, en sus siglas en inglés). La zona costera de Chile central (36°S) se caracteriza por tener una plataforma extensa, 40 km hacia el oeste y delimitadas por la presencia de cañones submarinos del río Itata y Biobío (Sobarzo et al., 2001). Esta área presenta una alta productividad ($1.1 \text{ kg C m}^{-2} \text{ año}^{-1}$), la cual se encuentra relacionada con un régimen estacional de surgencia costera forzado por los vientos provenientes del sur (S) y suroeste (SO); evento que se produce principalmente durante primavera verano (Sobarzo et al., 2007; Sobarzo y Djurfeldt, 2004). Dicho proceso conduce al afloramiento de Aguas Ecuatoriales Sub-Superficiales (AESS), las cuales son ricas en nutrientes y pobres en oxígeno. Por el contrario, debido al relajamiento de los vientos del S y SO, y el predominio de los vientos del norte (N) principalmente en otoño-invierno, se produce un fenómeno de hundimiento o “downwelling” que permite la dominancia en la columna de agua de Aguas SubAntárticas (ASAA) (Ahumada y Chuecas, 1979), las cuales son relativamente pobres en nutrientes y bien oxigenadas. No obstante, durante este último periodo se pueden detectar pulsos de productividad debido al ingreso de nutrientes por medio de las aguas continentales, especialmente de río Itata y eventualmente del Biobío coincidentes con la época de precipitaciones que hacen variar la salinidad, permitiendo una productividad basal relativamente alta todo el año (Testa et al., 2018).

3.2. Estación y frecuencia de muestreo

La estación de muestreo fue la Estación 18 ($36^{\circ} 0.802' S$ $73^{\circ} 07.750' W$) de la serie de tiempo del Departamento de Oceanografía de la Universidad de Concepción (ex COPAS). Se encuentra ubicada sobre la plataforma continental de Chile central ($36^{\circ}30.8 S$ $73^{\circ}7.7 O$) a 28.4 km de la costa, frente a Dichato y tiene una profundidad de 92 m aproximadamente (Fig. 3.1).

Esta estación fue creada en 1994 en el marco Expedición Thioploca-Chile 1994 y luego establecida como estación fija de serie de tiempo en el año 2002 por el centro COPAS, sin embargo, muestras de CH_4 se empezaron a coleccionar a partir del 2007 y se mantiene hasta la actualidad. El periodo estudiado comprende desde abril 2007 hasta abril 2019 (muestreos mensuales). Los cruceros se realizaron a bordo de la embarcación oceanográfica Kay-Kay II de la misma universidad.

Los muestreos de invierno, generalmente se caracterizaron por fuertes tormentas y mezcla vertical, homogeneizando y oxigenando la columna de agua, además de una disminución marcada en la salinidad superficial debido a la influencia de mayores descargas del río Itata, producto de las precipitaciones durante este periodo.

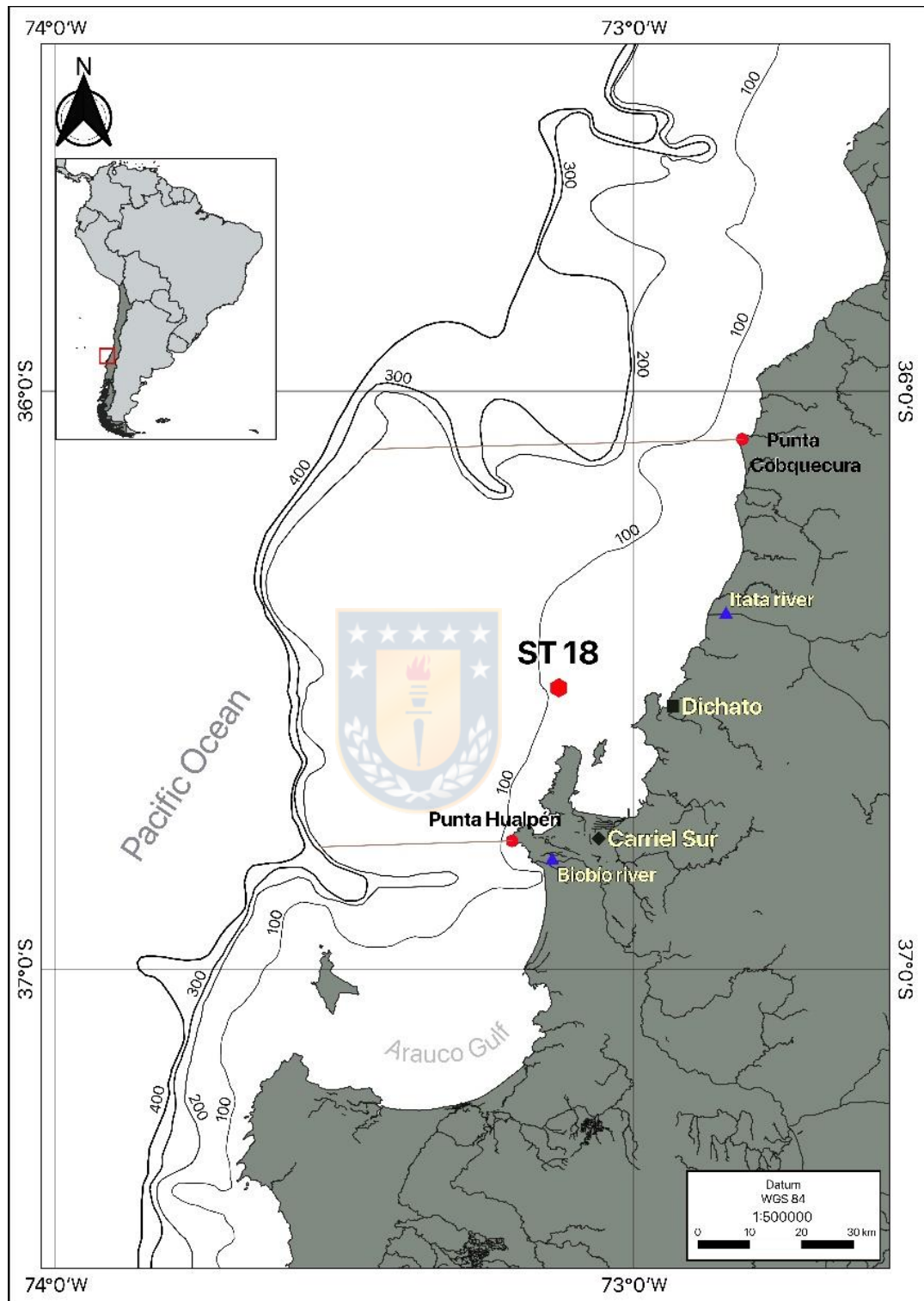


Figura 3.1. Localización geográfica de la estación 18 (ST18), situada sobre la plataforma continental de Chile central, influenciada por los ríos Itata y Biobío.

3.3. Variabilidad estacional de CH₄ en la columna de agua en relación a otras variables oceanográficas/biogeoquímicas, e intercambio de CH₄ a través de la interfaz mar-atmósfera.

3.3.1. Variables oceanográficas y biogeoquímicas

Los parámetros oceanográficos de la columna de agua se obtuvieron mediante un perfilador CTD (Sea-Bird 19 PLUS). Se registró temperatura, salinidad, presión y oxígeno disuelto. Durante el muestreo se tomó muestras de agua a profundidades discretas para determinar variables biogeoquímicas como la concentración de gases (CH₄ y O₂ disuelto), nutrientes (nitritos, nitratos, fosfatos y silicatos), Carbono Orgánico Disuelto (COD) y clorofila-*a*. Las muestras de agua de mar se tomaron cada 5 m entre los 0 y 20 (capa superficial) y cada 10-20 m entre los 30, 50, 65 y 80 m (capa sub superficial), siendo preservadas de acuerdo a sus respectivos protocolos.

Las muestras para Oxígeno disuelto (OD) se colectaron en frascos de vidrio de 125 mL (triplicado) y fueron fijadas a bordo y posteriormente analizadas mediante el método de Winkler (Carpenter, 1965), usando un Dosimat 665 con detector de punto final fotométrico automático, con un límite de detección de 2 $\mu\text{m L}^{-1}$.

Para medir la concentración de CH₄ se colectó agua de mar en viales cromatográficos de 20 mL (triplicado), obtenidos directamente de la botella Niskin a través de una manguera Tygon que llegó hasta el fondo del vial de manera que se desbordara tres veces su volumen; impidiendo la presencia de burbujas. Inmediatamente después se inoculó 50 μL de cloruro de mercurio (HgCl₂) concentrado para detener la actividad biológica y se selló con septas de goma y tapas de aluminio para evitar contaminación con gases de la atmósfera. El CH₄ fue analizado por el método del equilibrio de fases; para ello se tomó cada vial y se añadió 5 mL de Helio (gas inerte) para crear un espacio de cabeza o “headspace”, permitiendo un equilibrio entre la fase acuosa y gaseosa. Posteriormente, la fase gaseosa se analizó por cromatografía gaseosa en un cromatógrafo de gas (Shimadzu 17) con detector de

ionización de llama (FID) con una columna Restek RT QS-Bond (de 30 metros 053 mm ID, 20 μm Film) con una temperatura de 30 $^{\circ}\text{C}$ y flujo de la columna de 3.5 mL min^{-1}

Las muestras de nutrientes (por triplicado) se colectaron con una jeringa de 60 mL y fueron filtradas con un filtro de acetato de celulosa de 0.45 μm , el filtrado se almacenó en frascos de polietileno Falcon de 15 mL. Las muestras fueron analizadas mediante técnicas colorimétricas estándares (Grasshoff et al., 1983) en un auto-analizador Seal AA3 de flujo segmentado, el cual consta de cuatro canales con módulos específicos para cada nutriente. Para obtener las muestras de clorofila-a (triplicado) se filtró 100 mL (GF/F) de agua de mar y se analizó por el método de Holm-Hansen et al. (1965) utilizando el fluorómetro Turner desings 10AU.

3.3.2. Flujos de metano en la interfaz océano-atmósfera

Para la estimación del intercambio de CH_4 a lo largo de la interfaz océano-atmósfera, se utilizó la ecuación de flujos de Broecker and Peng (1974), modificado por Wanninkhof (1992):

$$F = (K_w(C_w - C^*)) * 0.24 \quad (\text{Ec. 2})$$

Donde, F es el flujo del gas que se desea calcular ($\mu\text{mol m}^{-2}\text{d}^{-1}$); k_w (cm h^{-1}) es la velocidad de transferencia del gas; C_w (nmol L^{-1}) es la concentración promedio de CH_4 en la capa de mezcla; C^* ($\mu\text{mol/m}^{-3}$) es la concentración de CH_4 en equilibrio con la atmósfera.

La velocidad de transferencia del gas se calculó de acuerdo a Wanninkhof (1992), siguiendo la ecuación 2.

$$K_w = 0.31 * U^2 * \left(\frac{Sc}{660}\right)^{-0.5} \quad (\text{Ec. 2})$$

Donde U es la velocidad del viento (m s^{-1}) correspondiente al promedio de una semana previa al día de muestreo (incluyendo el día muestreado). Magnitud y dirección del viento (por horas), se obtuvieron a partir de la estación meteorológica Carriel Sur (<http://www.meteochile.gob.cl/>). S_c es el número de Schmidt en función de la temperatura (Sarmiento y Gruber, 2006) y se calculó de la siguiente manera (Ecuación 3):

$$S_c = 2039.2 - 120.31 x T + 3.4209 x T^2 - 0.040437 x T^3 \quad (\text{Ec. 3})$$

La concentración de CH_4 en equilibrio con la atmósfera, se calculó a partir de Wiesenburg and Guinasso (1979), como se muestra en la ecuación 4.

$$C^* = \beta * (1 - P_{vp}) * f_G \quad (\text{Ec. 4})$$

β = Coeficiente de solubilidad de Bunsen, calculado a partir de la ecuación 5.

$$\beta = \text{Exp} \left[-68.8862 + 101.4956 \left(\frac{100}{T} \right) + 28.7314 * \ln \left(\frac{T}{100} \right) + S \left[-0.076146 + 0.043970 \left(\frac{T}{100} \right) \pm 0.0068672 \left(\frac{T}{100} \right)^2 \right] \right] \quad (\text{Ec. 5})$$

P_{vp} = corresponde la presión del vapor de agua (atm), en función de la temperatura ($^{\circ}\text{K}$) y la salinidad (Ecuación 6).

$$P_{vp} = \text{Exp} \left[24.4543 - 67.4509 \left(\frac{100}{T} \right) - 4.8489 \ln \left(\frac{T}{100} \right) - 0.000544S \right] \quad (\text{Ec. 6})$$

f_G = fracción molar de gases atmosféricos, obtenidos a partir de promedios mensuales de las concentraciones de CH_4 del ESRL de la NOAA (<http://www.esrl.noaa.gov>).

3.4. Variables/procesos que controlan la acumulación de CH₄ en la columna de agua.

Para este objetivo, se utilizaron datos ya disponibles de la serie de tiempo de CH₄ y otras variables, a esto se sumaron los resultados de los muestreos realizados durante el 2018 y el 2019 para detectar la recurrencia de acumulaciones de CH₄ en la superficie y analizar el ciclo anual (desde abril 2007 hasta abril 2019).

Para visualizar las diferentes variables oceanográficas, se realizó un análisis estadístico descriptivo y los resultados son mostrados en figuras hechas en los Softwares Ocean Data View (ODV) y Sigma Plot 12. Se verificó la existencia de una igualdad de varianzas a través de la prueba de Levene y si se ajustan a una distribución normal a través de la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Finalmente, para evaluar el grado de asociación o interdependencias entre las variables se usó el Coeficiente de Correlación de Spearman, a través del software R entre variables discretas de la columna de agua y sus respectivos inventarios, así como variables atmosféricas como velocidad y estrés del viento.

3.5. Tasa de producción de CH₄ en la columna de agua superficial (10 m) por parte de la comunidad planctónica fraccionada (comunidad total o natural, <150, <3 y <0.2 μm).

Se realizaron experimentos de reciclaje de CH₄ en comunidades planctónicas fraccionadas en diciembre 2018 y enero 2019, pruebas de sensibilidad con adición de sustratos en marzo y mayo del 2019 y por último se realizaron experimentos de microcosmos en abril y septiembre 2019 (Tabla 3.1), estos últimos serán explicados a detalle en la siguiente sección. Todos los experimentos se ejecutaron en condiciones controladas de temperatura (cámaras de frío de la estación de Biología Marina en Dichato).

Tabla 3.1. Resumen de diferentes fechas de experimentos realizados en viales de cromatografía y microcosmos.

Mes	Tipo de experimento	Descripción
Diciembre 2018	Vial GC	Fraccionamiento de plancton
Enero 2019	Vial GC	Fraccionamiento de plancton
Marzo 2019	Vial GC	Adición de sustratos metilados
Mayo 2019	Vial GC	Adición de sustratos metilados
Abril 2019	Microcosmos	Adición de sustratos metilados
Septiembre 2019	Microcosmos	Adición de sustratos metilados

En las salidas mensuales de la estación 18 se recolectó aproximadamente 40 L de agua de mar a 10 m de profundidad, donde se observa comúnmente un máximo de clorofila (Eissler et al., 2010; González et al., 2007; Testa et al., 2018). Para ello se utilizó botellas Niskin de 10 L, depositando el agua de mar en bidones de 20 L, los cuales se guardaron en oscuridad y a bajas temperaturas para disminuir la actividad biológica durante el proceso de traslado.

La tasa neta de reciclaje de CH₄ (acumulación menos consumo de CH₄) en distintos fraccionamientos de la comunidad del plancton se calculó a través de una regresión lineal de las concentraciones de CH₄ (Farías et al., 2009) durante el tiempo de incubación, de aproximadamente 24 horas, separando los ciclos de luz (12 horas de luz y 12 de oscuridad). Las incubaciones realizadas se describen en la Tabla 3.2, donde se tienen 5 fracciones planctónicas: A) agua de mar con toda la comunidad de microorganismos presente de manera natural (CN); B) agua de mar filtrada a 150 µm (microplancton); C) agua de mar filtrada a 3 µm (bacterioplancton o picoplancton); D)

agua de mar filtrada a 0,2 μm (control +) y E) agua de mar filtrada a 0,2 μm con HgCl_2 (control -).

Tabla 3.2. Diseño Experimental de reciclaje de metano en comunidades planctónicas fraccionadas, en viales GC (triplicado). Diciembre 2018 – enero 2019.

Condición	Tiempo	A CN (control)	B < 150 μm	C <3 μm	D < 0,2 μm (control +)	E < 0,2 μm (control -)	Total
Con luz	T1	3	3	3	3	3	15
Con luz	T2	3	3	3	3	3	15
Con luz	T3	3	3	3	3	3	15
Con luz	T4	3	3	3	3	3	15
Sin luz	T5	3	3	3	3	3	15
Sin luz	T6	3	3	3	3	3	15
Sin luz	T7	3	3	3	3	3	15
Sin luz	T8	3	3	3	3	3	15
Total		24	24	24	24	24	120

En el laboratorio, se fraccionó el agua de mar de los bidones oscuros, en cinco frascos (tratamientos) de plástico de 8 L aproximadamente (Figura 3.2A). Para obtener la fracción <150 μm se usó un filtro de Nylon del mismo diámetro de poro. Para las fracciones < 3 μm y < 0.2 μm , se realizó un pre-filtrado mediante una malla de nylon de 150 μm y luego, por los respectivos filtros (Membrana Isopore de 3 μm y Milipore-Express PES de 0.22 μm) se filtró 2L de agua por filtro a 60 revoluciones por minuto (para evitar desperfectos en el filtro y en la comunidad microbiana) hasta obtener la cantidad requerida. Se tomó en cuenta las condiciones iniciales de cada tratamiento: muestras de oxígeno (125 mL), COD (60 mL), clorofila-*a* (100 mL) y nutrientes (15 mL), todos ellos por triplicado (Figura 3.2B).

Cabe mencionar que los parámetros se analizaron de acuerdo a la forma descrita en la sección anterior (sección 3.3.1). Conjuntamente, el COD se colectó en frascos de polietileno de 60 mL (triplicado), previa filtración (GF/F muflados a 450 °C por 4 horas) y posterior acidificación (pH 2-3). Las muestras fueron analizadas por el método de combustión infrarroja en un Analizador para Carbono Orgánico Shimadzu. TOC-LCPH.

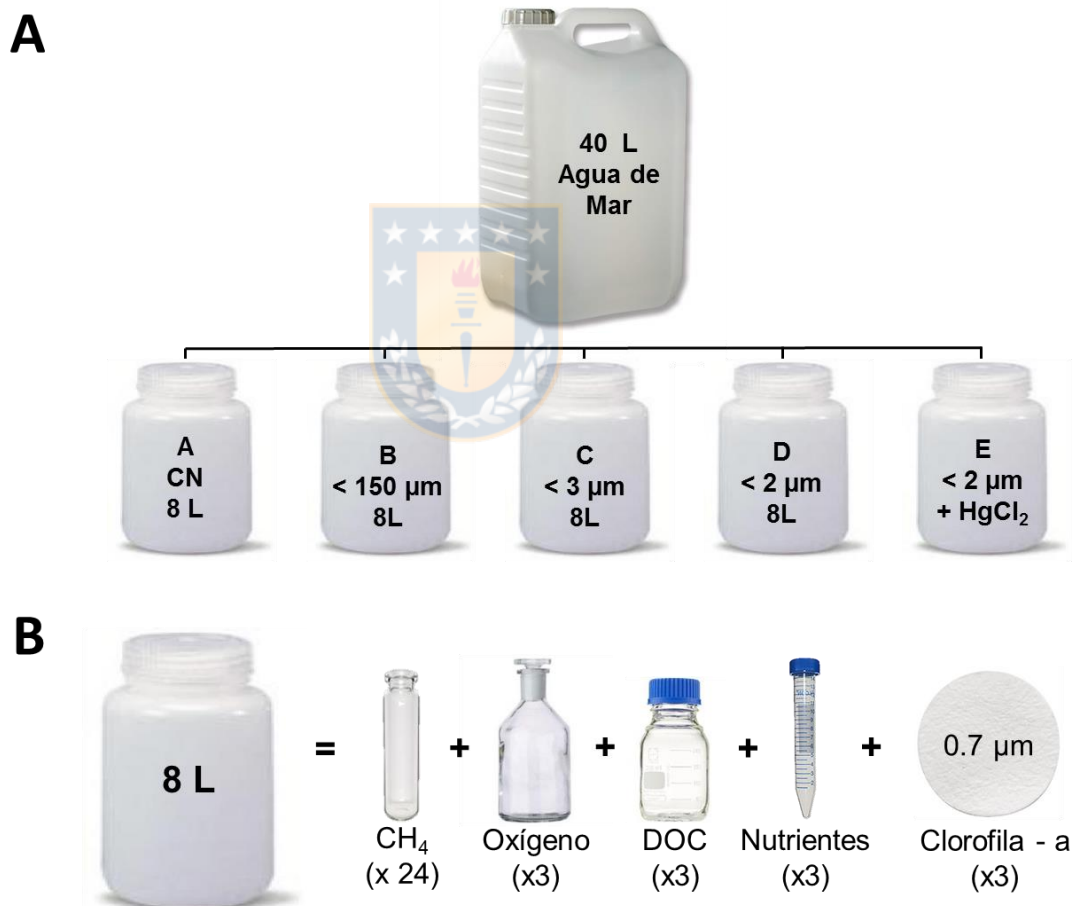


Figura 3.2. A. Distribución del agua de mar en los frascos de 8 L. B. Recolección de muestras para obtener condiciones iniciales de los diferentes tratamientos.

Se utilizaron 24 viales cromatográficos de 20mL (previamente esterilizado; Fig. 3.3A) para tomar muestras de CH₄ y posteriormente incubarlos. La toma de muestras consistió en colocar los viales (24 para cada tratamiento) en una rejilla de plástico (cinco en total), el cual fue cuidadosamente sumergido en el frasco correspondiente (Fig. 3.3B). Una vez obtenida la muestra, fueron sellados inmediatamente para evitar contaminación con gases atmosféricos. El uso de la rejilla fue para fines prácticos; para disminuir el tiempo de muestreo y tener un solo grupo de viales tomado bajo las mismas condiciones.

Las muestras de CH₄ se incubaron en una incubadora r FOC 225E a 13 °C con una inhibición de 70% de luz (Fig. 3.3C), teniendo en cuenta la Radiación Fotosintéticamente Activa (RFA) del día o en su defecto revisando el histórico de datos de RFA. Para ello se empleó un radiómetro y se utilizó dos filtros, uno azul y otro negro de densidad neutra obteniendo una iluminación entre 11 a 11.5 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ antes descrita.

Cada cuatro horas (previo una aclimatación de seis horas en oscuridad), tres viales de cada tratamiento fueron inoculados con 50 μL de HgCl₂ para detener toda actividad biológica (Fig. 3.3D). Al término del experimento, las muestras se analizaron por cromatografía de gases (Figura 3.3E), bajo las condiciones antes mencionadas. Una vez analizadas todas las muestras de CH₄, se recolectó la muestra restante de los viales en tubos falcon de 15 mL para analizar los nutrientes (nitratos, nitritos y fosfatos) de las diferentes horas de incubación.

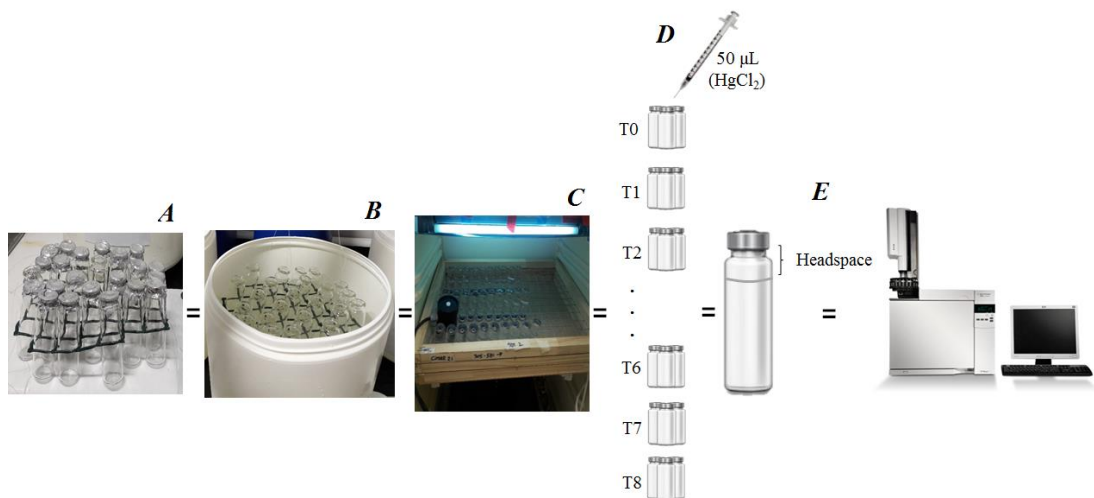


Figura 3.3. A. Grupo de 27 viales esterilizados puestos en una rejilla plástica. B. Toma de muestra de agua y posterior sellado. C. Incubación de viales con inhibición de luz. D. Envenenamiento de viales con HgCl_2 E. headspace generado al agregar 5 mL de He y posterior análisis en el GC.

3.6. Metanogénesis metilotrófica en aguas superficiales frente a Concepción.



3.6.1. Experimento en viales cromatográficos

Estos experimentos se realizaron en marzo y mayo (Tabla 3.3), bajo las condiciones descritas en el apartado anterior (sección 3.4), y sólo se trabajó con la fracción del bacterioplancton ($<3 \mu\text{m}$) añadiéndole sustratos con diferente fuente de fósforo y nitrógeno, en donde A) Tratamiento control, B) $<3 \mu\text{m}$ + ácido metilfosfónico (MPn) y C) $<3 \mu\text{m}$ + Trimetilamina (TMA) (Tabla 3.3). Las incubaciones tratadas con sustratos metilados empezaron con una concentración inicial de $1 \mu\text{M}$.

Cabe resaltar que, en marzo se agregó un tratamiento más, en donde se procedió a concentrar 2.5 veces la fracción del picoplancton, llamándola comunidad

concentrada, esto se logró mediante un filtrado de flujo tangencial (agua de mar filtrada a $3\ \mu\text{m}$), utilizando un filtro de $0.2\ \mu\text{m}$, logrando recuperar dicha comunidad (Fig. 3.4). Por otro lado, se tuvo registro de las condiciones iniciales (CH_4 , oxígeno, clorofila-a, COD y nutrientes) antes y media hora después de agregar los sustratos.

Tabla 3.3. Diseño Experimental de reciclaje de metano en la fracción del bacterioplancton ($<3\ \mu\text{m}$), en viales GC (triplicado). Marzo y mayo 2019.

Condición	Tiempo	A ($<3\ \mu\text{m}$ control)	B $<3\ \mu\text{m}$ + MPn	C $<3\ \mu\text{m}$ + TMA	Total
Con luz	T1	3	3	3	15
Con luz	T2	3	3	3	15
Con luz	T3	3	3	3	15
Con luz	T4	3	3	3	15
Sin luz	T5	3	3	3	15
Sin luz	T6	3	3	3	15
Sin luz	T7	3	3	3	15
Sin luz	T8	3	3	3	15
Total		24	24	24	120



Figura 3.4. Filtrado de flujo tangencial.

3.6.2. Experimentos en microcosmos

Para efectuar este objetivo se realizaron experimentos de microcosmos acoplados a un sistema de medición continua de gases, registrándose la variabilidad temporal de CH₄ y la respuesta de las comunidades planctónicas fraccionadas a la adición de sustratos orgánicos ricos en nitrógeno y fósforo. Estos experimentos se realizaron en abril y septiembre del 2019; el primero, cuando cambia la composición fitoplanctónica a nano y picoplancton, y el segundo cuando dominan diatomeas y fitoplancton de mayor tamaño (Cuevas et al., 2004; González et al., 2007; Testa et al., 2018). Estos experimentos consistieron en un microcosmos, el cual simuló el ambiente natural, controlando temperatura y luz, esto último similar a lo descrito para el objetivo 2.

Se realizaron tres tipos de incubaciones: 1) agua de mar con toda la comunidad de microorganismos presente de manera natural (CN), 2) agua de mar filtrada por <3 μm conteniendo la comunidad del bacterioplancton y 3) un concentrado de la comunidad del bacterioplancton. A cada comunidad se le añadió sustratos orgánicos metilados (tratamiento) con diferente fuente de fósforo y nitrógeno: A) ácido metilfosfónico y B) trimetilamina, respectivamente (Tabla 3.4).

Tabla 3.4. Diseño experimental de incubación en microcosmos, con adición de sustratos metilados, ácido metil fosfónico (A) y trimetilamina (B), a tres fracciones planctónicas diferentes.

	CN	< 3 μm	Concentrado
Sin sustrato	Control	Control	Control
	A	A	A
Con sustrato	B	B	B

Este experimento se realizó en una cámara de frío de la estación de Biología Marina (Dichato), y se le acondicionó a una temperatura entre 12 y 13 °C y se inhibió un 70% de luz (descrito en el objetivo 2). Este ensayo se llevó a cabo durante 60 horas, proporcionando 12 horas de luz y oscuridad. Se utilizaron aproximadamente 150 L de agua de mar, extraídas y transportadas bajo las condiciones descritas en el objetivo 2. Las mediciones de CH₄ se realizaron de manera continua.

El tratamiento del concentrado de la comunidad del picoplancton (entre 3 µm y 0.2 µm, previamente pre filtrado por 150 y 3 µm) se obtuvo mediante filtrado de flujo tangencial (filtro de 0.2 µm) (Fig. 3.4). Para el tratamiento del concentrado del bacterioplancton, se logró concentrar 1.8 a 2.25 veces esta comunidad.

Se tomaron muestras para análisis de citometría, fijándolos con glutaraldehído 1%, al inicio y al final de la concentración del picoplancton para verificar que hubo un aumento en la concentración de los organismos. Se realizó el mismo procedimiento al inicio y término del experimento.

El experimento consistió en un sistema de microcosmos (botellas de policarbonato de 13 L impermeable a los gases) cuyo tapón de goma tuvo cuatro orificios (Fig. 3.5A) con un capilar de vidrio de 5 mm cada uno, conectados a mangueras de teflón impermeable a los gases. El primer capilar (1) alcanzó hasta la mitad del “headspace” y estuvo conectado directamente al espectrómetro Picarro G-2308; el segundo capilar (2) también estuvo suspendido en el “headspace” y se conectó directamente a una bolsa Tedlar (3 L) llena de N₂; el tercer capilar (3) tuvo una cánula de 3 vías y sirvió para hacer una recirculación del aire contenido en el sistema (“headspace”) con el fin de optimizar el mismo y evitar tener mucho “headspace” al momento de extraer las muestras de agua, el cual conllevaría a un desequilibrio entre la fase gaseosa y acuosa del microcosmos. El cuarto orificio consistió en un capilar de vidrio que se introducía completamente al microcosmos, dejando un espacio de 3 cm con el fondo (4) y estuvo conectado a una cánula de 3 vías para facilitar el proceso de extracción de muestras (oxígeno, CH₄, nutrientes, COD y cl-a) por triplicado (Figura 3.5B).

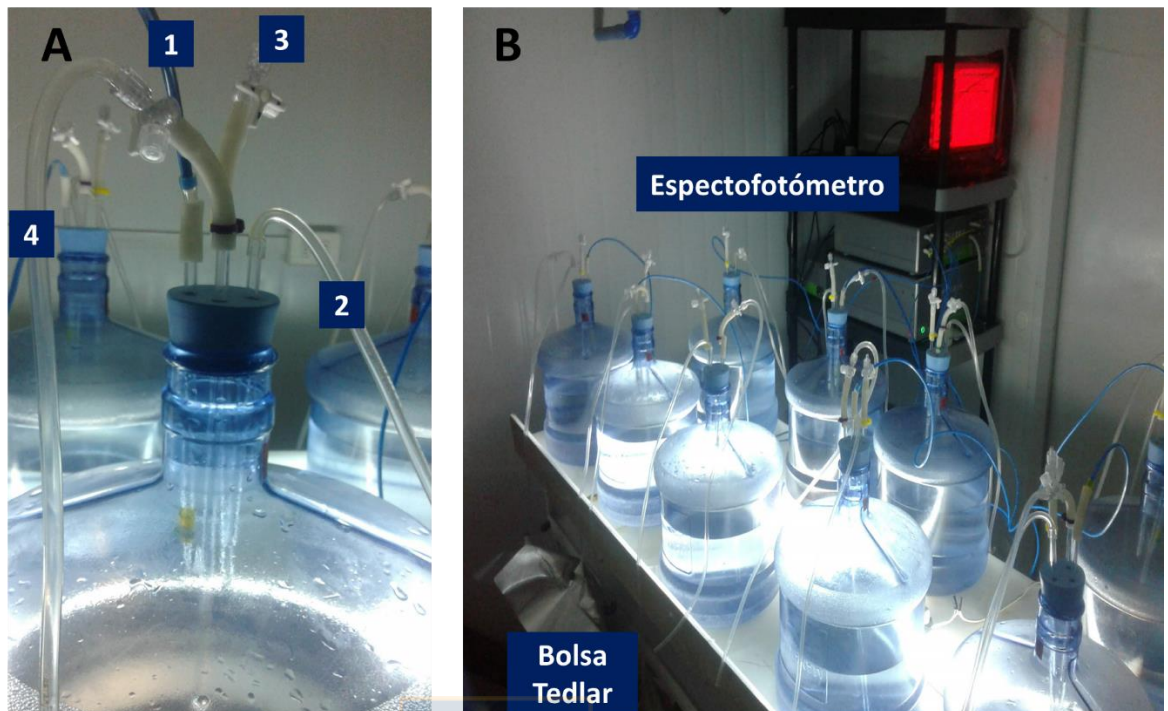


Figura 3.5. A. Diseño del microcosmos y B. Experimento en funcionamiento

El sistema de recirculación fue previamente probado y no se encontró ninguna interferencia de aumento o descenso en las concentraciones de gases ambientales (CH_4 , CO_2 , N_2O y % de humedad) en un lapso de media hora, por lo tanto, se asumió que no se tendría ninguna interferencia debido a que sólo se midió la concentración de CH_4 durante 6 minutos. A medida que terminaba el tiempo de medición de CH_4 en el “headspace”, se cerraba la cánula correspondiente (del capilar 3) y se dejaba cebar toda la manguera durante otros 6 minutos con N_2 , luego se colocaba la misma manguera (capilar 3) al siguiente bidón para medir CH_4 . Este procedimiento se repitió cada cuatro horas. Cabe resaltar que el equipo por cada 2 minutos de lectura toma 480 mL de aire, es por ello la necesidad de utilizar la recirculación del aire del microcosmos mencionado anteriormente.

La conexión a la bolsa Tedlar sirvió para que el gas inerte (N_2) compense el desequilibrio de presión causado por la succión durante la toma de muestras, además disminuye el riesgo de contaminación (Fig. 3.5B). Previo a la conexión con el equipo,

se hizo un “headspace” de 3 L aproximadamente al microcosmos, de esta manera nos aseguramos que el equipo sólo tome gas, ya que de ahí analizó la concentración de CH₄ (Fig. 3.5A).

Para medir la cantidad de CH₄ los microcosmos, se utilizó el sistema de espectroscopia de anillo de cavidad (CRDS, por sus siglas en inglés). Este espectrómetro consta de una cavidad de tres espejos para sustentar una trayectoria continua de la onda de luz infrarroja, permitiendo aumentar la sensibilidad en la medición (Troncoso et al. 2018).

A cada botella previamente sellada y aclimatadas durante seis horas, se le agregó 1 mL de sustrato, obteniendo una concentración final fue de 1 µM al disolverse en 10 L de agua (volumen de incubación).

Previo y posterior (media hora después) a ello se tomaron muestras por triplicado de CH₄, oxígeno (sólo una muestra), COD, clorofila-*a* y nutrientes de cada bidón. Luego, cada 24 horas se repitió este procedimiento para todos los tratamientos. Para determinar diferencias significativas entre las concentraciones dadas por los diferentes tratamientos se usó el test estadístico no paramétrico Kruskal-Wallis a un 0.05 de nivel de significancia.

4. RESULTADOS

4.1. CAPÍTULO 1: VARIABILIDAD TEMPORAL DE CH₄ EN LA COLUMNA DE AGUA EN RELACIÓN A OTRAS VARIABLES OCEANOGRÁFICAS/BIOGEOQUÍMICAS, E INTERCAMBIO DE CH₄ A TRAVÉS DE LA INTERFAZ MAR-ATMÓSFERA.

En este capítulo se presentan los resultados de la variabilidad temporal de CH₄ en la columna de agua en relación a otras variables oceanográficas/biogeoquímicas, y estimación de las tasas de intercambio de CH₄ a través de a interfaz mar-atmósfera. Estos resultados fueron descritos y analizados en el manuscrito “*Temporal methane variability in the water column of an area of seasonal coastal upwelling: a study based on a 12 year Time Series*” (Farías *et al.*, 2020) enviado a la revista *Progress in Oceanography*.

Temporal methane variability in the water column of an area of seasonal coastal upwelling: a study based on a 12 year Time Series

Farías, L. ^{1,2*}, S. Tenorio ^{2,3}, K. Sanzana¹ and J. Faundez^{2,4}

¹Department of Oceanography, Faculty of Natural and Oceanographic Sciences, University of Concepción, Concepción, Chile

²Center for Climate and Resilience Research, University of Chile, Santiago de Chile, Chile

³Graduate Program in Oceanography, Department of Oceanography, University of Concepción, Concepción, Chile.

⁴Faculty of Biology, Pontific Catholic University of Chile

* **Correspondence:** Laura Farías (laura.farias@udec.cl)

Abstract. Temporal distribution of dissolved CH₄ was analysed in a zone of strong seasonal coastal upwelling off central Chile (36.5°S 73°W). Observations were taken from a twelve-year time series that included monthly sampling of the water column at eight depths. CH₄ concentration fluctuated between 1.75 and 100.9 nmol L⁻¹ (or 67.11% and 3965% of saturation), with the highest levels at bottom waters, which increase as upwelling evolved. Three kind of CH₄ profiles were identified; a classical diffusion-advection distribution, with bottom/surface CH₄ concentration ratio > 2, was predominantly observed in ~54% of the all profiles and attributed to high CH₄ production in the sediments during coastal upwelling season (austral spring-summer); a period of higher biological productivity, as well as in hypoxic/anoxic condition. In contrast, relatively homogeneous profiles (CH₄ level ratio between bottom and surface depth <2) was observed about ~46% of all profiles during periods of extreme vertical mixing (such as winter storms). Furthermore, irregular CH₄ profile with superficial peaks occurring between the surface and 15-30 m depth was likely observed. These peaks indicated that local production rates exceed turbulent mixing rates, suggesting a rapid CH₄ cycling due to microbial processes on the surface. Despite the fact that strong seasonality was observed in most oceanographic variables, according to favourable and non-favourable upwelling periods, only a weak seasonality was observed in CH₄ content and its air-sea flux, the latter ranged from 1.27 to 47.02 μmol m⁻² d⁻¹ (mean±SD: 10.94±7.48). The annual weighted mean CH₄ effluxes during upwelling (64%) and non-upwelling (36%) periods fluctuated from 1.66 to 6.22 mmol m⁻² (mean±SD: 3.40±1.43), highlighting the importance of the continental shelf under the influence of coastal upwelling as a significant CH₄ source toward the atmosphere.

Keywords: dissolved methane, upwelling system, time series study.

Highlights

1. A high variation in CH₄ levels, ranging from 67.11 to 3965% saturation, is observed with greatest concentrations in bottom waters during the upwelling season.
2. In contrast to other oceanographic variables, a weak seasonality is observed in CH₄ content and its respective air-sea flux between favourable and non-favourable upwelling periods.
3. Superficial CH₄ peaks are frequently registered indicating high rates of microbial CH₄ cycling.
4. The continental shelf off central Chile acts a CH₄ source to the atmosphere, highlighting the importance of coastal upwelling as the major CH₄ outgassing regions.

1.-Introduction

Methane (CH₄) is the most abundant organic trace gas in the atmosphere and, also the second most important anthropogenically emitted greenhouse gas. On a per molecule basis, it is 20 times more potent in terms of being a climatically active gas than CO₂ (Etminan et al., 2016). Currently, atmospheric CH₄ concentration increases 2.5 over its pre-industrial baseline (from 700 to 1750 ppm; Houweling et al., 2000) and this trend continues to increase in response to greater anthropogenic forcing upon

Earth Systems (Saunois et al., 2020). There are concerns around how increasing CH₄ concentrations may affect atmospheric chemistry and climate (Wuebbles and Hayhoe, 2002). Increased CH₄ in the atmosphere depends on the equilibrium between anthropogenic and natural CH₄ sources and sinks from major reservoirs within the Earth's systems, such as atmospheric, terrestrial and oceanic systems.

Current knowledge on oceanic CH₄ distributions is based on relatively recent investigations, that are focused on technical constraints to effectively measure dissolved CH₄ (Wilson et al., 2017). Since the mid-1950's it has been reported that CH₄ concentrations reach millimolar levels in the sediments, whereas in oceanic waters CH₄ levels rarely exceed nanomolar levels (Lamontagne et al., 1973). Despite significant efforts in recent decades to quantify marine-derived CH₄, the global oceanic CH₄ dataset remains limited and indicates a concerning ambiguity around the global estimates of CH₄ emissions, that are reported to widely vary from 5 to 25 Tg yr⁻¹ (Bates et al., 1996; Rhee et al., 2009; Saunois et al., 2020; Wuebbles and Hayhoe, 2002). Recently, Weber et al. (2019) using Δ CH₄ database of ~120,000 observations compiled into a monthly climatology, reduce by a factor of three the range of oceanic CH₄ emission (6–12 TgCH₄ yr⁻¹)

Some studies have driven important efforts to obtain more accurate CH₄ measurements, from diurnal to decadal time scales, as well as from different spatial scales ranging from decameters up to much larger size scales; such as estuaries, coastal upwelling zones, continental shelves, subtropical gyres, and even global scales (Bates et al., 1996; Shindell et al., 2005). Relatively few studies exist on the temporal distribution of CH₄ in coastal areas, such as salt marshes, estuaries and coastal

upwelling (Borges et al., 2016; Weber et al., 2019). Including the present study, there seems to be only five studies on CH₄ time series in oceanic waters (Bange et al., 2010; Capelle and Tortell, 2016; Ma et al., 2020; Sudheesh et al., 2020; Wilson et al., 2017).

Furthermore, there are still unresolved aspects of the biogeochemical processes that lead to CH₄ recycling. CH₄ is produced through a process known as methanogenesis that involves microorganisms known as methanogens (including bacteria and archaea). Whereas CH₄ consumption occurs through a processes called methanotrophy involving microorganisms known as methanotrophs (Reeburgh, 2007). Microorganisms use various substrates to generate CH₄ during the anaerobic respiration of organic matter (OM), including CO₂, formate and acetate; thus, it is widely accepted that methanogenesis only occurs in anoxic environments, such as in sediments and oxygen deficient waters (Reeburgh, 2007). These types of pathways (anaerobic digestion) have also been identified in zooplankton and fish (Oremland's hypothesis in 1979), and within the pycnocline during CH₄ production in suspended particles (micro-niches), according to Karl and Tilbrook's hypothesis in 1994.

