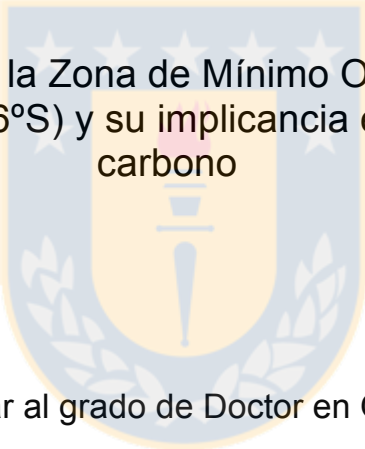




Universidad de Concepción
Dirección de Postgrado
Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas
Doctorado en Oceanografía



Fermentación en la Zona de Mínimo Oxígeno frente a
Concepción (36°S) y su implicancia en el ciclo del
carbono

Tesis para optar al grado de Doctor en Oceanografía

BENJAMÍN MELHJEN SRAIN CHÁVEZ
CONCEPCIÓN-CHILE
2015

Profesor Guía: Silvio Pantoja Gutiérrez
Dpto. de Oceanografía, Fac. Cs. Naturales y Oceanográficas
Universidad de Concepción

La Tesis de “*Doctorado en Oceanografía*” titulada “Fermentación en la Zona de Mínimo Oxígeno frente a Concepción (36°S) y su implicancia en el ciclo del carbono”, del Sr. *Benjamín Melhjen Srain Chávez* y realizada bajo la Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas, Universidad de Concepción, ha sido aprobada por la siguiente Comisión de Evaluación:

Dr. Silvio Pantoja
Profesor Guía
Universidad de Concepción

Dr. Renato Quiñones
Miembro Comité de Tesis
Universidad de Concepción

Dr. Rodrigo González
Miembro Comité de Tesis
Universidad de Concepción

Dr. Marcelo Gutiérrez
Miembro Comité de Tesis
Universidad de Concepción



Dra. Julieta Orlando
Evaluador Externo
Universidad de Chile

Dr. Rubén Escribano
Director
Programas de Postgrados en Oceanografía
Universidad de Concepción

Índice de Contenidos

Agradecimientos.....	i
Resumen.....	v
Abstract.....	vii
1.- CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Mineralización de materia orgánica: Respiración y Fermentación.....	1
1.2. Importancia biogeoquímica de las Zonas de Mínimo Oxígeno.....	2
1.3. Degradación terminal de la materia orgánica.....	3
1.4. Cadena trófica anaeróbica: Fermentación y Sintrofia.....	4
1.5. Tendencia de intensificación de fenómenos de hipoxia.....	6
1.6. Objetivo General.....	8
1.7. Hipótesis.....	8
1.8. Objetivos específicos.....	8
2. CAPÍTULO 2. MATERIAL Y MÉTODOS.....	10
2.1. Área de estudio.....	10
2.2. Muestreo.....	10
2.2.1. Muestras de agua.....	10

2.2.2. Muestras de sedimentos.....	11
2.3. Análisis de lípidos.....	11
2.3.1. Cromatografía de gas acoplada a espectrometría de masa.....	11
2.3.2. Cromatografía líquida de alta presión acoplada a espectrometría de masa. Análisis de biomarcadores lipídicos arqueanos.....	12
2.4. Análisis de ácidos grasos volátiles de cadenas cortas y otros compuestos orgánicos volátiles en muestras de columna de agua.....	13
2.4.1. Micro-extracción en fase sólida.....	13
2.4.2. Cromatografía de Gas acoplada a Espectrometría de Masa de compuestos volátiles.....	13
2.5. Extracción de ADN desde agua de mar y amplificación mediante PCR de fragmento de 16S rADN arqueano.....	14
2.6. Electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización.....	14
2.7. Extracción de ARN desde el agua de mar e hibridación <i>dotblot</i>	15
2.8. Obtención de inóculos y medios de cultivo.....	15
2.9. Estudio del potencial fermentativo anaeróbico mediante incubaciones.....	16
2.10. Utilización de acetato en procesos de degradación terminal del carbono.....	17
2.11. Producción de metano (CH ₄) y dióxido de carbono (CO ₂).....	17
2.12. Determinación de aminoácidos libres ambientales y en incubaciones.....	18

2.12.1. Derivatización e inyección.....	18
2.13. Cromatografía líquida de alta presión acoplada a detector de fluorescencia.....	18
2.14. Cálculos termodinámicos.....	19
2.15. Análisis estadísticos.....	19
3. CAPÍTULO 3. RESULTADOS.....	20
3.1. Archaeal and bacterial assemblages in the Oxygen Minimum Zone of the upwelling ecosystem off Central Chile as determined by organic biomarkers (Manuscrito 1).....	20
3.2 Cambios interdecadales en la intensidad de la Zona de Mínimo Oxígeno frente a Concepción, Chile (Manuscrito 2).....	70
3.3. Distribución de ácidos grasos volátiles de cadena corta, indicadores de actividad metabólica fermentativa, en la columna de agua de la Zona de Mínimo Oxígeno en el ecosistema de surgencia de Chile central (Manuscrito 3).....	115
CAPÍTULO 4. DISCUSIÓN GENERAL.....	185
4.1. Rol de la Zona de Mínimo Oxígeno estacional frente a Concepción sobre la distribución y abundancia de lípidos isoprenoides arqueanos: Implicancias sobre el índice de paleo-temperatura TEX ₈₆ e inferencias sobre la ecología de las arqueas pelágicas marinas oxidadoras de NH ₄ ⁺	185
4.2. Variación en los niveles de paleo-oxigenación en la Zona de Mínimo Oxígeno del ecosistema de surgencia frente a Chile Central.....	189
4.3. Fermentación en la Zona de Mínimo Oxígeno de la plataforma continental de Chile Central y su implicancia biogeoquímica.....	193

CAPÍTULO 5.

CONCLUSIONES.....198

Referencias.....201



Agradecimientos

Deseo expresar mis más sinceros agradecimientos a todas las personas que contribuyeron de una u otra forma a la construcción de esta tesis, en especial al Dr. Silvio Pantoja quien ha sido un excelente profesor guía apoyándome significativamente durante mis estudios de doctorado con material, sugerencias, escritura de manuscritos, contactos para pasantías en el extranjero, disponibilidad total de las instalaciones de su laboratorio además de su paciencia y dedicación. Del mismo modo, quisiera agradecer al Dr. Julio Sepúlveda por su invaluable apoyo tanto en mi formación profesional, así como por su participación y colaboración en los dos primeros capítulos de esta tesis. Debo también agradecer de igual forma los invaluable consejos y apreciaciones académicos realizados por parte de la Dr. Carina Lange, los cuales han enriquecido los resultados de esta tesis.

Quiero hacer presente también y agradecer el sincero apoyo de mis colegas y amigos del Laboratorio de Geoquímica Orgánica Marina Víctor Acuña, Rodrigo Castro, Eduardo Tejos y Lilian Núñez por su constante apoyo técnico y logístico durante los años de mis estudios de doctorado, así como por sus invaluable consejos. Agradecer también a la tripulación de la L/C Kay-Kay II y al personal de la Estación de Biología Marina de Dichato.

Quiero agradecer también a Dios y a mi familia, en especial a mis padres Benjamín y Nélica, así como a mi mujer Leslie por su gran cariño y apoyo durante estos años. Palabras especiales para mi hijita Josefa, quién hace ya tres años ha iluminado mi vida.

Es mi deber también agradecer infinitamente a las instituciones que apoyaron la realización de esta tesis, así como mi formación académica mediante el otorgamiento de becas de doctorado: Fundación Betty & Gordon Moore (2009-2012) y al programa COPAS Sur Austral (PFB-31) (2012-2014). Así mismo, debo agradecer al Programa del Ministerio de Educación MECESUP UCO-0602, al Departamento de Ciencias Atmosféricas, de la Tierra y Planetaria del Instituto Tecnológico de Massachusetts (MIT), a la Comisión Chilena Fullbright, la Iniciativa Internacional de Ciencia y Tecnología del MIT (MIT-MISTI-Chile) y al Laboratorio de Geobiología del Dr. Roger Summons por apoyar mi estadía en el MIT. Mis más sinceros agradecimientos a los cursos ECODIM y el Curso Internacional de Geobiología del Instituto Wrigley para Estudios Ambientales de la Universidad del

Sur de California y a sus instructores por su significativo aporte en mi formación en las ciencias ambientales, especialmente al Dr. Kurt Hanselman por su sincero compromiso y dedicación.