However, despite current knowledge indicating that methanogenesis is a strictly anaerobic process, it is clear that CH₄ is partially produced *in situ* within oxygenated waters; a phenomena known as aerobic methanogenesis. For this reason, this phenomenon has been termed the 'oceanic CH₄ paradox'. This has been mentioned in earlier studies by Wolfe (1971), suggesting that methylotrophs can utilize one-carbon (C1) or non C-C bond compounds, such as methylphosphonate (MPn), dimethylsulphoniopropionate (DMSP) and dimethylsulphide (DMS), and methylamines (MAs), among others (Damm et al., 2010; Florez-Leiva et al., 2013;

Karl et al., 2008; Neufeld et al., 2008). This pathway may be referred as ‘methylotrophic methanogenesis’, which seems to involve varying poorly understood biochemical routes (Repeta et al., 2016); where CH₄ is produced as a by-product (cleavage) of metabolic processes involving dissolved organic carbon (DOC). Additionally, marine bacteria are involved in these pathways, coupled with phytoplankton, which provide alternative organic substrates (Lenhart et al., 2016). In addition to CH₄ production associated with the degradation of OM mediated directly or indirectly by phytoplankton biomass, there are recent evidences that Cyanobacteria (Bizic et al., 2020) and widespread marine (Klitzsch et al., 2019) and fresh water (Morana et al., 2020) phytoplankton are able to release a substantial amount of CH₄ during photosynthesis.



This study aims to report the temporal CH₄ distribution in a coastal area off central Chile. Excluding Patagonia, this area comprises the widest section of the continental shelf off the Chilean coast, and is subjected to seasonal coastal upwelling. During the austral spring-summer, the intensification of south and southwest winds drives coastal upwelling, carrying Equatorial Subsurface Water (ESSW) with high levels of preformed NO₃⁻ but low dissolved oxygen (DO) concentrations toward the surface (Sobarzo and Djurfeldt, 2004). This upwelling system results in high rates of primary and secondary production (Daneri et al., 2000; Montero et al., 2007; Testa et al., 2018), which subsequently influence DO consumption and rapid OM mineralization (Farías et al., 2009). During late autumn and early winter, Sub-Antarctic Water (SAAW) dominates at the surface layer, which is rich in DO and relatively low in nutrients compared to ESSW.

2. Material and Methods

2.1 Sampling

Monthly cruises were carried out as a part of an ongoing time series program at the University of Concepción. This program includes the monitoring of one fixed time series station situated at 92 m depth on the mid-continental shelf (known as ST 18; see Fig. 1). This station has been regularly sampled on a monthly basis since 2002 to date (University of Concepción on board the R.V Kay-Kay II). CH₄ measurements were initiated in 2007 and continue to date. In this study, data came from April 2007 to April 2019 were analysed.

Continuous profiles of temperature, salinity and DO were collected using a conductivity, temperature and depth apparatus (CTD-O model SBE-25 from 2007 to 2015 or SBE-19 from 2016 to date). Fluorescence (Wet Labs) measurements were taken using sensors attached to the CTD-O₂ probe. Seawater samples were taken using 10-L Niskin bottles. Eight depth measurements of DO, CH₄, nutrients and pigments sampled consecutively in this order were obtained between the surface and 80 m depth (sup (>2 m), 5, 10, 20, 30, 50, 65 and 80 m depth). Triplicate samples were taken for measuring DO using iodometric bottles and fixed immediately. CH₄ samples (triplicate) were collected in 20 mL gas chromatography (GC) vials and preserved through the addition of 50 µL of saturated mercuric chloride (Karl and Tilbrook, 1994) and immediately sealed with a grey butyl-rubber septum and aluminium cap, and stored in darkness until analysis. To obtain nutrient samples (NO₃⁻, NO₂⁻ and PO₄³⁻), syringes were directly connected to the spigot of the Niskin bottle and samples were filtered through a 0.45 µm Uptidisc adapted to the syringe, then stored at -20°C. Chl-

a was filtered (in triplicate) through a glass-fibre filter (GF/F) and the filters were immediately frozen at -20°C .

2.2. Chemical analyses.

DO (125 mL, triplicate samples) was analysed following the Winkler method with an automatic procedure based on a photometric end point with a Dosimat 665 (Williams and Jenkinson, 1982). Dissolved CH_4 was analysed through static-headspace equilibration (McAuliffe, 1963) for GC; to achieve this, 5 mL of ultrapure Helium was added into GC vials, generating a headspace for the equilibration between both phases. Once the equilibrium was reached, gas injection was carried out both automatically (2007-2018, Agilent 7697A autosampler) and manually (2018 to date) on a Shimadzu 17A GC with a Flame ionization detector and capillary column (Restek RT QS, 0.53 mm 3×30 m), operated at 30°C temperature with a flow of 2.6 mL min^{-1} , using N_2 as an ultra-pure gas carrier.

Four point calibration curves were made for each sample set from 2007 to 2015, following certified standards (Mathison gas mixture) and from 2016 to date using primary standard with a composition and concentration similar to that of the current atmosphere from NOAA (1863.4 ± 0.3 ppbv for CH_4) (Bullister et al., 2016), two standard gas mixtures (Air Liquide, USA) and zero air (synthetic air without CH_4 tracers). Each day two standards were used to assess the performance of GC. The detector has a linear response to different used CH_4 concentration from 0.5 to 5 ppmv. The analytical error for CH_4 measurements was approximately 5%. Measurement uncertainty was calculated using the standard deviation taken from triplicate

measurements by depth. Depth CH₄ measurements (triplicates) with a variation coefficient higher than 10% were not integrated into the CH₄ database.

Nutrients were analysed using a standard manual techniques (from 2007 to 2009), or automated techniques (with an autoanalyzer, SEAL Analytical, from 2009 to present), based on colorimetric methods (Grasshoff et al., 1983). Chlorophyll a was measured with a Turner Designs Fluorometer (10AU), following the standard technique described in Holm-Hansen et al. (1965), using the appropriate pigment standard (Sigma-Aldrich C6144-1MG).

2.3. Data analysis

Dissolved CH₄ concentration was calculated in accordance with the solubility coefficient from Wiesenburg and Guinasso (1979). In order to interpret the vertical and temporal variation of CH₄, the water column was divided into two layers, according to density gradient (pycnocline) and light penetration (euphotic layer) (more details in Farías et al., 2015); i.e., 1) the layer from surface down to 25 m depth, which was continually well mixed and illuminated, in accordance with previous estimates of the photic layer depth (mean±SD: 23.9±11 m) and mixing layer depth (MLD) (mean±SD: 9±10 m), based on climatology data from the time series station (Aguirre et al., 2018; Testa et al., 2018); 2) a subsurface layer that extend from 26 m to 80 m depth, overlaying the sediments (~92 m depth). Inventories of gases, nutrients and Chl-a (only in the surface layer) were calculated through the trapezoidal integration of measurements taken over several depths (minimum of 3-5 depths) within each layer.

The daily CH₄ flux ($F = \mu\text{mol m}^{-2} \text{d}^{-1}$) across air-sea interface was determined using the equation from Broecker and Peng (1974), modified by Wanninkhof (1992) or W92:

$$F = K_w * (C_w - C^*)$$

where, k_w (cm h^{-1}) is the gas transfer velocity; C_w (nmol L^{-1}) is the mean CH₄ concentration in the MLD, according to ML climatology based on 15 years of CTD measurements using a potential Kara's density-based criterion (García, 2017). C^* is the gas concentration at equilibrium with the atmosphere, determined by the solubility equation for CH₄ (Wiesenburg and Guinasso, 1979) according to the last contact with the atmosphere. Historical atmospheric values were obtained from registers of gas hemispheric and global monthly means from the NOAA/ESRL program at NOAA (<http://www.esrl.noaa.gov>).

The gas transfer velocity or K_w was calculated according to W92, which is estimated to be the best available parameterization of wind regime within the study area according to previous studies (Farías et al., 2015). A comparison was made with the parameterization from Nightingale et al. (2000) and Wanninkhof (2014) or W14.

$$K_w = 0.31 * U^2 * \left(\frac{Sc}{660}\right)^{-0.5}$$

where U is the wind speed (m s^{-1}) and Sc is the Schmidt number for CH₄; this indicated the relationship between viscosity and the diffusion coefficient of CH₄ in the water column, which was dependent on the temperature and salinity of the seawater.

For CH₄, the Schmidt number was a function of temperature (°C) updated by Sarmiento and Gruber (2006).

$$Sc = 2039.2 - 120.31 \times T + 3.4209 \times T^2 - 0.040437 \times T^3$$

Wind speed and direction based on an hourly register, were obtained from a permanent meteorological station located at Carriel Sur (<http://www.meteochile.gob.cl/>), the station meets international standards and it is established as a coastal station. These data were compared with daily wind fields recorded via satellite, averaged every 6 hours and interpolated linearly for this study area, from 0.25° to 0.05°. Two products related to satellite observations were obtained from Copernicus marine service (<https://resources.marine.copernicus.eu/>) sources. Data for both periods are derived from scatterometers and radiometers (2007 to 2018) (WIND_GLO_WIND_L4_NRT_OBSERVATIONS_012_006) and during 2019 (WIND_GLO_WIND_L4_NRT_OBSERVATIONS_012_004).

Alongshore wind ($v = \text{m s}^{-1}$) was derived from meridional component which generates upwelling in the area, calculated from the wind magnitude ($|V| = \text{m s}^{-1}$) and direction (converted to radians), as follows.

$$v = -|V| * \cos\left(\frac{dd * \pi}{180}\right)$$

Daily stress (τ_y ; N m⁻²) was calculated following Nelson (1977):

$$\tau_y = C_d \cdot \rho_{\text{air}} \cdot |V| \cdot v$$

where C_d is the empirical drag coefficient, coinciding with the 10 m above sea level, corresponding to 0.0013 (Kraus, 1972), ρ_{air} is the air density that corresponds

to $0.00122 \text{ g cm}^{-3}$ or 1.22 kg m^{-3} , $|V|$ is the wind magnitude in m s^{-1} , and v is the southern component of the wind in m s^{-1} . To evaluate the cumulative alongshore wind stress, a 5-day running mean was used, according Barth et al. (2007).

The upwelling index (UI; $\text{m}^{-3} \text{ s}^{-1}$) from 2007 to 2019 was obtained through Ekman zonal transport per 1000 m of coastline (Bakun, 1973), as:

$$UI = \left(\frac{\tau_y}{\rho f} \right) * 1000 \text{ m}$$

Where τ_y (Pa ; $\text{kg m}^{-1} \text{ s}^{-2}$) is the mean wind stress meridional component within the box $73\text{-}74^\circ\text{W}$, $36\text{-}39^\circ\text{S}$, ρ represents the mean density of the water column at ST18 ($1026.21 \text{ kg m}^{-3}$), and f indicates the Coriolis parameter corresponding to the latitude of ST18 ($8.67 * 10^{-5} \text{ s}^{-1}$).

Regarding El Niño–Southern Oscillation (ENSO), oceanic episodes of El Niño (EN) and La Niña (LN) were detected using values of standardized Southern Oscillation Index (SOI), along the Tropical Pacific Ocean. Anomalous low negative values in pressure indicate an EN episode, and high positive values are related with LN (Trenberth, 1984). The data were obtained from the UCAR-NCAR climate data guide (<https://climatedataguide.ucar.edu/>).

2.4. Statistical analysis

Spearman correlations (Rho) were calculated between oceanographic variables ($T^\circ\text{C}$, S, DO, Chl-a, nutrients) along with CH_4 efflux, alongshore wind (ASW) and cumulative wind stress and, estimated inventories (CH_4 , DO, Chl-a, and nutrients) for two layers (except for Chl-a), in order to determine which physical and biogeochemical variables closely explained the temporal variation of CH_4 . The

threshold value for statistical significance was set at $p < 0.05$ and $p < 0.01$. Procedures for several pairwise comparisons between average values were carried out using a Kruskal-Wallis test, with the prior application of a Shapiro–Wilks test to confirm normal distribution.

In order to classify the occurrence of types of CH₄ vertical distributions (119 total profiles), the vertical profiles were analyzed qualitatively, and the CH₄ concentration difference between the surface and the bottom was taken into account as a vertical distribution type criterion. In general, all the profiles showed an increase with depth, but when the ratio of CH₄ concentration between the bottom and the surface depths exceed 2, the profiles were classified as diffusion-advection profiles (type I) and when the mentioned ratio was close or less than 2, they were a profiles almost constant (type II). On certain occasions, the type I or II profiles presented one or several surface peaks, so they were classified as type III profiles.

To determine the similarity between monthly profiles according to our classification (type I, II and II), we compared each vertical profile against each type of vertical distribution throughout a normalized cross correlation (NCC) at lag zero. Firstly, all vertical profiles were interpolated to fill the data gap of sampling depths. Secondly, the 3 vertical distribution types were theoretically created using absolute values between 1 (minimum as the surface) and 10 (maximum as the bottom) instead concentration values with the end aim to get shape type. Finally, each of 118 profiles were compared with each type using the NCC and $R=0.95$ as a threshold.

3. Results

3.1 Time series of oceanographic variables including dissolved methane

Time-series plots from April 2007 to April 2019, for variables as Chl-a, DO, NO_3^- , HPO_3^{2-} , inorganic dissolved N:P ratio and CH_4 , are presented in Fig. 2; while the temperature and salinity time series are included in the Supplementary Material (Fig. A.1). All these variables, except CH_4 , have been previously analysed in Farías et al. (2015) and other studies, describing the variation of physical variables, such as temperature and salinity. The present study continues time series analysis and includes by first time CH_4 covering the period from 2007 to 2019.

There was generally a wide fluctuation of Chl-a within the photic layer, between 0.11 and 47.70 $\mu\text{g L}^{-1}$ (mean \pm SD: 3.91 \pm 6.16), with maximum values in the spring-summer period (upwelling period), and minimum values ($<1.00 \mu\text{g L}^{-1}$) in the winter (non-upwelling period) and revealed a marked seasonal cycle (Fig. 2a). Although the surface layer remained well oxygenated, the subsurface layer presented hypoxic levels during the austral winter, followed by a gradual deoxygenation during September to April, reaching values of DO close to zero (Fig. 2b). That distribution revealed a marked seasonality and indicated the presence of an oxygen minimum zone (OMZ) with a marked oxycline occurring at depths as shallow as 20-30 m during the upwelling season. Remarkably, an oxygenation event (also accompanied by subsurface waters with warming and higher salinity) was observed during fall-winter of 2017 (Fig. 2 b).

Nutrients, such as NO_3^- (Fig. 2c) and PO_4^{3-} (Fig. 2d), also showed a seasonal variability mainly in subsurface waters, with increased levels during upwelling-favourable periods that diminished during non-upwelling periods. This was owed to the dominance of different water masses (ESSW vs. SAAW) and differential nutrient

uptake rates by phytoplankton, which increase during upwelling periods. However, NO_3^- and PO_4^{3-} concentrations were never depleted in surface waters, despite periods of high photoautotrophic production. Aside from some exceptional high values of PO_4^{3-} , during Dec 2016 and Feb 2017, whose cause has not been determined; the inorganic $\text{NO}_3^- + \text{NO}_2^-/\text{PO}_4^{3-}$ ratio averaged 9.09 ± 3.13 (ranging from 1.06 to 19.1) (Fig. 2e), being lower than expected ratio of 16: 1 (Redfield et al., 1963). These ratios indicated a NO_3^- deficit due to N loss process in subsurface waters associated with very low DO.

Dissolved CH_4 levels varied widely from 1.74 to 100.9 nmol L^{-1} , equivalent to 67.11 and 3965.99% of saturation (mean \pm SD: $762.79 \pm 496.43\%$) (Fig. 2f). In the surface layer, CH_4 levels varied from 1.74 to 54.63 nmol L^{-1} , whereas in subsurface waters CH_4 levels reached values as high as 100 nmol L^{-1} . Thus, CH_4 level ratio between the surface and the bottom water fluctuated from 0.57 to 18.71 folds. The highest CH_4 levels were always found in bottom waters at ~80 m depth (close to the sediments), with suboxic/anoxic conditions, high NO_3^- concentration and the lowest inorganic dissolved N:P ratio (Fig 2e).

When comparing the CH_4 levels during favourable vs. non-favourable upwelling periods, significant differences were observed in subsurface layer ($p=0.011$), however no significant differences of CH_4 levels were observed in the surface layer ($p=0.272$). Regarding temperature $T^\circ\text{C}$ ($p<0.000$), salinity S ($p<0.000$), DO ($p<0.000$) and Chl-a ($p<0.000$), they showed a marked significance between both periods. On the other hand, non-differences were observed in both periods for NO_3^- ($p=0.764$), however, when separating the surface ($p=0.003$) and subsurface ($p<0.000$)

layer, a statistical significance in NO_3^- was evidenced. In the case of PO_4^{3-} the difference was only given by the subsurface layer ($p < 0.000$).

3.2. Annual cycles of methane and other variables

Figure 3 presents the annual cycles of CH_4 (Fig 3a), Chl-a (Fig 3b) and DO (Fig 3c), based on 12 years of sampling at each sampled depth. The annual CH_4 cycle indicated that the bottom layer (80 m depth) is the depth with the highest mean values, ranging from 23.81 ± 11.62 and $45.05 \pm 7.16 \text{ nmol L}^{-1}$ and reaching maxima values in the summer months (February). Subsequently, CH_4 levels decreased towards the surface with mean values fluctuating from 7.22 ± 6.43 to $21.92 \pm 11.64 \text{ nmol L}^{-1}$. In addition, the surface layer presented a weak CH_4 variation that appeared to be unassociated with upwelling cycles, contrary to the observed patterns for Chl-a and DO (Fig. 3b and 3c). Besides, the difference in mean CH_4 concentration between the surface and bottom waters reached maximum and minimum values in summer and winter months, respectively (Fig. 3a). Chlorophyll-a and DO, in contrast to CH_4 , showed a marked seasonal variation (Fig. 3b, Fig 3c), Chl-a had high mean values during the austral spring-summer; for example, mean \pm SD value taken at 5 m depth in December showed Chl-a levels up to $16.58 \pm 11.17 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$, however mean levels of $0.38 \pm 0.31 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ were observed during in June and July (austral winter) (Fig. 3b).

In contrast with CH_4 pattern, DO presented mean \pm SD values during annual cycle between 64.16 ± 52.98 and up to $249.45 \pm 42.82 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ throughout the year at surface depth; whereas mean \pm SD values at 5 and 10 m depth remained similar (Fig 3c), but below 20 m depth, DO presented marked vertical and seasonal fluctuations from hypoxic to suboxic/anoxic levels. This distribution clearly marked the existence

of the OMZ and indicated marked vertical gradients (oxycline) in the spring-summer (Fig. 3c), which diminished in fall-winter with slight increase in DO at 80 m depth. However, DO values at 80 m remained persistently low ($4.48 \pm 3.21 \mu\text{mol L}^{-1}$) and these values may be zero given the sensitivity of the DO measurement methodology.

To demonstrate differences in the vertical CH_4 distribution between upwelling and non-upwelling favorable periods, the CH_4 inventories over layers and seasonal periods were calculated. Table 1 shows the inventories (mean \pm SD) of different variables separated into favourable and non-favourable (Table 1) periods and into surface and subsurface layers. When comparing the Chl-a and DO inventories or pool sizes between both periods, a significant differences ($p < 0.000$) were observed, however these were not the case of mean inventories for NO_3^- , NO_2^- and HPO_4^{3-} and CH_4 with p values, respectively, of $p=0.799$, $p=0.215$, $p=0.302$ and $p=0.570$.

Figure 4a, 4c and 4e showed box-and-whisker plot of CH_4 , Chl-a and DO inventories over both layers throughout an annual cycle (month values based on a 12 year time series). These CH_4 inventories throughout the subsurface layer fluctuated between 268.95 and 3102.02 $\mu\text{mol m}^{-2}$, and when they were compared with those estimated into the surface layer (73.58 to 871.28 $\mu\text{mol m}^{-2}$), revealed that the majority of CH_4 was accumulated in the subsurface water. The highest CH_4 inventories were observed in both December and April (Fig. 4a), and the former month coincided with maximum Chl-a biomass (December). Chl-a inventories were highly variable (ranging from 3.02 to 585.4 mg m^{-2}) with an abrupt increase in early spring, coinciding with an increase in upwelling favorable winds (Fig. 6) and showing a maximum Chl-a value in December (Fig. 4c). The DO inventories throughout the surface water column

fluctuated between 2,356 and 19,058 mol m⁻², continually showing increased values in winter-spring and a weak seasonality, which contrasted with a marked variation in the subsurface layers (142.76 and 12675.47 mol m⁻²) with extreme low values during February (Fig. 4e).

3.3. Inter-annual variability among variables (including dissolved methane)

When interannual CH₄ variability was analysed (Fig. 2f), there was a significant difference between years ($p=0.000$), and the austral summer of 2009/10 and 2014/15 and 2016/17, showing anomalous behaviour. For example, during 2009-10 and 2014-15 no CH₄ accumulation in the bottom water was registered and, during 2016/17 with a CH₄ accumulation in the whole water column was observed. The latter also coincided with the occurrence of more saline, warmer and oxygenated waters, suggesting a change in normal hydrographic conditions (Fig. A.1 and Fig. 2b). Respect to Chl-a, differences among years were found ($p=0.032$) and values above 0.68 µg L⁻¹ were recorded especially in 2007, 2011, 2014. Regarding to DO, besides highly oxygenated waters (Fig. 2b) observed in the entire water column in winter 2017, there was another in winter 2011; however, non-statistical differences among years were observed ($p=0.937$).

Figure 4b, 4d and 4f showed box-and-whisker plot of CH₄, Chl-a and DO inventories over both layers (except Chl-a) for each year sampled (from 2007 to 2019). When the estimated annual CH₄ inventories in both surface and subsurface layers are compared (Fig. 4b), a clear interannual variability was observed in subsurface water ($p<0.000$), and in surface layer ($p=0.006$). Specifically, the years 2009/10 and 2014/15 showed the lowest records in Chl-a pool size whereas the 2008, 2011 and 2017 years

had the highest pool sizes, but there was no inter-annual variability ($p=0.768$), likewise DO did not reveal significant differences among years ($p=0.460$; Fig. 4f), but winter of 2017 was a season of an extreme higher oxygenation in the entire water column.

3.4. Vertical distribution of dissolved methane

Figure 5 shows vertical profiles calculated by monthly means of CH_4 , DO and NO_3^- for each sampled depth based on data from 2007 to 2019. All obtained profiles in this study (119 in total) were included in Supplementary Material (Fig. A.2). It was possible to identify a transition of CH_4 profiles throughout the seasonal cycle. As the upwelling developed (Oct., Nov., Dec., Jan., Feb., March and April), a type I vertical distribution dominated in 54% of all profiles. This was a diffusion-advection profile, with a high CH_4 concentration in the bottom layer that gradually decreases towards surface (Fig. 5) and with a mean CH_4 level ratio between surface/bottom depth up to 4.5 (e.g., February). This pattern coincided with a sharp decline in DO towards the sediment and a marked increase in nutrients below the surface water. Both distributions were observed during the upwelling season and triggered by the dominance of ESSW and highest rate of OM mineralization. Towards the end of summer and early fall (Feb., March and April), the accumulation of CH_4 in bottom waters reached a maximum value and DO was extremely low reaching values near anoxia (Fig. 5, Feb. and March). Although NO_3^- levels had a gradual increase with depth, which is more pronounced in summer, this nutrient showed sometime a relative decrease at 80 m depth due to their consumption through the anaerobic mineralization processes of OM (denitrification); sometime a relative CH_4 decrease in 80 m depth was

also registered (Fig. A.2) probably associated with consumption by anaerobic CH₄ oxidation in the sediment.

The type II profiles presented a relatively homogeneous CH₄ distribution with a mean ratio of CH₄ bottom/surface concentration around or less than 2. This type of profile was observed 46% of the all profiles mainly during May, June, July and August, September (austral fall-winter), and could be related to intense mixing processes throughout the entire water column, which coincided with periods of higher oxygenation and low NO₃⁻ content, owing to the dominance of subAntarctic waters (SAAW).

A type III vertical distribution of CH₄ was also described and included cases of irregular vertical CH₄ distribution or CH₄ peaks in surface water ~15-30 m depth (Fig. 5 and Fig. A.2). These peaks were observed in both type I and II profiles and found in 40% of all profiles, being more frequent in transition months between favourable or non-favourable upwelling periods such as April and May (fall) and August-September (winter to spring) (Fig. A.2).

3.5. Air-sea CH₄ exchange and relationships between environmental variables

The daily wind speed taken from the weather station and satellite data ranged from 0.64 to 13.38 (means±SD: 3.53±1.44) and 0.06 to 14.91 m s⁻¹ (means±SD: 5.03±2.60), respectively. Wind speeds obtained from the satellite were 30% higher than those obtained by the weather station. Thus, both data sources were used to estimate gas exchange, considering that the range includes both a conservative (weather station) and maximum (satellite) values. The alongshore wind speeds fluctuated from -13.16 to 5.75 and -14.05 to 12.50 m s⁻¹ from weather station and satellite data, respectively.

These winds, that provoke favourable upwelling events (positive values), occurred more frequently during spring-summer, and overall during about 64.20% (weather station) and 73.90% (satellite) of the whole year; whereas non-favourable upwelling events (negative values) took place in part of fall and winter (around 27-34% of the year).

Alongshore wind stress (Fig. 6a) and upwelling index (Fig. 6b) (only using winds from weather station) varied from -0.27 to 0.18 N m⁻² (mean±SD: 0.01±0.02) and from -3009.01 to 2053.31 m³ s⁻¹ (mean±SD: 147.37±236.40), respectively, and clearly showed a cumulative upwelling-favourable wind stress during spring-summer (Table 2). Sea surface temperature (SST) measured at 10 m depth (to avoid the effect of solar radiation), displayed a similar pattern to the cumulated wind stress, indicating the upwelling of cold, rich-nutrient and low DO subsurface water to the surface through vertical advection (data no shown).

Using W92 parametrization, along with the speed wind measurements from the weather station, CH₄ air-sea fluxes were always positive (toward the atmosphere) and varied from 1.27 to 47.02 μmol m⁻² d⁻¹ (mean±SD= 10.94±7.48; Fig. 6c). Maximum CH₄ efflux was registered during December 2015 was 47.01 μmol m⁻² d⁻¹, followed by 30.36 (January 2008) and 29.00 μmol m⁻² d⁻¹ (October 2017), as well as other similar values during the summer periods. Using the same parameterization (W92) with satellite wind data, air-sea CH₄ efflux was on average 2.3 fold higher (data not shown). Furthermore, when W92 parametrization was compared with Nightingale (2000) parametrization, the latter overestimated the air-sea gas exchange by only

4.64±7.58%, while non differences were found between W92 and W14, indicating that W92 is a suitable parametrization for the existing local wind regime.

Table 2 presents daily CH₄ effluxes (mean±SD) and cumulative wind stress (mean±SD) averaged by upwelling and non-upwelling periods from 2007 to 2019. Air-sea CH₄ exchange ranged from did not show a marked seasonal differences between upwelling and non-upwelling (p=0.513; Table 2), being lightly lower (mean±SD: 8.51±5.99 μmol m⁻² d⁻¹) during non-favourable upwelling periods and higher (mean±SD: 12.29±7.91 μmol m⁻² d⁻¹) during favourable upwelling periods. A comparison among years (Table 2) indicated that maxima effluxes were registered during upwelling season of 2015-2016 and 2017-2018 (19.18±12.93 and 20.41±10.27 μmol m⁻² d⁻¹, respectively); whereas 2009-2010 presented the lowest seasonal upwelling CH₄ efflux of about 4.69±2.62 μmol m⁻² d⁻¹ (Table 2). Notably, during fall-winter of 2015 and 2017, CH₄ efflux equal or greater than those estimated in spring-summer periods were recorded. Cumulative wind stress was always significantly higher (p=0.00) in upwelling periods (cumulated of 242 days) compared to non-upwelling periods (cumulate of 123 days); also significant differences (p=0.05) among years were observed in any of both mentioned periods.

Figure 7 shows a Spearman correlations matrix for CH₄, T, S, DO, Chl-a, and nutrient variables along with ASW (Fig. 7a) and also among their inventories in the whole water columns, as well as ASW, cumulative wind stress and CH₄ effluxes (Fig. 7b). The results indicated that CH₄ levels were significantly correlated with variables such as temperature, DO and Chl-a (negative correlation) and salinity and nutrients (positive correlation). These implied that more CH₄ was accumulated or produced in

saltier, cooler, rich-nutrients and less oxygenated bottom waters (mainly associated with ESSW); but the negative correlation was observed among CH₄ and Chl-a (Fig. 7a) would indicate at least a lag between Chl-a and the amount of CH₄ accumulated. Correlation matrix among the inventories in the whole water column and CH₄ fluxes are presented in Fig. 7b. CH₄ efflux revealed significant negative correlations with NO₃⁻ and positive correlations with Chl-a and wind stress, suggesting that more CH₄ was accumulated in surface water as NO₃⁻ was consumed in favourable upwelling period (coinciding with favourable upwelling wind stress).

4. Discussion

4.1. Temporal variability in oceanographic conditions including methane distribution



Despite a widely recognised lack of information around oceanic CH₄ distribution and its exchange with the atmosphere, it is well established that coastal systems are important in terms of CH₄ production and emissions (IPCC, 2013, Weber et al., 2019). The seawater overlaying continental shelves are significantly more enriched with CH₄ in comparison to the open ocean, with reductions of up to one order of magnitude as the sea floor deepens. For example, recent studies by Sudheesh et al. (2020) off the South-Eastern Arabian Sea, and Sierra et al. (2020) in the SE Spain report a reduction from ~20-40 nmol L⁻¹ on the inner shelves to ~2-4 nmol L⁻¹ on the outer shelf.

High CH₄ content in coastal zones is predominantly linked to areas of high biological productivity, which in turn is exported to the sediment, where OM sedimentation occurs. The input of OM stimulates the metabolisms of benthic organisms, and if OM input is sufficient, an increased flux of CH₄ from the sediments to the overlying water column could occur (Jayakumar et al., 2001; Martens and Klump, 1980). The correlation between CH₄ and Chl-a has been explored in several studies over different spatial scales; however, similar to the results of this study, a clear positive correlation is not always observed (see Fig.7a) (Bange et al., 2010; Borges et al., 2017; Ma et al., 2020; Weber et al., 2019). This could be due to a time gap that takes for the OM to settle and mineralize as it sinks into the water column or/and, due to other processes are taking place, such as cold seeps, especially on continental margins (Johnson et al., 2019), as well as other forms of physical CH₄ transport (e.g., continental runoff) and superficial CH₄ production (discussed in the following).

Coastal upwelling is identified to occur at sites with enhanced CH₄ concentrations and emissions; such as in the NW and SW Arabian Sea, the Oregon coast off the west coast USA, and off Canarias Islands and Namibia (SW Africa) (Kock et al., 2008; Monteiro et al., 2006; Owens et al., 1991; Rehder et al., 2002; Sudheesh et al., 2020). This is also the case in the upwelling region off central Chile, which shows a marked seasonality in biological productivity (Fig 2a) and DO (Fig 2b), i.e., during periods of wind driven stress on surface waters occurring ~64% of the year (Fig. 6a), which provokes the upwelling of subsurface water with particular features. This regime reintroduces bio-available NO₃⁻ (Fig. 2c) and PO₄³⁻ (Fig. 2d) to the euphotic layer, enhancing primary production (Testa et al., 2018). This process is also

triggered by the vertical advection of cold and more saline water (Sobarzo et al., 2007), which in turn has low DO (Fig 2b), creating a well-established OMZ.

The intensity and vertical presence of the OMZ varies according to upwelling evolves over time (Fig. 2b), leading to the development of hypoxic/suboxic conditions at intermediate and bottom depths, that coincide with low N:P ratios as low as 6 (Fig. 2e). This nitrogen deficit is partially caused through substantial nitrogen loss in subsurface water (Galán et al., 2017) as well as the consumption of NO_3^- through denitrification in the sediments, particularly during the spring-summer (Farías et al., 2004). These variations are also related with the increase in biomass (Chl-a) and the typical succession of phytoplankton; that initiates with large diatoms and terminates with small flagellates (Anabalón et al., 2007).

In contrast with DO (Fig. 3c) and Chl-a (Fig 3b), it is not possible to clearly define a seasonality within the annual CH_4 cycle (Fig. 3a). Indeed, when comparing the CH_4 inventories during non- and upwelling favourable periods, there are no significant differences observed in surface waters (see Table 1). It is important to note that CH_4 levels increase in the surface layer towards the end of winter (Fig 3a; Fig 4a), a transitional period that coincides with the largest discharge of fresh water from rivers (Testa et al., 2018) and the lowest salinities in the surface waters (Fig. A.1), indicating the potential impact of continental ecosystems. It is notable in winter 2009, 2011 2015 (Table 1 and 2). Rivers and wetlands have been recognized for their CH_4 inputs during seasonal runoff, as recorded in estuarine waters (Rao and Sarma, 2017; Upstill-Goddard et al., 2000; Upstill-Goddard and Barnes, 2016). Only a few studies in central-south Chile report high CH_4 levels in estuarine systems which increase during

periods of enhanced continental freshwater runoff (Bello, 2016; Daniel et al., 2013; Farías et al., 2018).

The oceanographic time series off central Chile constitutes an excellent tool to study seasonal processes, as has been described, however with 12 years of monthly sampling interannual variability in CH₄ contents (regarding both depth concentrations and inventories) can be analysed (Fig. 2f, Fig 4b). CH₄ time series indicates that *in situ* CH₄ production and/or input are not necessarily associated with seasonal cycles as those associated with coastal upwelling or that there is another source of variability. In fact, part of the variability could be associated with the ENSO cycle. That is the case with four warm events in the past 12 years, the 2006/07, 2009/2010, the failed 2014 event, 2015/16 Godzilla EN and the intense coastal EN during summer-fall 2017 (Cai et al., 2020).

For example, during 2009/10, 2011/12 and 2015/16 EN, CH₄ inventories in the surface layer are similar or even higher in non-upwelling period, compared to upwelling, losing the expected seasonality. This is not accompanied by changes in the phytoplankton biomass, but in the case of 2009/10 and 2015/16 coincides with the occurrence of more saline and warming waters, suggesting a change in normal hydrographic conditions (Fig. A.1). Besides, notable oxygenation and anomalous PO₄³⁻ concentrations (Fig. 2d) are only registered during the 2017 coastal EN.

It is known that ENSO, especially to its warm phase (EN) changes completely the physical, chemical, and biological dynamics of eastern South Pacific (Escribano et al., 2004, Graco et al., 2017; Gutiérrez et al., 2008). For example, coastal waters off

Peru under EN conditions, (i) increase of sea surface temperature and 15°C isotherm progressive deepens in the water column, (ii) change of water mass distribution, dominating in surface Surface Subtropical Water (SSW), (iii) decrease of primary production mainly associated with a decreasing in nutrient supply to surface waters and, iv) the upper boundary limit of the OMZ, usually shallower, deepens to more than 100 m depth.

However, a few time series of the whole water column reveal a rich spectrum of variability of different oceanographic distributions that includes frequencies ranging from seasonal to interannual scales (Escribano et al., 2004; Fariñas et al., 2015; Graco et al., 2017). Differences in the response of the ocean could be depended on the genesis (region in the equatorial Pacific) and the diversity of the EN events taking place during in the 21st century (Cai et al., 2020; Capotondi et al., 2015); different types of responses or manifestations in vertical distribution of biogeochemical variables could depend on if EN or LN events have strong, moderate or weak signals through the eastern South Pacific, but that observed as the 2017 coastal EN clearly differs from the others registered and could be similar to that observed 1997-98 EN (Escribano et al., 2004; Graco et al., 2017).

It is possible that coastal waters off central Chile respond differently to those off Peru and northern Chile due to the efficient oceanic teleconnection respect to central-southern Chile; the latter can be considered as the southernmost region where the Kelvin wave signal can arrive more altered and the oceanographic and hydrographic conditions are also different. In additions, central-south Chilean region is experiencing an intensification of coastal upwelling mainly associated with changes

Southeast Pacific Subtropical Anticyclone (SPSA), which in turn are partially controlled by ENSO like process (Aguirre et al., 2018; Pinochet et al., 2019, Winckler et al., 2020).

4.2. Vertical methane distribution in coastal upwelling water

The shape of vertical profiles are determined by a number of factors; inputs from the sediment, vertical diffusion and advection transport, removal through gas exchange with the atmosphere, as well as *in situ* biological production and consumption in the pelagic zone. In contrast to CH₄ profiles in the coastal ocean (Fig 5), CH₄ concentration in the open ocean decreases with depth, or peaks at the surface or within the pycnocline (Forster et al., 2009; Kelley and Jeffrey, 2002). There is a coincidence between CH₄ and Chl-a maxima at the subsurface that may be a product of phytoplankton metabolism (Scranton and Brewer, 1977) or from CH₄ production in the guts of zooplankton (Alldredge and Cohen, 1987; Paerl and Prufert, 1987; Scranton and Brewer, 1977), which are likely to be grazing in increased concentrations within this layer. In this sense, the superficial CH₄ peak coincides with the maximum stratification of the water column inferred through Brunt Väisälä frequency; this index shows its maximum values between 10 and 25 m. depth (data not shown), depths that match with the thermocline and oxycline along with the base of the photic layer; therefore many metabolisms involved in the CH₄ production could meet in this layer

In the coastal ocean, vertical CH₄ distributions are similar to those observed in marine systems dominated by intense benthic production, as the findings in this study (Fig. 5). A clear increase in CH₄ concentrations is continually observed in the bottom

layer, and it is particularly marked during the summer (February and March). There is a clear variation in differences in CH₄ levels between the surface and deeper waters throughout the whole study with up to an 18 fold difference between the surface and bottom waters in the summer period. This is also evident in annual CH₄ inventories, which always maintain higher levels in the subsurface layer; being higher in upwelling compared to no upwelling periods (Table 1).

The consistently elevated concentrations of CH₄ in bottom waters over the continental shelf implies the benthic origin of CH₄ through diagenesis in the sediments, which then act as a source to the water column (Capelle and Tortell, 2016; Martens and Klump, 1980). It is widely accepted that the sediments beneath upwelling zones receive a higher input of OM through sedimentation (Hebbeln et al., 2000) and accumulate large reservoirs of C and N (Summerhayes, 1983), thus they play a role in global C and nutrient cycles (Walsh, 1991). The majority of biogenic CH₄ is generated through the fermentation of acetate and by the reduction of CO₂ with H₂ (Whiticar et al., 1986), pathways that require completely anoxic conditions, as well as a sequential use of electron acceptor, such as O₂, Fe, NO₃⁻ and SO₄⁻. High rates of OM remineralization through anaerobic pathways have been observed in the continental shelf sediments off central Chile (Farías et al., 2004; Ferderlman et al., 1997; Glud et al., 1999; Gutierrez et al., 2000; Thamdrup and Canfield, 1996). Indeed, local NO₃⁻ depletion was observed in bottom waters (Fig. 2c), indicating NO₃⁻ consumption in bottom waters and/or within the sediments by dissimilative NO₃⁻ reduction and denitrification, as previously observed by Farías et al. (2004) and Galán et al. (2014, 2017). In turn, these processes coincide with local NH₄⁺ and NO₂⁻

accumulation (data non shown), which is partially associated with benthic OM matter remineralization (Farías et al., 2004). In addition to denitrification and anammox, also sulphate reduction and methanogenesis has been reported within the sediment of the study area (Ferderlman et al., 1997; Glud et al., 1999; Gutiérrez et al., 2000) confirming the prevalence of anoxic conditions and sufficient OM availability in the sediments. However, this study was unable to determine if the CH₄ accumulated in bottom water originates from anaerobic methanogenesis in the sediment or it is partially formed in the bottom water.

On another hand, our findings frequently show a shallower CH₄ maximum (Fig. 5 and Fig. A.2). It is possible that a depth with an elevated CH₄ concentration may be positioned in between two adjacent depths with a higher rates of CH₄ loss, either through aerobic CH₄ oxidation or sea-air exchange. Thus, the observed CH₄ peaks in the surface layer would be a result of local CH₄ production and consumption, or both processes are occurring simultaneously and operating at faster rates compared to vertical mixing, and/or advection. Regarding advection, piston or gas transfer velocities (K_w) can be used to calculate the duration for gaseous equilibration to be reached with the atmosphere. Considering that the mixed layer is typically positioned at about 10-20 m depth, the length of required time to push all of the gas through this layer is at minimum between half-day and one day, considering that the wind velocity exceeds 7 m h⁻¹. It suggests that surface CH₄ production rate may be fast enough to lead to local accumulation. Similarly, the CH₄ maximum in surface waters observed in numerous other studies suggest that the timescales for biological CH₄ production/consumption processes are relatively short compared with those of

physical mixing (Burke et al., 1983; Conrad and Wolfgang, 1988; Karl and Tilbrook, 1994).

CH₄ production in anoxic environments is predominantly produced by archaea methanogens, however CH₄ production in oxic water requires further investigation and new insights in terms of CH₄ cycling (Damm et al., 2010; Florez-Leiva et al., 2013; Holmes et al., 2000; Karl et al., 2008; Repeta et al., 2016). The previously mentioned authors found that some methylated substrates, such as methylphosphonate, methylamines and even DMSP and DMS (the most abundant methylated compounds) could be cycled through methylotrophic methanogenesis pathways facilitated by microorganisms (Levipan et al., 2007; Neufeld et al., 2008). CH₄ microbial production in surface water could be directly related to the use of compounds by bacterioplankton in oligotrophic regions as established by Karl et al. (2008) or through DOC substrates generated by phytoplankton growth as DMSP (Damm et al., 2010) or via the production of exudates through extracellular release, which are directly coupled with heterotrophic bacteria (Dinasquet et al., 2018; Lenhart et al., 2016; Neufeld et al., 2008)). These processes are particularly active in coastal upwelling zones off central Chile, where a direct coupling between both communities has been identified, leading to rapid DOC cycling (Cuevas et al., 2004; Vargas et al., 2007). Additionally, this also generates substrate for methyltrophic bacteria which have been detected within the study area (Levipan et al., 2007).

Ample evidence exists on the subject of microbial production; indeed, Sun et al. (2011) found that SAR11 Alphaproteobacteria, the most abundant heterotrophs in the ocean, are likely to play a major role in mineralizing marine dissolved organic

carbon. Additionally, analyses of metagenomic data indicate that the genes involved in C1 metabolism frequently occur in natural SAR11 populations, as observed by Carini et al. (2014). The microorganisms produce enzymes that are able to break down compounds, thus liberating phosphorus for growth, and producing CH₄ as a by-product (Metcalf et al., 2012). Thus, SAR11's ability to cleave off CH₄ is noteworthy, as it can partially explain the increased in CH₄ abundance in mid-oceanic waters with elevated DO. This goes hand in hand with our finding in the study area, where Bacteroidetes (orders Sphingobacteriales and Flavobacteriales), SAR11 (subclades Ia–Candidatus Pelagibacter ubique and II) dominated in surface waters containing DO levels $\geq 70\mu\text{M}$ (Aldunate et al., 2018).

Finally, studies by Ward and Kilpatrick (1993) at a limited number of oceanic sites that focus on aerobic CH₄ oxidation and consumption (MOx), or methanotrophy, observe that the highest CH₄ oxidation rates in the California Bight are associated with the pycnocline, with a maximum concentration in the subsurface. A further occurrence of MOx processes are observed in the northern Gulf of Mexico (Kelley and Jeffrey, 2002). It appears that CH₄ production and oxidation may be coupled at this density interface, generating a transient CH₄ accumulation and/or depletion. Recently, Steinle et al. (2017) found that MOx is a ubiquitous process that acts as pelagic microbial filter and is able to adapt rapidly within changing environments; furthermore MOx rates can reach levels up to 11.6 nmol L⁻¹ d⁻¹ in coastal waters and MOx effectively proceeds at sub-micromolar DO levels (Steinle et al., 2017).

4.3. Air sea exchange of methane in the coastal ocean

Marine coastal areas are an important CH₄ source that must be considered in the global methane balance. Bange et al. (1998) indicated annual oceanic emissions ranging from 10.9–17.8 Tg CH₄; furthermore these values have been re-evaluated and may reach from 5 to 50 Tg yr⁻¹ (Bates et al., 1996; Rhee et al., 2009). This inconsistency of up to one order of magnitude is due to a potential multiplying effect caused by several factors, such as gas transfer coefficient (kw) (Sweeney et al., 2007) and estimates of wind speed (weather station vs. satellite) as is the case in this study.

The estimates for CH₄ fluxes in the study area indicate that those based on the winds recorded by satellite were more elevated than those effluxes based on Carriel Sur winds (Fig. 6); thus, this discrepancy would have a considerable effect on the calculations of air-sea CH₄ exchange, whereas effluxes based on satellite wind are from 0.01 up to 14.07 times greater than these based on weather station (Carriel Sur station). This could be due the location of the Carriel Sur station, on the border continent and may be exposed to some physical barriers, whereas the satellite wind is frequently overestimated with respect to the actual wind velocity over the sea surface (Lebedev et al., 2019; Salvacao and Guedes, 2015). In order to take a more conservative approach, this study discusses the CH₄ fluxes obtained with wind from the Carriel Sur weather station.

In addition, several gas exchange parametrizations are used in the literature in order to estimate gas exchange across the air-sea interface. This study makes several comparisons among the most used parameterizations, but all of them get similar results (less than 5% difference). CH₄ air-sea fluxes in our study area range from 1.27 to 47.02 with a mean±SD values of 10.94±7.48 μmol m⁻² d⁻¹, there are no significant difference

in daily fluxes between upwelling (mean±SD: $12.29 \pm 7.91 \mu\text{mol m}^{-2}$) and non-upwelling periods (mean±SD: $8.51 \pm 5.99 \mu\text{mol m}^{-2}$), suggesting a continuous CH_4 production throughout the year, but coastal upwelling exerts an overall role of outgassing; indeed, CH_4 efflux are pretty correlated with wind stress.

Regarding interannual variability in CH_4 efflux (Table 2), the lowest and highest CH_4 efflux are observed during the 2009/10 and the 2015/16 EN, respectively; also higher CH_4 efflux is found during the 2017 coastal EN. These differences seem to be associated with the type of the EN-ENSO events. CH_4 efflux variability seems not associated with changes in favorable upwelling wind stress (Table 2); so these may be due to some biogeochemical and hydrographical conditions in the water column remotely advected.

Remarkably, during fall-winter of 2009, 2011, 2012 and 2015, CH_4 effluxes are greater or similar than those estimated in spring-summer (Table 2). This is a different pattern from that usually observed where the weighted average CH_4 efflux in spring summer always exceed between 1.4 and 2.7 time that estimated in fall-winter. In addition, these periods coincide with lower CH_4 inventories in the surface layer (Table 1) during upwelling with respect to non-upwelling and, with inverted vertical CH_4 distributions (decreasing from surface to bottom water) (Fig. A.2). Even though, however, interannual variability of CH_4 efflux remains unresolved and it is more likely to be associated with oceanographic conditions and variations in advected water masses and/or continental runoff. Knowing that the EN events increase rainfall, CH_4 levels could come from the rivers discharge and continental runoff. But further efforts are necessary to better understand the related biogeochemical and physical

mechanisms (e.g., ENSO, Pacific Decadal Oscillation PDO, and other climate teleconnections).

Considering i) annual CH₄ effluxes, calculated through the weighted averages for during upwelling (64%) and non-upwelling (36%) periods (which fluctuate from 1.66 to 6.22 mmol m⁻², mean±SD: 3.40±1.43) and, ii) a representative continental shelf area equivalent to 41 150 km² (*sensu* Farías et al., 2015), that is located between the coastline and the 200 m isobath, and 36°10'52.07" and 36° 47'20.03" latitudes (Cobquecura and Punta Hualpen, respectively, Fig. 1), the areal CH₄ efflux ranges from ~1 to 4 Gg y⁻¹ is estimated in this study. As continental shelf off Concepción represents only 3.5% of the global area of coastal upwelling (EPA, 2010), this area becomes a true hot spot for CH₄ emission, accounting from 1.7 to 13% of global emission for upwelling regions, which vary from 0.02 to 1.5 Tg C year⁻¹ (Bakker et al., 2014). This could be the case of other coastal upwelling areas underlying continental shelves. These estimations align with those values from Berner et al. (2003), Jayakumar et al. (2001) and Rhee et al. (2009), and reiterate that coastal upwelling regions are a major CH₄ source (Bakker et al., 2014; Denman et al., 2007; Hamdan and Wickland, 2016).

Conclusions

Based on a 12 year time series with monthly frequency, this study reported different temporal variability scale of dissolved CH₄ in the water column subjected to coastal upwelling. CH₄ widely fluctuated between 67.11% and 3965% (or 1.75 and 100.86 nmol L⁻¹), with greatest concentration in bottom waters during the upwelling

season, indicating that most of CH₄ came from benthic OM remineralization under suboxic/anoxic conditions. In fact, classical diffusion-advection distribution dominated over 54% of the all obtained profiles.

Despite the fact that strong seasonality was observed in most oceanographic variables such as physical (temperature, salinity wind-driven stress), DO and even Chl-a, according to favorable and non-favorable upwelling periods, only a weak seasonality was observed in CH₄ and nutrient contents, these suggested an intense local recycling (production/consumption) at a high frequency that we could not be captured with a monthly sampling.

Continental shelf off central Chile behaved as a permanent source of CH₄ into the atmosphere with effluxes ranged from 1.27 to 47.02 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{d}^{-1}$ (mean \pm SD: 10.94 \pm 7.48), highlighting the importance of coastal upwelling as the major outgassing regions. Indeed, this area became a true hot spot for CH₄ emission, accounting from 1.7 to 13% of global emission for upwelling regions.

Although a weak seasonality was also found in air-sea CH₄ efflux, the annual weighted mean CH₄ effluxes during upwelling (64%) and non-upwelling (36%) periods fluctuated from 1.66 to 6.22 mmol m^{-2} (mean \pm SD: 3.40 \pm 1.43). That revealed a strong inter-annual variability, which was not associated with changes in along shore wind or favorable wind stress to coastal upwelling, but rather reflected variations in CH₄ content and other physical variables in the water column, that could be associated with EN events like the one observed in 2009-10 or those occurs in 2015/16 and 2017.

Figure caption

Figure 1. Bathymetry and geographic location of time series station, Station 18 (ST18); Carriel Sur weather station, Itata (IT) and Biobío (BB) rivers are indicated. The shaded area represents the integrated shelf area off Concepcion and comprises as far offshore as the 200 m depth contour between Cobquecura and Punta Hualpén.

Figure 2. Time series vertical distributions at ST18 based on data collected from April 2007 to April 2019 of: (A) Chlorophyll-a levels ($\mu\text{g L}^{-1}$); (B) Dissolved Oxygen (DO) concentrations ($\mu\text{mol L}^{-1}$); (C) Nitrate concentrations ($\mu\text{mol L}^{-1}$); (D) Phosphate concentrations ($\mu\text{mol L}^{-1}$); (E) Inorganic dissolved N/P ratio and (F) Dissolved CH_4 concentrations (nmol L^{-1}). Vertical lines represent every year (January).

Figure 3. Mean annual climatology for variables measured at different depths throughout the water column (A) CH_4 (B) Chlorophyll-a, and (C) Dissolved Oxygen (DO) concentrations.

Figure 4. Box-and-whisker plot of monthly and annually inventories, respectively, of CH_4 (A and B); Chlorophyll-a (D and E) and Dissolved Oxygen (G and H) throughout the water column separated by surface (blue box) and subsurface (red box) layer. The box represents the interquartile range (first and third quartile) containing 25 to 75% of the values of each variable. The line on the box represents the median. The whiskers represent the range of non-typical values. The filled circles represent outliers.

Figure 5. Mean CH_4 profile (black line) and its standard deviation (shown as a shadow) with corresponding dissolved oxygen (blue line) and nitrate (red line) vertical distributions for each months (based on 12 years of monthly frequency).

Figure 6. (a) Alongshore wind Stress (N m^{-2}) (b) Upwelling Index ($\text{m}^3 \text{s}^{-1}$), (c) Daily CH_4 fluxes ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{d}^{-1}$) estimated from weather wind from April 2007 to April 2019. Red shadow shows non-favorable upwelling periods (mid-April to the first week of September). The solid white line shows the smoothed values through a timespan (3% of total samples), solved by a local quadratic polynomial function resistant to outliers. While the thin white line represents the average

Figure 7. Correlations matrix among (A) variables and (B) parameters (inventories in the whole water column, CH₄ efflux and cumulative wind stress). Values in violet shades (green) represent, respectively, positive (negative) values of the Spearman correlations (Rho). Variables correspond to the T°C: temperature, S: salinity, DO: dissolved oxygen; Chl-a, chlorophyll-a; CH₄: methane; NO₃⁻: nitrate; PO₃³⁻: phosphate; air-sea CH₄ exchange: CH₄F.; ASW: along shore wind and WS: wind stress. * and ** mean significant correlation at the 0.05 and 0.01 level, respectively. I denotes inventory.



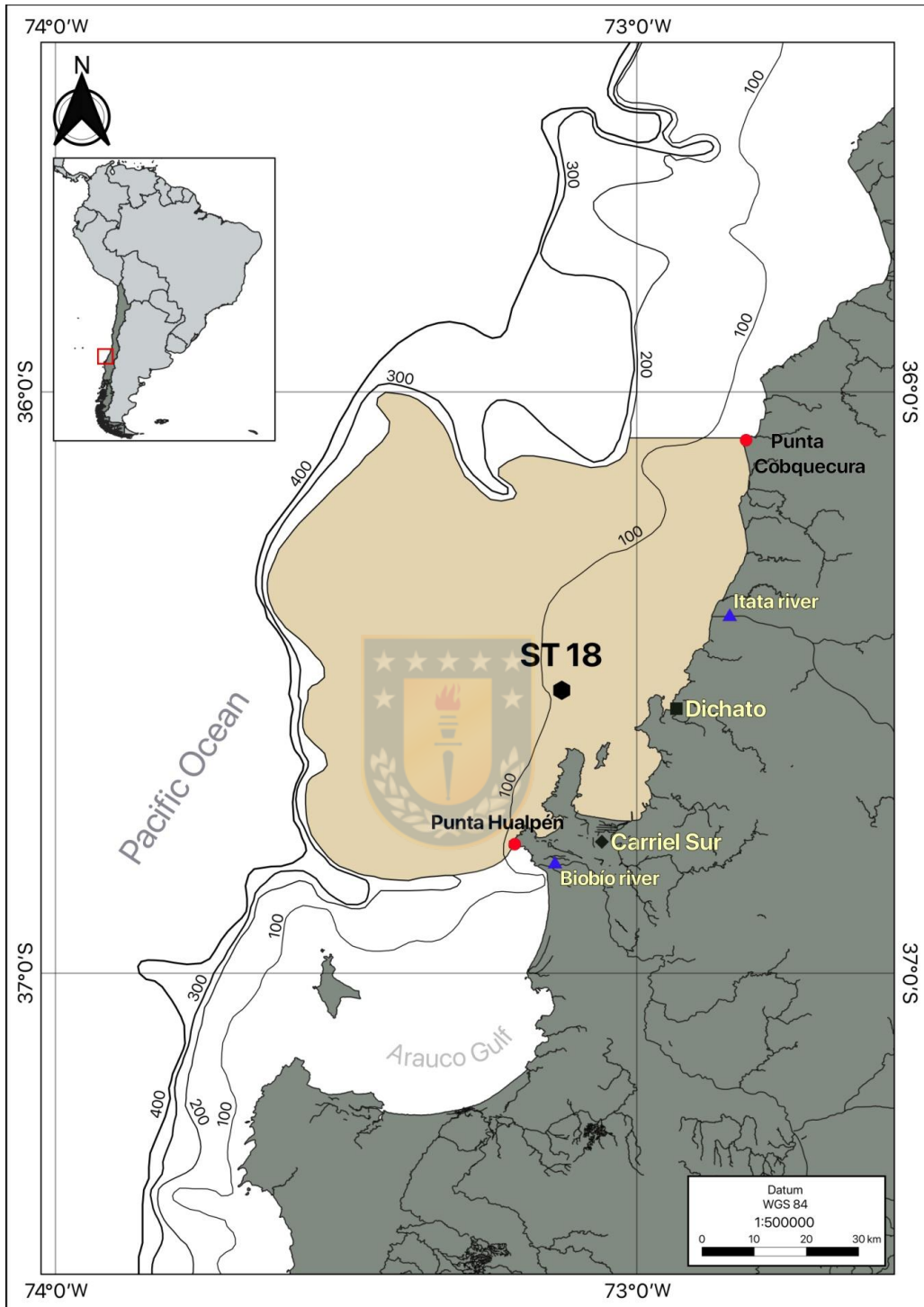


Figure 1.

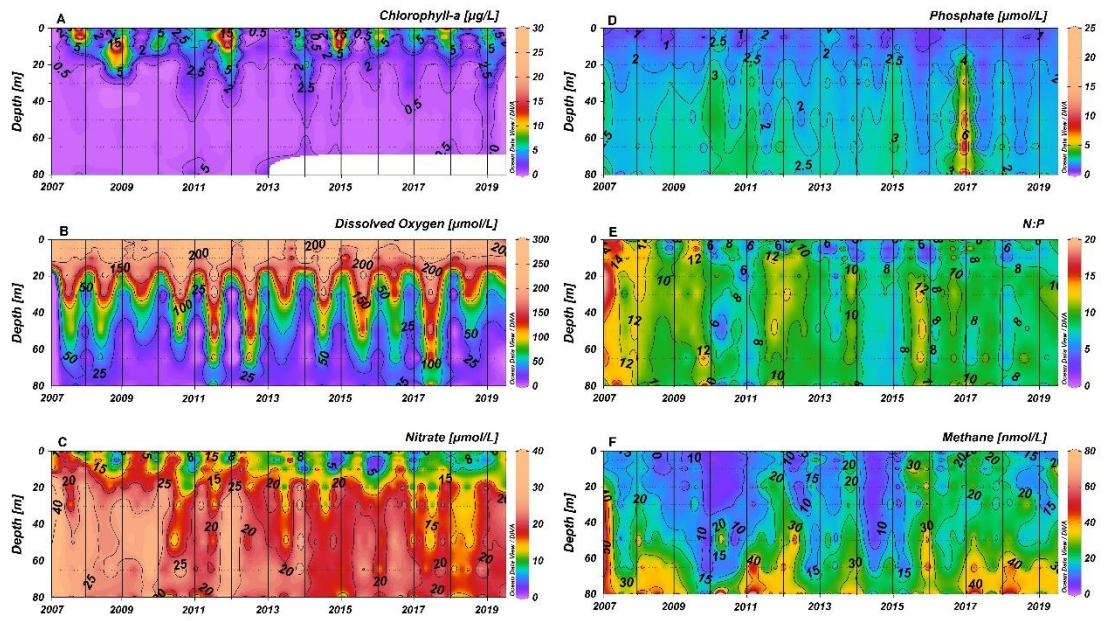


Figure 2



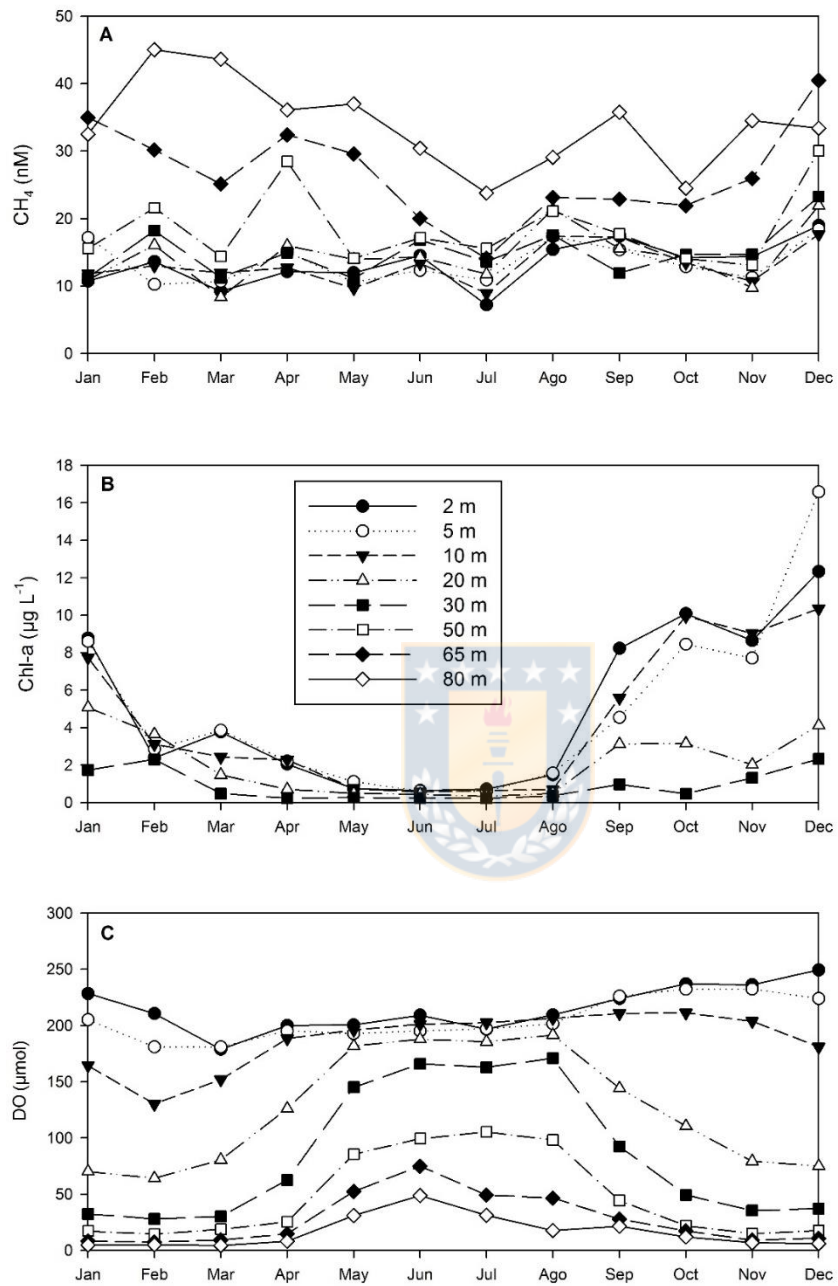


Figure 3

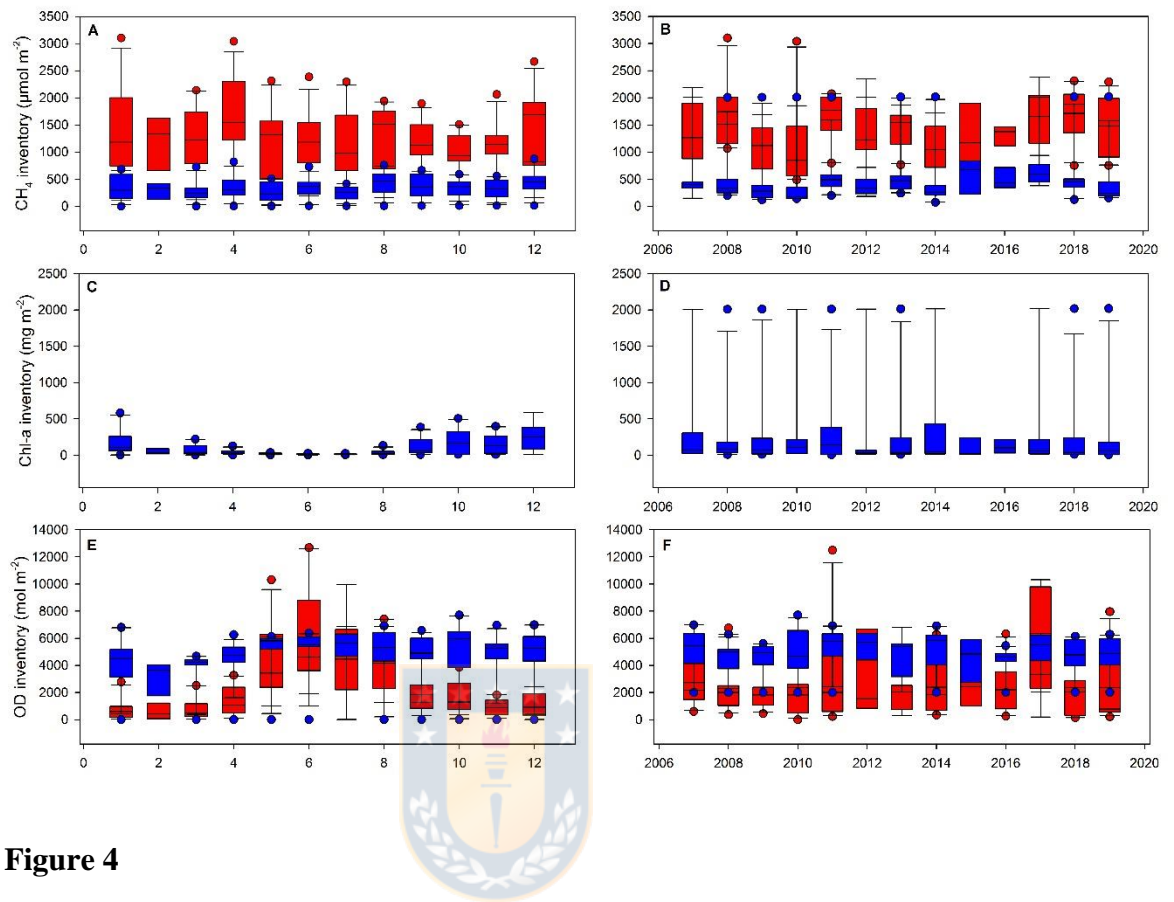


Figure 4

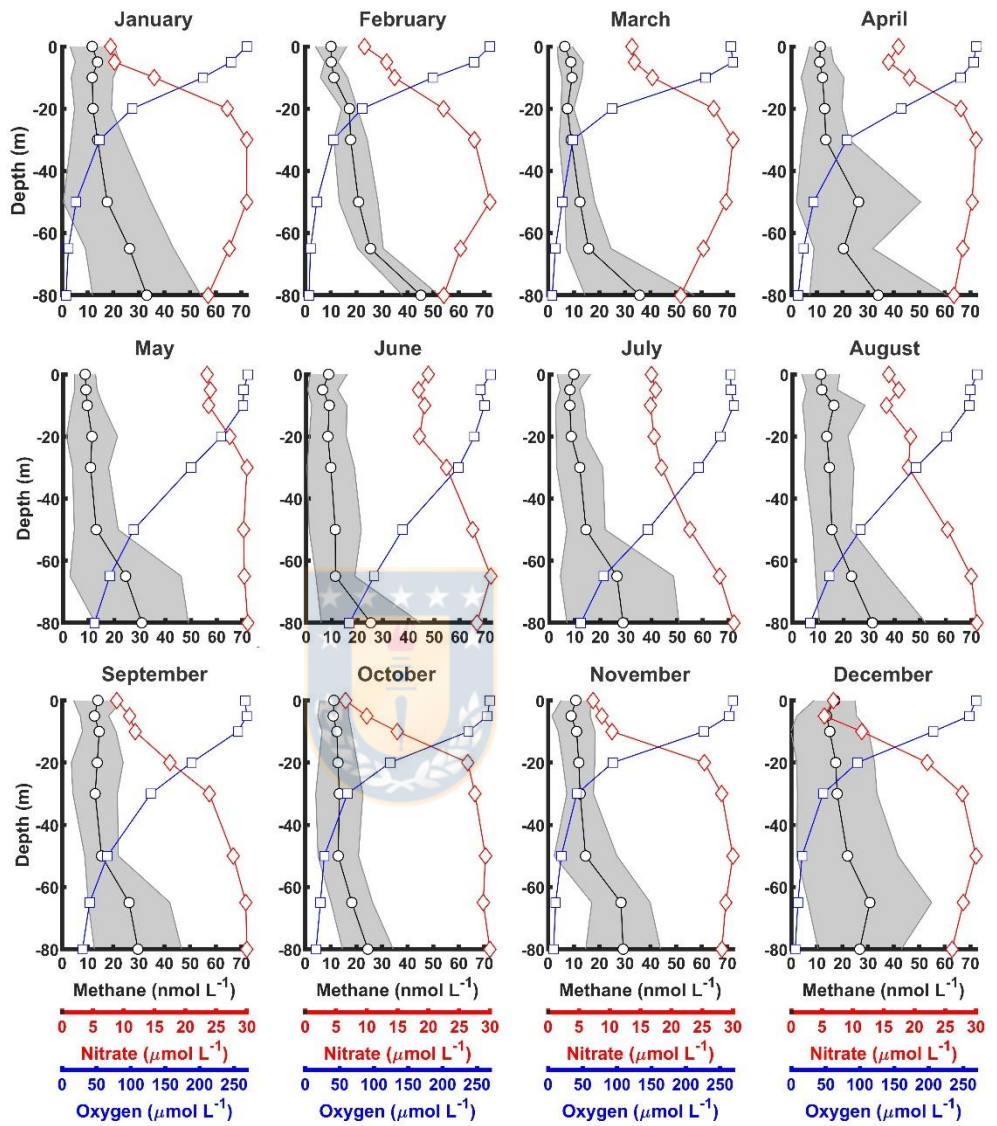


Figure 5.

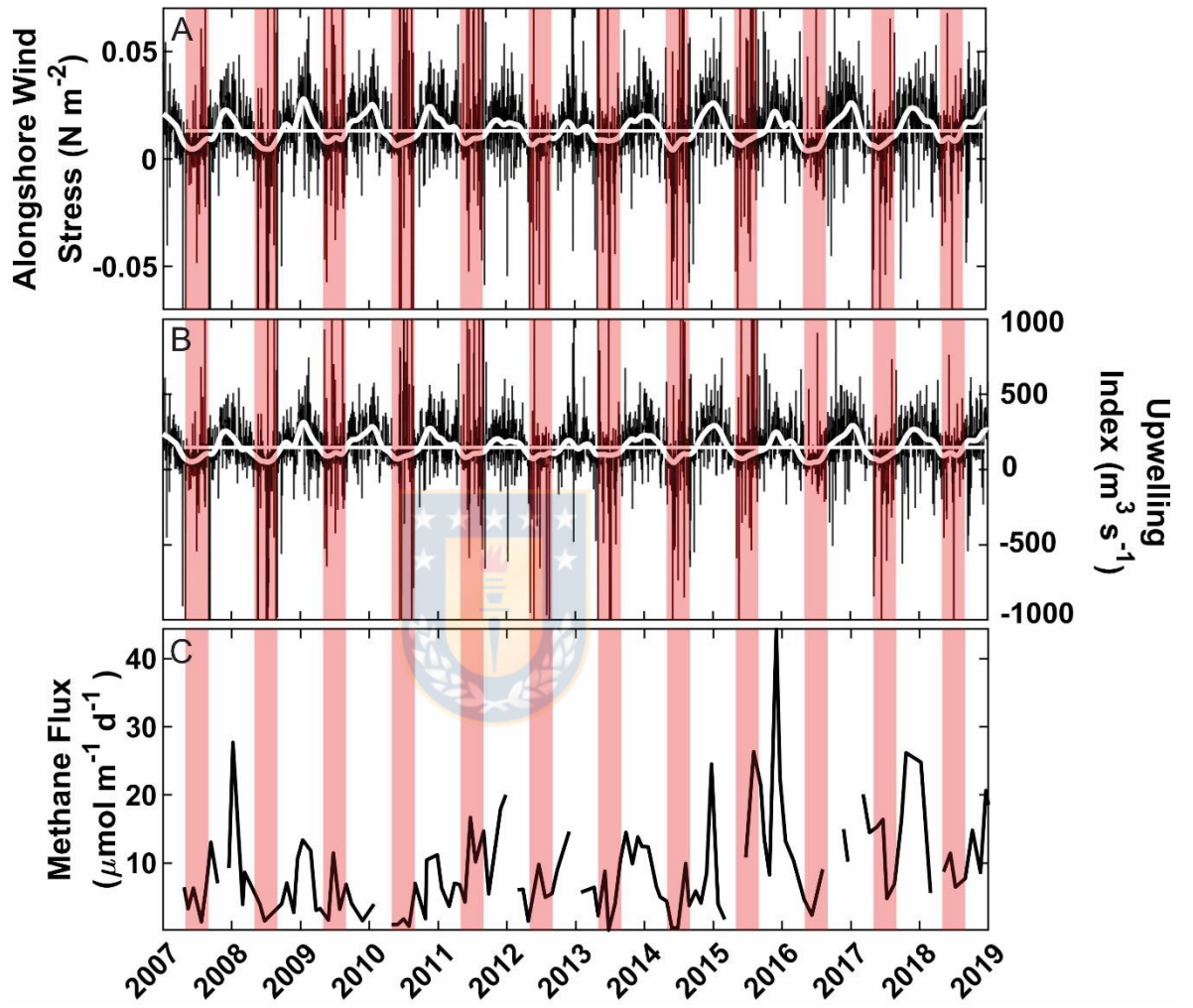


Figure 6.

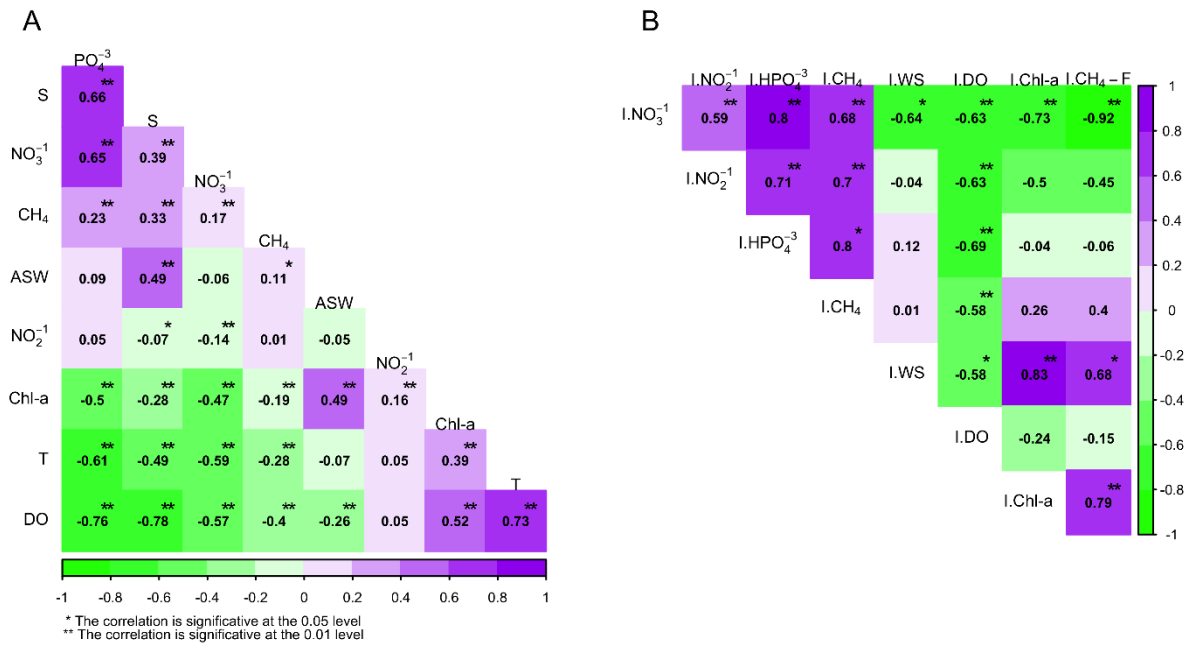


Figure 7



Table 1. Seasonal averages (mean±SD) of methane, chlorophyll-a, dissolved oxygen, nitrate, phosphate inventories during the upwelling (spring-summer) and non- upwelling (fall-winter) season and in both the surface and subsurface layers.

Years		Upwelling Season					Non upwelling season				
		CH ₄ μmol m ⁻²	Chl-a mg m ⁻²	DO mol m ⁻²	NO ₃ ⁻ μmol m ⁻²	PO ₄ ³⁻ μmol m ⁻²	CH ₄ μmol m ⁻²	Chl-a mg m ⁻²	DO mol m ⁻²	NO ₃ ⁻ μmol m ⁻²	PO ₄ ³⁻ μmol m ⁻²
2007-2008	SL	418.29±131.47	165.81±117.62	4937.76±1480.74	426.05±112.97	35.10±8.38	344.68±140.47	35.61±24.51	5355.61±760.87	507.90±117.37	36.60±4.38
	SSL	1518.52±769.60		1972.60±1487.72	1441.50±219.47	132.13±12.33	1248.01±623.43		4043.00±682.56	1366.26±293.63	110.08±4.68
2008-2009	SL	274.92±80.47	210.62±210.88	4931.34±784.95	334.80±133.76	35.52±10.07	249.83±6.11	15.09±11.69	5652.47±832.26	425.85±22.55	38.63±2.22
	SSL	1310.23±276.24		1312.36±701.32	1361.56±171.53	146.40±9.86	1770.66±869.11		5136.89±2287.42	1234.70±177.23	124.72±36.64
2009-2010	SL	144.38±21.29	96.49±68.01	4738.24±669.76	383.55±152.27	51.37±22.14	301.76±118.94	17.38±9.82	5156.74±624.15	500.95±77.00	41.62±6.42
	SSL	1133.17±1280.58		1036.52±724.20	1386.09±357.01	159.06±26.65	977.64±347.70		2984.07±1326.69	1352.94±141.69	139.60±12.66
2010-2011	SL	275.05±106.15	138.54±91.70	5543.53±1513.94	249.04±167.64	35.47±22.96	160.02±21.50	22.51±3.13	5532.84±1006.05	378.50±117.32	51.29±14.78
	SSL	1368.50±526.80		1276.78±993.43	1055.20±192.86	154.84±22.58	612.32±148.87		4515.52±1707.42	1009.61±311.19	151.79±43.86
2011-2012	SL	398.77±178.96	222.30±209.88	4821.62±554.12	433.16±130.10	43.05±10.46	473.77±65.87	11.69±7.10	6296.12±470.70	369.42±109.57	39.27±18.90
	SSL	1635.86±546.63		725.84±226.96	1536.52±272.37	149.96±11.77	1385.18±449.76		7454.21±3824.17	1008.50±239.85	108.11±40.46
2012-2013	SL	404.50±172.48	28.79±21.18	5496.32±429.47	402.39±45.95	48.86±9.44	299.02±65.09	17.95±5.55	6489.89±323.64	325.44±80.77	32.08±10.35
	SSL	1059.51±119.18		1458.39±805.03	1195.11±32.15	140.33±7.23	1163.22±440.53		8182.87±4161.85	1077.67±265.33	108.62±16.78
2013-2014	SL	419.52±114.86	110.28±92.08	5101.43±1422.49	305.46±124.31	41.57±14.43	388.84±190.44	13.80±3.15	4369.16±1649.86	400.61±166.74	48.33±2.26
	SSL	1408.85±293.51		831.57±771.57	1249.08±259.35	135.24±17.25	1324.67±486.06		3093.39±860.55	938.29±269.92	119.46±11.01
2014-2015	SL	258.63±146.60	231.68±234.14	5063.85±1648.61	228.18±63.52	37.81±12.15	128.85±82.91	16.88±5.27	6019.82±208.76	302.01±47.64	40.16±5.95
	SSL	1030.32±424.20		1384.67±908.90	1000.08±208.42	157.54±14.31	534.30±235.09		5422.46±1103.75	944.96±38.62	132.52±8.38
2015-2016	SL	536.77±199.86	121.62±116.81	4516.74±124.94	198.14±99.64	25.53±8.33	725.56±5.82	11.83±7.86	5880.22±741.41	406.48±102.51	40.94±4.08
	SSL	1455.69±631.33		1878.77±1340.29	1101.74±186.48	115.92±24.24	1342.86±311.20		4645.37±2033.98	1180.86±236.72	123.53±10.97
2016-2017	SL	588.09±226.12	99.87±68.32	4870.77±862.09	276.36±189.66	47.84±37.43	566.92±267.52	20.34	4818.54±89.70	379.28±66.52	45.50±4.57
	SSL	1733.38±587.30		1357.53±1183.16	1015.75±462.83	248.85±345.48	1179.03±389.40		5277.15±1480.23	1223.98±111.62	135.24±50.75
2017-2018	SL	558.50±66.03	155.64±96.25	4660.19±1039.46	306.08±70.93	41.44±2.81	458.34±83.51	20.58±8.35	5776.91±309.23	240.38±59.26	28.00±6.14
	SSL	1487.66±591.60		1377.05±1652.70	978.75±337.24	137.23±20.61	1568.68±235.98		8305.43±3344.72	854.01±122.77	93.63±9.18
2018-2019	SL	373.51±108.94	121.07±140.34	4713.87±1142.76	277.88±49.16	37.49±3.76	366.96±162.97	24.79±26.35	5283.49±723.20	254.51±59.37	31.19±5.01
	SSL	1372.38±330.90		1525.02±1195.83	1108.90±151.05	130.70±15.92	1657.53±665.92		2903.48±1035.39	801.84±161.49	93.49±16.66

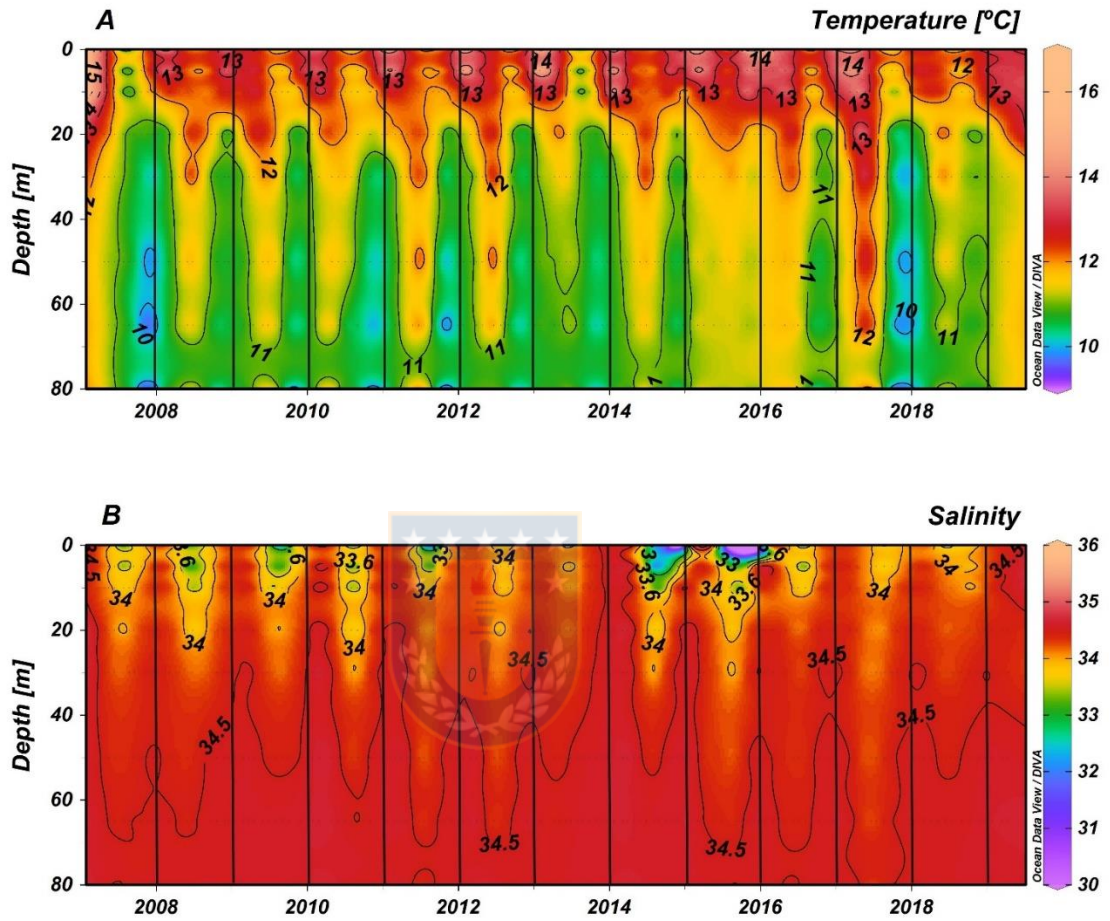
SL and SSL mean surface and subsurface layer, respectively.