Curriculum Vitae

Benjamín Melhjen Srain Chávez

Nacido el 20 de Julio, 1973, en Concepción, Chile

2000-2006: Biología Marina (Biólogo Marino, Licenciado en Ciencias c/m en Biología Marina), Universidad Católica de la Santísima Concepción, Chile.

2008-2014: Doctor (c) en Oceanografía, Universidad de Concepción, Chile.

PUBLICACIONES

Srain, B., & Rudolph, A. 2007. Alteration of Acetylcholinesterase Activity of *Semele solida* (Mollusca: SEMELIDAE) as a Biochemical Response to Coastal Anthropogenic Impact. *Journal of Environmental Science and Health Part B* 43(1): 75-80.

Srain, B., & Rudolph, A. 2010. Comparative Anticholinesterase Activity, Lipid peroxidation and Antioxidative Defenses in the Clam *Semele solida* (Gray, 1828) from Three Different Habitats Coastal Chilean Experiencing Different Levels of Insult Pollutant. *Journal of Marine Biology and Oceanography* 45(2): 227-233.

Benjamín Srain, Julio Sepúlveda, Silvio Pantoja, Roger E. Summons, Renato A. Quiñones, Héctor A. Levipan. Seasonal and vertical patterns of archaeal and bacterial assemblages in the Oxygen Minimum Zone of the upwelling ecosystem off Central Chile determined by the distribution of organic biomarkers. *International Journal of Biodiversity, Oceanology and Conservation*, GAYANA (en prensa).

ÁREAS DE INVESTIGACIÓN

Principal: Oceanografía Biológica

Secundaria: Geoquímica Orgánica Marina

Otras: Geomicrobiología

CRUCEROS OCEANOGRÁFICOS

- Serie de Tiempo del COPAS e Iniciativa Microbiana en Bajo Oxígeno frente a Concepción y Oregon, Universidad de Concepción, Chile, 2009-2011.

ESTADÍAS DE INVESTIGACIÓN O ENTRENAMIENTO

- Laboratorio de Geobiología, Instituto Tecnológico de Massachusetts (MIT), Dr. Roger Summons, EE.UU, 2010.
- Laboratorio Hinrichs, MARUM, Universidad de Bremen, Alemania, 2012.



Resumen

Fermentación en la Zona de Mínimo Oxígeno frente a Concepción (36°S) y su implicancia en el ciclo del carbono

Benjamín Srain Ch.

Programa de Doctorado en Oceanografía

Universidad de Concepción, 2015

Dr. Silvio Pantoja, Profesor Guía

Las Zonas de Mínimo Oxígeno juegan un rol preponderante en los ciclos globales del carbono y el nitrógeno en los cuales intervienen una amplia variedad de especies químicas de acuerdo a su grado de oxidación y diferentes procesos microbianos. La alta disponibilidad de materia orgánica así como episodios de agotamiento severo de O₂ hacen de este sistema un potencial nicho biogeoquímico para la ocurrencia de procesos fermentativos en la columna de agua. La fermentación puede ser definida como la utilización de un compuesto orgánico en la ausencia de un aceptor de electrones externo, involucrando la producción de metabolitos reducidos implicados en el metabolismo terminal de la degradación de la materia orgánica. En este trabajo estudiamos la ocurrencia, estacionalidad e intensidad de fenómenos de fermentación en la columna de agua de la Zona de Mínimo Oxígeno frente a Concepción durante un ciclo anual, así como interpretamos las fluctuaciones de las condiciones de óxido-reducción del registro sedimentario, y determinamos si la variación estacional de las concentraciones de O₂ en la columna de agua inciden en la estructura de la comunidad arqueana-pelágica. Patrones verticales y temporales en la distribución y abundancia de GDGTs fueron observados. Las concentraciones de GDGTs fueron altas en el agua subsuperficial (sobre 36 ng/l) durante el periodo de no-surgencia, siendo dominados por GDGT-0 (46%) y crenarqueol (48%). Discrepancias entre temperaturas derivadas desde TEX₈₆ y temperaturas *in situ* fueron observadas en aguas sub-superficiales suboxicas/anoxicas. Los metabolitos fermentativos acetato e isobutirato fueron los compuestos dominantes en la columna de agua en concentraciones promedio de 0,1 μM, y más concentrados en las capas más profundas de la columna de agua donde las condiciones de suboxia y/o anoxia fueron más intensas (i.e., < 30 μM O₂). Correlaciones significativas fueron encontradas