Table 2. Seasonal effluxes of CH₄ along with cumulative wind stress during upwelling (spring summer) and non-upwelling season (late autumn-winter)

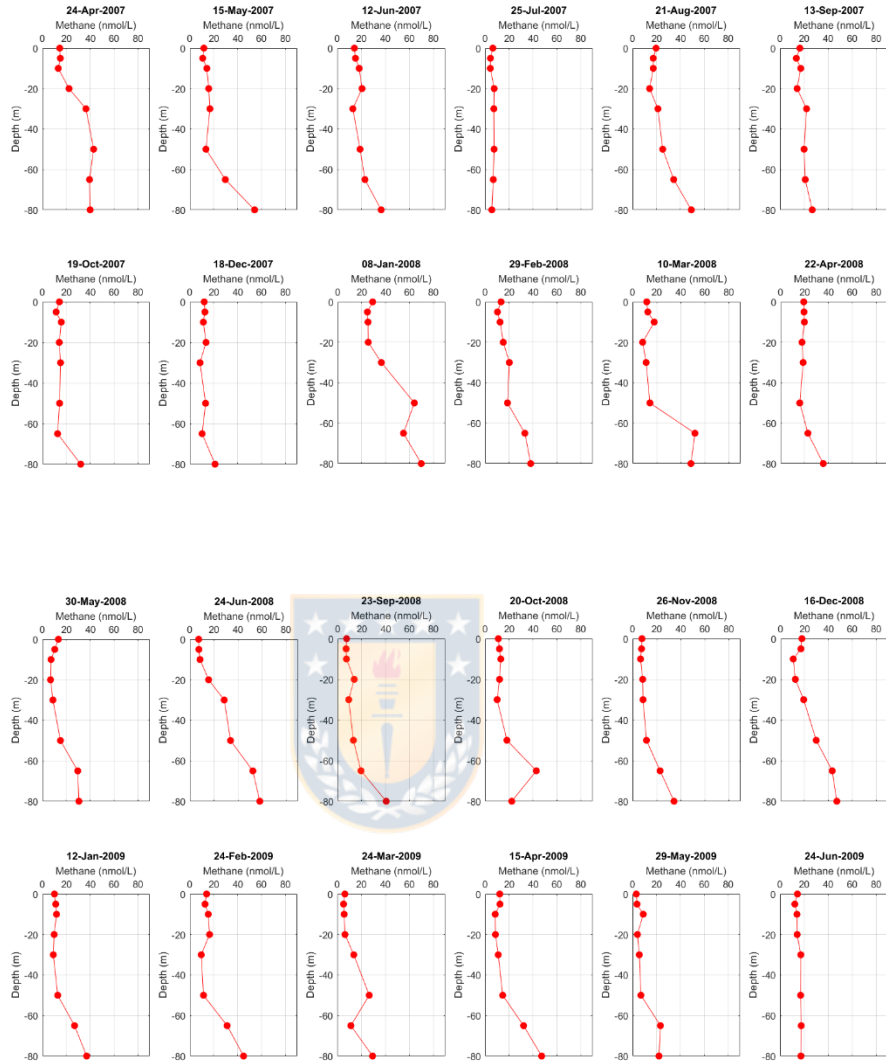
Year	CH ₄ Flux μmol m ⁻² day ⁻¹	Wind Stress N m ⁻²	CH ₄ Flux μmol m ⁻² day ⁻¹	Wind Stress N m ⁻²
	Non Upwelling period (123 days) (May, Jun., Jul., Aug.)		Upwelling period (242 days) (Sep, Oct, Nov, Dec, Jan, Feb, Mar., April)	
2007-2008	5.58±2.62	0.88±0.01	12.56±8.54	3.49±0.01
2008-2009	3.64±2.11	-0.90±0.03	8.97±5.03	4.04±0.01
2009-2010	7.34±4.97	1.30±0.01	4.69±2.62	4.40±0.01
2010-2011	3.92±3.87	1.10±0.02	8.77±3.54	4.14±0.01
2011-2012	13.41±6.29	1.46±0.01	11.57±7.36	3.70±0.01
2012-2013	8.52±3.85	0.18±0.02	9.12±5.41	3.37±0.01
2013-2014	7.20±4.94	0.86±0.01	11.63±4.26	4.04±0.01
2014-2015	5.53±5.60	0.83±0.01	10.31±8.98	4.21±0.01
2015-2016	20.27±11.92	1.39±0.01	19.18±12.93	3.96±0.01
2016-2017	6.12±3.52	0.70±0.00	16.83±3.91	4.35±0.01
2017-2018	12.62±6.82	0.29±0.01	20.41±10.27	4.06±0.01
2018-2019	10.84±1.87	0.80±0.01	15.60±5.41	4.56±0.01

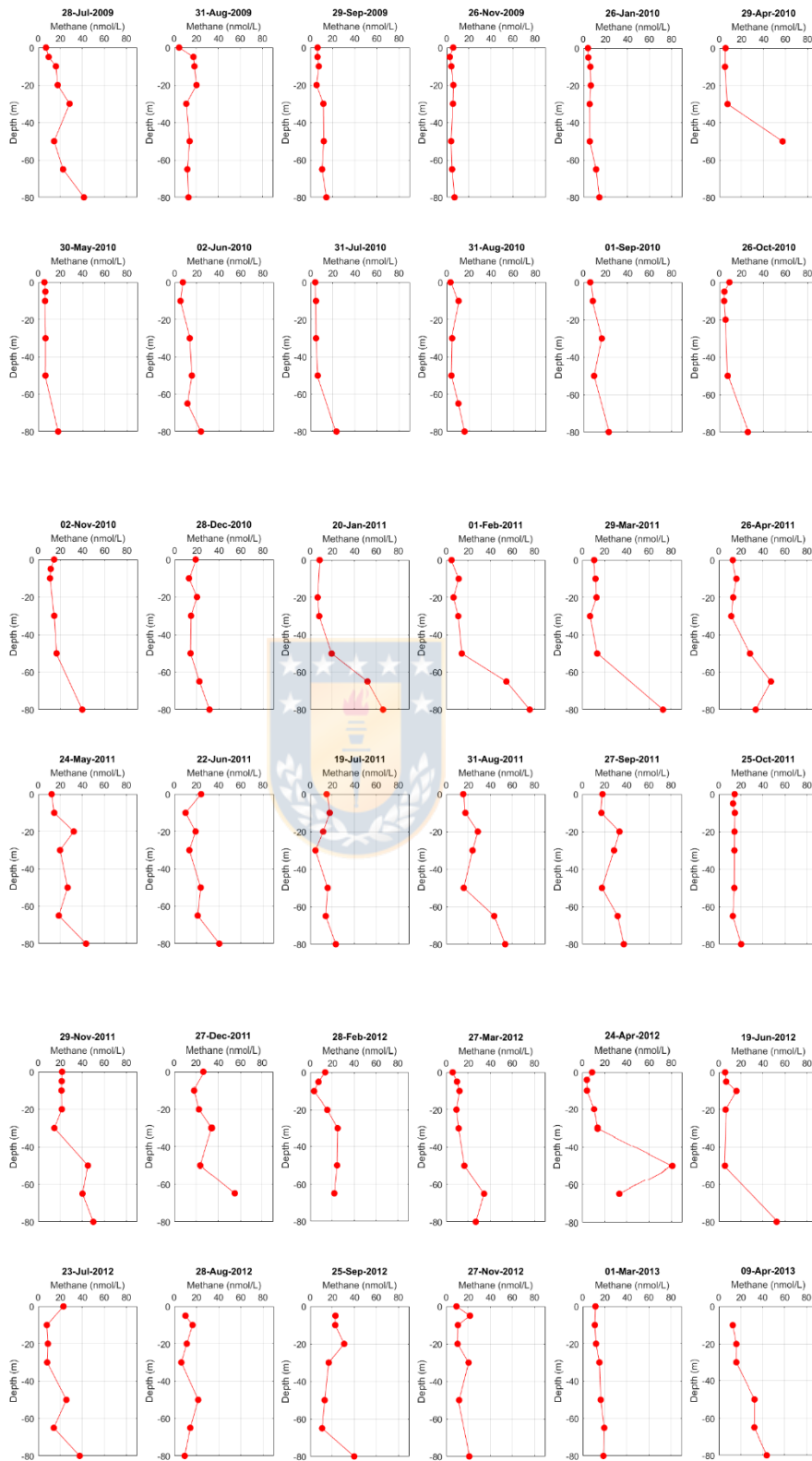
Supplementary material

Supplemental figure A.1:

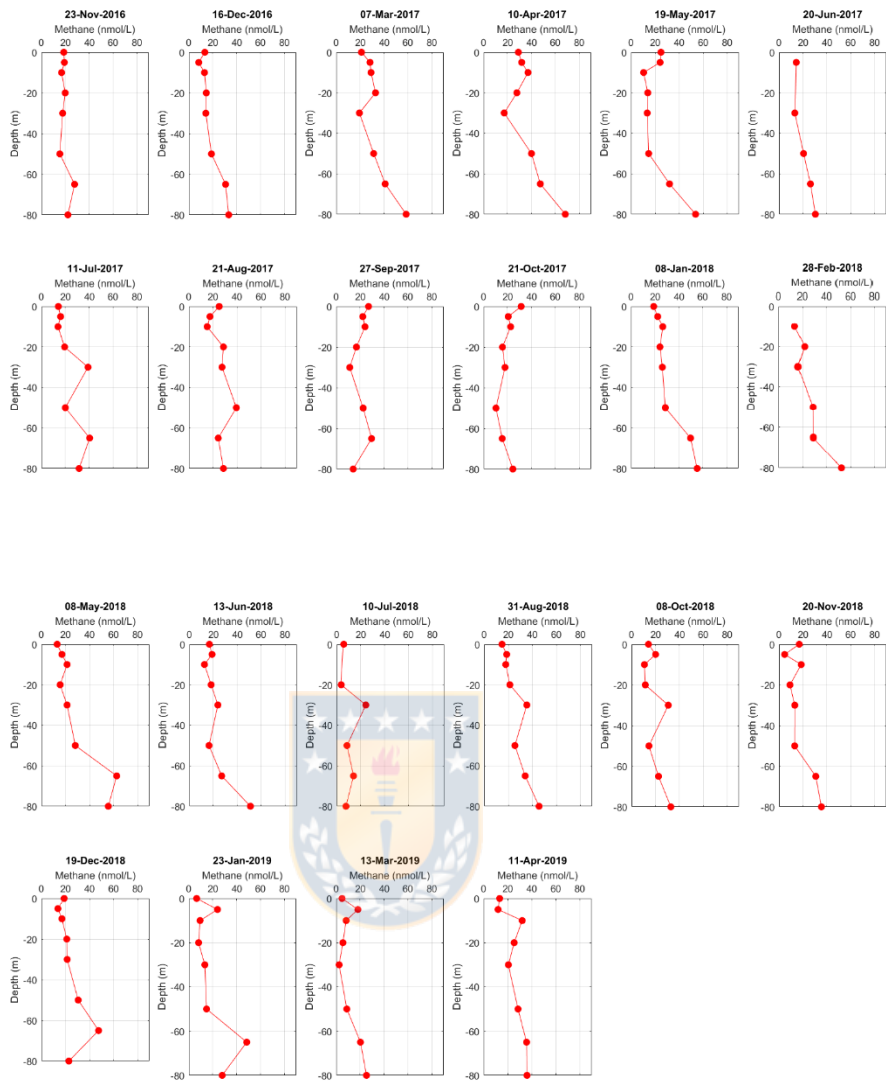


Supplemental figure A.2:









Conflict of Interest Statement: the authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Data availability. The dataset will be available in Pangea once the manuscript were published, meanwhile the research data can be accessed by contacting the corresponding author

Acknowledgements

The authors thank the biogeochemistry group of the Universidad de Concepción for their help and support. We also thank to technical staff of the laboratory and the crew and personnel support in oceanographic time series. Special thanks to Dr. Renato Quiñones for joining the effort to continue the time series of Station 18. This research was funded by FONDECYT N° 1161138 and the Center of Excellence FONDAP CONICYT N° 15110009.



Appendix A. Supplementary material

List of supplemental figures

Supplemental figure A.1: Time series vertical distributions of: (A) Temperature (°C); (B) Salinity at the time series station (Station 18) (April 2007 – April 2019). Vertical lines represent every January of every year, except in 2007, it starts on April.

Supplemental figure A.2: Vertical profiles of methane at the time series station station (ST18) from April 2007 to April 2019.

5.-References

- Allredge, A.L., Cohen, Y., 1987. Can microscale chemical patches persist in the sea? Microelectrode study of marine snow, fecal pellets. *Science* (80-.). 235, 689–691. <https://doi.org/10.1126/science.235.4789.689>
- Anabalón, V., Morales, C.E., Escribano, R., Varas, A.M., Varas, M.A., 2007. The contribution of nano- and micro-planktonic assemblages in the surface layer (0–30 m) under different hydrographic conditions in the upwelling area off Concepción, central Chile. *Prog. Oceanogr.* 75, 396–414. <https://doi.org/10.1016/j.pocean.2007.08.023>
- Azam, F., Fenchel, T., Field, J., Gray, J., Meyer-Reil, L., Thingstad, F., 1983. The Ecological Role of Water-Column Microbes in the Sea. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 10, 257–263. <https://doi.org/10.3354/meps010257>
- Azam, F., Malfatti, F., 2007. Microbial structuring of marine ecosystems. *Nat. Rev. Microbiol.* 5, 782–791. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1747>
- Bakker, D., Bange, H., Gruber, N., Johannessen, T., Upstill-Goddard, R.C., Borges, A., Delille, B., Löscher, C., Naqvi, S., Omar, A., Santana-Casiano, J., 2014. Air–sea interactions of natural long-lived greenhouse gases (CO₂, N₂O, CH₄/ in a changing climate, in: Liss, P.S., Johnson, M.T. (Eds.), *Ocean-Atmosphere Interactions of Gases and Particles*. Springer, pp. 113–169.
- Bakun, A., 1973. Coastal upwelling indices, west coast of North America, 1946–71. NOAA Tech. Rep. NMFS SSRF-671.
- Bange, H.W., Bergmann, K., Hansen, H.P., Kock, A., Koppe, R., Malien, F., Ostrau, C., 2010. Dissolved methane during hypoxic events at the Boknis Eck time series station (Eckernförde Bay, SW Baltic Sea). *Biogeosciences* 7, 1279–1284. <https://doi.org/10.5194/bg-7-1279-2010>
- Bange, H.W., Ramesh, R., Rapsomanikis, S., Andreae, M., 1998. Methane in surface waters of the Arabian Sea. *Geophys. Res. Lett.* 25, 3547–3550.
- Barth, J.A., Menge, B.A., Lubchenco, J., Chan, F., Bane, J.M., Kirincich, A.R., McManus, M.A., Nielsen, K.J., Pierce, S.D., Washburn, L., 2007. Delayed upwelling alters nearshore coastal ocean ecosystems in the northern California current. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 3719–3724. <https://doi.org/10.1073/pnas.0700462104>
- Bates, T.S., Kelly, K.C., Johnson, J.E., Gammon, R.H., 1996. A reevaluation of the open ocean source of methane to the atmosphere. *J. Geophys. Res. Atmos.* 101, 6953–6961. <https://doi.org/10.1029/95JD03348>
- Bello, E., 2016. Variabilidad estacional en la descarga de metano disuelto desde un sistema estuarino a la zona marina adyacente, el caso de ríos de la zona central de Chile (río Itata). Universidad de Concepción.
- Berner, U., Poggenburg, J., Faber, E., Quadfasel, D., Frische, A., 2003. Methane in ocean waters of the Bay of Bengal: Its sources and exchange with the atmosphere. *Deep. Res. Part II Top. Stud. Oceanogr.* 50, 925–950. [https://doi.org/10.1016/S0967-0645\(02\)00613-6](https://doi.org/10.1016/S0967-0645(02)00613-6)
- Borges, A. V., Champenois, W., Gypens, N., Delille, B., Harlay, J., 2016. Massive marine methane emissions from near-shore shallow coastal areas. *Sci. Rep.* 6, 1–8. <https://doi.org/10.1038/srep27908>

- Borges, A. V., Speeckaert, G., Champenois, W., Scranton, M.I., Gypens, N., 2017. Productivity and Temperature as Drivers of Seasonal and Spatial Variations of Dissolved Methane in the Southern Bight of the North Sea. *Ecosystems* 21, 583–599. <https://doi.org/10.1007/s10021-017-0171-7>
- Broecker, W.S., Peng, T.H., 1974. Gas exchange rates between air and sea. *Tellus XXVI* 1, 21–35. <https://doi.org/10.1111/j.2153-3490.1974.tb01640.x>
- Bullister, J.L., Wisegarver, D.P., Wilson, S.T., 2016. The Production of Methane and Nitrous Oxide Gas Standards for SCOR Working Group # 143.
- Burke, R.A., Reid, D.F., Brooks, J.M., Lavoie, D.M., 1983. Upper water column methane geochemistry in the eastern tropical North Pacific. *Am. Soc. Limnol. Oceanogr.* 28, 19–32. <https://doi.org/10.4319/lo.1983.28.1.0019>
- Capelle, D.W., Tortell, P.D., 2016. Factors controlling methane and nitrous-oxide variability in the southern British Columbia coastal upwelling system. *Mar. Chem.* 179, 56–67. <https://doi.org/10.1016/j.marchem.2016.01.011>
- Carini, P., White, A.E., Campbell, E.O., Giovannoni, S.J., 2014. Methane production by phosphate-starved SAR11 chemoheterotrophic marine bacteria. *Nat. Commun.* 5, 1–7. <https://doi.org/10.1038/ncomms5346>
- Conrad, R., Wolfgang, S., 1988. Methane and hydrogen in seawater (Atlantic Ocean). *Deep Sea Res. Part A, Oceanogr. Res. Pap.* 35, 1903–1917. [https://doi.org/10.1016/0198-0149\(88\)90116-1](https://doi.org/10.1016/0198-0149(88)90116-1)
- Cornejo, M., Farías, L., 2012. Meridional variability of the vertical structure and air-sea fluxes of N₂O off central Chile (30–40°S). *Prog. Oceanogr.* 92–95, 33–42. <https://doi.org/10.1016/j.pocean.2011.07.016>
- Damm, E., Helmke, E., Thoms, S., Schauer, U., Nöthig, E., Bakker, K., Kiene, R.P., 2010. Methane production in aerobic oligotrophic surface water in the central Arctic Ocean. *Biogeosciences* 7, 1099–1108. <https://doi.org/10.5194/bgd-6-10355-2009>
- Daneri, G., Dellarossa, V., Quiñones, R., Jacob, B., Montero, P., Ulloa, O., 2000. Primary production and community respiration in the Humboldt Current System off Chile and associated oceanic areas. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 197, 41–49. <https://doi.org/10.3354/meps197041>
- Daniel, I., DeGrandpre, M., Farías, L., 2013. Greenhouse gas emissions from the Tubul-Raqui estuary (central Chile 36°S). *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 134, 31–44. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2013.09.019>
- Denman, K., Brasseur, G., Chidthaisong, A., Ciais, P., Cox, P., Dickinson, R., Hauglustaine, D., Heinze, C., Holland, E., Jacob, D., Lohman, U., Ramachandran, S., Da Silva Dias, P., Wofsy, S., Zhang, X., 2007. Couplings between changes in the climate system and biogeochemistry, in: Solomon, S., Qin, D., Manning, M., Chen, Z., Marquis, M., Averyt, K., Tignor, M., Miller, H. (Eds.), *Climate Change 2007: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*. Cambridge University Press, Cambridge/ New York, pp. 499–587. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.6b00417>
- Dinasquet, J., Tirola, M., Azam, F., 2018. Enrichment of Bacterioplankton Able to Utilize One-Carbon and Methylated Compounds in the Coastal Pacific Ocean. *Front. Mar. Sci.* 5, 1–13. <https://doi.org/10.3389/fmars.2018.00307>
- EPA, 2010. Methane and Nitrous Oxide emissions from natural sources. U.S.

Environmental Protection Agency, Washington D.C. USA.

- Etminan, M., Myhre, G., Highwood, E.J., Shine, K.P., 2016. Radiative forcing of carbon dioxide, methane, and nitrous oxide: A significant revision of the methane radiative forcing. *Geophys. Res. Lett.* 43, 12614–12623. <https://doi.org/10.1002/2016GL071930>
- Farías, L., Bello, E., Arancibia, G., Fernandez, J., 2018. Distribution of dissolved methane and nitrous oxide in Chilean coastal systems of the Magellanic Sub-Antarctic region (50°–55°S). *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 215, 229–240. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2018.10.020>
- Farías, L., Besoain, V., García-Loyola, S., 2015. Presence of nitrous oxide hotspots in the coastal upwelling area off central Chile: An analysis of temporal variability based on ten years of a biogeochemical time series. *Environ. Res. Lett.* 10, 1–13. <https://doi.org/10.1088/1748-9326/10/4/044017>
- Farías, L., Fernández, C., Faúndez, J., Cornejo, M., Alcaman, M.E., 2009. Chemolithoautotrophic production mediating the cycling of the greenhouse gases N₂O and CH₄ in an upwelling ecosystem. *Biogeosciences* 6, 3053–3069.
- Farías, L., Graco, M., Ulloa, O., 2004. Temporal variability of nitrogen cycling in continental-shelf sediments of the upwelling ecosystem off central Chile. *Deep. Res. Part II Top. Stud. Oceanogr.* 51, 2491–2505. <https://doi.org/10.1016/j.dsr2.2004.07.029>
- Ferderlman, T.G., Lee, C., Pantoja, S., Harder, J., Bebout, B.M., Fossing, H., 1997. Sulfate reduction and methanogenesis in a Thioploca-dominated sediment off the coast of Chile. *Geochim. Cosmochim. Acta* 61, 3065–3079.
- Florez-Leiva, L., Damm, E., Farías, L., Farías, L., 2013. Methane production induced by dimethylsulfide in surface water of an upwelling ecosystem. *Prog. Oceanogr.* 112–113, 38–48. <https://doi.org/10.1016/j.pocean.2013.03.005>
- 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. *Limnol. Oceanogr.* 59, 1865–1878. <https://doi.org/10.4319/lo.2014.59.6.1865>
- Galán, A., Thamdrup, B., Saldías, G.S., Farías, L., 2017. Vertical segregation among pathways mediating nitrogen loss (N₂ and N₂O production) across the oxygen gradient in a coastal upwelling ecosystem. *Biogeosciences* 14, 4795–4813. <https://doi.org/10.5194/bg-14-4795-2017>
- García, S.A., 2017. Variaciones temporales de los parámetros físicos y biogeoquímicos en un sistema costero de Chile central bajo distintos forzantes atmosféricos : Un estudio basado en observaciones y modelación unidimensional. University of Concepción.
- Glud, R.N., Gundersen, J.K., Holby, O., 1999. Benthic in situ respiration in the upwelling area off central Chile. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 186, 9–18. <https://doi.org/10.3354/meps186009>
- Grasshoff, K., Ehrhardt, M., Kremling, K., 1983. *Methods of Seawater Analysis*. Second, Second, Re. ed. John Wiley & Sons, Ltd, Deerfield Beach, Florida: Verlag Chemie. <https://doi.org/10.1002/iroh.19850700232>
- Gutierrez, D., Gallardo, V.A., Mayor, S., Neira, C., Vasquez, C., Sellanes, J., Rivas, M., Soto, A., Carrasco, F., Baltazar, M., 2000. Effects of dissolved oxygen and fresh organic matter on the bioturbation potential of macrofauna in sublittoral

- sediments off Central Chile during the 1997/1998 El Niño. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 202, 81–99. <https://doi.org/10.3354/meps202081>
- Hamdan, L.J., Wickland, K.P., 2016. Methane emissions from oceans, coasts, and freshwater habitats: New perspectives and feedbacks on climate. *Limnol. Oceanogr.* 61, S3–S12. <https://doi.org/10.1002/lno.10449>
- Hebbeln, D., Marchant, M., Freudenthal, T., Wefer, G., 2000. Surface sediment distribution along the Chilean continental slope related to upwelling and productivity. *Mar. Geol.* 164, 119–137. [https://doi.org/10.1016/S0025-3227\(99\)00129-2](https://doi.org/10.1016/S0025-3227(99)00129-2)
- Holm-Hansen, O., Lorenzen, C.J., Holmes, R.W., Strickland, J.D.H., 1965. Fluorometric determination of chlorophyll. *J. du Cons. Int. pour l'Exploration de la Mer* 30, 3–15. <https://doi.org/10.1093/icesjms/30.1.3>
- Holmes, E.M., Sansone, F.J., Rust, T.M., Popp, B.N., 2000. Methane production, consumption, and air-sea exchange in the open ocean: An evaluation based on carbon isotopic ratios. *Global Biogeochem. Cycles* 14, 1–10. <https://doi.org/10.1029/1999GB001209>
- Houweling, S., Dentener, F., Lelieveld, J., Walter, B., Dlugokencky, E., 2000. The modeling of tropospheric methane: How well can point measurements be reproduced by a global model? *J. Geophys. Res. Atmos.* 105, 8981–9002. <https://doi.org/10.1029/1999JD901149>
- IPCC, 2013. *Climate Change 2013: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change.* Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA.
- Jayakumar, D.A., Naqvi, S.W.A., Narvekar, P. V., George, M.D., 2001. Methane in coastal and offshore waters of the Arabian Sea. *Mar. Chem.* 74, 1–13. [https://doi.org/10.1016/S0304-4203\(00\)00089-X](https://doi.org/10.1016/S0304-4203(00)00089-X)
- Johnson, H.P., Merle, S., Salmi, M., Embley, R., Sampaga, E., Lee, M., 2019. Anomalous Concentration of Methane Emissions at the Continental Shelf Edge of the Northern Cascadia Margin. *J. Geophys. Res. Solid Earth* 124, 2829–2843. <https://doi.org/10.1029/2018JB016453>
- Karl, D., Beversdorf, L., Björkman, K., Church, M., Martinez, A., DeLong, E., 2008. Aerobic production of methane in the sea. *Nat. Geosci.* 1, 473–478. <https://doi.org/10.1038/ngeo234>
- Karl, D., Tilbrook, B., 1994. Production and transport of methane in oceanic particulate organic matter. *Nature* 368, 732–734.
- Kelley, C.A., Jeffrey, W.H., 2002. Dissolved methane concentration profiles and air-sea fluxes from 41°S to 27°N. *Global Biogeochem. Cycles* 16, 13-1-13–6. <https://doi.org/10.1029/2001gb001809>
- Kock, A., Gebhardt, S., Bange, H.W., 2008. Methane emissions from the upwelling area off Mauritania (NW Africa). *Biogeosciences* 5, 1119–1125.
- Kraus, E.B., 1972. Atmosphere-ocean interaction, in: Libes, S. 1992 (Ed.), *An Introduction to Marine Biogeochemistry.* Oxford Univ. Press, New York, p. 734.
- Lamontagne, R.A., Swinnerton, J.W., Linnenbom, V.J., Smith, W.D., 1973. Methane Concentrations in Various Marine Environments. *J. Geophys. Res.* 78, 5317–5324. <https://doi.org/10.1029/JC078i024p05317>
- Lebedev, S.A., Sorokin, A.S., Kluev, P. V., Kravchenko, P.N., 2019. Validation of

- Wind Speed Calculated on Satellite Altimetry Data by Measurements on Weather Stations Located Along the White Sea Coast. *Ecol. Montenegrina* 25, 36–43. <https://doi.org/10.37828/em.2019.25.4>
- Lenhart, K., Klintzsch, T., Langer, G., Nehrke, G., Bunge, M., Schnell, S., Keppler, F., 2016. Evidence for methane production by the marine algae *Emiliania huxleyi*. *Biogeosciences* 13, 3163–3174. <https://doi.org/10.5194/bg-13-3163-2016>
- Levipan, H.A., Quiñones, R.A., Johansson, H.E., Urrutia, H., 2007. Methylophilic Methanogens in the Water Column of an Upwelling Zone with a Strong Oxygen Gradient Off Central Chile. *Microbes Environ.* 22, 268–278. <https://doi.org/10.1264/jsme2.22.268>
- Luria, C.M., Amaral-Zettler, L.A., Ducklow, H.W., Repeta, D.J., Rhyne, A.L., Rich, J.J., 2017. Seasonal shifts in bacterial community responses to phytoplankton-derived dissolved organic matter in the Western Antarctic Peninsula. *Front. Microbiol.* 8, 1–13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02117>
- Ma, X., Sun, M., Lennartz, S.T., Bange, H.W., 2020. A decade of methane measurements at the Boknis Eck Time-series Station in the Eckernförde Bay (Southwestern Baltic Sea). *Biogeosciences Discuss.* 2020, 1–22. <https://doi.org/10.5194/bg-2020-107>
- Martens, C.S., Klump, V.J., 1980. Biogeochemical cycling in an organic-rich coastal marine basin-I. Methane sediment-water exchange processes. *Geochim. Cosmochim. Acta* 44, 471–490. [https://doi.org/10.1016/0016-7037\(80\)90045-9](https://doi.org/10.1016/0016-7037(80)90045-9)
- McAuliffe, C., 1963. Solubility on water of C1-C9 hydrocarbons. *Nature* 200, 1092–1093.
- Metcalf, W.W., Griffin, B.M., Cicchillo, R., Gao, J., Janga, S., Cooke, H., Circello, B., Evans, B., Martens-Habbena, W., Stahl, D., Van Der Donk, W., 2012. Synthesis of Methylphosphonic Acid by Marine Microbes: A Source for Methane in the Aerobic Ocean. *Science* (80-.). 337, 1104–1107. <https://doi.org/10.1126/science.1219875>
- Monteiro, P.M.S., Van Der Plas, A., Mohrholz, V., Mabilhe, E., Pascall, A., Joubert, W., 2006. Variability of natural hypoxia and methane in a coastal upwelling system: Oceanic physics or shelf biology? *Geophys. Res. Lett.* 33, 1–5. <https://doi.org/10.1029/2006GL026234>
- Montero, P., Daneri, G., Cuevas, 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. *Prog. Oceanogr.* 75, 518–530. <https://doi.org/10.1016/j.pocean.2007.08.013>
- Nelson, C.S., 1977. Wind stress and wind stress curl over the California current. <https://doi.org/10.5962/bhl.title.60783>
- Neufeld, J.D., Boden, R., Moussard, H., Schäfer, H., Murrell, J.C., 2008. Substrate-specific clades of active marine methylophilic associated with a phytoplankton bloom in a temperate coastal environment. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 7321–7328. <https://doi.org/10.1128/AEM.01266-08>
- Nightingale, D., Malin, G., Law, C.S., Watson, A.J., Liss, P.S., Liddicoat, M.I., Boutin, J., Upstill-Goddard, R.C., 2000. In situ evaluation of air-sea gas exchange parameterizations using novel conservative and volatile tracer. *Global Biogeochem. Cycles* 14, 373–387.

- Oremland, R.S., 1979. Methanogenic activity in plankton samples and fish intestines: A mechanism for in situ methanogenesis in oceanic surface waters. *Limnol. Ocean.* 24, 1136–1141.
- Owens, N.J.P., Law, C.S., Mantoura, P.H., Burkill, P.H., Llewellyn, C.A., 1991. Methane flux to the atmosphere from the Arabian Sea. *Nature* 354, 293–296.
- Paerl, H.W., Prufert, L.E., 1987. Oxygen-Poor Microzones as Potential Sites of Microbial N₂ Fixation in Nitrogen-Depleted Aerobic Marine Waters. *Appl. Environ. Microbiol.* 53, 1078–1087. <https://doi.org/10.1128/aem.53.5.1078-1087.1987>
- 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. Res. Part II Top. Stud. Oceanogr.* 56, 1055–1062. <https://doi.org/10.1016/j.dsr2.2008.09.007>
- Rao, G.D., Sarma, V.V.S.S., 2017. Influence of river discharge on the distribution and flux of Methane in the coastal Bay of Bengal. *Mar. Chem.* 197. <https://doi.org/10.1016/j.marchem.2017.11.002>
- Reeburgh, W.S., 2007. Oceanic methane biogeochemistry. *Am. Chem. Soc.* 107, 486–513. <https://doi.org/10.1021/cr050362v>
- Rehder, G., Collier, R.W., Heeschen, K., Kosro, P.M., Barth, J., Suess, E., 2002. Enhanced marine CH₄ emissions to the atmosphere off Oregon caused by coastal upwelling. *Global Biogeochem. Cycles* 16, 2-1-2–11. <https://doi.org/10.1029/2000gb001391>
- Repeta, D.J., Ferrón, S., Sosa, O.A., Johnson, C.G., Repeta, L.D., Acker, M., DeLong, E.F., Karl, D.M., 2016. Marine methane paradox explained by bacterial degradation of dissolved organic matter. *Nat. Geosci.* 9, 1–7. <https://doi.org/10.1038/ngeo2837>
- Rhee, T.S., Kettle, A.J., Andreae, M.O., 2009. Methane and nitrous oxide emissions from the ocean: A reassessment using basin-wide observations in the Atlantic. *J. Geophys. Res. Atmos.* 114, 1–20. <https://doi.org/10.1029/2008JD011662>
- Salvacao, N., Guedes, C., 2015. Offshore wind energy assessment for the Iberian coasts using remotely sensed data, in: Guedes Soares, C. (Ed.), *Renewable Energies Offshore*. Taylor & Francis Group, London, pp. 237–244. <https://doi.org/10.1201/b18973-35>
- Sarmiento, J.L., Gruber, N., 2006. Air-Sea Interface, in: *Ocean Biogeochemical Dynamics*. Princeton University Press, Princeton, New Jersey, p. 503. <https://doi.org/10.2307/j.ctt3fgxqx>
- Saunois, M., Bousquet, P., Poulter, B., Peregón, A., Ciais, P., Canadell, J.G., Dlugokencky, E.J., Etiope, G., Bastviken, D., Houweling, S., Janssens-Maenhout, G., Tubiello, F.N., Castaldi, S., Jackson, R.B., Alexe, M., Arora, V.K., Beerling, D.J., Bergamaschi, P., Blake, D.R., Brailsford, G., Brovkin, V., Bruhwiler, L., Crevoisier, C., Crill, P., Covey, K., Curry, C., Frankenberg, C., Gedney, N., Höglund-Isaksson, L., Ishizawa, M., Ito, A., Joos, F., Kim, H.S., Kleinen, T., Krummel, P., Lamarque, J.F., Langenfelds, R., Locatelli, R., Machida, T., Maksyutov, S., McDonald, K.C., Marshall, J., Melton, J.R., Morino, I., Naik, V., O'Doherty, S., Parmentier, F.J.W., Patra, P.K., Peng, C., Peng, S., Peters, G.P., Pison, I., Prigent, C., Prinn, R., Ramonet, M., Riley, W.J., Saito, M., Santini, M., Schroeder, R., Simpson, I.J., Spahni, R., Steele, P., Takizawa, A.,

- Thornton, B.F., Tian, H., Tohjima, Y., Viovy, N., Voulgarakis, A., Van Weele, M., Van Der Werf, G.R., Weiss, R., Wiedinmyer, C., Wilton, D.J., Wiltshire, A., Worthy, D., Wunch, D., Xu, X., Yoshida, Y., Zhang, B., Zhang, Z., Zhu, Q., 2016. The global methane budget 2000-2012. *Earth Syst. Sci. Data* 8, 697–751. <https://doi.org/10.5194/essd-8-697-2016>
- Scranton, M.I., Brewer, P.G., 1977. Occurrence of methane in the near-surface waters of the western subtropical North-Atlantic. *Deep. Res.* 24, 127–138. [https://doi.org/10.1016/0146-6291\(77\)90548-3](https://doi.org/10.1016/0146-6291(77)90548-3)
- Shindell, D.T., Faluvegi, G., Bell, N., Schmidt, G.A., 2005. An emissions-based view of climate forcing by methane and tropospheric ozone. *Geophys. Res. Lett.* 32, 1–4. <https://doi.org/10.1029/2004GL021900>
- Sierra, A., Jiménez-López, D., Ortega, T., Fernández-Puga, M.C., Delgado-Huertas, A., Forja, J., 2020. Methane dynamics in the coastal – Continental shelf transition zone of the Gulf of Cadiz. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 236, 1–18. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2020.106653>
- Sobarzo, M., Bravo, L., Donoso, D., Garcés-Vargas, J., Schneider, W., 2007. Coastal upwelling and seasonal cycles that influence the water column over the continental shelf off central Chile. *Prog. Oceanogr.* 75, 363–382. <https://doi.org/10.1016/j.pocean.2007.08.022>
- Sobarzo, M., Djurfeldt, L., 2004. Coastal upwelling process on a continental shelf limited by submarine canyons, Concepción, central Chile. *J. Geophys. Res.* 109, 1–20. <https://doi.org/10.1029/2004JC002350>
- Steinle, L., Maltby, J., Treude, T., Kock, A., Bange, H.W., Engbersen, N., Zopfi, J., Lehmann, M.F., Niemann, H., 2017. Effects of low oxygen concentrations on aerobic methane oxidation in seasonally hypoxic coastal waters. *Biogeosciences* 14, 1631–1645. <https://doi.org/10.5194/bg-14-1631-2017>
- Sudheesh, V., Gupta, G.V.M., Naqvi, W.A., 2020. Massive Methane Loss During Seasonal Hypoxia / Anoxia in the Nearshore Massive Methane Loss During Seasonal Hypoxia/Anoxia in the Nearshore Waters of Southeastern Arabian Sea. *Front. Mar. Sci.* 7, 1–13. <https://doi.org/10.3389/fmars.2020.00324>
- Summerhayes, C., 1983. Sedimentation of organic matter in upwelling regimes, in: Thiede, J., Suess, E. (Eds.), *Coastal Upwelling, Its Sediment Record. Part B: Sedimentary Records of Ancient Coastal Upwelling*. Plenum, New York, pp. 29–72.
- Sun, J., Steindler, L., Thrash, J.C., Halsey, K.H., Smith, D.P., Carter, A.E., Landry, Z.C., Giovannoni, S.J., 2011. One Carbon Metabolism in SAR11 Pelagic Marine Bacteria. *PLoS One* 6, 1–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023973>
- Sweeney, C., Gloor, E., Jacobson, A.R., Key, R.M., McKinley, G., Sarmiento, J.L., Wanninkhof, R., 2007. Constraining global air-sea gas exchange for CO₂ with recent bomb ¹⁴C measurements. *Global Biogeochem. Cycles* 21, 1–10. <https://doi.org/10.1029/2006GB002784>
- Testa, G., Masotti, I., Farías, L., 2018. Temporal Variability in Net Primary Production in an Upwelling Area off Central Chile (36°S). *Front. Mar. Sci.* 5, 1–17. <https://doi.org/10.3389/fmars.2018.00179>
- Thamdrup, B., Canfield, D.E., 1996. Pathways of carbon oxidation in continental margin sediments off central Chile. *Limnol. Oceanogr.* 41, 1629–1650. <https://doi.org/10.4319/lo.1996.41.8.1629>

- Trenberth, K.E., 1984. Signal versus noise in the Southern Oscillation. *Am. Meteorol. Soc.* 112, 326–332. [https://doi.org/10.1175/1520-0493\(1984\)112<0326:SVNITS>2.0.CO;2](https://doi.org/10.1175/1520-0493(1984)112<0326:SVNITS>2.0.CO;2)
- Upstill-goddard, R.C., Barnes, J., 2016. Methane emissions from UK estuaries : Re-evaluating the estuarine source of tropospheric methane from Europe 180, 14–23. <https://doi.org/10.1016/j.marchem.2016.01.010>
- Upstill-goddard, R.C., Barnes, J., Frost, T., Punshon, S., Owens, N.J.P., 2000. Methane in the southern North Sea : Low-salinity inputs , estuarine removal , and atmospheric flux 14, 1205–1217.
- Vargas, C.A., Martínez, R.A., Cuevas, L.A., Pavez, M.A., Cartes, C., González, H.E., Escribano, R., Daneri, G., 2007. The relative importance of microbial and classical food webs in a highly productive coastal upwelling area. *Limnol. Oceanogr.* 52, 1495–1510. <https://doi.org/10.4319/lo.2007.52.4.1495>
- Walsh, J.J., 1991. Importance of continental margins in the marine biogeochemical cycling of carbon and nitrogen. *Nature* 350, 53–55.
- Wanninkhof, R., 2014. Relationship between wind speed and gas exchange over the ocean revisited. *Limnol. Oceanogr. Methods* 12, 351–362. <https://doi.org/10.4319/lom.2014.12.351>
- Wanninkhof, R., 1992. Relationship Between Wind Speed and Gas Exchange. *J. Geophys. Res.* 97, 7373–7382.
- Ward, B.B., Kilpatrick, K.A., 1993. Methane oxidation associated with mid-depth methane maxima in the Southern California Bight. *Cont. Shelf Res.* 13, 1111–1122. [https://doi.org/10.1016/0278-4343\(93\)90044-X](https://doi.org/10.1016/0278-4343(93)90044-X)
- Weber, T., Wiseman, N.A., Kock, A., 2019. Global ocean methane emissions dominated by shallow coastal waters. *Nat. Commun.* 10, 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-12541-7>
- Weller, Z.D., Yang, D.K., Von Fischer, J.C., 2019. An open source algorithm to detect natural gas leaks from mobile methane survey data. *PLoS One* 14, 1–18. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0212287>
- Whiticar, M.J., Faber, E., Schoell, M., 1986. Biogenic methane formation in marine and freshwater environments: CO₂ reduction vs. acetate fermentation-Isotope evidence. *Geochim. Cosmochim. Acta* 50, 693–709. [https://doi.org/10.1016/0016-7037\(86\)90346-7](https://doi.org/10.1016/0016-7037(86)90346-7)
- Wiesenburg, D.A., Guinasso, N.L., 1979. Equilibrium Solubilities of Methane, Carbon Monoxide, and Hydrogen in Water and Sea Water. *Am. Chem. Soc.* 24, 356–360.
- Williams, P.J. I. B., Jenkinson, N.W., 1982. A transportable microprocessor-controlled precise Winkler titration suitable for field station and shipboard use. *Limnol. Oceanogr.* 27, 576–584. <https://doi.org/10.4319/lo.1982.27.3.0576>
- Wilson, S.T., Ferrón, S., Karl, D.M., 2017. Interannual Variability of Methane and Nitrous Oxide in the North Pacific Subtropical Gyre. *Geophys. Res. Lett.* 44, 9885–9892. <https://doi.org/10.1002/2017GL074458>
- Wolfe, R.S., 1971. Microbial formation of methane, 6th ed, *Advances in microbial physiology*. Academic press, London and New York.
- Wuebbles, D.J., Hayhoe, K., 2002. Atmospheric methane and global change. *Elsevier Sci.* 57, 177–210. [https://doi.org/10.1016/S0012-8252\(01\)00062-9](https://doi.org/10.1016/S0012-8252(01)00062-9)

4.2. CAPÍTULO 2: TASA DE PRODUCCIÓN NETA DE CH₄ EN LA COLUMNA DE AGUA SUPERFICIAL POR PARTE DE LA COMUNIDAD PLANCTÓNICA.

En este capítulo se presentan los resultados de las concentraciones y tasas de producción de CH₄ dado por la comunidad natural, microplancton y bacterioplancton, con la finalidad de corroborar la producción de CH₄ en condiciones oxigenadas, exponiéndolo a un fotoperiodo de 24 horas, bajo experimentos controlados de laboratorio.

Para evaluar la relevancia de la comunidad planctónica en el reciclaje de CH₄, se procedió al fraccionamiento de esta, considerando las siguientes fracciones: total o comunidad natural (CN, control), <150 μm (microplancton), <3 μm (pico o bacterioplancton) y la <0.2 μm (fentoplancton); a esta última fracción, se dividió en dos y una de ellas fue sometida a un envenenamiento (adición de HgCl₂), considerándola como control negativo.

En la Tabla 4.1 se resumen las concentraciones iniciales de las diferentes variables medidas al inicio de cada tratamiento (experimento). Todos los experimentos partieron con concentraciones de OD similares a las encontradas en la capa superficial al momento del muestreo (144.58 - 229.44 μM) a los 10 m de profundidad, mientras que los niveles de clorofila variaron acordes con el tipo de tratamiento. Esto es, la clorofila fue sustancialmente mayor en la CN y en la fracción <150 μm, donde toda la comunidad microplanctónica estuvo totalmente representada; en comparación a la fracción <3 μm, donde sólo están representados los pequeños eucariontes y algunas cianobacterias fotosintéticas. En la fracción menor a <0.2 μm, no se detectaron niveles de clorofila, indicando un correcto fraccionamiento. Los niveles de COD y nutrientes no fluctuaron significativamente entre tratamientos al inicio de los experimentos. Es importante notar que los niveles iniciales de CH₄ variaron entre tratamientos, esto puede ser debido a la fugacidad que tuvo el gas durante los distintos procedimientos de filtrado, siendo particularmente mayor en la CN (enero).

Debido al periodo de incubación, nutrientes como NO_3^- , PO_4^{3-} y Si(OH)_4 disminuyeron sustancialmente en comparación a lo encontrado *in situ*, de 7.80 y 11.32 μM , 1.40 y 1.83 μM , 5.24 y 4.77 μM correspondientemente. No obstante, es importante resaltar la diferencia en los niveles de nutrientes que se encontraron entre diciembre y enero, mientras que el muestreo de diciembre correspondió a un periodo de agotamiento de nutrientes, sobre todo de silicatos; probablemente a un florecimiento de diatomeas, el muestreo de enero coincidió con una acumulación relativa de nutrientes (Tabla 4.1).

Tabla 4.1. Concentraciones iniciales de diferentes variables en los experimentos de plancton fraccionado (CN: Comunidad Natural, <150 μm : microplancton, <3 μm : picoplancton y la <0.2 μm : fentoplancton) en viales cromatográficos, en diciembre 2018 y enero 2019.

Mes	Tratamientos (μm)	CH_4 (nM)	OD (μM)	Cl-a (mg m^{-3})	COD (μM)	NO_3^- (μM)	NO_2^- (μM)	PO_4^{3-} (μM)	Si(OH)_4 (μM)
DIC	CN	2,21	274,67	43,81	101,12	1,55	0,14	0,77	0,30
	<150	5,92	273,63	41,96	102,58	1,59	0,13	0,63	0,19
	<3	6,98	273,32	6,50	127,10	1,31	0,13	0,66	0,07
	<0,2	3,88	279,55	*	124,26	2,29	0,14	0,79	0,47
ENE	CN	13,77	185,48	15,70	158,82	16,18	0,33	1,62	4,21
	<150	4,10	201,64	13,29	117,67	14,75	0,32	1,57	3,75
	<3	5,01	235,28	2,39	98,36	15,86	0,35	1,69	3,94
	<0,2	3,46	259,79	*	123,60	17,46	0,36	1,91	5,53

La Figura 4.1 presenta el reciclaje de CH_4 en distintas fracciones del plancton durante un ciclo diario (12 de luz y 12 horas de oscuridad), en diciembre (Fig. 4.1A). Primeramente, las fracciones <0,2 μm (y su control negativo) no mostraron

acumulación o consumo aparente de CH₄ durante el ciclo de 24 horas. A diferencia de este comportamiento, las fracciones <3 μm, <150 μm y comunidad natural, mostraron una acumulación mayor de CH₄ durante el tiempo de incubación y un comportamiento similar en las primeras 12 horas de luz. No obstante, la fracción del bacterioplancton (<3 μm) experimentó un incremento significativo (p=0,002) de CH₄ en condiciones de oscuridad a partir de las 12 horas de incubación, el cual se mantuvo creciente hasta el final de experimento (Fig. 4.1A). Esto coincidió con una disminución de nitritos (Fig. 4.1B) y un ligero incremento de nitratos y fosfatos (Fig. 4.1C y D).



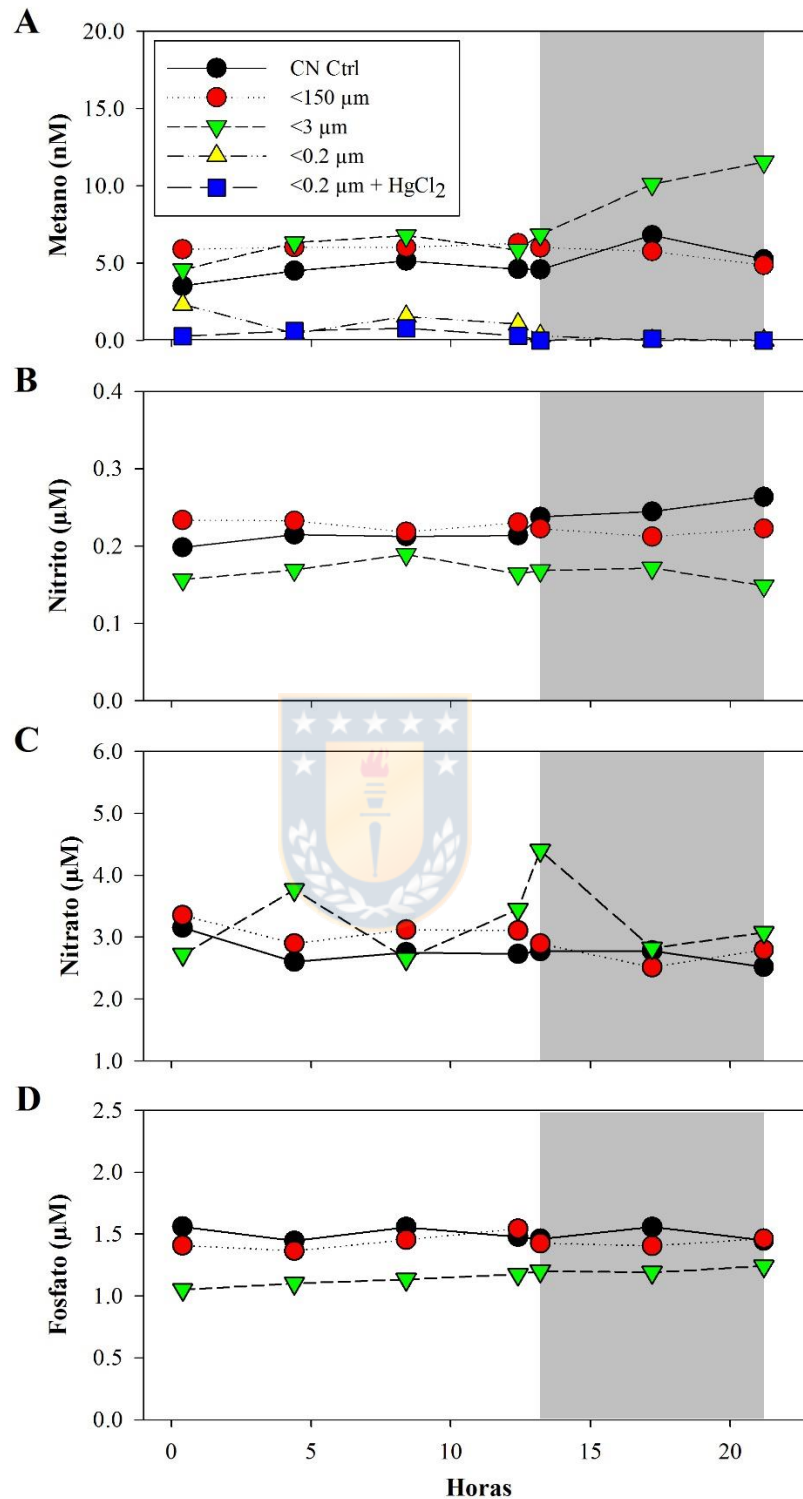


Figura 4.1. Evolución temporal de experimentos de plancton fraccionado (CN: Comunidad Natural, <150 μm: microplancton, <3 μm: picoplancton, <0,2 μm: fentoplancton) en viales cromatográficos en condiciones oxigenadas en diciembre 2019. A. metano B. nitrito, C. nitrato y D. fosfato. El fotoperiodo está representado en blanco (luz) y gris (oscuridad).

En enero, las fracciones $<0,2 \mu\text{m}$ no revelaron una acumulación de CH_4 , a diferencia de las fracciones $<3 \mu\text{m}$, $<150 \mu\text{m}$ y la comunidad natural, que muestran patrones similares en horas de iluminación (Fig. 4.2A). No obstante, cuando se cambió la fase de luz a oscuridad, la comunidad microplanctónica ($<150 \mu\text{m}$) mostró una alta acumulación de CH_4 de hasta 38,96 nM, indicando mecanismos de reciclaje y acoplamiento entre las distintas comunidades del microplancton. Esto último corroborado con pruebas estadísticas que evidencian diferencias significativas entre los tratamientos ($p=0,001$). Los nutrientes también mostraron un incremento en la fase oscura, sobre todo los nitratos y fosfatos en las fracciones $<150 \mu\text{m}$ y $< 3\mu\text{m}$ (Fig. 4.2B, C y D).

El rango de variación de la concentración de CH_4 en ambos meses fue muy amplio; en diciembre la comunidad con mayor producción de CH_4 fue dado por la comunidad $<3 \mu\text{m}$, cuyo rango fluctuó entre 4,57 y 11,54 nM, al inicio y al final del experimento, respectivamente (Fig. 4.1A). En enero, la mayor diferencia estuvo dada por la comunidad $<150 \mu\text{m}$ con una fluctuación entre 2,02 y 38,96 nM, este último valor se observó a las 13 horas aproximadamente cuando se hizo el cambio de luz a oscuridad (Fig. 4.2A). Las fracciones $<0,2 \mu\text{m}$ (incluido el inoculado con HgCl_2) se mantuvieron constantes a lo largo de los experimentos, con concentraciones por debajo de 2,32 nM (diciembre) y 5,51 nM (enero).

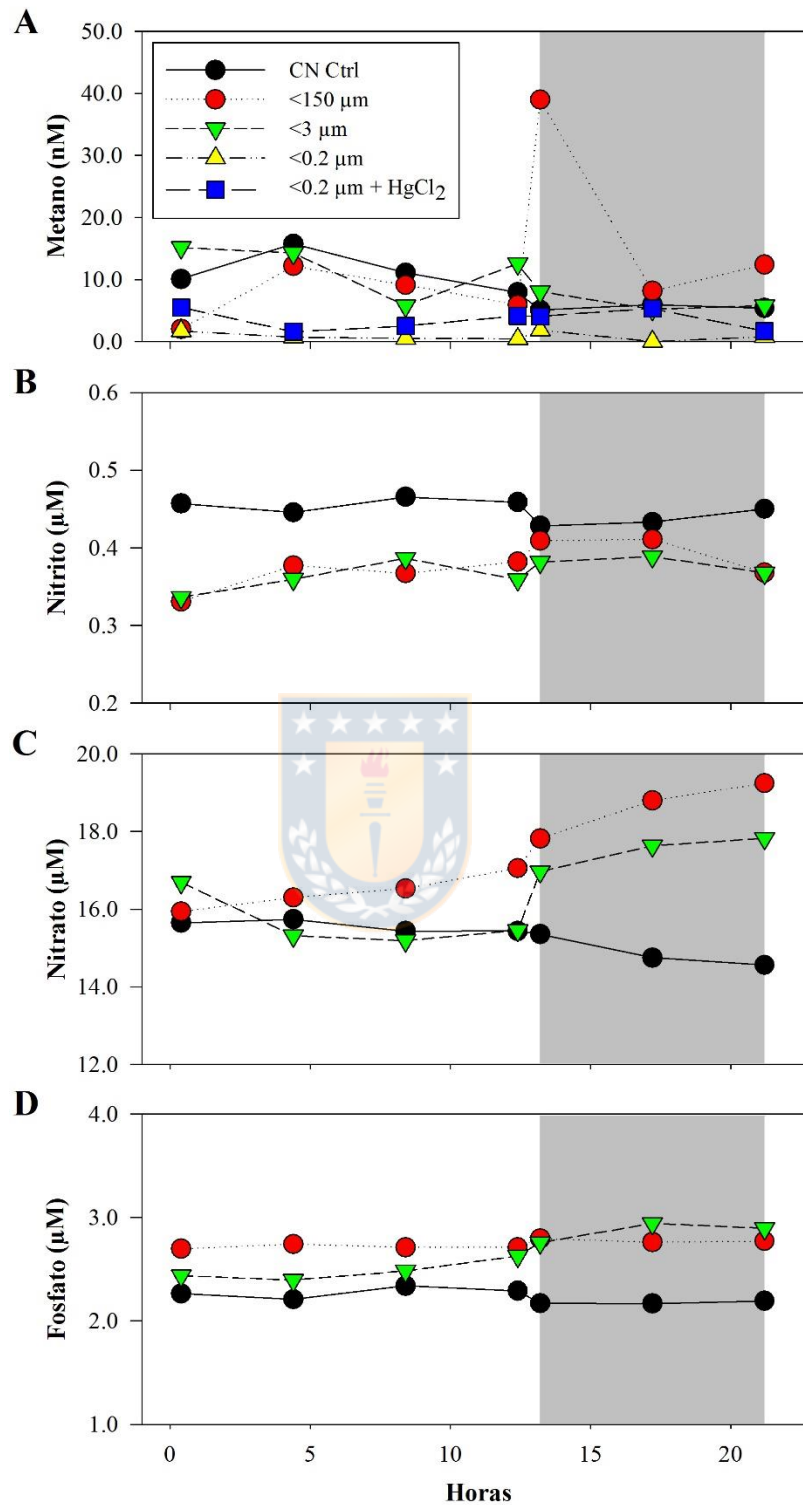


Figura 4.2. A. Evolución temporal de experimentos de plancton fraccionado (CN: Comunidad Natural, <math><150 \mu\text{m}</math>: microplancton, <math><3 \mu\text{m}</math>: picoplancton, <math><0,2 \mu\text{m}</math>: fentoplancton) en viales cromatográficos en condiciones oxigenadas en enero 2019. A. metano B. nitrito, C. nitrato y D. fosfato. El fotoperiodo está representado en blanco (luz) y gris (oscuridad).

Finalmente, las tasas de acumulación o consumo neto de CH₄ se resumen en la Tabla 4.2; las tasas se estimaron para la fase de luz y oscuridad y estas difirieron significativamente en Diciembre, siendo la comunidad <3 μm la que presentó mayor acumulación neta de CH₄ (0,30 ± 0,07 nmol L⁻¹ h⁻¹), seguido por la comunidad natural (0,10 ± 0,04 nmol L⁻¹ h⁻¹), indicando que en estas comunidades, la producción fue mayor que el consumo, además, ambas comunidades presentaron una acumulación neta en ambas condiciones, siendo mayor en la comunidad <3 μm en condiciones de oscuridad (0,59 ± 0,13 nmol L⁻¹ h⁻¹). Por el contrario, en enero, se observó mayor acumulación de CH₄ en la comunidad <150 μm en condiciones de luz (0,22 ± 0,58 nmol L⁻¹ h⁻¹) (Tabla 4.2).

Tabla 4.2. Tasas netas de acumulación y/o consumo de CH₄ (nmol L⁻¹ h⁻¹) en experimentos de plancton fraccionado (CN: Comunidad Natural, <150 μm: microplancton, <3 μm: picoplancton) en viales cromatográficos, en diciembre 2018 y enero 2019.

Tratamientos (μm)	Diciembre			Enero		
	Total	Luz	Oscuridad	Total	Luz	Oscuridad
CN	0,1 ± 0,04	0,1 ± 0,06	0,08 ± 0,27	-0,41 ± 0,16	-0,28 ± 0,41	-0,04 ± 0,1
<150	-0,04 ± 0,02	0,03 ± 0,01	-0,14 ± 0,05	0,46 ± 0,72	0,22 ± 0,58	-3,32 ± 2,53
<3	0,3 ± 0,07	0,11 ± 0,11	0,59 ± 0,13	-0,46 ± 0,17	-0,41 ± 0,5	-0,28 ± 0,24

4.3. CAPÍTULO 3: DISCERNIR SI PROCESOS DE METANOGÉNESIS METILOTRÓFICA ESTÁN PRESENTES EN AGUAS SUPERFICIALES FRENTE A CONCEPCIÓN.

En este capítulo se presentan los resultados de las concentraciones y tasas de producción de CH₄ dado por la comunidad natural y el bacterioplancton, adicionando sustratos metilados. Con el propósito de discernir la existencia de metanogénesis metilotrófica en condiciones oxigenadas bajo experimentos de controlados de microcosmos en laboratorio.

Para llevar a cabo este objetivo se realizaron experimentos de enriquecimiento con sustratos orgánicos metilados. Primeramente, se realizaron experimentos de sensibilidad en frascos GC (igual al objetivo 2) con la fracción del bacterioplancton o picoplancton (<3 µm, sección 4.3.1); las cuales se enriquecieron con ácido metilfosfónico (<3 µm + MPn) y trimetilamina (<3 µm + TMA) a concentraciones iniciales de 1 µM. Además, en marzo se procedió a concentrar 2.5 veces la comunidad del picoplancton, denominándola comunidad concentrada (CC). Posteriormente, en abril y septiembre se realizó dos experimentos de microcosmos en sistemas de flujos controlados acoplados a un medidor de gases en continuo (ver sección 4.3.2.).

4.3.1. Tasas de reciclaje de metano enriquecido con sustratos orgánicos

En la Tabla 4.3 se resumen las condiciones iniciales de las incubaciones de los experimentos (tratamientos) en marzo. Las concentraciones de OD variaron entre 185,82 y 218,90 µM, acorde a lo encontrado *in situ* (216,43 µM). Los valores de CH₄ presentaron variaciones debido al tiempo de incubación inicial y al proceso de filtración. Relativo a las concentraciones de nutrientes, COD y clorofila-a, sólo el

tratamiento con la CC presentó los mayores valores de estas variables, producto del proceso de concentración de la comunidad de pico y bacterioplancton

Tabla 4.3. Concentraciones iniciales de diferentes variables en los experimentos de plancton fraccionado (<3 μm : picoplancton y CC: Comunidad Concentrada) en viales cromatográficos con adición de sustratos metilados (MPn: Ácido metilfosfónico y TMA: Trimetilamina) en marzo 2019.

Tratamiento (μm)	CH ₄ (nM)	OD (μM)	Cl-a (mg m^{-3})	COD (μM)	NO ₃ ⁻ (μM)	NO ₂ ⁻ (μM)	PO ₄ ³⁻ (μM)	Si(OH) ₄ (μM)
<3 Ctrl	8,65	187,81	1,39	73,94	6,61	0,60	1,54	5,29
<3+MPn	22,74	218,23	0,44	88,73	5,92	0,56	1,53	4,56
CC	14,25	173,40	0,86	101,27	11,56	0,70	1,83	7,00

La Figura 4.3A muestra la evolución temporal del CH₄ en un ciclo diario en el mes de marzo. El tratamiento control (<3 μm) mostró un incremento sostenido en el tiempo de incubación, mientras que el tratamiento <3 μm + MPn registró una mayor producción de CH₄ en condiciones de oscuridad, con un máximo de 20,34 nM al inicio de esta fase; no obstante, tiende a disminuir hacia el final del experimento. En comparación, la comunidad concentrada (CC) exhibió un comportamiento semejante al enriquecido con MPn, con un máximo de 15,02 nM en condiciones de oscuridad. A pesar de lo descrito anteriormente, las pruebas estadísticas no evidenciaron significancias en la producción de CH₄ ($p=0,802$) entre tratamientos. Los nutrientes no variaron sustancialmente con el tiempo de incubación, sin embargo, se destaca que los niveles de estos en el tratamiento CC fueron sostenidamente más altos (Fig. 4.3A, B y C).

En el mes de mayo, se incluyó un tratamiento enriquecido con TMA. Las condiciones iniciales de este experimento se indican en la Tabla 4.4. El OD y el CH₄

fueron similares en todos los tratamientos, producto del filtrado realizado. En general, el tratamiento con TMA, presentó valores altos de Cl-a, COD y nutrientes, sin embargo, al cabo de media hora aproximadamente, se observó una leve disminución en el COD en la comunidad $<3 \mu\text{M}$ tratada con TMT y MPn, no siendo así para el tratamiento control, que, por el contrario, aumentó. Similar situación presentó la clorofila-a (Tabla 4.4). La adición de MPn ocasionó que los nutrientes aumentaran luego de media hora, sin embargo, esto no ocurrió con la adición de TMA (se mantuvo casi constante).



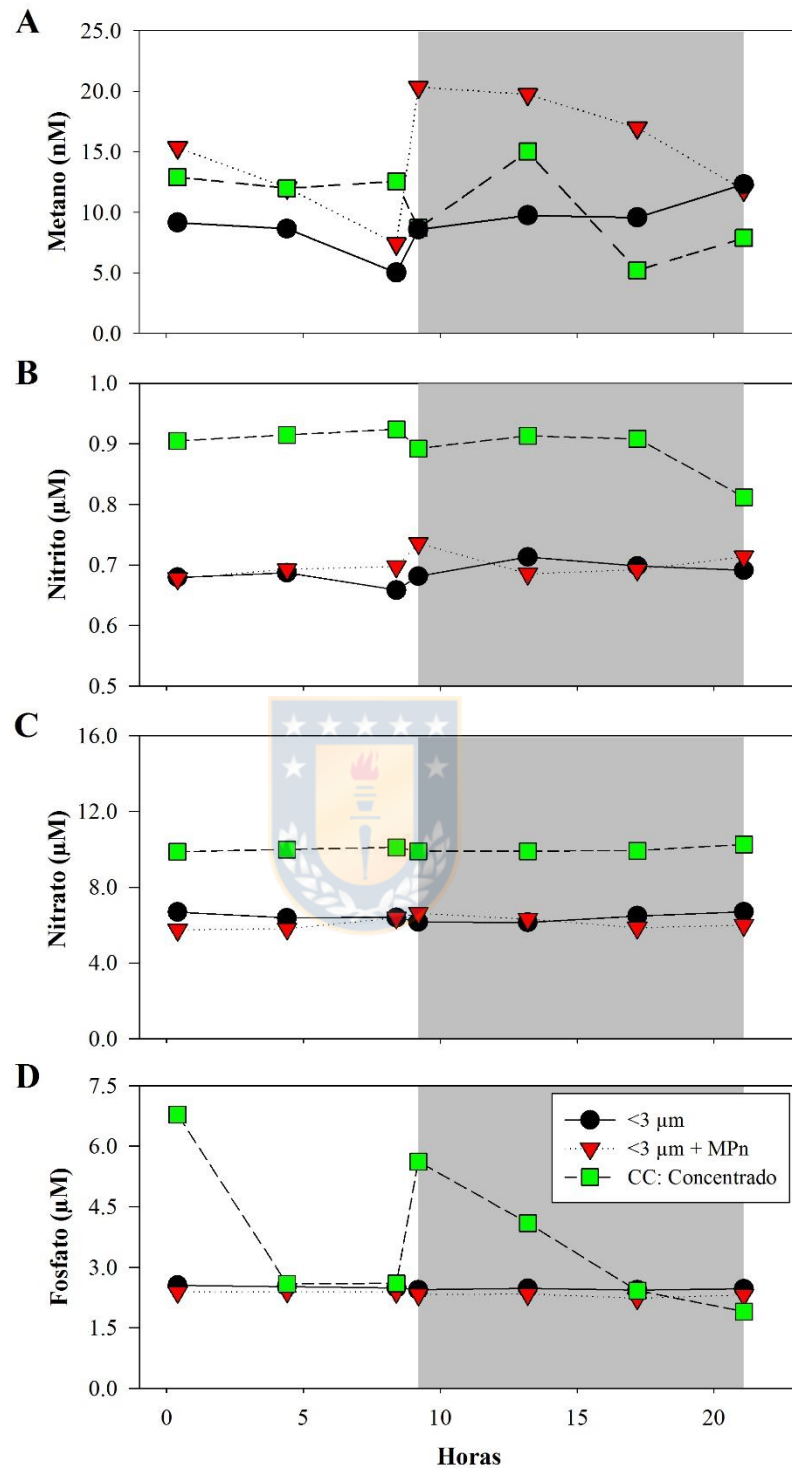


Figura 4.3. Evolución temporal de A. Metano (nM), B. Nitritos (μM), C. Nitratos (μM) y D. Fosfatos (μM) durante experimentos de plancton fraccionado (<3 μm : picoplancton, CC: Comunidad Concentrada) con adición de sustratos metilados (MPn: Ácido metil fosfónico y TMA: Trimetilamina) en viales cromatográficos bajo condiciones oxigenadas, en marzo 2019. Se indica el fotoperiodo en blanco (luz) y gris (oscuridad).

Tabla 4.4. Concentraciones iniciales de diferentes variables en los experimentos de plancton fraccionado (<3 μm : picoplancton y CC: Comunidad Concentrada) en viales cromatográficos con adición de sustratos metilados (MPn: Ácido metilfosfónico y TMA: Trimetilamina) en mayo 2019.

Mes	Tratamiento (μm)	CH ₄ (nM)	OD (μM)	Cl-a (mg m^{-3})	COD (μM)	NO ₃ ⁻ (μM)	NO ₂ ⁻ (μM)	PO ₄ ³⁻ (μM)	Si(OH) ₄ (μM)
MAYO 2019 (Antes del reactivo)	<3 Ctrl	-	212,02	0,43	124,81	11,41	0,44	1,34	4,67
	<3+MPn	-	216,76	0,45	133,09	10,36	0,34	1,22	3,56
	<3+TMA	-	238,04	0,47	170,43	13,20	0,42	1,37	4,41
MAYO 2019 (después de agregar el sustrato)	<3 Ctrl	17,41	275,27	0,46	166,68	9,71	0,30	1,15	3,15
	<3+MPn	16,25	268,94	0,41	123,06	13,45	0,40	1,25	4,24
	<3+TMA	18,15	268,74	0,43	149,62	13,69	0,43	1,37	4,49

La variación temporal de CH₄, nitrito, nitrato y fosfato en la fracción de picoplancton con y sin enriquecimiento orgánico, en mayo, se muestran en la Fig. 4.4A, B, C y D, respectivamente. Se observa nuevamente que el tratamiento con enriquecimiento con MPn produjo una acumulación de CH₄ en la fase oscura respecto al control (<3 μm), mientras que el enriquecimiento con TMA produjo un comportamiento variable. El control negativo (<3 μm + HgCl₂) no evidenció variaciones con el tiempo, indicando que no existió actividad microbiana. Las pruebas estadísticas mostraron diferencias significativas entre los tratamientos ($p = 0,042$).

La Tabla 4.5 muestra las tasas de acumulación o consumo neto de CH₄ en las fases iluminada y oscura. En los tratamientos controles (<3 μm) de marzo y mayo, las tasas de reciclaje de CH₄ fueron de $0,16 \pm 0,11 \text{ nmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ y $-0,14 \pm 0,09 \text{ nmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$, respectivamente, habiendo una mayor producción neta en marzo bajo condiciones de

oscuridad ($0,28 \pm 0,1$). Se destaca la mayor tasa de reciclaje en la comunidad $<3 \mu\text{m}$ enriquecida con MPn en mayo ($0,17 \pm 0,22 \text{ nmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$) en ambas condiciones, mientras que el tratamiento negativo ($<3 \mu\text{m} + \text{HgCl}_2$) presentó tasas no significativas tanto en condiciones de luz y oscuridad ($-0,01 \pm 0,04$ y $0,01 \pm 0,07 \text{ nmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$, respectivamente), indicando que el reciclaje de CH_4 es de origen biogénico.

Tabla 4.5. Tasas netas de producción y/o consumo de CH_4 ($\text{nmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$) en experimentos de plancton fraccionado ($<3 \mu\text{m}$: picoplancton y CC: Comunidad Concentrada) en viales cromatográficos con adición de sustratos metilados (MPn: Ácido metilfosfónico y TMA: Trimetilamina) en marzo y mayo 2019.

Mes	Tratamiento (μm)	Total	Luz	Oscuridad
Marzo	$<3 \text{ Ctrl}$	$0,16 \pm 0,11$	$-0,51 \pm 0,23$	$0,28 \pm 0,10$
	$<3 + \text{MPn}$	$0,05 \pm 0,29$	$-0,99 \pm 0,09$	$-0,71 \pm 0,18$
	CC	$-0,28 \pm 0,17$	$-0,04 \pm 0,11$	$-0,31 \pm 0,53$
Mayo	$<3 \text{ Ctrl}$	$-0,14 \pm 0,09$	$-0,25 \pm 0,12$	$-0,13 \pm 0,33$
	$<3 + \text{MPn}$	$0,17 \pm 0,22$	$0,19 \pm 0,33$	$1,02 \pm 0,53$
	$<3 + \text{TMA}$	$-0,01 \pm 0,16$	$0,21 \pm 0,60$	$0,25 \pm 0,08$

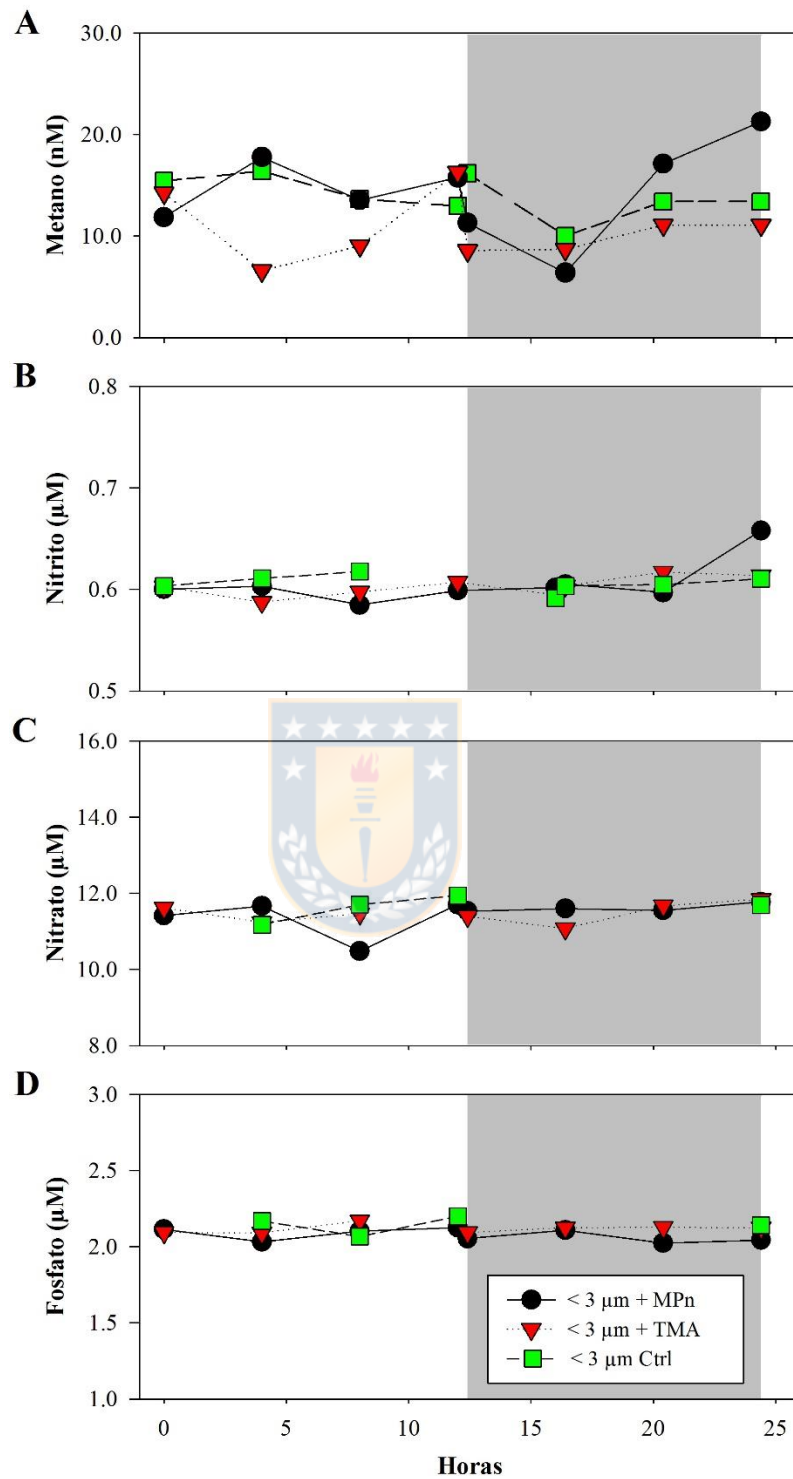


Figura 4.4. Evolución temporal de A. Metano (nM), B. Nitritos (μM), C. Nitratos (μM) y D. Fosfatos (μM) durante experimentos de plancton fraccionado ($<3 \mu\text{m}$: picoplancton, CC: Comunidad Concentrada) con adición de sustratos metilados (MPn: Ácido metilfosfónico y TMA: Trimetilamina) en viales cromatográficos bajo condiciones oxigenadas, en mayo 2019. Se indica el fotoperiodo en blanco (luz) y gris (oscuridad).

4.3.2. Tasas de reciclaje de CH₄ en experimentos de microcosmos

Se evaluó la evolución temporal de CH₄ en experimentos de microcosmos durante 60 horas con tres comunidades, estas son: la comunidad natural (CN), picoplancton (<3 μm) y concentrada (1,8 a 2,25 veces más concentrada respecto a la comunidad <3 μm) enriquecida con MPn y TMA. Para controlar la efectividad del fraccionamiento y concentración de la comunidad, se analizó el contenido de Cl-a y abundancia de células de *Synechococcus*, pico-nanoeucariontes y bacterias.

4.3.2.1. Periodo de transición entre surgencia y mezcla vertical

Las condiciones iniciales de las incubaciones en microcosmos realizadas en abril se detallan en la Tabla 4.6, este periodo corresponde a finalización del periodo de surgencia dominado por microplancton más pequeño y nanoplancton fotosintético. En general, todos los tratamientos se iniciaron con altas concentraciones de oxígeno y similares de CH₄. La clorofila-a varió de acuerdo al tratamiento, siendo mayor en la comunidad natural, seguida de la comunidad picoplanctónica concentrada, indicando en esta fracción la presencia de pigmentos. Las concentraciones de nutrientes fueron similares en todos tratamientos, mientras que los niveles de COD fue únicamente mayor en el tratamiento concentrado con enriquecimientos orgánicos (Tabla 4.6).

Tabla 4.6. Concentraciones iniciales de diferentes variables en los experimentos de microcosmos en tres comunidades planctónicas (CN: Comunidad Natural, <3 µm: picoplancton y CC: Comunidad Concentrada) bajo condiciones oxigenadas y con adición de sustratos metilados (MPn: Ácido metilfosfónico y TMA: Trimetilamina), abril 2019.

Tratamiento (µm)	CH ₄ (nM)	OD (µM)	Cl-a (mg m ⁻³)	COD (µM)	NO ₃ ⁻ (µM)	NO ₂ ⁻ (µM)	PO ₄ ³⁻ (µM)	Si(OH) ₄ (µM)
CN Ctrl	50,26	223,35	8,48	97,27	15,35	0,74	1,95	3,72
CN + MPn	50,26	211,44	8,47	90,76	14,40	0,71	1,93	4,04
CN + TMA	50,25	202,06	7,36	94,81	13,16	0,62	1,75	3,15
<3 Ctrl	50,18	209,11	0,39	115,27	13,32	0,66	1,74	3,84
<3+MPn	50,12	217,01	0,16	117,97	13,66	0,65	1,73	3,91
<3+TMA	50,11	220,72	0,88	118,02	13,69	0,73	1,93	3,69
CC Ctrl	47,42	273,65	1,76	118,98	14,49	0,43	1,84	4,69
CC + MPn	48,74	264,15	1,19	156,74	11,76	0,35	1,51	3,90
CC + TMA	42,11	270,68	1,64	142,50	10,76	0,37	1,47	3,51

La Figura 4.5A muestra la acumulación de CH₄ durante 60 horas. Inicialmente todas las incubaciones mostraron un patrón similar en las primeras 40 horas, excepto con las comunidades CC (Ctrl) y CC + TMA, las cuales, a partir de las 46 horas en adelante, aumentaron las concentraciones de CH₄, especialmente en las comunidades concentradas tratadas con MPn y TMA, y la comunidad <3 µm tratada con TMA, siendo la primera (CC + MPn) quien presentó altos valores de CH₄ durante todo el experimento. Por el contrario, los tratamientos conformados por CC (Ctrl), CN + MPn y <3 µm Ctrl, presentaron valores similares de CH₄ desde las 46 horas hasta finalizar las incubaciones. Las pruebas estadísticas evidenciaron diferencias estadísticas entre los diferentes tratamientos (p<0,05).

La Figura 4.5B, C, D muestran respectivamente la variación de nitritos, nitratos y fosfatos con el tiempo de incubación en los distintos tratamientos. La comunidad concentrada presentó bajas concentraciones de nitritos (Fig. 4.5B), los nitratos mostraron un comportamiento errático y los fosfatos se mantuvieron constantes en todas las incubaciones (Fig. 4.5D)

Se destaca que los tratamientos permanecieron oxigenados, con una tendencia a incrementar hacia el final de la incubación (Fig. 4.6A) indicando que el reciclaje de CH₄ se realizó en condiciones de oxigenación. Las variaciones en los niveles de clorofila-a (Figura 4.6B) se mostraron constantes con una leve disminución con el tiempo de incubación, excepto en la comunidad natural y sus tratamientos enriquecidos (Fig. 4.6B). Por otro lado, las variaciones de COD (Figura 4.6C) se mantuvieron bajas y constantes con el tiempo de incubación, excepto CC + MPn que presentó mayores valores de COD, junto con el de CH₄.

Finalmente, la abundancia de células de cianobacterias (*Synechococcus*), piconanoeucariontes y bacterias heterótrofas se presentan en la Figura 4.7A, B y C. En términos generales, se resalta que producto de la filtración realizada para concentrar (CC) a la comunidad del bacterioplancton (<3 μm), se observó un aumento notable en todas las células al inicio del experimento (Fig. 4.7).

La abundancia inicial de *Synechococcus* fluctuó entre 6,1 x10⁴ y 6,8 x10⁴, y fue similar en los tratamientos control (CN) y <3 μm, pero se duplica en los tratamientos de picoplancton concentrado y enriquecido (Fig. 4.7A), indicando la efectividad del tratamiento de concentración de células. La abundancia de estas células al final de la incubación se mantiene semejante o disminuye, producto de la senescencia natural. La abundancia de células de pico y nanoeucariontes fue menor a *Synechococcus* (Fig. 4.7B) y varió entre 4,9 x 10³ y 1 x 10⁴ al inicio de los tratamientos control (CN) y <3 μm, y respondió de similar manera a lo que se observó con *Synechococcus*. Finalmente, la abundancia de bacterias, fue significativamente mayor a *Synechococcus* y las pico y nanoeucariontes. Las bacterias aumentaron o se

mantuvieron constantes en algunos tratamientos (Fig. 4.7C), esto puede coincidir con la mayor producción de CH₄ en las últimas 14 horas (Fig. 4.5A).



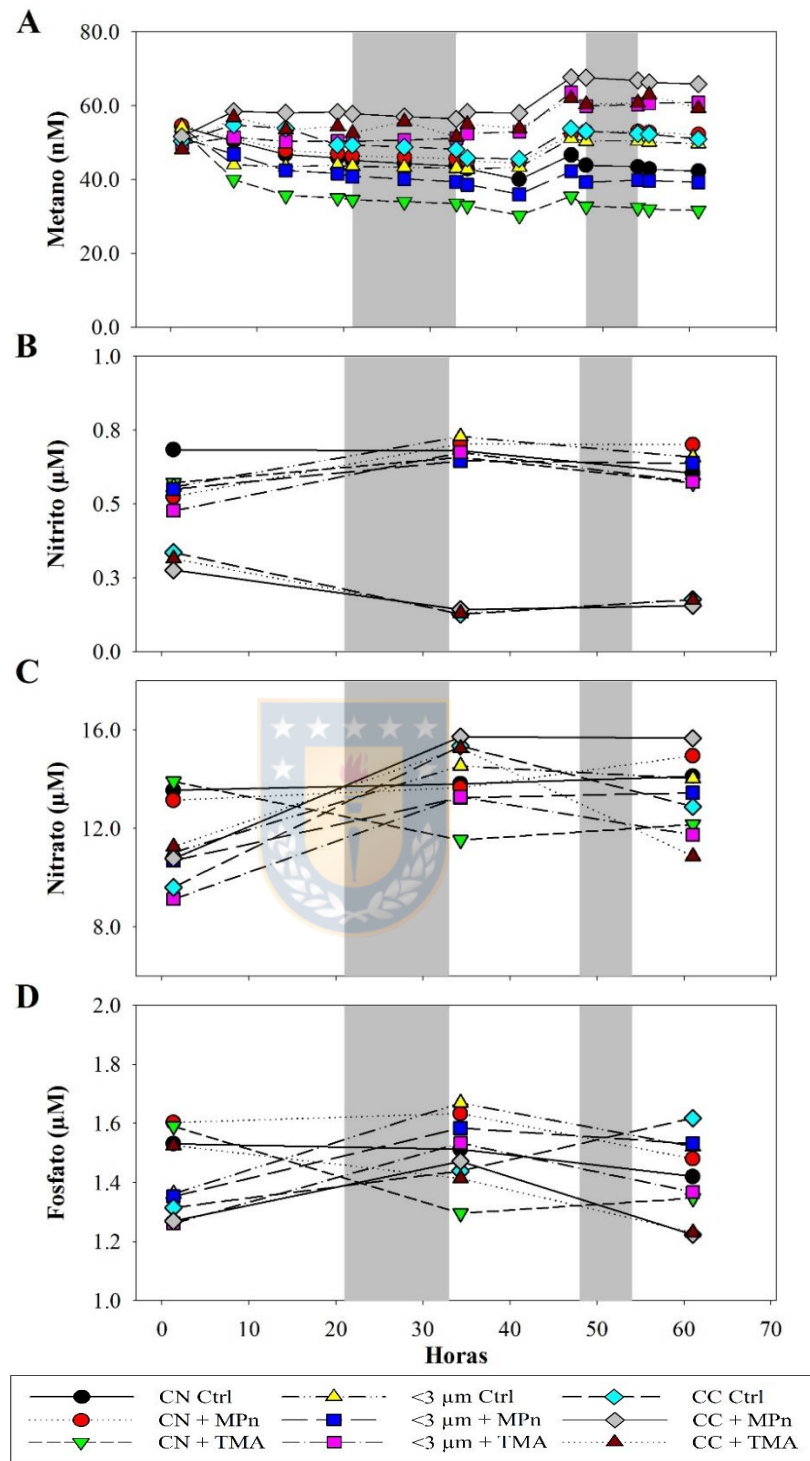


Figura 4.5. Evolución temporal de incubaciones en microcosmos en tres comunidades planctónicas (CN: Comunidad Natural, <3 μm : bacterioplancton y CC: Comunidad Concentrada) bajo condiciones oxigenadas y con adición de sustratos metilados (MPn: Ácido metilfosfónico y TMA: Trimetilamina), en abril 2019. A. Producción neta de metano (nM), B. Nitritos (μM), C. Nitratos (μM) y D. Fosfatos (μM). El fotoperiodo está representado en blanco (luz) y gris (oscuridad).