entre actividad fermentativa, O₂ y estacionalidad ($p < 0,05$; Kruskal-Wallis ANDEVA). Etanol, acetato, y CO₂ fueron producidos en incubaciones *ex situ*, bajo condiciones anaeróbicas fermentativas con glucosa como fuente de carbono demostrando el potencial fermentador de la comunidad procarionte del sitio de estudio. La actividad fermentativa de aminoácidos fue evidenciada mediante la formación de ácidos carboxílicos volátiles y CO₂. Por otra parte, la evolución del perfil de aminoácidos durante la incubación indicó que la reacción de Stickland es la posible vía metabólica fermentativa de este material. La oxidación asimilativa de acetato a CO₂ con la consecuente reducción de Fe(III)_s y SO₄⁻ bajo condiciones anaeróbicas experimentales sugiere un activo rol de la fermentación en la biogeoquímica del carbono acoplada a los ciclos del hierro y el azufre en la columna de agua. Biomarcadores orgánicos procariontes y metales sensibles a cambios de óxido-reducción mostraron correlaciones significativas ($p < 0,05$; Spearman) en el registro sedimentario (ca. 110 años), sugiriendo la ocurrencia de un prolongado periodo de ca. 35 años de condiciones muy bajas de O₂ frente a Concepción, aparentemente relacionado a la variación inter-decadal de baja frecuencia de la Oscilación Decadal del Pacífico. Estos resultados implican que la comunidad procarionte ha sido modulada por cambios en la oxigenación de la columna de agua del centro-sur de Chile.

Palabras clave: Zonas de Mínimo Oxígeno, O₂, GDGTs, TEX₈₆, Arquea, biomarcadores, fermentación, metabolitos fermentativos, Reacción de Stickland, oxidación anaerobia asimilativa, ácidos grasos volátiles, estructura comunitaria procarionte, Oscilación Decadal del Pacífico.

Abstract

Oxygen Minimum Zones play an important role in the global cycles of carbon and nitrogen which involved a wide variety of chemical species according to their degree of oxidation and different microbial processes. High availability of organic matter as well as episodes of severe O₂ depletion makes this system a potential biogeochemical niche for the occurrence of fermentation processes in the water column. Fermentation can be defined as the use of an organic compound in the absence of an external electron acceptor, involving the production of terminal reduced metabolites involved in the metabolism of the organic matter degradation. We study the occurrence, seasonality and intensity of fermentation in the water column of the Oxygen Minimum Zone off Concepcion during an annual cycle and interpret the fluctuations of redox conditions of the sedimentary record, and determine whether the seasonal variation in O₂ concentrations in the water column affect the structure of the Archean-pelagic community. Vertical and temporal patterns in the distribution and abundance of GDGTs were observed. GDGTs concentrations were high in the subsurface water (about 36 ng / l) during the non-upwelling, being dominated by GDGT-0 (46%) and crenarqueol (48%). Discrepancies between temperatures derived from TEX₈₆ and in situ temperatures were observed in subsurface suboxic / anoxic waters. Acetate and isobutyrate metabolites were the dominant in the whole water column with average concentrations of 0.1 μM, being more concentrated in the deeper layers of the water column where suboxic and / or anoxia conditions were more intense (i.e., <30 uM O₂). Significant correlations were found between fermentation activity, O₂ and seasonality (p <0.05, Kruskal-Wallis ANOVA). Ethanol, acetate and CO₂ were produced in incubations under anaerobic fermentative conditions with glucose as carbon source demonstrating the fermenter potential of microbial community inhabiting the study site. Amino acid fermentation activity was evidenced by the formation of volatile carboxylic acids and CO₂. Moreover, the evolution of the amino acid profile during incubation indicated that the Stickland reaction was the fermentative metabolic pathway of this material. The assimilative acetate oxidation to CO₂ with the consequent reduction of Fe (III)_s and SO₄⁻ under experimental conditions suggests an active role of anaerobic fermentation in the biogeochemical carbon cycle coupled to iron and sulfur in the water column. Organic prokaryote biomarkers and redox sensitive metals showed significant correlations (p