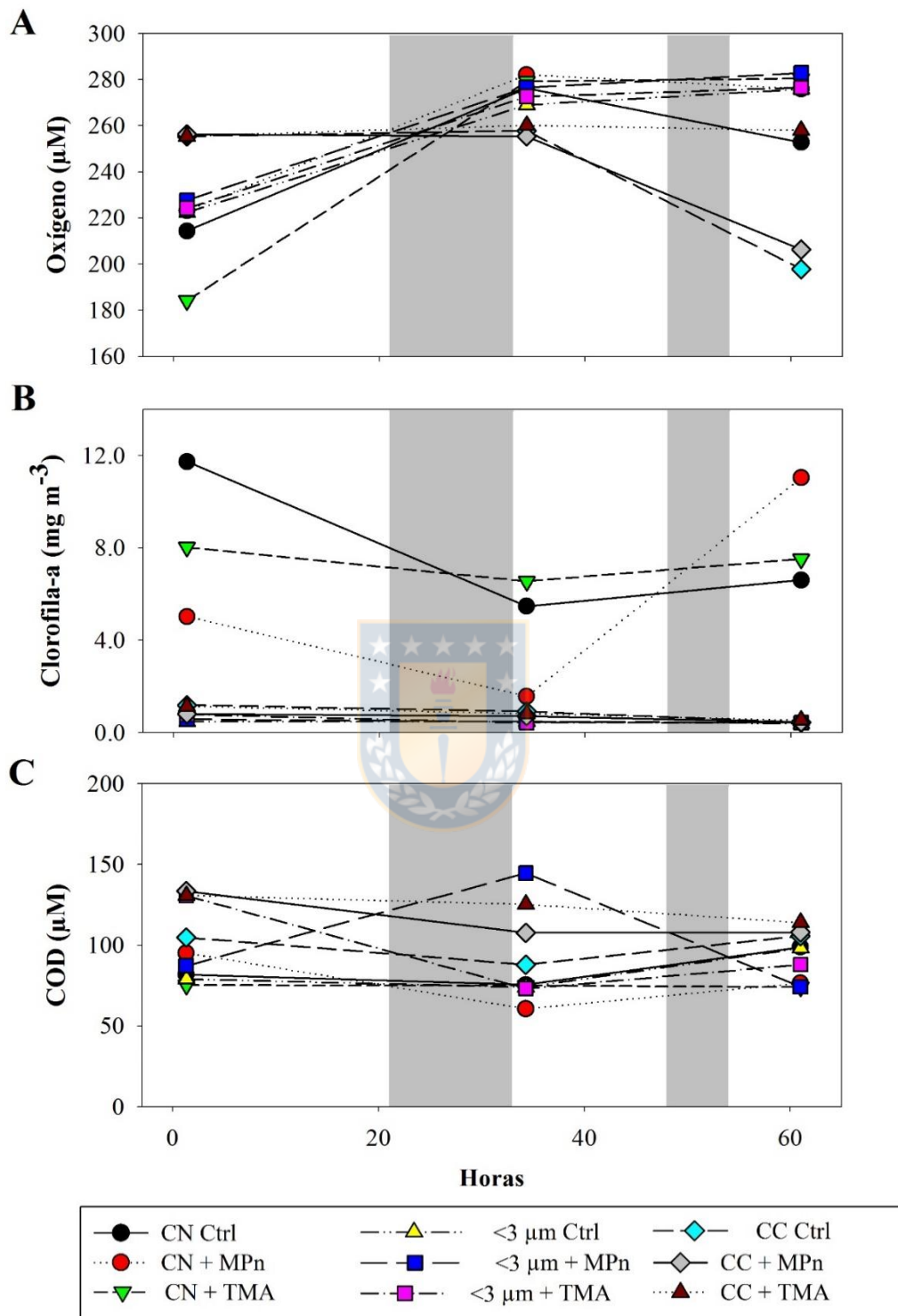


Figura 4.6. Evolución temporal de incubaciones en microcosmos en tres comunidades planctónicas (CN: Comunidad Natural, <3 μm : bacterioplancton y CC: Comunidad Concentrada) en microcosmos bajo condiciones oxigenadas y con adición de sustratos metilados (MPn: Ácido metilfosfónico y TMA: Trimetilamina), en abril 2019. A. Oxígeno (μM), B. Clorofila-a (mg m^{-3}) y C. Carbono Orgánico Disuelto (μM).

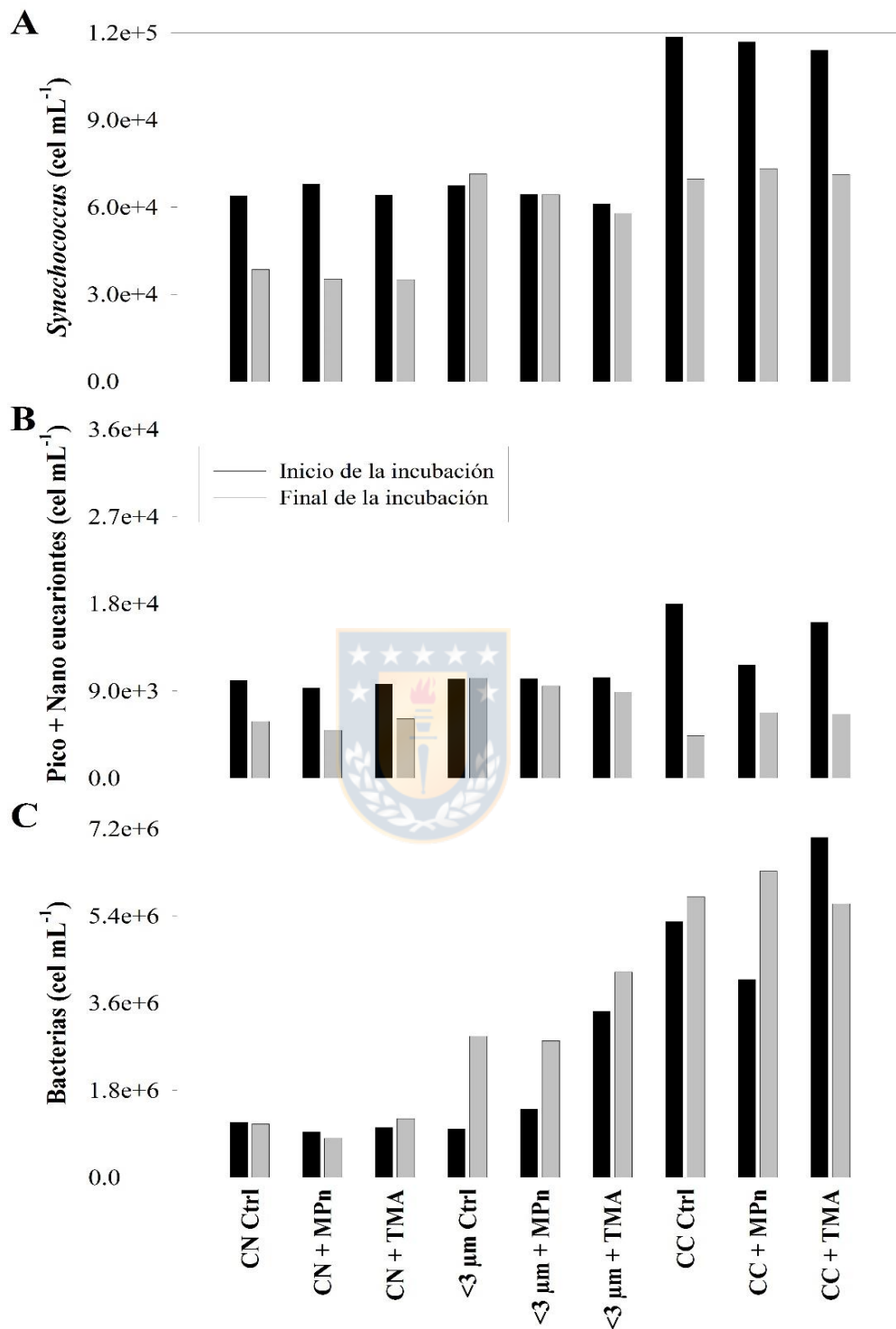


Figura 4.7. Abundancia de A. *Synechococcus*, B. Pico + nanoeucariontes y C. Bacterias en incubaciones de microcosmos en tres comunidades planctónicas (CN: Comunidad Natural, <3 μm: bacterioplancton y CC: Comunidad Concentrada) en microcosmos bajo condiciones oxigenadas y con adición de sustratos metilados (MPn: Ácido metilfosfónico y TMA: Trimetilamina), en abril 2019.

4.3.2.2. Inicio de la surgencia costera.

En la Tabla 4.7 se resumen las condiciones iniciales con los cuales partieron las incubaciones de microcosmos en septiembre, periodo de inicio de la surgencia costera, donde existen florecimientos de micro-plancton, dominado por diatomeas de gran tamaño. Los valores de CH₄ fueron similares en todos los tratamientos. La comunidad natural mostró mayores concentraciones de clorofila-a, además, como secuela del filtrado, la CC presentó mayores valores de cl-a que la comunidad <3 μm, mostrando que cada comunidad responde a su propia dinámica (CN y <3 μm). Respecto al COD, sólo la comunidad CC presento valores altos de COD, este hecho no ocurrió en los tratamientos enriquecidos en la comunidad <3 μm. Producto de la duración del filtrado, los niveles de nutrientes en la comunidad concentrada son similares con la comunidad <3 μm (Tabla 4.7). Los silicatos en septiembre aumentaron un poco más del doble en comparación con abril (Tabla 4.6), debido a la mayor presencia de diatomeas en esta época. Además, se destacan bajos valores de nitritos en septiembre siendo aún más bajos en la comunidad concentrada (Tabla 4.7).

Tabla 4.7. Concentraciones iniciales de diferentes variables en los experimentos de microcosmos en tres comunidades planctónicas (CN: Comunidad Natural, <3 µm: picoplancton y CC: Comunidad Concentrada) bajo condiciones oxigenadas y con adición de sustratos metilados (MPn: Ácido metilfosfónico y TMA: Trimetilamina), septiembre 2019.

Tratamiento	CH ₄ (µM)	OD (µM)	Cl-a (mg m ⁻³)	COD (µM)	NO ₃ ⁻ (µM)	NO ₂ ⁻ (µM)	PO ₄ ³⁻ (µM)	Si(OH) ₄ (µM)
CN Ctrl	42,27	210,03	1,31	162,65	12,44	0,23	2,08	12,09
CN + MPn	40,86	175,84	1,16	100,93	14,95	0,24	1,68	11,35
CN + TMA	40,65	189,53	1,02	179,15	11,92	0,23	1,73	9,12
<3 Ctrl	40,17	201,42	0,39	151,80	13,81	0,23	1,85	8,69
<3+MPn	40,65	209,76	0,36	102,51	12,89	0,23	1,97	8,63
<3+TMA	41,46	192,07	0,35	104,45	12,27	0,15	1,56	8,22
CC Ctrl	-	194,99	0,85	107,82	13,51	0,11	1,84	9,53
CC + MPn	-	178,55	0,80	122,47	13,10	0,07	1,77	11,36
CC + TMA	-	155,93	0,83	174,24	13,59	0,09	1,48	7,91

En la Figura 4.8A se observan las variaciones en las concentraciones de CH₄ a lo largo del periodo incubado. Todos los tratamientos presentaron un patrón de aumento hacia el final del experimento, observándose claramente dos grupos diferenciados en cuanto a la cantidad de CH₄ producido. La mayor acumulación se dio a partir del cambio de condiciones de luz a oscuridad a las 46 horas aproximadamente. Se resalta un mayor reciclaje de CH₄ por parte de la comunidad concentrada tratada con TMA y su respectivo control. El reciclaje de CH₄ producido por los diferentes tratamientos evidenciaron significancias estadísticas (p<0,5).

Nutrientes como nitritos y fosfatos, se mantuvieron constantes durante las incubaciones (Fig. 4.8B y D). Los nitratos mostraron un patrón de incremento hacia el final del experimento, no obstante, en la CN estos disminuyeron a la mitad del experimento (Fig. 4.8B). Se destaca que, durante el periodo de incubación, todos los tratamientos se mantuvieron oxigenados (Fig. 4.9A). Las concentraciones de clorofila-a (Fig. 4.9B) mostraron una disminución al final de las incubaciones, sin embargo, el tratamiento CN+TMA mantuvo valores por encima ($0,94-1,30 \text{ mg m}^{-3}$) de los demás tratamientos. Altas concentraciones de COD coinciden con este periodo favorable a la surgencia, además, se destaca una acumulación de COD a la mitad del experimento dado por la CN+MPn ($339,51 \mu\text{M}$) y hacia el final del experimento por la $<3 \mu\text{m}+\text{MPn}$ ($342,65 \mu\text{M}$), los demás tratamientos no exhibieron mayores cambios (Fig. 4.9C).

Los análisis de citometría evidenciaron mayor abundancia de pico y nanoeucariontes al inicio de las incubaciones, fluctuando entre $1,81 \times 10^4$ y $3,51 \times 10^4$ (Fig. 4.10A), sin embargo, estas disminuyen en la comunidad CC producto del tiempo empleado en la filtración, no obstante, debido a este mecanismo, hubo una mayor acumulación de *Synechococcus* ($1,90 \times 10^4$ y $2,21 \times 10^4$) y bacterias ($3,82 \times 10^6$ y $4,07 \times 10^6$) en las comunidades concentradas (Fig. 4.10A y B). Cabe mencionar que al final del experimento, todos los tratamientos presentaron una disminución en el número de células, no siendo así para la comunidad $<3 \mu\text{m}$ (Fig. 4.10C)

La Tabla 4.8 resume las tasas de producción y/o consumo de CH_4 en los experimentos de microcosmos realizados en abril y septiembre. En abril, la comunidad $<3 \mu\text{m}$ tratada con TMA, mostró tasas positivas en condiciones de luz y oscuridad, igualmente ocurrió con las comunidades concentradas tratadas con compuestos metilados, esto evidencia una producción por parte de estas comunidades. En septiembre, las comunidades $<3 \mu\text{m}$ y CC mostraron tasas positivas en condiciones de luz y oscuridad, respectivamente, asimismo, tasas positivas que indican producción neta, sólo fueron manifestadas por la comunidad $<3 \mu\text{m}$ tratados con sustratos metilados, por la CC tratado con TMA y por el tratamiento control de la comunidad natural.

Tabla 4.8. Tasas de producción y/o consumo de CH₄ (nmol L⁻¹ h⁻¹) en experimentos en microcosmos en tres comunidades planctónicas (CN: Comunidad Natural, <3 µm: bacterioplancton y CC: Comunidad Concentrada) bajo condiciones oxigenadas y con adición de sustratos metilados (MPn: Ácido metilfosfónico y TMA: Trimetilamina), en abril y septiembre 2019.

Tratamiento (µm)	Abril			Septiembre		
	Total	Luz	Oscuridad	Total	Luz	Oscuridad
CN Ctrl	-0,18 ± 0,04	-0,19 ± 0,06	-0,14 ± 0,01	0,02 ± 0,02	0,03 ± 0,03	-0,02 ± 0,02
CN + MPn	-0,04 ± 0,05	-0,06 ± -0,01	0,07 ± -0,02	-0,03 ± -0,35	-0,02 ± 0,03	-0,11 ± 0,02
CN + TMA	-0,23 ± 0,07	-0,24 ± -0,05	-0,13 ± 0,03	-0,04 ± -0,46	-0,03 ± 0,03	-0,11 ± 0,02
<3 Ctrl	-0,02 ± 0,06	-0,03 ± -0,01	0,08 ± -0,01	-0,01 ± -0,09	0,00 ± 0,03	-0,07 ± 0,02
<3+MPn	-0,17 ± 0,04	-0,18 ± -0,06	-0,12 ± 0,03	0,00 ± -0,03	0,01 ± 0,03	-0,06 ± 0,02
<3+TMA	0,11 ± 0,03	0,11 ± -3,23	0,14 ± -0,02	0,01 ± 0,18	0,02 ± 0,03	-0,03 ± 0,02
CC Ctrl	-0,07 ± 0,03	-0,08 ± -0,62	-0,02 ± 0,02	-0,02 ± -0,31	-0,03 ± 0,03	0,02 ± 0,01
CC + MPn	0,10 ± 0,02	0,10 ± -0,17	0,12 ± -0,25	-0,07 ± -0,53	-0,09 ± 0,04	0,03 ± 0,01
CC + TMA	0,07 ± 0,02	0,07 ± 0,01	0,06 ± 0,04	0,01 ± 0,08	-0,02 ± 0,03	0,09 ± 0,03

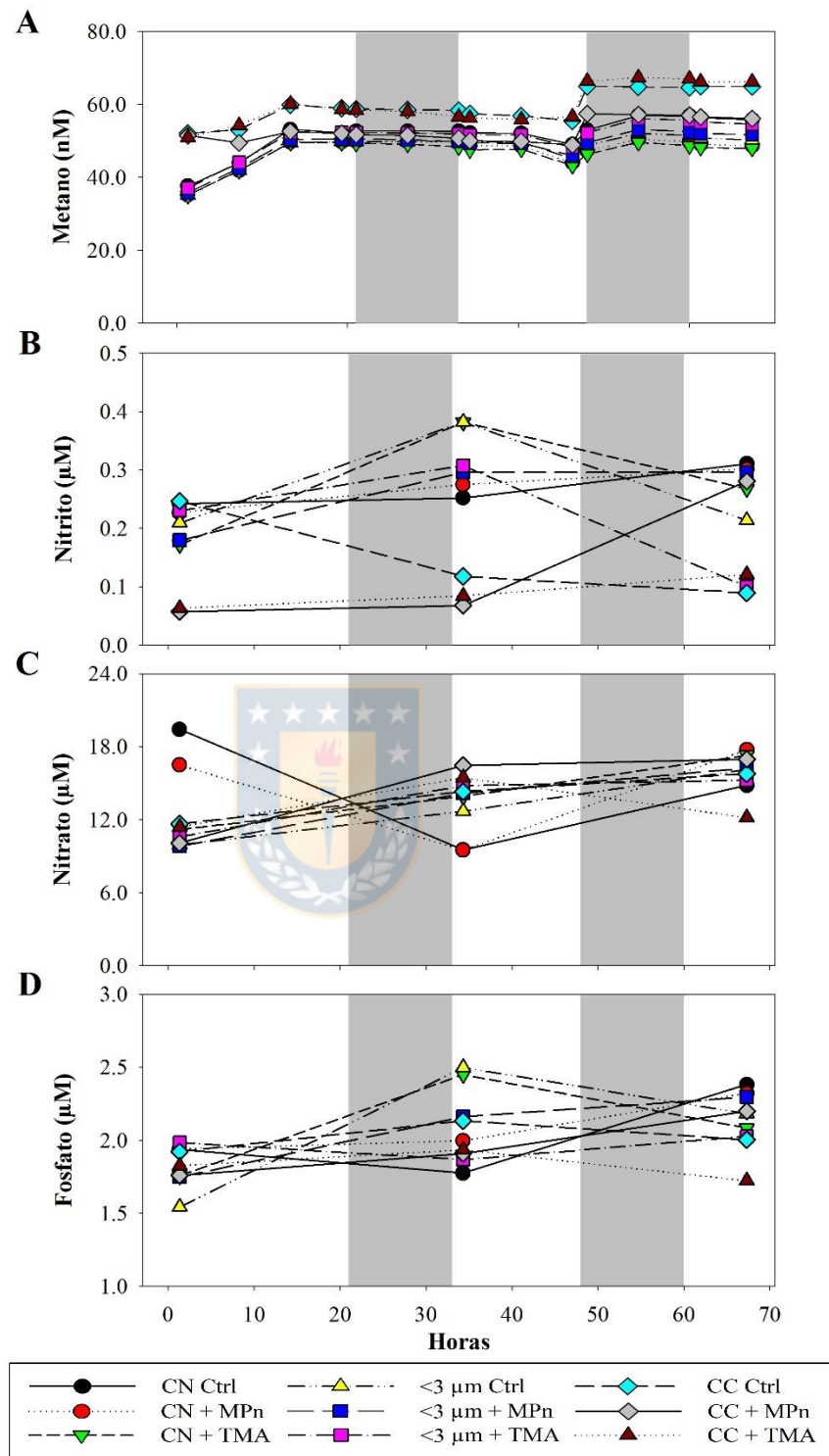


Figura 4.8. Evolución temporal de incubaciones en microcosmos en tres comunidades planctónicas (CN: Comunidad Natural, <3 μm : bacterioplancton y CC: Comunidad Concentrada) en microcosmos bajo condiciones oxigenadas y con adición de sustratos metilados (MPn: Ácido metilfosfónico y TMA: Trimetilamina), en septiembre 2019. A. Producción neta de metano (nM), B. Nitritos (μM), C. Nitratos (μM) y D. Fosfatos (μM). El fotoperiodo está representado en blanco (luz) y gris (oscuridad).

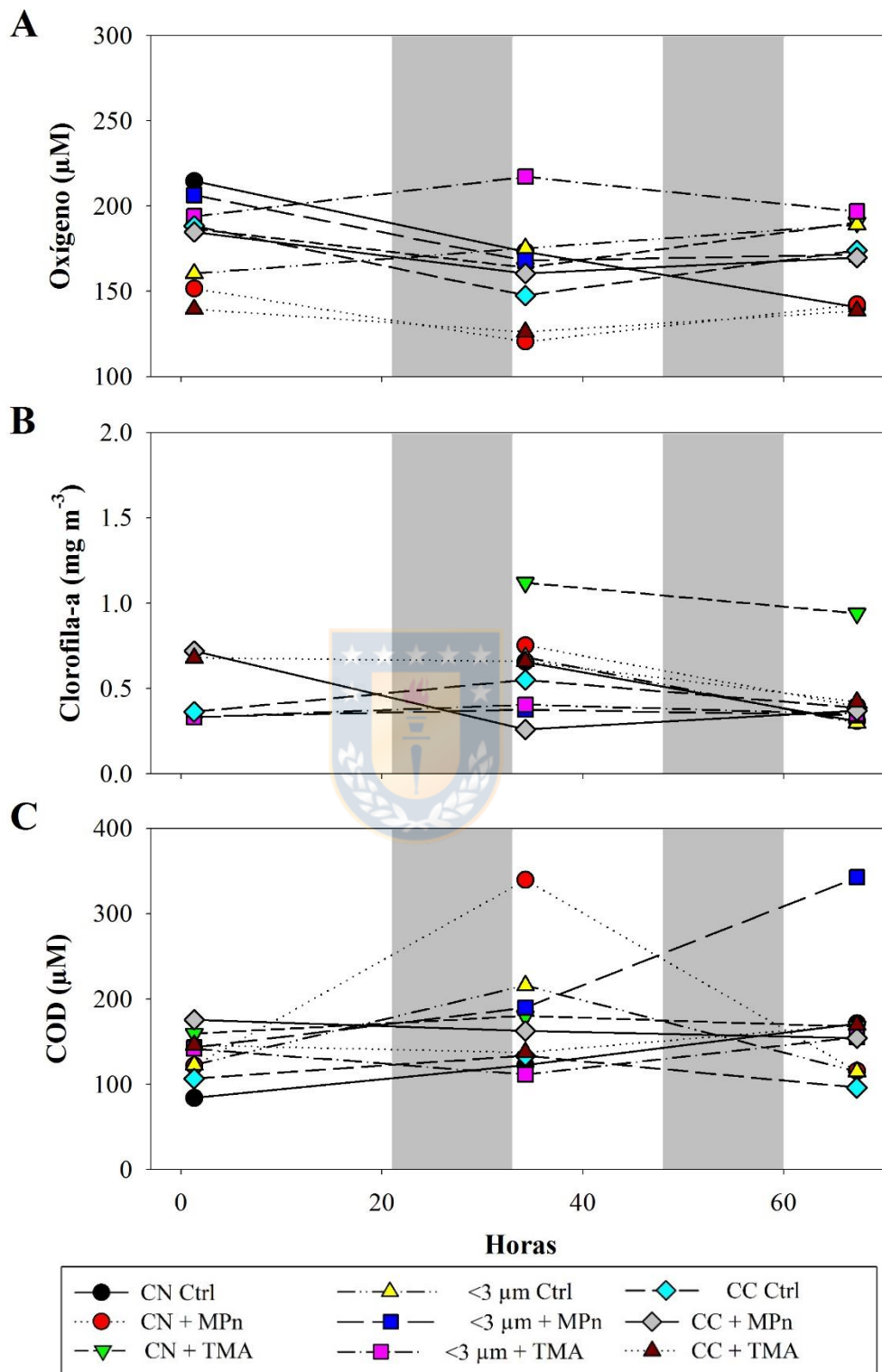


Figura 4.9. Evolución temporal de incubaciones en microcosmos en tres comunidades planctónicas (CN: Comunidad Natural, $<3 \mu\text{m}$: bacterioplancton y CC: Comunidad Concentrada) en microcosmos bajo condiciones oxigenadas y con adición de sustratos metilados (MPn: Ácido metilfosfónico y TMA: Trimetilamina), en septiembre 2019. A. Oxígeno (μM), B. Clorofila-a (mg m^{-3}) y C. Carbono Orgánico Disuelto (μM).

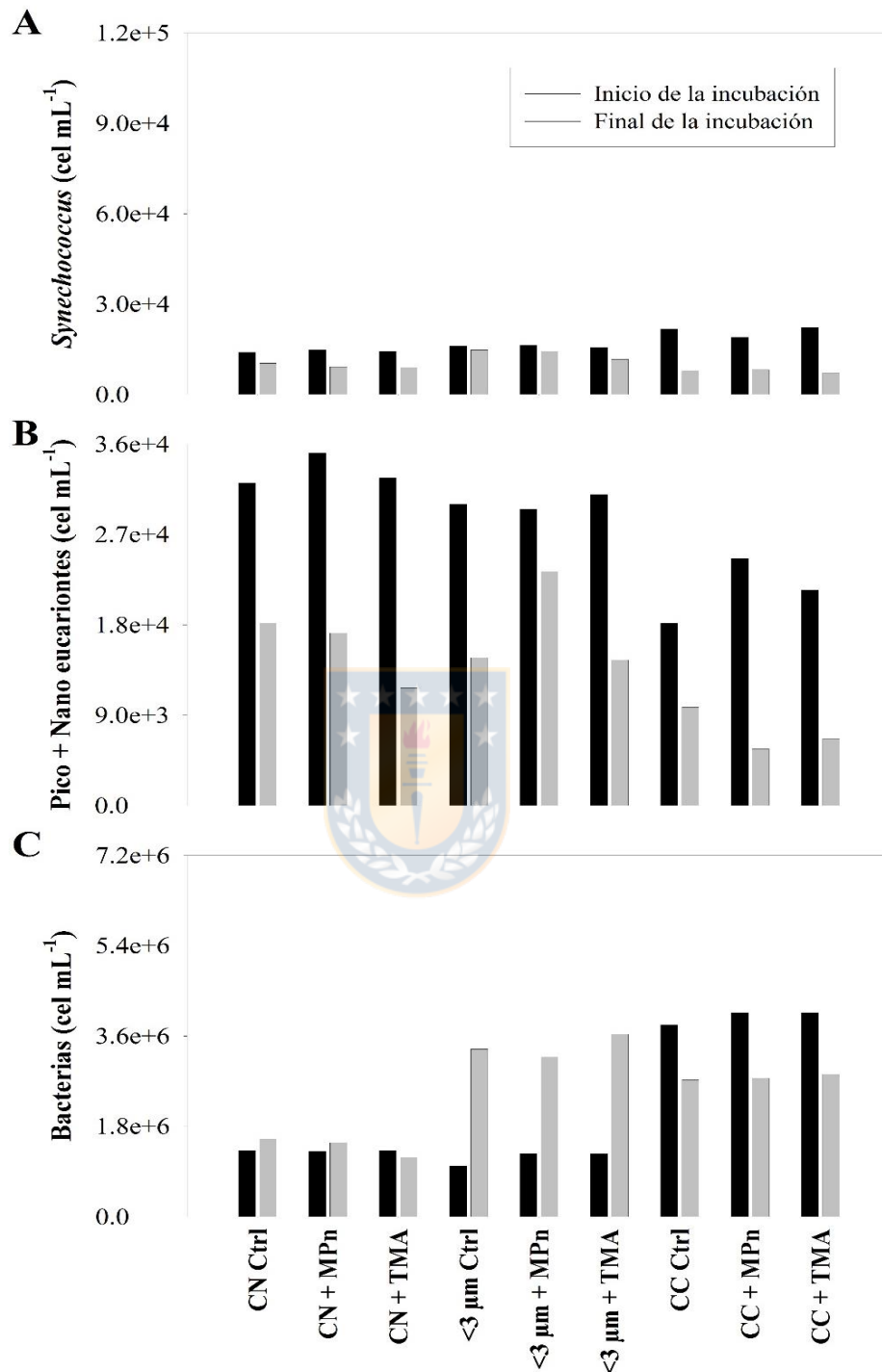


Figura 4.10. Abundancia de A. *Synechococcus*, B. Pico + nanoeucariontes y C. Bacterias en incubaciones de microcosmos en tres comunidades planctónicas (CN: Comunidad Natural, <3 μm: bacterioplancton y CC: Comunidad Concentrada) en microcosmos bajo condiciones oxigenadas y con adición de sustratos metilados (MPn: Ácido metilfosfónico y TMA: Trimetilamina), en septiembre 2019.

5. DISCUSIÓN

5.1. Mecanismos biogeoquímicos que condicionan la regeneración de metano en la columna de agua

El análisis de serie de tiempo basada en muestreos discretos o “ship based time series” es fundamental en el análisis de procesos oceanográficos y biogeoquímicos, el estudio de frecuencias de eventos y las escalas de variabilidad; en particular para estudios de tendencias decadales. Las series de tiempo permiten inferir sobre los forzantes físicos y biogeoquímicos (Valdés et al., 2002) que controlan los ciclos de carbono y nitrógeno (IPCC, 2013; Saunois et al., 2020). Esto es particularmente relevante para el estudio de gases, como el caso del CH₄, un importante gas de efecto invernadero que reacciona con radicales libres en la estratósfera, afectando el poder radiativo del planeta (Saunois et al., 2020; Wuebbles and Hayhoe, 2000).

Para el caso del CH₄, aún existe la necesidad de medir este gas en forma discreta, debido al escaso desarrollo tecnológico en la medición de gases disueltos. Mediciones continuas *in situ* basadas en tecnologías ópticas se perfilan como una buena metodología (Grilli et al., 2018; Gülzow et al., 2011; Troncoso et al., 2018) dado que implican una menor manipulación, menos contaminación atmosférica y menor variabilidad en la temperatura; variables que influyen directamente en la concentración de gas en una muestra (Troncoso et al., 2018). Además, permiten una alta resolución vertical y la identificación de “hot spot” y “hot moments” (Gülzow et al., 2011; Troncoso et al., 2018), estudios de transporte, producción y consumo de CH₄ (Grilli et al., 2018); pero están limitados por el costo, consumo de energía, baja sensibilidad en áreas con bajas concentraciones (Grilli et al., 2018), mantenimiento a bordo y variabilidad en marcados gradientes (Gülzow et al., 2011). Por ello, las medidas discretas de gases siguen siendo una metodología fundamental para el estudio de la distribución espacial y temporal.

Por ello, es necesario incidir que, dada la distribución vertical heterogénea del CH₄, un muestreo discreto es la única forma accesible hasta el momento, al menos para una serie de tiempo. En este sentido, el estudio de la distribución temporal de variables oceanográficas y biogeoquímicas como el CH₄, a una frecuencia mensual y por más de 10 años, permiten estudiar su variabilidad estacional y, en una medida más limitada, su variabilidad interanual.

La distribución del CH₄ en la columna de agua es heterogénea (Bates et al., 1996), y en general depende de la actividad microbiana y de las variables ambientales que controlan el reciclaje de dicho gas, además de procesos físicos que lo distribuyen, ya sea por difusión, advección o ebullición. Por ejemplo, los microorganismos involucrados en la metanogénesis anaeróbica en sedimentos requieren condiciones anóxicas para la producción *in situ* de dicho gas (Reeburgh, 2007), el cual puede transportarse a la superficie por advección vertical asociada a eventos de surgencia (Bange et al., 1998; Schneider et al., 2014; Weber et al., 2019) y/o ebullición o movimiento de burbujas desde los sedimentos (Weber et al., 2019).

La regeneración biológica del CH₄ depende básicamente de dos variables biogeoquímicas; el oxígeno, que es el aceptor universal de electrones y su presencia/ausencia condicionan procesos aeróbicos o anaeróbicos (Cicerone and Oremland, 1988; Wolfe, 1971) y la disponibilidad y labilidad de la materia orgánica (Borges et al., 2017; Isidorova et al., 2019; Wolfe, 1971) que actúa como dador de electrones para la regeneración de CH₄. Además, otros factores físicos, como la temperatura y la salinidad, controlan la solubilidad de este gas (Borges et al., 2017; Schneider et al., 2014; Weber et al., 2019).

Finalmente, además de la bien descrita metanogénesis anaeróbica, que toma lugar fundamentalmente en sedimentos con alta carga orgánica, aguas anóxicas y/o micro nichos anóxicos (Angle et al., 2017), se introduce el proceso de metanogénesis aeróbica. Este último ha sido de vital importancia para explicar lo que se ha observado durante los últimos 47 años (Lamontagne et al., 1973). El océano superficial oxigenado, presenta saturaciones de CH₄ por encima del equilibrio con la atmósfera

(Bange et al., 1998; Farías et al., 2009; Lamontagne et al., 1973; Scranton and Brewer, 1977); esto ha desafiado nuestra comprensión previa de procesos de formación biogeoquímicos de CH₄. En este contexto, diferentes hipótesis (Karl and Tilbrook, 1994; Oremland, 1979) se han planteado para explicar la presencia de este gas en la capa superficial oxigenada, la cual se resumen en la Figura 5.1, y se irán discutiendo en distintas secciones de esta discusión. No obstante, queda pendiente la participación relativa de estos distintos procesos, los factores que lo controlan, el rol de los microorganismos y las distintas vías metabólicas que estos pueden usar. No obstante, procesos aeróbicos que podrían explicar la presencia de este gas en la capa superficial del océano serán analizados en detalle en la sección 5.4.

En este contexto, cabe mencionar que los procesos biológicos juegan un papel fundamental (Lamontagne et al., 1973; Repeta et al., 2016). Las primeras hipótesis sugieren una producción biológica *in situ* (Scranton and Brewer, 1977), en el tracto digestivo de peces (Oremland, 1979), zooplancton (De Angelis and Lee, 1994), material orgánico particulado (Karl & Tilbrook, 1994; Sasakawa et al., 2008); a partir del 2008 la metabolización de sustratos metilados introducido por Karl et al. (2008) ha cobrado relevancia, especialmente en la última década (Figura 5.1).

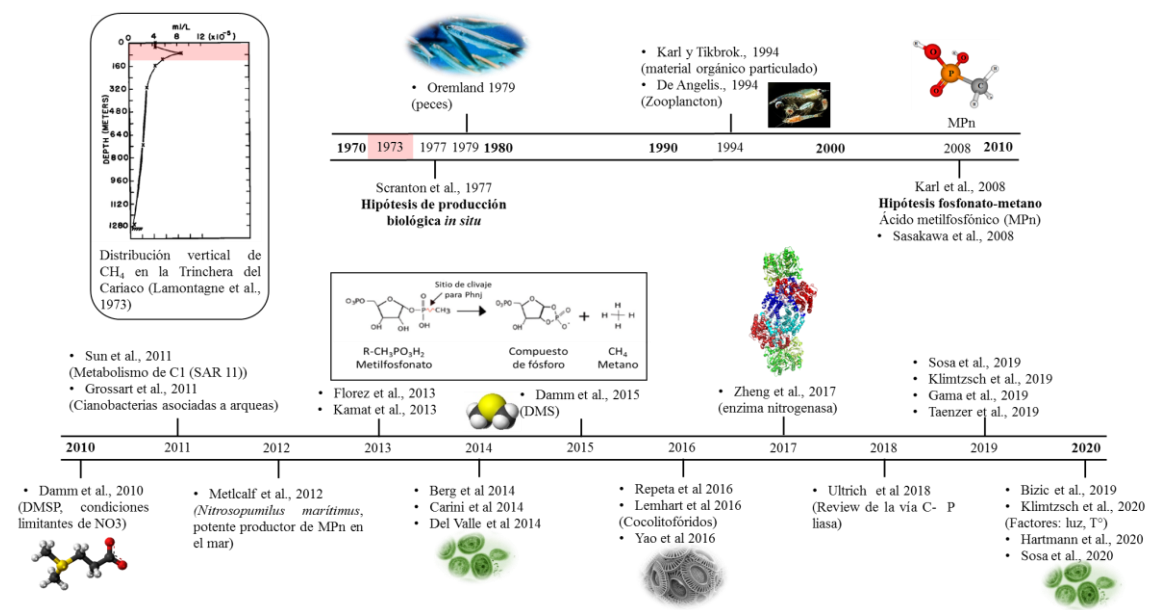


Figura 5.1. Línea de tiempo de los diferentes estudios y procesos que han ido surgiendo para analizar el origen superficial del metano.

En este sentido, el sistema de surgencia de Chile Central presenta altas concentraciones de CH_4 disuelto, que fluctúan entre 1,75 y 100,86 nM. La mayor concentración de este gas se encuentra en la capa sub superficial, particularmente cerca al fondo (Figura 2F); situación que también se refleja en los inventarios de este gas, en esta misma capa (Figura 3A, Tabla 1). Dicha fuente de CH_4 , se refleja en la distribución vertical (Fig. 5); de hecho, el perfil vertical que domina (54 %) es el de difusión-advección con incremento de la concentración de CH_4 a medida que aumenta la profundidad; aunque aún no se puede discernir el porcentaje relativo de CH_4 que se origina en los sedimentos y/o aguas de fondo.

La alta remineralización producido en los sedimentos, producto de la alta productividad biológica en la capa superficial, crea las condiciones anóxicas necesarias para la metanogénesis, y a su vez genera aceptores de electrones para el consumo del mismo, mediante la oxidación anaeróbica del CH_4 (OAM), donde se asocian arqueas con las bacterias reductoras del sulfato (Farías et al., 2004); no obstante, las tasas de metanogénesis anaeróbica en sedimentos del área son bajas, dominando la sulfato reducción (Ferderlman et al., 1997).

Existen algunos antecedentes de que la producción de CH_4 podría asociarse a la presencia de Arqueas productoras de metano metilotróficas, que generalmente aumentan durante los periodos de surgencia activa (Levipan et al., 2007); sin embargo, autores como Peters & Conrad, (1995) han demostrado que las arqueas no son funcionales en ambientes óxicos, por lo tanto, no tendrían actividad en la columna de agua, salvo sea en micro ambientes anóxicos del material particulado (Karl & Tilbrook, 1994; Sasakawa et al., 2008). Finalmente, mecanismos biogeoquímicos de generación de CH_4 en la capa superficial se discutirán en la sección 5.4.

5.2. Dinámica estacional de la generación de metano en la plataforma continental de Chile central y forzantes físicos

La plataforma continental frente a Chile central (36° S) es caracterizada por presentar eventos de surgencia, principalmente durante los meses de primavera-verano, en un porcentaje que fluctúa entre 64 - 73 % del año (Figura 2). Debido al régimen del viento durante ese periodo, predominantemente del sector SO, genera un estrés de viento sobre la superficie del océano y conduce a un ascenso de aguas hacia la superficie, con valores de estrés del viento que fluctúan entre -0,11 y 0,14 N m⁻² (Fig. 6A). Por el contrario, durante el período de otoño-invierno (27 - 36 % del año), el patrón de los vientos es mayoritariamente desde el N, con valores de estrés del viento principalmente negativos y altos (-0,27 – 0,18 N m⁻²), conducen a procesos de hundimiento de aguas superficiales y eventos de intensa mezcla vertical debido al paso de frentes de baja presión que causan tormentas (Sobarzo et al., 2007).

El viento constituye el principal forzante físico que condiciona la estacionalidad del sistema de surgencia costera en Chile central; de hecho, la variabilidad anual del ciclo del viento controla en gran parte la distribución de las variables físicas de la columna de agua como la temperatura y salinidad (Capítulo 1, Appendix A1). Al respecto, la distribución de la temperatura sigue el comportamiento esperado por el viento y la estructura de masas de aguas y, por lo tanto, refleja un acoplamiento mar-atmósfera. En la época invernal, la columna de agua mostró ser mucho más homogénea en su estructura térmica que el resto del año, llegando hasta aproximadamente los 40 m, donde en algunos meses (ejemplo: junio y julio) alcanza toda la columna de agua, debido principalmente a la mayor intensidad del viento y paso de tormentas o frentes de baja presión, sumado al hundimiento de aguas de origen SubAntártico (Ahumada y Chuecas, 1979). En verano, la temperatura mostro una mayor estratificación superficial con un mayor gradiente de temperaturas, debido principalmente a una mayor exposición de la superficie de la columna a la radiación solar y ascenso de aguas sub superficiales relativamente más frías por surgencia costera (Testa et al., 2018). La salinidad (Appendix A2), por el contrario, mostró una

estacionalidad debido a la dominancia de la surgencia costera y el ascenso de masas de agua salina de origen ecuatorial, en verano; mientras que en invierno además de la dominancia de agua SubAntártica (Ahumada and Chuecas, 1979), la zona se ve afectada por la descarga de agua dulce producto de ciclo de precipitación de la región (Testa et al., 2018).

A los eventos de surgencia descritos por Sobarzo et al. (2007), se le asocian eventos de fertilización y agotamiento de nutrientes que se traducen en una alta producción, biomasa fitoplanctónica (Anabalón et al., 2007; Daneri et al., 2012), e intensificación de las condiciones de hipoxia a anoxia en las aguas sub superficiales (Fig. 2B) (Farías et al., 2015). A su vez, estos eventos de surgencia incrementan el secuestro y exportación de carbono orgánico particulado hacia el sedimento (Grunewald et al., 2002), representado principalmente por grandes diatomeas, algunos dinoflagelados y pellets fecales (González et al., 2007).

Los gases disueltos y nutrientes no sólo se ven afectados por una dinámica física descrita (como es el caso de la temperatura y la salinidad), sino también por el reciclamiento biogeoquímico del carbono y el nitrógeno, que están mediados por la actividad microbiana. Es así que la presencia de una zona deficiente en oxígeno afecta directamente al ciclo del carbono, particularmente a la metanogénesis anaeróbica que depende de niveles bajos de oxígeno, como se mencionó en la sección 5.1.

A diferencia de las variables físicas y biogeoquímicas, el CH₄ no exhibió una marcada variación estacional. De hecho, las concentraciones de CH₄ durante el periodo de surgencia es 1,7 a 2,7 veces mayor al de no-surgencia. Ambos periodos, favorable y no favorable a la surgencia, mostraron concentraciones por encima de la saturación en la capa superficial, sin embargo, no se evidenció diferencias estadísticas en ambos periodos. Por otro lado, una correlación entre clorofila-a y CH₄ que podría explicar dichas sobresaturaciones en la superficie del océano (Bange et al., 2010), no se evidenciaron en este estudio. Esto coincide con lo encontrado en la serie de tiempo en el SO del Mar Báltico (Ma et al., 2020) y sugiere que no solo la abundancia del fitoplancton explica las posibles fuentes y/o mecanismos de regeneración de COD,

sino también en la composición del fitoplancton (Lenhart et al., 2016) y el mecanismo de acoplamiento entre fitoplancton y bacterioplancton (Azam et al., 1983). En invierno, a pesar que los niveles de clorofila-a disminuyen significativamente, altos valores superficiales de CH₄ se mantuvieron altos, esto pudo estar asociados con la descarga de los ríos (Bello, 2016; Testa et al., 2018), como lo observado en Bahía de Benguela (Rao and Sarma, 2017).

Finalmente, la existencia de una variación interanual en el CH₄ durante los 12 años de medición no se puede explicar claramente debido a una débil correlación con variaciones en biomasa fitoplanctónica; sin embargo, esta variabilidad parecer estar asociada al ciclo ENSO, que cambia la dinámica física, química y biológica en el Pacífico Sur Oriental, especialmente en su fase cálida (Escribano et al., 2004; Graco et al., 2017). De hecho, durante los años 2006-2007, 2009-2010 y 2015-2016 se registraron eventos El Niño en el Pacífico; aunque de diferente génesis (El Niño costero, Niño Modoki, Niño Gotzila) e intensidades, estos aparentemente tienen un efecto en la distribución de las variables en la columna de agua, en donde sólo en los años 2010 y 2015 la distribución de CH₄ mostraron comportamientos anómalos, sin acumulación de CH₄ en el agua de fondo, aguas más salinas y sin cambios en la oxigenación, lo que sugiere cambios en las condiciones hidrográficas normales. No obstante, debido a la ubicación de ésta área, se le puede considerar como la región más meridional donde la onda Kelvin pueda llegar más alterada, en comparación con Perú (Dewitte et al., 2012) por ejemplo, además que dos eventos de El Niño no son iguales (Wyrski, 1975) y evidencias de que el incremento de estos eventos puede estar relacionados con el cambio climático antropogénico (Yeh et al., 2009).

5.3. Intercambio de metano en la interfaz mar-atmósfera.

El océano se comporta como una fuente menor de CH₄ hacia la atmósfera (hasta un 3% de las emisiones globales), respecto a fuentes terrestres (Saunio et al., 2020). Las bajas emisiones de CH₄ marinas a pesar de la existencia de múltiples fuentes y

reservorios, se cree que es debido a barreras que previenen que el CH₄ salga a la superficie, siendo la oxidación aeróbica del CH₄, llevada a cabo por los metanótrofos, la barrera más importante ya que estos organismos requieren CH₄ como fuente de carbón y energía (Hanson and Hanson, 1996; James et al., 2016).

No obstante, las zonas costeras concentran hasta el 75% de las emisiones oceánicas, constituyéndose, dada la reducida área, en importantes emisores de CH₄ hacia la atmósfera (Bange et al., 1994; Weber et al., 2019). Las zonas costeras, por lo tanto, concentran la mayor parte de regeneración de CH₄ (Bakker et al., 2014) y parte de esta producción ha sido explicada por la alta producción biológica que mantienen estas áreas (Karl and Tilbrook, 1994) y en el caso de zonas costeras sujetas a surgencia, el intercambio de este gas con la atmósfera se ve favorecido por procesos advectivos verticales (Kock et al., 2008) y ciertas características geomorfológicas como una baja profundidad (Weller et al., 2019).

En la Tabla 5.1 se muestra una compilación de flujos de CH₄ en distintos sistemas. En relación a los sistemas estudiados, se debe recalcar que las regiones costeras presentan flujos mayores de hasta un orden de magnitud mayores que el océano abierto. Sin embargo, Sansone et al. (2001), para el Pacífico Norte reportó flujos que aumentan hacia el oeste (océano abierto), esto debido a la disminución promedio de la velocidad del viento desde el giro subtropical del Pacífico Norte hasta la plataforma mexicana, evidenciando nuevamente que el viento actúa como forzante en los flujos de CH₄ en la interfaz mar-atmósfera.

Los flujos de la zona costera de Chile central variaron entre 1,27 y 47,02 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{d}^{-1}$; estos son relativamente altos comparado con la surgencia de la costa oeste de Canadá (Capelle and Tortell, 2016), mar arábigo (Bange et al., 1998), el mar Báltico (Bange et al., 2010), incluso al NO de Mauritania (Brown et al., 2014); sin embargo, para este último Kock et al. (2008), reportó flujos mayores, esto debido a la intensidad de la surgencia presentado durante su estudio que fue 13,3 veces mayor comparado a la reportada por Brown et al. (2014). Se resalta los altos flujos reportados por Florez-Leiva et al. (2013) para esta zona de estudio (Tabla 5.1), esto se debe a que los datos

de vientos obtenidos por los autores (3,5 a 15,6 m s⁻¹), fueron mayores en comparación con nuestro estudio (0,64 a 13,38 m s⁻¹). Por otra parte, no se encontraron variaciones en los flujos durante los periodos favorables y no favorables la surgencia, lo que sugiere una continua regeneración e intercambio de CH₄ durante todo el año, aunque la surgencia juega un papel importante en la desgasificación (Brown et al., 2014), evidenciándose en los promedios calculados para cada periodo de 1,66 a 6,22 mmol m⁻² en el periodo no favorable y favorable a la surgencia, respectivamente.

Finalmente, la plataforma continental localizada entre los 36°10'52.07" S y 36°47'20.03" S y entre la línea de costa y los 200 m de profundidad (equivalente a 41 150 km²; Farías et al., 2015), intercambia con la atmosfera una cantidad equivalente a 2,5 Gg CH₄ año⁻¹. La plataforma costera de Concepción, representa el 3.5% del área global de zonas de surgencias (EPA, 2010), por lo tanto, esta zona, aunque pequeña en área, representa una fuente significativa de CH₄ hacia la atmósfera, teniendo que cuenta que representa entre 0,1 y 0,4 Tg CH₄ año⁻¹ de las emisiones globales de zonas costeras, sin incluir estuarios, el cual varía entre 1 a 4 Tg CH₄ año (Saunio et al., 2020), sin embargo, se resalta su importancia en las emisiones globales para las zonas de surgencia, en donde esta zona contribuye con el 1,7 al 13% de las emisiones globales, el cual varía de 0,02 a 1,5 Tg C año (Bakker et al., 2014), esto último se evidencia con las emisiones dadas por los diferentes ecosistemas de surgencia (Bange et al., 1998; Brown et al., 2014; Kock et al., 2008).

En cuanto a la variabilidad interanual de los flujos, estos no estuvieron asociados a una variabilidad del viento en los periodos favorables y no favorables a la surgencia (Tabla 2), sugiriendo que esto puede deberse a algunas condiciones oceanográficas de la zona o condiciones biogeoquímicas e hidrográficas en la columna de agua no advertidas en este estudio.

Tabla 5.1. Recopilación de flujos de metano hacia la atmósfera en diferentes sistemas del océano.

Localización	Concentración de CH ₄ en la capa superficial		Flujos de CH ₄ hacia la atmósfera		Referencias
	nM	% Saturación	Flujos diarios (μmol m ⁻² d ⁻¹)	Emisión anual por área (Gg CH ₄ año ⁻¹)	
Atlántico Nororiental subtropical (Océano abierto)	3,52	-	0,11	-	Scranton y Brewer (1977)
Mar Árábigo					
- Surgencia costera	2,25 ± 0,10	116 ± 8	1,37 - 2,33	0,50 - 0,90	Bange et al. (1998)
- Océano abierto	-	113 ± 5	1,06 - 1,87	1,00 - 1,80	
Pacífico Nororiental subtropical					
- Giro	2,84	-	3,00	-	Sansone et al. (2001)
- Surgencia costera	3,51	-	0,77	-	
Bahía de Benguela (BB)					
- Sur BB	32,73	-	-9,98 – 0,35	-	Berner et al. (2003)
- Centro BB	26,00 - 100,00	-	-24,57 – 27,53	-	
- Norte BB	13,50 - 120,00	-	145,00 – 39,00	-	
Atlántico Nororiental tropical (Surgencia Mauritania)	2,10 – 5,50	-	26,15 – 45,67	1,60 - 2,90	Kock et al. (2008)
Mar Báltico (Bahía Eckernförde)	6,60 - 235,00	1785 - 8340	6,20 - 14,70	-	Bange et al. (2010)
Sistema de Surgencia de Central Chile	3,08 - 16,00	125 - 550	11 – 115	-	Florez-Leiva et al. (2013)
Surgencia de Mauritania (NO de África)	2,20 ± 0,30	101,70 ± 14,00	10,17 ± 8,51	0,77 ± 0,64	Brown et al. (2014)
Mar Báltico (Sur de la isla de Gotland)	5,10	137%	-	-	Schneider et al. (2014)
Surgencia de la Columbia Británica (Costa Oeste de la Isla de Vancouver, Canadá)	6,70 - 9,50	-	2,5 a 34,1	-	Capelle y Tortell (2016)
Zona costera Belga					
- Cerca a la cota	670	-	345,24	-	Borges et al. (2017)
- Alejado de la costa	4	-	76,72	-	
Giro subtropical del Pacífico norte (Estación ALOHA)	2,00 – 2,30	99,00 - 105,00	-0,2 - 1,5	-	Wilson et al. (2017)
Suroeste del Mar Báltico	187,20 – 217,80	129 - 5563	0,3 - 746,3	-	Ma et al. (2020)
Surgencia costera de Chile central	1,75 – 54,64	6,97 – 1508,95	1,27 – 47,02	1 – 4	Este estudio

5.4. Mecanismos de generación de metano en la capa superficial del océano costero de Chile central

Como se ha mencionado anteriormente, el océano superficial oxigenado exhibe niveles sobresaturados de CH₄ con respecto a la atmósfera (Bange et al., 1994; Lamontagne et al., 1973), hecho denominado como la “paradoja del CH₄ oceánico” (Lamontagne et al., 1973), donde los procesos biológicos juegan un papel fundamental en este exceso. En este contexto, en los últimos años ha cobrado relevancia la metabolización de sustratos orgánicos metilados como mecanismos de generación de CH₄ (Karl et al., 2008; Metcalf et al., 2012; Repeta et al., 2016). Entre estos sustratos se resalta el ácido metilfosfónico, observado principalmente en aguas con déficit de fósforo (e.g., ortofosfatos) (Carini et al., 2014; Repeta et al., 2016; Sosa et al., 2020; Wilson et al., 2017); la metionina (Lenhart et al., 2016), DMSP, DMS (Damm et al., 2015; Florez-Leiva et al., 2013) y el dimetilsulfóxido (DMSO) (Althoff et al., 2014). Además, se debe incluir las aminas metiladas, tales como trimetilamina (Bižić et al., 2020; De Angelis and Lee, 1994). En este contexto, el conjunto de mecanismos biogeoquímicos y el uso de diferentes sustratos orgánicos metilados para la generación de CH₄ es llamado metanogénesis metilotrófica, donde se ven implicados compuestos de C-1 y la escisión de un grupo metil (CH₃) en los enlaces C-P, C-S y C-N.

Por tanto, mecanismos de desmetilación (escisión del enlace del grupo metil) y la presencia del grupo metilo que provienen de estos compuestos metilados podrían tener un rol muy importante en la producción de CH₄ en la capa superficial oxigenada (Lenhart et al., 2016). Cabe destacar también que la producción de CH₄, podría estar mediado por la asimilación de compuestos inorgánicos como el bicarbonato durante la fijación autotrófica del carbono (Günthel et al., 2020; Lenhart et al., 2016).

5.4.1. El rol del fitoplancton en la generación de metano

En experimentos envenenados con HgCl_2 (Fig. 4.2. A), no hubo acumulación o consumo aparente de CH_4 , pudiendo concluir que el o los procesos involucrados en el reciclaje de CH_4 , es netamente biológico. En este sentido, las tasas de reciclaje de CH_4 estimadas en este estudio (experimento en viales en diciembre y enero) mostraron una dominancia de la acumulación neta de CH_4 con el tiempo de incubación (valores positivos) (Tabla 4.2); aunque con tasas de acumulación o consumo neto muy variables que fluctuaron entre $-0,04$ y $0,46 \text{ nmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Esta variabilidad podría estar asociada a la interacción entre fitoplancton fotosintético (de distintas fracciones de tamaño) y el bacterioplancton.

La luz fue una variable muy importante que influyó en las tasas de acumulación de CH_4 en los experimentos realizados durante los meses favorables a la surgencia (diciembre y enero); en la fracción $<150 \mu\text{m}$ que incluyen el micro, nano y picoplancton, las tasas de reciclaje de CH_4 en condiciones iluminadas fueron mayores que en condiciones de oscuridad, indicando que el fitoplancton media la producción de CH_4 o que genera sustratos que estimulan la producción de este gas por el bacterioplancton (Tabla 8). No obstante, la fracción $>3 \mu\text{m}$, donde se esperan cianobacterias y bacterias heterótrofas, la tasa de acumulación de CH_4 fue mayor en oscuridad.

La actividad fotosintética y la presencia de ciertas especies de fitoplancton han sido reportados e involucradas en la regeneración de CH_4 (Klintzsch et al., 2020; Lenhart et al., 2016; Scranton and Brewer, 1977); esto debido a su capacidad de liberación de COD a través de exudación o durante la senescencia, incluso durante el pastoreo (Strom et al., 1997), controlando parcialmente el crecimiento del bacterioplancton que utiliza gran parte del COD; como lo reportado en nuestra área de estudio donde se reporta un estrecho acoplamiento entre el fito y bacterioplancton (Cuevas et al., 2004; Troncoso et al., 2003). De hecho, para la zona de estudio, se ha indagado sobre el rol de las bacterias en la red alimentaria microbiana, donde las

bacterias canalizan cerca del 10 - 24% de la productividad primaria (Troncoso et al., 2003), siendo mayor en primavera (17 - 61 %) que en invierno (6 - 34 %) (Cuevas et al., 2004; Montero et al., 2007).

Por otro lado, otra posible explicación de una mayor acumulación de CH₄ en condiciones de luz puede deberse a que los metanótrofos se inhiben en presencia de luz (Dumestre et al., 1999), de esta manera no existe consumo de CH₄ por oxidación aeróbica y la tasa neta (producción menos consumo) permite la mayor acumulación de CH₄. Además, experimentos realizados por Zheng et al. (2017) y Klintzsch et al. (2020) señalan que la tasa de producción de CH₄ incrementó a medida que se incrementó la intensidad de luz, de 30 a 2 670 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Klintzsch et al., 2020). Esto podría guardar relación con las mayores concentraciones de CH₄ que encontramos en la capa superficial de la columna de agua (Fig. 2), especialmente en los meses de verano, donde la intensidad de luz es mucho mayor (Testa et al., 2018).

Además, la presencia de cianobacterias fotosintetizadoras como *Prochlorococcus sp.* y *Synechococcus sp.* también pueden producir CH₄ por sí solas pero a intensidades de luz menores a 20 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Bižić et al., 2020), en este sentido, en el área de surgencia de Chile central, la presencia de *Synechococcus sp.* podría estar explicando la sobresaturación en la capa superficial oxigenada, aunque las tasas de regeneración de CH₄ dadas por este organismo sean menores en comparación con *Prochlorococcus sp.* (Bižić et al., 2020).

La importancia de la luz en la producción de CH₄ también se evidencia en lo encontrado por Berg et al. (2014), donde la iluminación moderada podría estar activando la enzima nitrogenasa (implicadas en la fijación de N₂) en organismos fotosintéticos como cianobacterias (Svensson, 1984); de esta manera se pueden estar liberando los H necesarios para la formación de CH₄ por parte de las arqueas metanogénicas asociadas (Berg et al., 2014). No obstante, en cultivos axénicos de bacterias fototróficas como *Rhodospseudomonas palustris*, la producción de CH₄ ocurre mientras se fija N₂ y CO₂ simultáneamente, involucrando sólo a la enzima nitrogenasa -Fe dependiente, la misma que fue detectada en el genoma de diversos organismos aerobios, anaerobios, fotótrofos, quimioautótrofos y quimioheterótrofos

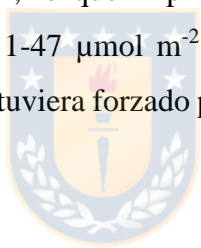
(Zheng et al., 2017), evidenciando la relación entre el ciclo del N con la producción de CH₄.

En este sentido, en nuestro estudio, al no tener cultivos axénicos, no podemos concluir si existe interacción entre cianobacterias y arqueas para la producción de CH₄ (Berg et al., 2014; Grossart et al., 2011); estas últimas pudiendo coexistir en micronichos anóxicos. Cabe destacar que, si bien los experimentos transcurrieron en condiciones oxigenadas, bloqueando la actividad de arqueas metanogénicas (Peters y Conrad, 1995), no se puede descartar la formación de micronichos anóxicos a medida que transcurrió el experimento, no obstante, es discutible dado el volumen de los viales (20 mL).

Es necesario mencionar que, a pesar de no haber encontrado una correlación entre clorofila-a y CH₄ en el estudio de serie de tiempo (capítulo 1), y la ausencia de experimentos con el microplancton (<150 µm) tratado con los sustratos metilados; no se descarta que este gas se genere a partir de compuestos sintetizados por el fitoplancton, ya que la dinámica de generación de CH₄, es muy rápida, no pudiendo capturar mecanismos biogeoquímicos de alta frecuencia con una serie de frecuencia mensual. Al respecto, se ha descrito que determinadas especies de fitoplancton está vinculado a la síntesis de fosfonatos (Kittredge et al., 1969; Kittredge and Roberts, 1969), DMSP (Keller et al., 1989; Stefels, 2000; Yoch, 2002) y TMA (Kneifel, 1979), lo que posteriormente puede ser metabolizado por las comunidades bacterianas como SAR 11 (Carini et al., 2014) y/o Pelagibacter (Sosa et al., 2020), aspecto que será discutido en la sección 5.5.

Por último, recientemente se ha evidenciado que algas marinas como *Emiliania huxley*, *Chrysochromulina* sp. y *Phaeocystis globosa* (Klitzsch et al., 2019; Lenhart et al., 2016), y de agua dulce como diatomeas, criptofitas y algas verdes (Hartmann et al., 2020), incluidas algunas cianobacterias (Beverdors et al., 2010; Bižić et al., 2020; Hartmann et al., 2020; Yao et al., 2016) producen CH₄ por sí mismas, esto último podría evidenciarse por la presencia de cianobacterias cuantificadas en nuestros experimentos (Fig. 4.7A y 4.10A). En este sentido, esto puede dar luz a nuevas líneas de investigación sobre la sucesión fitoplanctónica y el rol de determinadas especies en

la regeneración de CH₄, especies que no necesariamente tienen una abundancia o biomasa relativamente importante. De hecho, en la zona de estudio existe un recambio de especies de fitoplancton desde diatomeas (70%), tintínidos y dinoflagelados micropláctónicos, donde destacan los géneros *Skeletonema*, *Chaetoceros* y *Thalassiosira* (González et al., 2007) a pequeños organismos del nano (nanodínoflagelados) y picoplancton autótrofo como cianobacterias (*Synechococcus sp.*), acompañado de pequeños ciliados (Anabalón et al., 2007; Collado-Fabbri et al., 2011; Testa et al., 2018). El cambio sucesional del fitoplancton y la ausencia de marcadas diferencias en el inventario de CH₄ en la capa superficial puede ser explicado parcialmente por la generación de CH₄ en la capa superficial. A modo de ejercicio, considerando una tasa de acumulación de 0,03 nmol L⁻¹ h⁻¹ (Tabla 4.2) y que esta producción transcurre en los 12 m superficiales (12.64 nM), entrega una tasa de producción de 8 μmol m⁻² d⁻¹, lo que implica un aporte a los flujos de CH₄ a la atmósfera que fluctúan entre 1-47 μmol m⁻² d⁻¹. Esto significa un aporte más que importante, si el sistema no estuviera forzado por la advección vertical de la surgencia costera



5.4.2. El rol del bacterioplancton en el reciclaje de metano

En la sección anterior se delinearán nuevas investigaciones sobre la producción de CH₄ directamente por organismos fotosintéticos como cianobacterias, tanto de agua dulce, (Hartmann et al., 2020; Yao et al., 2016) como agua de mar (Beverdors et al., 2010; Bižić et al., 2020). Para el caso de esta zona de estudio, el picoplancton tiene una abundancia muy baja (Morales y Anabalón, 2012), con altas concentraciones en otoño-invierno (Collado-Fabbri et al., 2011), donde las cianobacterias (*Synechococcus sp.*) tienen una abundancia de 10² a 10⁵ cel mL⁻¹ (Collado-Fabbri et al., 2011) con 0.1 x 10⁶ cel mL⁻¹ en otoño y 0.03 x 10⁶ cel mL⁻¹ en primavera (Alarcón, 2008), mostrando que este organismo puede cobrar relevancia durante el periodo no favorable a la surgencia.

Se debe mencionar que una de las falencias de este estudio fue no corroborar inicialmente el número de microorganismos para cada comunidad (micro, nano y picoplancton). No obstante, la cuantificación e identificación de organismos del picoplancton ($<3\mu\text{m}$) proveen importantes indicios; además corrobora la efectividad de la concentración de células en la comunidad concentrada (Fig. 4.7 y 4.10). Los experimentos en microcosmos evidencian lo anteriormente descrito, donde el pico y nanoplancton son abundantes en abril (Fig. 4.7B) y el mayor número de células está dado por *Synechococcus sp* (Fig. 7.4A). Sin embargo, se resalta el mayor número de pico y nanoeucarionte en septiembre (Fig. 4.10B), esto debido a que éstas abundan durante y hacia la transición a la surgencia (Anabalón et al., 2007).

Los experimentos en viales también evidenciaron que la máxima acumulación de CH_4 transcurrió en oscuridad con tasas 5,4 veces mayor que en condiciones de luz en la comunidad del bacterioplancton ($<3\mu\text{m}$) (Tabla 8, Fig. 4.1A). Esto puede ser explicado por la mayor actividad de bacterioplancton heterotrófico, donde la producción de CH_4 podría depender de la regeneración del COD, parte de los cuales, son productos fotosintéticos generados durante la luz y de los compuestos almacenados durante el periodo de oscuridad. De este modo, el reciclaje de COD y nutrientes por la comunidad $<3\mu\text{m}$ puede ser explicada por exudados fitoplanctónicos y la muerte de los mismos por lisis viral (Krabberød et al., 2017). La segunda explicación plausible de acumulación de CH_4 en la fase oscura es la posible competencia entre el fito y bacterioplancton; es conocido que el fitoplancton puede utilizar compuestos orgánicos disueltos ya que ocasionalmente tiene comportamiento mixótrofo, en donde las algas pequeñas no tienen dependencia de nutrientes inorgánicos (Zubkov and Tarran, 2008).

En enero, el cambio de fase de luz a oscuridad produjo una acumulación importante de CH_4 en la comunidad $<150\mu\text{m}$ (Figura 4.2A). Posiblemente esto pudo afectar el metabolismo de los metanótrofos traduciéndose en una mayor acumulación de CH_4 a inicios del periodo de incubación en condiciones de oscuridad, pero que fue rápidamente consumida por los metanótrofos que se activan en condiciones de oscuridad (Dumestre et al., 1999). Definitivamente, con lo anteriormente descrito se

resalta la influencia de los parámetros ambientales como la intensidad y duración de la luz en los procesos de reciclaje de CH₄, como lo recientemente evaluado por Klintzsch et al. (2020). Por lo tanto, se determina que la producción de CH₄ es un proceso dependiente de la luz, pero queda aún abierta la pregunta de qué organismos podrían estar mayormente involucrados, ya que claramente la luz y oscuridad favorecen la producción de CH₄ para microplancton y el bacterioplancton, respectivamente.

Finalmente, Klintzsch et al. (2019) concluyeron que la producción de CH₄ depende del crecimiento de algas y que es poco probable que las bacterias por sí solas sean responsables de la producción de CH₄, hecho contrario a lo que se encontró en este estudio, ya que se evidenció que el bacterioplancton produjo CH₄ en condiciones experimentales, sin embargo debido a la limitancia de los experimentos, no se puede concluir qué organismos específicamente podrían estar activo durante el reciclaje de este gas, pero no se descarta la presencia de organismos autótrofos (Ej: *Synechococcus sp.*) que podrían estar aportando COD al medio para la producción de CH₄ o incluso estar produciendo este gas *per se* (Bižić et al., 2020).

5.5. Potenciales fuentes orgánicas que estimulan la regeneración heterotrófica de metano en la capa superficial

Para que exista producción de CH₄, deben existir sustratos orgánicos apropiados y una comunidad heterotrófica capaz de utilizarlos (Dinasquet et al., 2018, 2013). En este sentido la generación de CH₄ en condiciones óxicas es llevada a cabo por el metabolismo bacteriano heterotrófico, la cual media mecanismos de desmetilación (Bižić-Ionescu et al., 2018; Karl et al., 2008; Lenhart et al., 2016; Repeta et al., 2016), es decir por escisión del grupo metil (Tabla 1.2)

Cabe señalar que, en el área de estudio, se asume un alto nivel de disponibilidad de COD debido a la alta productividad primaria reportada en la zona (Daneri et al., 2000; Testa et al., 2018), donde el plancton fotosintético produce material orgánico

particulado y disuelto autóctono, el cual constituye una fuente de N y P para microorganismos heterótrofos (Hansell et al., 2009); igualmente MOD alóctono proveniente de ríos también pueden ingresar a la zona estudiada (Vargas et al., 2013). No obstante, existe muy pocos reportes de concentraciones de COD en la zona de surgencia de Chile central, con valores de alrededor de $\sim 100 \mu\text{M}$ en la capa superficial (Cuevas et al., 2004). En este sentido, mediciones realizadas en la ST 18, durante los años 2019-2020 en serie de tiempo, muestran concentraciones de COD entre 54,92 y $116,81 \mu\text{M}$ en la capa superficial entre 0 - 20 m (Fig. 5.2), coincidentes con los valores mencionados anteriormente.

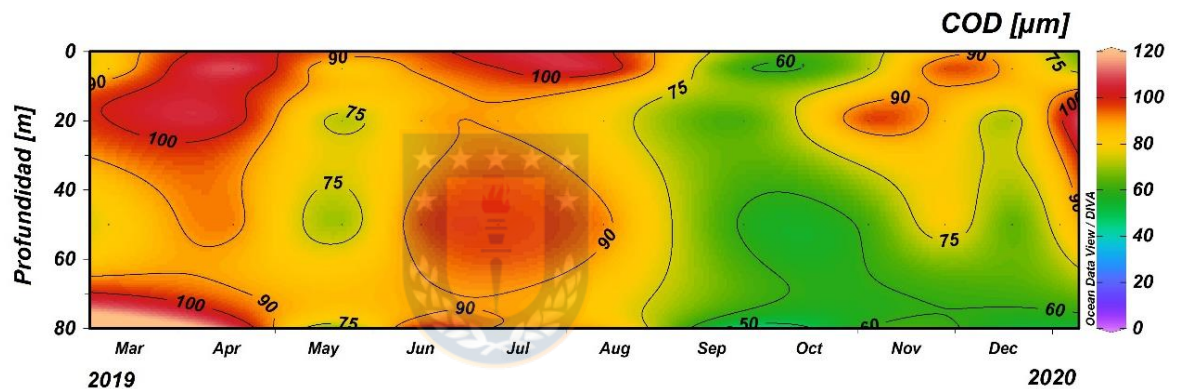


Figura 5.2. Distribución vertical del Carbono Orgánico Disuelto en una estación fija (ST18) sobre la plataforma continental de la zona de surgencia de Chile Central (Tenorio et al. data no publicada)

Los experimentos en viales tratados con MPn, mostraron mayor tasa de producción de CH_4 en la comunidad $<3 \mu\text{m} + \text{MPn}$ (en mayo; Tabla 4.5) en condiciones de oscuridad (Fig. 4.3A y 4.4A); esto coincide con los resultados encontrados por Sosa et al. (2020) quienes, mediante experimentos, mostraron que las bacterias que poseen la enzima C-P liasa, son ubicuos en las aguas marinas (Sosa et al., 2020) y, por lo tanto, podrían estar en las aguas de plataforma continental de Chile central. La producción de CH_4 en la columna de agua a partir de fosfonatos es un proceso ubicuo (Kittredge et al., 1969; Kittredge and Roberts, 1969), sin embargo las

velocidades de producción serían mucho más bajas en comparación con el mar abierto (Repeta et al., 2016; Sosa et al., 2020). De la misma manera, diferentes experimentos en ambientes oxigenados corroboran que la metabolización de MPn por parte del bacterioplancton tiene un rol significativo en la formación de CH₄ (Karl et al., 2008; Metcalf et al., 2012; Repeta et al., 2016; Wang et al., 2017), además la presencia de fosfonatos en la columna de agua sugiere una fuente biótica de este gas en la capa superficial (Kittredge et al., 1969; Kittredge and Roberts, 1969; Repeta et al., 2016). Por otro lado, Bižić et al. (2020) corroboraron que la producción de CH₄ por el bacterioplancton fotosintético como las cianobacterias, no estuvieron relacionadas con la enzima C-P liasa, ya que en cultivos axénicos y mediante datos transcriptómicos no se detectaron la presencia de dicha enzima en estos organismos.

La enzima metilfosfonato sintasa, sintetiza ácido metilfosfónico (MPn) en organismos marinos (Born et al., 2017); ha sido encontrada en microorganismos que abundan en el océano como *Pelagibacter ubique* (clado SAR 11 de las alfa proteobacterias) (Morris et al., 2002) y el arqueon *Nitrosopumilus maritimus* (Metcalf et al., 2012). A su vez el complejo enzimático C-P liasa, que ha sido reportado en una amplia diversidad de microorganismos autótrofos y heterótrofos (Carini et al., 2014; Sosa et al., 2020), es la responsable de la escisión del grupo -CH₃ del MPn para la formación de CH₄ (Kamat et al., 2013, 2011). Por lo tanto, el MPn, representa una fuente biótica de CH₄ en la capa superficial (Carini et al., 2014; Metcalf et al., 2012; Repeta et al., 2016) en condiciones limitantes de PO₃⁴⁻ (Carini et al., 2014; Damm et al., 2010; Repeta et al., 2016), ello puede explicar la sobresaturación de CH₄ en la capa superficial oxigenada de los océanos (Lamontagne et al., 1973; Scranton y Brewer, 1977). Los resultados muestran que éste, es un proceso que también puede transcurrir en agua costeras, con déficit de nitratos como es el caso del área de surgencia de Chile central.

Respecto a la TMA, este es un sustrato altamente esperado en sistemas costeros (Sun et al., 2019), son productos de degradación de la glicina-betaina por parte de varios grupos de fitoplancton (Kneifel, 1979) y de la carnitina en bacterias (Rebouche y Seim, 1998). La TMA ha sido detectada en agua de mar con niveles que oscilan entre

0 a 22 nM (Cree et al., 2018; Gibb et al., 1999). Contrario a lo que se creía, la presencia de TMA no evidenció producción alguna de CH₄ por parte del bacterioplancton (Fig 4.4), por el contrario, las concentraciones de este gas fueron menores que el tratamiento control, esto coincide con lo encontrado por Bižić-Ionescu et al. (2018). Sin embargo, se destaca que los datos de los tratamientos con trimetilamina, deben ser examinados con cautela, ya que, al no medir la concentración del sustrato a lo largo de la duración del experimento, puede que haya existido una alta tasa de reciclaje o que también la cantidad de sustrato agregado fue mucho menor al necesario para activar el metabolismo de micro-organismos presentes durante la incubación. Se ha evidenciado que organismos del clado Roseobacter y SAR11, tienen las enzimas para catabolizar la oxidación de TMA (Chen et al., 2011) en condiciones aeróbicas (Fig. 5.3), lo que sugiere que esta es una importante vía utilizada por organismos en aguas superficiales oxigenadas (Sun et al., 2019) y que al oxidarse y sufrir procesos de desmetilación, produce CH₄ (Bižić-Ionescu et al., 2018; De Angelis and Lee, 1994).

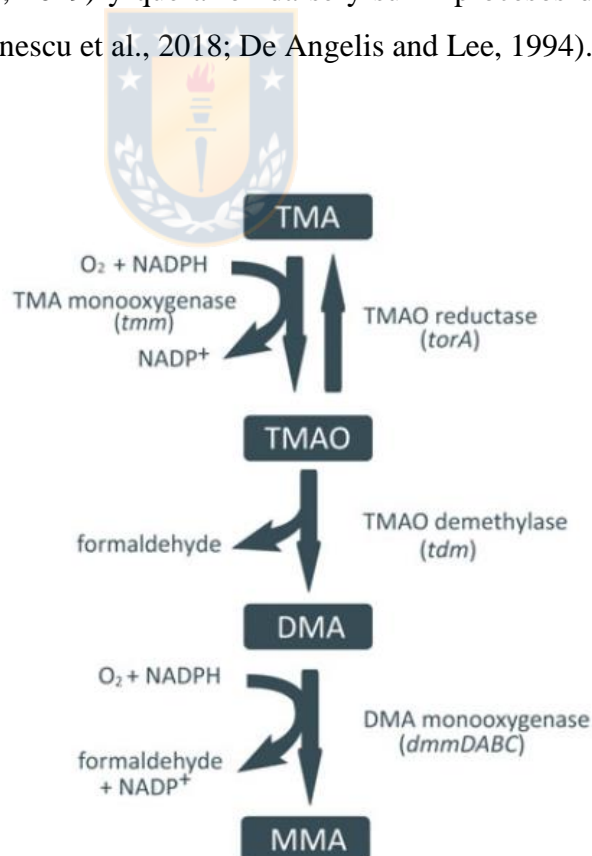


Figura 5.3. Vía de oxidación aeróbica de la TMA en microbios marinos. Tomado de Sun et al 2019.

A diferencia de los experimentos de sensibilidad realizada en los viales, los experimentos de microcosmos (Fig. 4.6 A y 4.9A), evidencian que la adición de TMA estimuló la generación de CH₄ por parte del bacterioplancton (<3 μm) en el periodo no favorable y favorable a la surgencia, y que el MPn sólo sería viable en el periodo favorable a la surgencia (Fig. 4.5A y 4.8A).

Finalmente, en experimentos con la comunidad concentrada (concentración del bacterioplancton) realizados para demostrar el rol de bacterioplancton, se observaron tasas positivas con ambos sustratos y en ambas condiciones en el periodo no favorable a la surgencia (abril; Tabla 4.8), lo que sugiere que una mayor abundancia de bacterioplancton podrían estar reciclando constantemente el COD alóctono, manteniéndolo casi constante durante el periodo de incubación (Fig. 4.6C) y que este COD es importante en la generación de CH₄, ya que en la comunidad <3 μm + MPn, el COD disminuye hasta 75,24 μm, y es justamente en esa comunidad donde se presentan tasas negativas en ambas condiciones de luz y oscuridad (Tabla 4.8). Por el contrario, en el periodo favorable a la surgencia (septiembre), la mayor tasa de producción dada por la comunidad concentrada, fue cuando se le trató con TMA en condiciones de oscuridad, pero a tasas muy bajas (Tabla 4.8), no difiriendo del tratamiento control (Fig. 4.8A). Por otro lado, el tratamiento con MPn mostró tasas positivas muy bajas en condiciones de oscuridad, evidenciándose que en un sistema de surgencia, a pesar de no ser limitante en fósforo, la utilización de este sustrato puede darse, pero las tasas de producción de CH₄ se darán a tasas muy bajas, hecho similar fue observado por Bižić-Ionescu et al. (2018) en cultivos de cianobacterias, pero en condiciones de luz.

Por otro lado, es necesario mencionar que el concentrado de microorganismos en el periodo no favorable a la surgencia (abril), tuvo efecto en la producción de CH₄ en las 35 primeras horas, debido a que los controles de las comunidades <3 μm y comunidad concentrada, siguieron un patrón similar en las concentraciones de CH₄ durante ese periodo (Fig. 4.5A), no obstante, este patrón se hace similar a partir de las 40 horas aproximadamente, ello puede evidenciar que, a pesar de haber muchas bacterias, si no existe un organismo fotosintético (ej. *Synechococcus sp.*) que produzca

MOD (Repeta et al., 2016), no se puede generar CH₄; esto se evidencia en la figura 4.7A donde se observa claramente que *Synechococcus sp.* tiene la misma abundancia en ambas comunidades control al final de los experimentos. No obstante, esto no ocurre en el periodo favorable a la surgencia (septiembre), ya que aquí la concentración de microorganismos influyó significativamente en la producción de CH₄, esto se puede deber a la rápida tasa de crecimiento de las bacterias durante este periodo (Cuevas et al., 2004).

5.6. Perspectivas

Para finalizar, se puede concluir que, en el área de surgencia de Chile central, el CH₄ presenta una variación estacional que no es tan marcada ni significativa respecto a otras variables como la clorofila-a, el OD, la temperatura, la salinidad y los nutrientes; además, tiene una variabilidad interanual en los inventarios y en el intercambio de CH₄ dado por procesos como el ENSO. Asimismo, este sistema actúa como fuente neta de CH₄ durante todo el año, especialmente durante el periodo favorable a la surgencia (64 %). Al mismo tiempo, existen mecanismos biológicos de generación de CH₄ en la capa superficial oxigenada, dada por el microplancton y el bacterioplancton, en condiciones de luz y oscuridad, respectivamente. La adición de potenciales sustratos para la producción de CH₄ como la TMA y el MPn, sugieren la existencia de mecanismos de desmetilación de estos compuestos.

El periodo, frecuencia de muestreo y experimentos realizados, le confiere a este estudio un aporte al conocimiento de reciclaje de CH₄ en una zona de surgencia costera; y se le puede considerar “precursor o línea de base” sobre la variabilidad temporal del CH₄ en la columna de agua, flujos de este gas hacia la atmósfera en el sistema de surgencia costera de Chile central; por lo que futuros estudios en el área o en otras zonas similares, pueden contrastar la variabilidad de este gas en cuanto a su dinámica y flujos, en un contexto de océano cambiante y procesos asociados al cambio climático.

Por último, futuras investigaciones referidas al CH₄ oceánico en el océano costero deberían incluir una mayor cobertura latitudinal, así como la evaluación de su variabilidad en un contexto de acidificación. Igualmente, se destaca la necesidad de estudios isotópicos de CH₄ para determinar el origen de este gas y poder separar y cuantificar la proporción de CH₄ de sus diferentes fuentes (bentónico, del agua de fondo y de superficie). Por otro lado, evaluar los posibles organismos implicados en la metabolización de compuestos metilados mediante estudios genómicos. Asimismo, se propone estudiar la interacción de la producción de CH₄ con eventos de afloramiento de fitoplancton, así como su fisiología en cuanto a la dependencia de la luz y la temperatura, aspectos que condicionan sobremanera la zona estudiada.



5.7. Contrastación de hipótesis

Hipótesis 1: El contenido de CH₄ en la capa superficial y su intercambio con la atmósfera en la zona de surgencia frente a Concepción responden parcialmente a un mecanismo de regeneración biológica *in situ* mediado por el bacterioplancton heterótrofo; es parcialmente aceptada dado que, en condiciones de laboratorio, se ha evidenciado la existencia de una producción biológica por parte del microplancton y el bacterioplancton. No obstante, procesos físicos juegan un rol muy importante en la zona de surgencia de Chile central, ya que, según los perfiles analizados, producto de la advección de aguas sub superficiales, aparentemente se arrastra el agua de fondo rica en CH₄ hacia la superficie. Por lo tanto, ambos mecanismos, físicos y biológicos, sostienen una sobresaturación de CH₄ en la superficie, siendo los procesos físicos los que posiblemente tengan mayor relevancia.



Hipótesis 2: La presencia de compuestos orgánicos disueltos como trimetilamina y ácido metilfosfónico y otros, estimulan la producción de CH₄ *in situ* por parte del bacterioplancton heterótrofo; es aceptada, ya que en condiciones de laboratorio se demostró que la comunidad <3 μm produjo tasas significativas de CH₄ en base a estos compuestos metilados. Por lo tanto, dado la disponibilidad de COD y la presencia del bacterioplancton en el sistema de surgencia de Chile central, no se descarta que la TMA sea el compuesto que podría jugar un rol muy importante durante todo el año y el MPn durante el periodo favorable a la surgencia. Sin embargo, no se descarta el CH₄ producido en los micronichos anóxicos y organismos pelágicos.

6. CONCLUSIONES

La concentración de CH₄ en la columna de agua, en la surgencia de Chile central varía entre 1,74 y 100,86 nM, cuyas acumulaciones (inventarios) son mayores la capa sub superficial (1348,11 $\mu\text{mol m}^{-2}$) en comparación con la capa superficial (365,60 $\mu\text{mol m}^{-2}$).

Se observó una variabilidad interanual en los flujos de CH₄, no necesariamente asociado a la intensidad de los vientos favorables a la surgencia, sino que puede responder a Eventos El Niño como el observado en el 2009-2010.

Contrario a lo esperado, no existe una marcada estacionalidad en el contenido de CH₄, sin embargo, a diferencia de la capa superficial, en la capa sub superficial, se observan diferencias estadísticas en el periodo no favorable y favorable a la surgencia, con concentraciones de hasta 100,86 en este último periodo a los 80 m (cerca al fondo).

No existen diferencias estacionales en los flujos de CH₄ hacia la atmósfera (1.27 y 47.01 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{d}^{-1}$), sin embargo, se destaca que en el periodo favorable a la surgencia (64%), los flujos son 1,4 a 2,7 veces mayores que en el periodo no favorable a la surgencia.

Los flujos en la zona costera (promedio 10,9 $\mu\text{mol m}^{-1} \text{día}^{-1}$) son dos órdenes de magnitud mayores que en la zona abierta, poniendo en relieve la importancia del acoplamiento bentónico pelágico y la mineralización de la materia orgánica en el flujo de CH₄ hacia la superficie. En este contexto, la zona de surgencia de Chile representa entre 1.7 y 13 % de las emisiones globales para las regiones costeras.

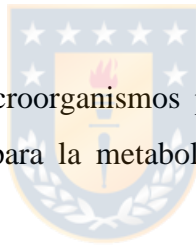
No se encontró una clara relación con la clorofila que pueda explicar la variación temporal del CH₄, esto sugiere que podría existir un desfase entre el tiempo que tarde en hundirse la materia orgánica y el tiempo en que se remineraliza en la columna de agua.

La sobresaturación de CH₄ en la capa superficial oxigenada responde a procesos advectivos y a una regeneración biológica *in situ* dado por el acoplamiento entre fitoplancton y bacterioplancton, y por el metabolismo propio del bacterioplancton, siendo la luz un factor importante para el desarrollo de esta actividad.

Tasas de reciclaje positivas de CH₄ en la comunidad del bacterioplancton (<3 μm) tratado con MPn (0,05 y 0,17 nmol L⁻¹ h⁻¹), indican que el MPn es un potencial sustrato para la producción de CH₄ en condiciones oxigenadas y sin agotamiento de nutrientes como las zonas de surgencia, pero se resalta que las tasas de producción son muy lentas en comparación con el océano abierto.

Experimentos controlados evidencian que la TMA es un sustrato para ser utilizado durante todo el año y que el MPn sólo podría ser metabolizado en el periodo favorable a la surgencia.

La abundancia de microorganismos parece ser menos sustancial si no hay suficiente MOD disponible para la metabolización por parte del bacterioplancton heterótrofo.