<0.05; Spearman) in the sedimentary record (ca. 110 years), suggesting the occurrence of an extended period of ca. 35 years of very low O₂ conditions off Concepción, apparently related to inter-decadal low frequency variation Pacific Decadal Oscillation. These results imply that the prokaryote community has been modulated by changes in oxygenation of the water column off central southern Chile.

Keywords: Oxygen Minimum Zones, O₂, GDGTs, TEX₈₆, Archaea, biomarkers, fermentation, fermentative metabolites, Stickland reaction, assimilative anaerobic oxidation, volatile fatty acids, prokaryote community structure, Pacific Decadal Oscillation.



CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

1.1. Mineralización de materia orgánica: Respiración y Fermentación

La ausencia de O₂ en la atmósfera primitiva de la Tierra requirió la generación de vías metabólicas anaeróbicas para la conservación de energía. Debido a su flexibilidad energética, el metabolismo anaeróbico ha sido mantenido a través y después de la transición hacia una atmósfera oxigenada hace aproximadamente 2,7 billones de años atrás (Livingstone 1991, Summons et al. 1999).

El O₂ es el principal oxidante para las demandas energéticas de la biosfera. Sin embargo, existen ecosistemas que son una excepción a esta regla, los que pueden ser encontrados en suelos (Inglett et al. 2005), sedimentos oceánicos (Kristensen 2000, Schink 2006), cuerpos de agua subóxicos y anóxicos (Levin 2000, Paulmier & Ruiz-Pino 2008) y ciertos compartimientos de organismos vivos como tractos digestivos (Brune et al. 2000, Brune & Friedrich 2000).

El fenómeno de agotamiento severo de O₂ en aguas sobre plataformas continentales es altamente significativo. Estos ecosistemas están cubiertos en la actualidad por mares marginales relativamente someros alrededor de la periferia de los continentes. Al comienzo de la era Cenozoica, hace alrededor de 65 millones de años atrás, hubo extensos periodos con un océano altamente estratificado que cubrió vastas áreas de los continentes, en el cual las condiciones de bajas concentraciones de O₂ fueron más severas y más ampliamente extendidas (Tyson & Pearson 1991).

En el océano moderno, las Zonas de Mínimo Oxígeno son capas de aguas sub-superficiales sub-óxicas de varios cientos de metros de profundidad que se consideran trazas persistentes de un océano primitivo anóxico. Estas Zonas de Mínimo Oxígeno están ubicadas en el Pacífico Nororiental Tropical, el Mar de Arabia y el Pacífico Suroriental (Helly & Levin 2004) y se caracterizan por una alta producción primaria, la cual es degradada en la columna de agua consumiendo una alta cantidad de O₂ lo que a su vez es agudizado por una débil ventilación (Wyrtsky 1962, Helly & Levin 2004, Fuenzalida et al. 2009). Zonas agotadas en O₂ estacionalmente son también conocidas, como es el caso de las aguas sobre la plataforma continental frente a Chile central (ca. 36°S), las que se tornan agotadas en O₂ durante la primavera y el verano austral debido a la influencia de la pobremente oxigenada Agua Ecuatorial Sub-Superficial y alto consumo de O₂. En otoño e invierno estas aguas se vuelven oxigenadas otra vez por el aporte de aguas Sub-Antárticas

(Levin 2002).