7. BIBLIOGRAFÍA

- Aguirre, C., García-Loyola, S., Testa, G., Silva, Di., Farías, L., 2018. Insight into anthropogenic forcing on coastal upwelling off south-central Chile. *Elementa* 6. <https://doi.org/10.1525/elementa.314>
- Ahumada, R., Chuecas, L., 1979. Algunas características hidrográficas de Bahía de Concepción (36° 40'S; 73° 02'W) y áreas adyacentes. *Gayana Misc.* 8, 1–56.
- Alarcón, G., 2008. Variabilidad estacional de la comunidad picoplantónica en la zona de surgencia altamente productiva. Universidad de Concepción.
- Aldunate, M., De la Iglesia, R., Bertagnolli, A.D., Ulloa, O., 2018. Oxygen modulates bacterial community composition in the coastal upwelling waters off central Chile. *Deep Sea Res. Part II Top. Stud. Oceanogr.* 156, 68–79. <https://doi.org/10.1016/j.dsr2.2018.02.001>
- Althoff, F., Benzing, K., Comba, P., McRoberts, C., Boyd, D.R., Greiner, S., Keppler, F., 2014. Abiotic methanogenesis from organosulphur compounds under ambient conditions. *Nat. Commun.* 5. <https://doi.org/10.1038/ncomms5205>
- Anabalón, V., Morales, C.E., Escribano, R., Varas, A.M., Varas, M.A., 2007. The contribution of nano- and micro-planktonic assemblages in the surface layer (0–30 m) under different hydrographic conditions in the upwelling area off Concepción, central Chile. *Prog. Oceanogr.* 75, 396–414. <https://doi.org/10.1016/j.pocean.2007.08.023>
- Ancapichun, S., Garcés-Vargas, J., 2015. Variability of the Southeast Pacific Subtropical Anticyclone and its impact on sea surface temperature off north-central Chile. *Ciencias Mar.* 41, 1–20. <https://doi.org/10.7773/cm.v41i1.2338>
- Angle, J.C., Morin, T.H., Solden, L.M., Narrowe, A.B., Smith, G.J., Borton, M.A., Rey-Sanchez, C., Daly, R.A., Mirfenderesgi, G., Hoyt, D.W., Riley, W.J., Miller, C.S., Bohrer, G., Wrighton, K.C., 2017. Methanogenesis in oxygenated soils is a substantial fraction of wetland methane emissions. *Nat. Commun.* 8, 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-01753-4>
- Azam, F., Fenchel, T., Field, J., Gray, J., Meyer-Reil, L., Thingstad, F., 1983. The Ecological Role of Water-Column Microbes in the Sea. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 10, 257–263. <https://doi.org/10.3354/meps010257>
- Bakker, D., Bange, H., Gruber, N., Johannessen, T., Upstill-Goddard, R.C., Borges, A., Delille, B., Löscher, C., Naqvi, S., Omar, A., Santana-Casiano, J., 2014. Air-sea interactions of natural long-lived greenhouse gases (CO₂, N₂O, CH₄) in a changing climate, in: Liss, P.S., Johnson, M.T. (Eds.), *Ocean-Atmosphere Interactions of Gases and Particles*. Springer, pp. 113–169.
- Bange, H.W., Bartell, U.H., Rapsomanikis, S., Andreae, M.O., 1994. Methane in the Baltic and North Seas and a reassessment of the marine emissions of methane. *Global Biogeochem. Cycles* 8, 465–480.

- Bange, H.W., Bergmann, K., Hansen, H.P., Kock, A., Koppe, R., Malien, F., Ostrau, C., 2010. Dissolved methane during hypoxic events at the Boknis Eck time series station (Eckernförde Bay, SW Baltic Sea). *Biogeosciences* 7, 1279–1284. <https://doi.org/10.5194/bg-7-1279-2010>
- Bange, H.W., Ramesh, R., Rapsomanikis, S., Andreae, M., 1998. Methane in surface waters of the Arabian Sea. *Geophys. Res. Lett.* 25, 3547–3550.
- Bates, T.S., Kelly, K.C., Johnson, J.E., Gammon, R.H., 1996. A reevaluation of the open ocean source of methane to the atmosphere. *J. Geophys. Res. Atmos.* 101, 6953–6961. <https://doi.org/10.1029/95JD03348>
- Bello, E., 2016. Variabilidad estacional en la descarga de metano disuelto desde un sistema estuarino a la zona marina adyacente, el caso de ríos de la zona central de Chile (río Itata). Universidad de Concepción.
- Berg, A., Lindblad, P., Svensson, B.H., 2014. Cyanobacteria as a source of hydrogen for methane formation. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 30, 539–545. <https://doi.org/10.1007/s11274-013-1463-5>
- Berner, U., Poggenburg, J., Faber, E., Quadfasel, D., Frische, A., 2003. Methane in ocean waters of the Bay of Bengal: Its sources and exchange with the atmosphere. *Deep. Res. Part II Top. Stud. Oceanogr.* 50, 925–950. [https://doi.org/10.1016/S0967-0645\(02\)00613-6](https://doi.org/10.1016/S0967-0645(02)00613-6)
- Beverdors, L.J., White, A.E., Björkman, K.M., Letelier, R.M., Karl, D.M., 2010. Phosphonate metabolism of *Trichodesmium* IMS101 and the production of greenhouse gases. *Limnol. Oceanogr.* 55, 1768–1778. <https://doi.org/10.4319/lo.2010.55.4.1768>
- Bižić-Ionescu, M., Ionescu, D., Günthel, M., Tang, K.W., Grossart, H.P., 2018. Biogenesis of Hydrocarbons. *Biog. Hydrocarb.* 1–22. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-53114-4>
- Bižić, M., Klintzsch, T., Ionescu, D., Hindiyeh, M.Y., Günthel, M., Muro-Pastor, A.M., Eckert, W., Ulrich, T., Keppler, F., Grossart, H.P., 2020. Aquatic and terrestrial cyanobacteria produce methane. *Sci. Adv.* 6, 1–10. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aax5343>
- Boetius, A., Wenzhöfer, F., 2013. Seafloor oxygen consumption fuelled by methane from cold seeps. *Nat. Geosci.* 6, 725–734. <https://doi.org/10.1038/ngeo1926>
- Bogard, M.J., Giorgio, P.A., Boutet, L., Carolina, M., Chaves, G., Prairie, Y.T., Merante, A., Derry, A.M., 2014. Oxic water column methanogenesis as a major component of aquatic CH₄ fluxes. *Nat. Commun.* 5, 1–9. <https://doi.org/10.1038/ncomms6350>
- Borges, A. V., Speeckaert, G., Champenois, W., Scranton, M.I., Gypens, N., 2017. Productivity and Temperature as Drivers of Seasonal and Spatial Variations of Dissolved Methane in the Southern Bight of the North Sea. *Ecosystems* 21, 583–599. <https://doi.org/10.1007/s10021-017-0171-7>
- Born, D.A., Ulrich, E.C., Ju, K.S., Peck, S.C., Van Der Donk, W.A., Drennan, C.L., 2017. Structural basis for methylphosphonate biosynthesis. *Science* (80-.). 358,

1336–1339. <https://doi.org/10.1126/science.aao3435>

- Broecker, W.S., Peng, T.H., 1974. Gas exchange rates between air and sea. *Tellus XXVI* 1, 21–35. <https://doi.org/10.1111/j.2153-3490.1974.tb01640.x>
- Brown, I.J., Torres, R., Rees, A.P., 2014. The origin of sub-surface source waters define the sea-air flux of methane in the Mauritanian Upwelling, NW Africa. *Dyn. Atmos. Ocean.* 67, 39–46. <https://doi.org/10.1016/j.dynatmoce.2014.06.001>
- Capelle, D.W., Tortell, P.D., 2016. Factors controlling methane and nitrous-oxide variability in the southern British Columbia coastal upwelling system. *Mar. Chem.* 179, 56–67. <https://doi.org/10.1016/j.marchem.2016.01.011>
- Carini, P., White, A.E., Campbell, E.O., Giovannoni, S.J., 2014. Methane production by phosphate-starved SAR11 chemoheterotrophic marine bacteria. *Nat. Commun.* 5, 1–7. <https://doi.org/10.1038/ncomms5346>
- Carpenter, J., 1965. Do rats and pigeons readily acquire instrumental responses for food in the presence of free food? *Limnol. Oceanogr.* 10, 141–143. <https://doi.org/10.3758/BF03209628>
- Chang, Y.L., Wong, Y.S., Tam, N.F.Y., Ye, Y., Lin, P., 1999. Methane flux and production from sediments of a mangrove wetland on Hainan Island, China. *Mangroves Salt Marshes* 3, 41–49.
- Chen, Y., Patel, N.A., Crombie, A., Scrivens, J.H., Murrell, J.C., 2011. Bacterial flavin-containing monooxygenase is trimethylamine monooxygenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 17791–17796. <https://doi.org/10.1073/pnas.1112928108>
- Cicerone, R.J., Oremland, R.S., 1988. Biogeochemical aspects of atmospheric methane. *Global Biogeochem. Cycles* 2, 299–327. <https://doi.org/10.1029/GB002i004p00299>
- Collado-Fabbri, S., Vaultot, D., Ulloa, O., 2011. Structure and seasonal dynamics of the eukaryotic picophytoplankton community in a wind-driven coastal upwelling ecosystem. *Limnol. Oceanogr.* 56, 2334–2346. <https://doi.org/10.4319/lo.2011.56.6.2334>
- Cree, C.H.L., Airs, R., Archer, S.D., Fitzsimons, M.F., 2018. Measurement of methylamines in seawater using solid phase microextraction and gas chromatography. *Limnol. Oceanogr. Methods* 16, 411–420. <https://doi.org/10.1002/lom3.10255>
- Cuevas, L.A., Daneri, G., Jacob, B., Montero, P., 2004. Microbial abundance and activity in the seasonal upwelling area off Concepción (~36°S), central Chile: A comparison of upwelling and non-upwelling conditions. *Deep. Res. Part II Top. Stud. Oceanogr.* 51, 2427–2440. <https://doi.org/10.1016/j.dsr2.2004.07.026>
- Damm, E., Beszczynska-Möller, T.A., Nöthing, E.M., Kattner, G., 2015. Methane excess production in oxygen-rich polar water and a model of cellular conditions for this paradox. *Polar Sci.* 9, 327–334. <https://doi.org/10.1016/j.polar.2015.05.001>
- Damm, E., Helmke, E., Thoms, S., Schauer, U., Nöthig, E., Bakker, K., Kiene, R.P.,

2010. Methane production in aerobic oligotrophic surface water in the central Arctic Ocean. *Biogeosciences* 7, 1099–1108. <https://doi.org/10.5194/bgd-6-10355-2009>
- Daneri, G., Dellarossa, V., Quiñones, R., Jacob, B., Montero, P., Ulloa, O., 2000. Primary production and community respiration in the Humboldt Current System off Chile and associated oceanic areas. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 197, 41–49. <https://doi.org/10.3354/meps197041>
- Daneri, G., Lizárraga, L., Montero, P., González, H.E., Tapia, F.J., 2012. Progress in Oceanography Wind forcing and short-term variability of phytoplankton and heterotrophic bacterioplankton in the coastal zone of the Concepción upwelling system (Central Chile). *Prog. Oceanogr.* 92–95, 92–96. <https://doi.org/10.1016/j.pocean.2011.07.013>
- De Angelis, M.A., Lee, C., 1994. Methane production during zooplankton grazing on marine phytoplankton. *Limnol. Ocean.* 39, 1298–1308.
- Del Valle, D.A., Karl, D.M., 2014. Aerobic production of methane from dissolved water-column methylphosphonate and sinking particles in the North Pacific Subtropical Gyre. *Aquat. Microb. Ecol.* 73, 93–105. <https://doi.org/10.3354/ame01714>
- Denman, K., Brasseur, G., Chidthaisong, A., Ciais, P., Cox, P., Dickinson, R., Hauglustaine, D., Heinze, C., Holland, E., Jacob, D., Lohman, U., Ramachandran, S., Da Silva Dias, P., Wofsy, S., Zhang, X., 2007. Couplings between changes in the climate system and biogeochemistry, in: Solomon, S., Qin, D., Manning, M., Chen, Z., Marquis, M., Averyt, K., Tignor, M., Miller, H. (Eds.), *Climate Change 2007: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*. Cambridge University Press, Cambridge/ New York, pp. 499–587. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.6b00417>
- Dewitte, B., Vazquez-Cuervo, J., Goubanova, K., Illig, S., Takahashi, K., Cambon, G., Purca, S., Correa, D., Gutierrez, D., Sifeddine, A., Ortlieb, L., 2012. Change in El Niño flavours over 1958-2008: Implications for the long-term trend of the upwelling off Peru. *Deep. Res. Part II Top. Stud. Oceanogr.* 77–80, 143–156. <https://doi.org/10.1016/j.dsr2.2012.04.011>
- Dinasquet, J., Kragh, T., Schrøter, M.L., Søndergaard, M., Riemann, L., 2013. Functional and compositional succession of bacterioplankton in response to a gradient in bioavailable dissolved organic carbon. *Environ. Microbiol.* 15, 2616–2628. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12178>
- Dinasquet, J., Tirola, M., Azam, F., 2018. Enrichment of Bacterioplankton Able to Utilize One-Carbon and Methylated Compounds in the Coastal Pacific Ocean. *Front. Mar. Sci.* 5, 1–13. <https://doi.org/10.3389/fmars.2018.00307>
- Dlugokencky, E., 2020. Trends in Atmospheric Methane [WWW Document]. NOAA/GML. URL https://www.esrl.noaa.gov/gmd/ccgg/trends_ch4/
- Dumestre, J.F., Guézennec, J., Galy-Lacaux, C., Delmas, R., Richard, S., Labroue, L., 1999. Influence of light intensity on methanotrophic bacterial activity in Petit

- Saut Reservoir, French Guiana. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 534–539. <https://doi.org/10.1128/aem.65.2.534-539.1999>
- Eissler, Y., Letelier, J., Cuevas, L.A., Morales, C.E., Escribano, R., 2010. The microbial community in the coastal upwelling system off Concepción, Chile, 36°S, 2002-2003 period. *Rev. Biol. Mar. Oceanogr.* 45, 1–18. <https://doi.org/10.4067/s0718-19572010000100001>
- EPA, 2010. Methane and Nitrous Oxide emissions from natural sources. U.S. Environmental Protection Agency, Washington D.C. USA.
- Escribano, R., Daneri, G., Farías, L., Gallardo, V.A., González, H.E., Gutiérrez, D., Lange, C.B., Morales, C.E., Pizarro, O., Ulloa, O., Braun, M., 2004. Biological and chemical consequences of the 1997-1998 El Niño in the Chilean coastal upwelling system: A synthesis. *Deep. Res. Part II Top. Stud. Oceanogr.* 51, 2389–2411. <https://doi.org/10.1016/j.dsr2.2004.08.011>
- Farías, L., Fernández, C., Faúndez, J., Cornejo, M., Alcaman, M.E., 2009. Chemolithoautotrophic production mediating the cycling of the greenhouse gases N₂O and CH₄ in an upwelling ecosystem. *Biogeosciences* 6, 3053–3069.
- Farías, L., Florez-Leiva, L., Besoain, V., Sarthou, G., Fernández, C., 2015. Dissolved greenhouse gases (nitrous oxide and methane) associated with the naturally iron-fertilized Kerguelen region (KEOPS 2 cruise) in the Southern Ocean. *Biogeosciences* 12, 1925–1940. <https://doi.org/10.5194/bg-12-1925-2015>
- Farías, L., Graco, M., Ulloa, O., 2004. Temporal variability of nitrogen cycling in continental-shelf sediments of the upwelling ecosystem off central Chile. *Deep. Res. Part II Top. Stud. Oceanogr.* 51, 2491–2505. <https://doi.org/10.1016/j.dsr2.2004.07.029>
- Ferderlman, T.G., Lee, C., Pantoja, S., Harder, J., Bebout, B.M., Fossing, H., 1997. Sulfate reduction and methanogenesis in a Thioploca-dominated sediment off the coast of Chile. *Geochim. Cosmochim. Acta* 61, 3065–3079.
- Ferry, J.G., 1999. Enzymology of one-carbon metabolism in methanogenic pathways. *FEMS Microbiol. Rev.* 23, 13–38. [https://doi.org/10.1016/S0168-6445\(98\)00029-1](https://doi.org/10.1016/S0168-6445(98)00029-1)
- Florez-Leiva, L., Damm, E., Farías, L., Farias, L., 2013. Methane production induced by dimethylsulfide in surface water of an upwelling ecosystem. *Prog. Oceanogr.* 112–113, 38–48. <https://doi.org/10.1016/j.pocean.2013.03.005>
- Fung, I., John, J., Lerner, J., Matfhevs, E., Prather, M., Steele, L.P., Fraser, P.J., 1991. Three-Dimensional Model Synthesis of the Global Methane Cycle. *J. Geophys. Res.* 96, 13033–13065.
- Gibb, S.W., Mantoura, R.F.C., Liss, P.S., Barlow, R.G., 1999. Distributions and biogeochemistries of methylamines and ammonium in the Arabian Sea. *Deep. Res. Part II Top. Stud. Oceanogr.* 46, 593–615. [https://doi.org/10.1016/S0967-0645\(98\)00119-2](https://doi.org/10.1016/S0967-0645(98)00119-2)
- González, H.E., Menschel, E., Aparicio, C., Barría, C., 2007. Spatial and temporal variability of microplankton and detritus, and their export to the shelf sediments

- in the upwelling area off Concepción, Chile ($\sim 36^\circ\text{S}$), during 2002–2005. *Prog. Oceanogr.* 75, 435–451. <https://doi.org/10.1016/j.pocean.2007.08.025>
- Graco, M.I., Purca, S., Dewitte, B., Castro, C.G., Morón, O., Ledesma, J., Flores, G., Gutiérrez, D., 2017. The OMZ and nutrient features as a signature of interannual and low-frequency variability in the Peruvian upwelling system. *Biogeosciences* 14, 4601–4617. <https://doi.org/10.5194/bg-14-4601-2017>
- Grasshoff, K., Ehrhardt, M., Kremling, K., 1983. *Methods of Seawater Analysis*. Second, Second, Re. ed. John Wiley & Sons, Ltd, Deerfield Beach, Florida: Verlag Chemie. <https://doi.org/10.1002/iroh.19850700232>
- Grilli, R., Triest, J., Chappellaz, J., Calzas, M., Desbois, T., Jansson, P., Guillerm, C., Ferré, B., Lechevallier, L., Ledoux, V., Romanini, D., 2018. Sub-Ocean: Subsea Dissolved Methane Measurements Using an Embedded Laser Spectrometer Technology. *Environ. Sci. Technol.* 52, 10543–10551. <https://doi.org/10.1021/acs.est.7b06171>
- Grossart, H.P., Frindte, K., Dziallas, C., Eckert, W., Tang, K.W., 2011. Microbial methane production in oxygenated water column of an oligotrophic lake. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 19657–19661. <https://doi.org/10.1073/pnas.1110716108>
- Grunewald, A.C., Morales, C.E., Gonzalez, H.E., Sylvester, C., Castro, L.R., 2002. Grazing impact of copepod assemblages and gravitational flux in coastal and oceanic waters off central Chile during two contrasting seasons. *J. Plankton Res.* 24, 55–67. <https://doi.org/10.1093/plankt/24.1.55>
- Gülzow, W., Rehder, G., Schneider, B., Schneider, J., Sadkowiak, B., 2011. A new method for continuous measurement of methane and carbon dioxide in surface waters using off-axis integrated cavity output spectroscopy (ICOS): An example from the Baltic Sea. *Limnol. Oceanogr. Methods* 9, 176–184. <https://doi.org/10.4319/lom.2011.9.176>
- Günthel, M., Klawonn, I., Woodhouse, J., Bižić, M., Ionescu, D., Ganzert, L., Kümmel, S., Nijenhuis, I., Zoccarato, L., Grossart, H.P., Tang, K.W., 2020. Photosynthesis-driven methane production in oxic lake water as an important contributor to methane emission. *Limnol. Oceanogr.* 1–13. <https://doi.org/10.1002/lno.11557>
- Hansell, D.A., Carlson, C.A., Repeta, D.J., Schlitzer, R., 2009. Dissolved organic matter in the ocean a controversy stimulates new insights. *Oceanography* 22, 202–211. <https://doi.org/10.5670/oceanog.2009.109>
- Hanson, R.S., Hanson, T.E., 1996. Methanotrophic bacteria. *Microbiol. Rev.* 60, 439–471. <https://doi.org/10.1128/mmbr.60.2.439-471.1996>
- Hartmann, J.F., Günthel, M., Klintzsch, T., Kirillin, G., Grossart, H.P., Keppler, F., Isenbeck-Schröter, M., 2020. High Spatiotemporal Dynamics of Methane Production and Emission in Oxic Surface Water. *Environ. Sci. Technol.* 54, 1451–1463. <https://doi.org/10.1021/acs.est.9b03182>
- Holm-Hansen, O., Lorenzen, C.J., Holmes, R.W., Strickland, J.D.H., 1965.

- Fluorometric determination of chlorophyll. *J. du Cons. Int. pour L'Exploration la Mer* 30, 3–15. <https://doi.org/10.1093/icesjms/30.1.3>
- Holmes, E.M., Sansone, F.J., Rust, T.M., Popp, B.N., 2000. Methane production, consumption, and air-sea exchange in the open ocean: An evaluation based on carbon isotopic ratios. *Global Biogeochem. Cycles* 14, 1–10. <https://doi.org/10.1029/1999GB001209>
- IPCC, 2013. *Climate Change 2013: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change.* Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA.
- Isidorova, A., Grasset, C., Mendonça, R., Sobek, S., 2019. Methane formation in tropical reservoirs predicted from sediment age and nitrogen. *Sci. Rep.* 9, 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-47346-7>
- James, R.H., Bousquet, P., Bussmann, I., Haeckel, M., Kipfer, R., Leifer, I., Niemann, H., Ostrovsky, I., Piskozub, J., Rehder, G., Treude, T., Vielstädte, L., Greinert, J., 2016. Effects of climate change on methane emissions from seafloor sediments in the Arctic Ocean: A review. *Limnol. Oceanogr.* 61, S283–S299. <https://doi.org/10.1002/lno.10307>
- Kamat, S.S., Williams, H.J., Dangott, L.J., Chakrabarti, M., Raushel, F.M., 2013. The catalytic mechanism for aerobic formation of methane by bacteria. *Nature* 000, 1–5. <https://doi.org/10.1038/nature12061>
- Kamat, S.S., Williams, H.J., Raushel, F.M., 2011. Intermediates in the transformation of phosphonates to phosphate by bacteria. *Nature* 480, 570–573. <https://doi.org/10.1038/nature10622>
- Karl, D., Beversdorf, L., Björkman, K., Church, M., Martinez, A., DeLong, E., 2008. Aerobic production of methane in the sea. *Nat. Geosci.* 1, 473–478. <https://doi.org/10.1038/ngeo234>
- Karl, D., Tilbrook, B., 1994. Production and transport of methane in oceanic particulate organic matter. *Nature* 368, 732–734.
- Keller, M.D., Bellows, W.K., Guillard, R.R.L., 1989. E. M. Coper et al. (eds.),
- Kittredge, J.S., Horiguchi, M., Williams, P.M., 1969. Aminophosphonic acids: Biosynthesis by marine phytoplankton. *Comp. Biochem. Physiol.* 29, 859–863. [https://doi.org/10.1016/0010-406X\(69\)91639-9](https://doi.org/10.1016/0010-406X(69)91639-9)
- Kittredge, J.S., Roberts, E., 1969. A carbon-phosphorus bond in nature. *Science* (80-.). 164, 37–42. <https://doi.org/10.1126/science.164.3875.37>
- Klitzsch, T., Langer, G., Nehrke, G., Wieland, A., Lenhart, K., Keppler, F., 2019. Methane production by three widespread marine phytoplankton species: release rates, precursor compounds, and relevance for the environment. *Biogeosciences Discuss.* 16, 4129–4144. <https://doi.org/10.5194/bg-2019-245>
- Klitzsch, T., Langer, G., Wieland, A., Geisinger, H., Lenhart, K., Nehrke, G., Keppler, F., 2020. Effects of Temperature and Light on Methane Production of

- Widespread Marine Phytoplankton. *J. Geophys. Res. Biogeosciences* 125, 1–16. <https://doi.org/10.1029/2020JG005793>
- Kneifel, H., 1979. Amine in algae, in: Hoppe, H., Levring, T., Tanaka, Y. (Eds.), *Marine Algae and Pharmaceutical Science*. Walter de Gruyter, Berlin, New York, pp. 365–401.
- Kock, A., Gebhardt, S., Bange, H.W.W., 2008. Methane emissions from the upwelling area off Mauritania (NW Africa). *Biogeosciences* 5, 1119–1125. <https://doi.org/10.5194/bg-5-1119-2008>
- Konnerup, D., Betancourt-portela, J.M., Villamil, C., Parra, J., 2014. Estuarine , Coastal and Shelf Science Nitrous oxide and methane emissions from the restored mangrove ecosystem of the Ciénaga Grande de Santa Marta , Colombia. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 140, 43–51. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2014.01.006>
- Krabberød, A.K., Bjorbækmo, M.F.M., Shalchian-Tabrizi, K., Logares, R., 2017. Exploring the oceanic microeukaryotic interactome with metaomics approaches. *Aquat. Microb. Ecol.* 79, 1–12. <https://doi.org/10.3354/ame01811>
- Lamontagne, R.A., Swinnerton, J.W., Linnenbom, V.J., Smith, W.D., 1973. Methane Concentrations in Various Marine Environments. *J. Geophys. Res.* 78, 5317–5324. <https://doi.org/10.1029/JC078i024p05317>
- Lenhart, K., Klintzsch, T., Langer, G., Nehrke, G., Bunge, M., Schnell, S., Keppler, F., 2016. Evidence for methane production by the marine algae *Emiliania huxleyi*. *Biogeosciences* 13, 3163–3174. <https://doi.org/10.5194/bg-13-3163-2016>
- León-Palmero, E., Contreras-Ruiz, A., Sierra, A., Morales-Baquero, R., Reche, I., Reche, I., 2020. Dissolved CH₄ coupled to photosynthetic picoeukaryotes in oxic waters and to cumulative chlorophyll *ia/i* in anoxic waters of reservoirs. *Biogeosciences* 17, 1–23. <https://doi.org/10.5194/bg-17-3223-2020>
- Levipan, H.A., Quiñones, R.A., Johansson, H.E., Urrutia, H., 2007. Methylo-trophic Methanogens in the Water Column of an Upwelling Zone with a Strong Oxygen Gradient Off Central Chile. *Microbes Environ.* 22, 268–278. <https://doi.org/10.1264/jsme2.22.268>
- Liu, Y., Whitman, W.B., 2008. Metabolic, phylogenetic, and ecological diversity of the Methanogenic Archaea. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1125, 171–189. <https://doi.org/10.1196/annals.1419.019>
- Lyu, Z., Shao, N., Akinyemi, T., Whitman, W.B., 2018. Methanogenesis. *Curr. Biol.* 28, R727–R732. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.05.021>
- Ma, X., Sun, M., Lennartz, S.T., Bange, H.W., 2020. A decade of methane measurements at the Boknis Eck Time-series Station in the Eckernförde Bay (Southwestern Baltic Sea). *Biogeosciences Discuss.* 2020, 1–22. <https://doi.org/10.5194/bg-2020-107>
- Madigan, M., Martinko, J., Parker, J., 2004. *Brock Biología de los Microorganismos*, 10^a edición. ed. Editorial Pearson/prentice Hall, Madrid, España.
- Menschel, E., González, H.E., Giesecke, R., 2016. Coastal-oceanic distribution

- gradient of coccolithophores and their role in the carbonate flux of the upwelling system off Concepción, Chile (36°S). *J. Plankton Res.* 38, 798–817. <https://doi.org/10.1093/plankt/fbw037>
- Metcalf, W.W., Griffin, B.M., Cicchillo, R., Gao, J., Janga, S., Cooke, H., Circello, B., Evans, B., Martens-Habbena, W., Stahl, D., Van Der Donk, W., 2012. Synthesis of Methylphosphonic Acid by Marine Microbes: A Source for Methane in the Aerobic Ocean. *Science* (80-). 337, 1104–1107. <https://doi.org/10.1126/science.1219875>
- Milkov, A. V., 2004. Global estimates of hydrate-bound gas in marine sediments: How much is really out there? *Earth-Science Rev.* 66, 183–197. <https://doi.org/10.1016/j.earscirev.2003.11.002>
- Montero, P., Daneri, G., Cuevas, 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. *Prog. Oceanogr.* 75, 518–530. <https://doi.org/10.1016/j.pocean.2007.08.013>
- Morales, C., Anabalón, V., 2012. Progress in Oceanography 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. *Prog. Oceanogr.* 92–95, 81–91. <https://doi.org/10.1016/j.pocean.2011.07.004>
- Morales, C., González, H.E., Hormazabal, S.E., Yuras, G., Letelier, J., Castro, L.R., 2007. The distribution of chlorophyll- a and dominant planktonic components in the coastal transition zone off Concepción, central Chile, during different oceanographic conditions. *Prog. Oceanogr.* 75, 452–469. <https://doi.org/10.1016/j.pocean.2007.08.026>
- Morris, R.M., Rappé, M.S., Connon, S.A., Vergin, K.L., Siebold, W.A., Carlson, C.A., Giovannoni, S.J., Rappe, M.S., Connon, S.A., Vergin, K.L., Siebold, W.A., Carlson, C.A., Giovannoni, S.J., 2002. SAR11 clade dominates ocean surface bacterioplankton communities. *Nature* 420, 806–810. <https://doi.org/10.1038/nature01240>
- Naqvi, S.W.A., Bange, H.W., Farías, L., Monteiro, P.M.S., Scranton, M.I., Zhang, J., 2010. Marine hypoxia/anoxia as a source of CH₄ and N₂O. *Biogeosciences* 7, 2159–2190. <https://doi.org/10.5194/bg-7-2159-2010>
- Neufeld, J.D., Boden, R., Moussard, H., Schäfer, H., Murrell, J.C., 2008. Substrate-specific clades of active marine methylotrophs associated with a phytoplankton bloom in a temperate coastal environment. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 7321–7328. <https://doi.org/10.1128/AEM.01266-08>
- Oremland, R.S., 1979. Methanogenic activity in plankton samples and fish intestines: A mechanism for in situ methanogenesis in oceanic surface waters. *Limnol. Ocean.* 24, 1136–1141.
- Peters, V., Conrad, R., 1995. Methanogenic and other strictly anaerobic bacteria in desert soil and other oxic soils. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 1673–1676. <https://doi.org/10.1128/aem.61.4.1673-1676.1995>

- Rao, G.D., Sarma, V.V.S.S., 2017. Influence of river discharge on the distribution and flux of Methane in the coastal Bay of Bengal. *Mar. Chem.* 197. <https://doi.org/10.1016/j.marchem.2017.11.002>
- Rebouche, C.J., Seim, H., 1998. Carnitine metabolism and its regulation in microorganisms and mammals. *Annu. Rev. Nutr.* 18, 39–61. <https://doi.org/10.1146/annurev.nutr.18.1.39>
- Reeburgh, W.S., 2007. Oceanic methane biogeochemistry. *Am. Chem. Soc.* 107, 486–513. <https://doi.org/10.1021/cr050362v>
- Repeta, D.J., Ferrón, S., Sosa, O.A., Johnson, C.G., Repeta, L.D., Acker, M., DeLong, E.F., Karl, D.M., 2016. Marine methane paradox explained by bacterial degradation of dissolved organic matter. *Nat. Geosci.* 9, 1–7. <https://doi.org/10.1038/ngeo2837>
- Rhee, T.S., Kettle, A.J., Andreae, M.O., 2009. Methane and nitrous oxide emissions from the ocean: A reassessment using basin-wide observations in the Atlantic. *J. Geophys. Res. Atmos.* 114, 1–20. <https://doi.org/10.1029/2008JD011662>
- Rosentreter, J.A., Maher, D.T., Erler, D. V, Murray, R.H., Eyre, B.D., 2018. Methane emissions partially offset “blue carbon” burial in mangroves. *Sci. Adv.* 4, 1–11.
- San Martín, L., 2014. Procesos y microorganismos involucrados en la producción de metano en la capa superficial del océano. Universidad de Concepción.
- Sansone, F.J., Popp, B.N., Gasc, A., Graham, A.W., Rust, T.M., 2001. Highly elevated methane in the Eastern tropical North Pacific and associated isotopically enriched fluxes to the atmosphere. *Geophys. Res. Lett.* 28, 4567–4570. <https://doi.org/10.1029/2001GL013460>
- Sarmiento, J.L., Gruber, N., 2006. Air-Sea Interface, in: *Ocean Biogeochemical Dynamics*. Princeton University Press, Princeton, New Jersey, p. 503. <https://doi.org/10.2307/j.ctt3fgxqx>
- Sasakawa, M., Tsunogai, U., Kameyama, S., Nakagawa, F., Nojiri, Y., Tsuda, A., 2008. Carbon isotopic characterization for the origin of excess methane in subsurface seawater. *J. Geophys. Res.* 113, 1–7. <https://doi.org/10.1029/2007JC004217>
- Saunoy, M., Stavert, A.R., Poulter, B., Bousquet, P., Canadell, J.G., Jackson, R.B., Raymond, P.A., Dlugokencky, E.J., Houweling, S., 2020. The Global Methane Budget 2000 – 2017. *Earth Syst. Sci. Data* 12, 1561–1623. <https://doi.org/10.5194/essd-12-1561-2020>
- Schneider, B., Güllow, W., Sadkowiak, B., Rehder, G., 2014. Detecting sinks and sources of CO₂ and CH₄ by ferrybox-based measurements in the Baltic Sea: Three case studies. *J. Mar. Syst.* 140, 13–25. <https://doi.org/10.1016/j.jmarsys.2014.03.014>
- Scranton, M.I., Brewer, P.G., 1977. Occurrence of methane in the near-surface waters of the western subtropical North-Atlantic. *Deep. Res.* 24, 127–138. [https://doi.org/10.1016/0146-6291\(77\)90548-3](https://doi.org/10.1016/0146-6291(77)90548-3)

- Sobarzo, M., Bravo, L., Donoso, D., Garcés-Vargas, J., Schneider, W., 2007. Coastal upwelling and seasonal cycles that influence the water column over the continental shelf off central Chile. *Prog. Oceanogr.* 75, 363–382. <https://doi.org/10.1016/j.pocean.2007.08.022>
- Sobarzo, M., Djurfeldt, L., 2004. Coastal upwelling process on a continental shelf limited by submarine canyons, Concepción, central Chile. *J. Geophys. Res.* 109, 1–20. <https://doi.org/10.1029/2004JC002350>
- Sobarzo, M., Figueroa, M., Djurfeldt, L., 2001. Upwelling of subsurface water into the rim of the Biobio submarine canyon as a response to surface winds. *Cont. Shelf Res.* 21, 279–299. [https://doi.org/10.1016/S0278-4343\(00\)00082-0](https://doi.org/10.1016/S0278-4343(00)00082-0)
- Sosa, O.A., Burrell, T.J., Wilson, S.T., Foreman, R.K., Karl, D.M., Repeta, D.J., 2020. Phosphonate cycling supports methane and ethylene supersaturation in the phosphate-depleted western North Atlantic Ocean. *Limnol. Oceanogr.* 65, 1–17. <https://doi.org/10.1002/lno.11463>
- Sosa, O.A., Repeta, D.J., Ferrón, S., Bryant, J.A., Mende, D.R., Karl, D.M., Delong, E.F., 2017. Isolation and Characterization of Bacteria That Degrade Phosphonates in Marine Dissolved Organic Matter. *Front. Microbiol.* 8, 1–16. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01786>
- Stefels, J., 2000. Physiological aspects of the production and conversion of DMSP in marine algae and higher plants. *J. Sea Res.* 43, 183–197. [https://doi.org/10.1016/S1385-1101\(00\)00030-7](https://doi.org/10.1016/S1385-1101(00)00030-7)
- Strom, S.L., Benner, R., Ziegler, S., Dagg, M.J., 1997. Planktonic grazers are a potentially important source of marine dissolved organic carbon. *Limnol. Oceanogr.* 42, 1364–1374. <https://doi.org/10.4319/lo.1997.42.6.1364>
- Sudheesh, V., Gupta, G.V.M., Naqvi, W.A., 2020. Massive Methane Loss During Seasonal Hypoxia / Anoxia in the Nearshore Waters of Southeastern Arabian Sea. *Front. Mar. Sci.* 7, 1–13. <https://doi.org/10.3389/fmars.2020.00324>
- Sun, J., Mausz, M.A., Chen, Y., Giovannoni, S.J., 2019. Microbial trimethylamine metabolism in marine environments. *Environ. Microbiol.* 21, 513–520. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14461>
- Sun, J., Steindler, L., Thrash, J.C., Halsey, K.H., Smith, D.P., Carter, A.E., Landry, Z.C., Giovannoni, S.J., 2011. One Carbon Metabolism in SAR11 Pelagic Marine Bacteria. *PLoS One* 6, 1–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023973>
- Svensson, B.H., 1984. Different Temperature Optima for Methane Formation When Enrichments from Acid Peat Are Supplemented with Acetate or Hydrogen. *Appl. Environ. Microbiol.* 48, 389–394. <https://doi.org/10.1128/aem.48.2.389-394.1984>
- Taenzer, L., 2019. The isotope biogeochemistry of methane produced from the C-P lyase pathway. Dartmouth College.
- Testa, G., Masotti, I., Farías, L., 2018. Temporal Variability in Net Primary Production in an Upwelling Area off Central Chile (36°S). *Front. Mar. Sci.* 5, 1–17.

<https://doi.org/10.3389/fmars.2018.00179>

- Thauer, R.K., Kaster, A.K., Seedorf, H., Buckel, W., Hedderich, R., 2008. Methanogenic archaea: Ecologically relevant differences in energy conservation. *Nat. Rev. Microbiol.* 6, 579–591. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1931>
- Troncoso, A., Daneri, G., Cuevas, L.A., Jacob, B., Montero, P., 2003. Bacterial carbon flow in the Humboldt Current System off Chile. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 250, 1–12. <https://doi.org/10.3354/meps250001>
- Troncoso, M., Garcia, G., Verdugo, J., Farías, L., 2018. Toward High-Resolution Vertical Measurements of Dissolved Greenhouse Gases (Nitrous Oxide and Methane) and Nutrients in the Eastern South Pacific. *Front. Mar. Sci.* 5, 1–15. <https://doi.org/10.3389/fmars.2018.00148>
- Upstill-goddard, R.C., Barnes, J., Frost, T., Punshon, S., Owens, N.J.P., 2000. Methane in the southern North Sea : Low-salinity inputs , estuarine removal , and atmospheric flux 14, 1205–1217.
- Valdés, L., Lavín, A., Fernández de Puelles, M.L.L., Varela, M., Anadón, R., Miranda, A., Camiñas, J., Mas, J., 2002. Spanish ocean observation system. IEO core project: Studies on time series of oceanographic data, in: Fleming, N., Vallergera, S., Pinardi, N., Behrens, H.W.A., Manzella, G., Prandle, D., Stel, J.H. (Eds.), *Operational Oceanography*, Elsevier Oceanography Series. Elsevier Science, pp. 99–105. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0422-9894\(02\)80014-9](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0422-9894(02)80014-9)
- Vargas, C.A., Arriagada, L., Sobarzo, M., Contreras, P.Y., Saldías, G., 2013. Bacterial production along a river-to-ocean continuum in central Chile: Implications for organic matter cycling. *Aquat. Microb. Ecol.* 68, 195–213. <https://doi.org/10.3354/ame01608>
- Vargas, C.A., Contreras, P.Y., Pérez, C.A., Sobarzo, M., Saldías, G.S., Salisbury, J., 2016. Influences of riverine and upwelling waters on the coastal carbonate system off Central Chile and their ocean acidification implications. *J. Geophys. Res. Biogeosciences* 121, 1–16. <https://doi.org/10.1002/2015JG003213>
- Wang, Q., Dore, J.E., McDermott, T.R., 2017. Methylphosphonate Metabolism by *Pseudomonas* sp . Populations Contributes to the Methane Oversaturation Paradox in an Oxic Freshwater Lake. *Environ. Microbiol.* 19, 1–41. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13747>
- Wanninkhof, R., 1992. Relationship Between Wind Speed and Gas Exchange. *J. Geophys. Res.* 97, 7373–7382.
- Weber, T., Wiseman, N.A., Kock, A., 2019. Global ocean methane emissions dominated by shallow coastal waters. *Nat. Commun.* 10, 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-12541-7>
- Welhan, J.A., Craig, H., 1979. Methane and hydrogen in the East Pacific Rise. *Geophys. Res. Lett.* 6, 829–831.
- Weller, Z.D., Yang, D.K., Von Fischer, J.C., 2019. An open source algorithm to detect natural gas leaks from mobile methane survey data. *PLoS One* 14, 1–18.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0212287>

- Wiesenburg, D.A., Guinasso, N.L., 1979. Equilibrium Solubilities of Methane, Carbon Monoxide, and Hydrogen in Water and Sea Water. *Am. Chem. Soc.* 24, 356–360.
- Wilson, S.T., Ferrón, S., Karl, D.M., 2017. Interannual Variability of Methane and Nitrous Oxide in the North Pacific Subtropical Gyre. *Geophys. Res. Lett.* 44, 9885–9892. <https://doi.org/10.1002/2017GL074458>
- Wolfe, R.S., 1971. Microbial formation of methane, 6th ed, *Advances in microbial physiology*. Academic press, London and New York.
- Wuebbles, D.J., Hayhoe, K., 2002. Atmospheric methane and global change. *Elsevier Sci.* 57, 177–210. [https://doi.org/10.1016/S0012-8252\(01\)00062-9](https://doi.org/10.1016/S0012-8252(01)00062-9)
- Wuebbles, D.J., Hayhoe, K., 2000. *Atmospheric Methane: Trends and Impacts*. <https://doi.org/10.1007/978-94-015-9343-4>
- Wyrtki, K., 1975. El Niño - The dynamic response of the Equatorial Pacific Ocean to atmospheric forcing. *J. Phys. Oceanogr.* 5, 572–584. [https://doi.org/https://doi.org/10.1175/1520-0485\(1975\)005<0572:ENTDRO>2.0.CO;2](https://doi.org/https://doi.org/10.1175/1520-0485(1975)005<0572:ENTDRO>2.0.CO;2)
- Yao, M., Henny, C., Maresca, J.A., 2016. Freshwater bacteria release methane as a by-product of phosphorus acquisition. *Appl. Environ. Microbiol.* 82, 6994–7003. <https://doi.org/10.1128/AEM.02399-16>
- Yeh, S.W., Kug, J.S., Dewitte, B., Kwon, M.H., Kirtman, B.P., Jin, F.F., 2009. El Niño in a changing climate. *Nature* 461, 511–514. <https://doi.org/10.1038/nature08316>
- Yoch, D.C., 2002. Dimethylsulfoniopropionate: Its sources, role in the marine food web, and biological degradation to dimethylsulfide. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 5804–5815. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.12.5804-5815.2002>
- Yoshikawa, C., Hayashi, E., Yamada, K., Yoshida, O., Toyoda, S., Yoshida, N., 2014. Methane sources and sinks in the subtropical South Pacific along 17°S as traced by stable isotope ratios. *Chem. Geol.* 382, 24–31. <https://doi.org/10.1016/j.chemgeo.2014.05.024>
- Zheng, Y., Harris, D.F., Yu, Z., Fu, Y., Poudel, S., Ledbetter, R.N., Fixen, K.R., Yang, Z.Y., Boyd, E.S., Lidstrom, M.E., Seefeldt, L.C., Harwood, C.S., 2017. A pathway for biological methane production using bacterial iron-only nitrogenase. *Nat. Microbiol.* 3, 281–286. <https://doi.org/10.1038/s41564-017-0091-5>
- Zubkov, M. V., Tarran, G.A., 2008. High bacterivory by the smallest phytoplankton in the North Atlantic Ocean. *Nature* 455, 224–226. <https://doi.org/10.1038/nature07236>