1.2. Importancia biogeoquímica de las Zonas de Mínimo Oxígeno

Las Zonas de Mínimo Oxígeno son conocidas por jugar un rol preponderante en los ciclos globales del carbono y el nitrógeno en los cuales intervienen una amplia variedad de especies químicas de acuerdo a su grado de oxidación y diferentes procesos microbianos (Ulloa & Pantoja, 2009). En estas zonas se ha detectado la producción de N_2O y N_2 (Bange et al. 1996; Lam & Kuypers 2011), H_2S (Dugdale et al. 1977) y CH_4 (Cicerone & Oremland 1988), episódicamente o por contacto de las aguas subóxicas con sedimentos subyacentes (Paulmier & Ruiz-Pino 2008).

En estas zonas agotadas en O_2 ocurre además una significativa pérdida de N, donde los procesos metabólicos microbianos responsables son la desnitrificación anaerobia heterotrófica y la oxidación anaerobia de amonio quimio-lito autotrófica (e.g., anammox, por su acrónimo en inglés) (Lam & Kuypers 2011). Se ha estimado que “anammox” en las Zonas de Mínimo Oxígeno da cuenta de ca. 20-40 % de pérdida de N fijado desde los océanos del mundo (Kuypers et al. 2005, Hemersley et al. 2007). Por otra parte, se ha sugerido que “anammox” puede ser aún más importante en regiones tales como las zonas de surgencia de Chile y Perú (Kuypers et al. 2005; Lam & Kuypers 2011) donde aguas sub-óxicas con alta concentración de NO_3^- están en contacto con sedimentos que producen grandes cantidades de NH_4^+ (Arrigo 2005), siendo estas las condiciones óptimas que anammox requiere.

Estudios moleculares han demostrado la presencia de genes bacterianos asociados a la oxidación de NH_4^+ tanto en la capa óxica como en el núcleo de la Zona de Mínimo Oxígeno del norte de Chile (Molina et al. 2007), indicando una alta tasa de nitrificación tanto en la oxiclina, así como en la Zona de Mínimo Oxígeno (Molina & Fariás, 2009). Evidencia molecular arqueana para el sitio de estudio ha evidenciado la ocurrencia de genes oxidadores de NH_3^+ arqueanos, así como, la ocurrencia de arqueas metilotróficas productoras de metano, corroborando el rol de las arqueas pelágicas como activos componentes del ciclo del N y el C en el sitio de estudio (Levipan et al. 2007, Quiñones et al. 2009, Molina et al. 2010, Levipan et al. 2012; Srain et al. 2014). Una significativa actividad hidrolítica bacteriana de material polimérico orgánico se ha medido tanto en la capa óxica como en la capa sub-óxica de la columna de agua del sistema de surgencia costera de Chile (Pantoja et al. 2009). La degradación anaeróbica terminal de la materia

orgánica necesita un activo mecanismo de producción de monómeros orgánicos disponibles para ser fermentados por las comunidades microbianas fermentativas de la columna de agua.

1.3. Degradación terminal de la materia orgánica

Los microorganismos juegan un importante rol en la transformación de materia orgánica en la parte superior de la litósfera (tierra, sedimentos) y en la hidrosfera (océanos y cuerpos de agua dulce). Este proceso es llamado respiración, la que puede ser aeróbica y anaeróbica. En la respiración aeróbica la materia orgánica es completamente degradada a CO_2 , H_2O , NO_3^- , SO_4^{2-} y PO_4^{3-} . El proceso por el cual esta re-mineralización ocurre es llamado respiración aeróbica ya que es el O_2 el aceptor terminal de electrones en la oxidación. En muchos casos de mineralización aeróbica, un solo grupo de microorganismos puede ser el responsable de la completa degradación del compuesto. En otras instancias, sin embargo, un consorcio de dos o más organismos puede colaborar en el proceso, especialmente en la degradación de polímeros debido a que solamente uno o unos pocos miembros del consorcio producen las enzimas necesarias para la despolimerización, la cual ocurre extracelularmente en general (Hoppe 1991; Hoppe et al. 1993; Arnosti et al. 2005a, 2005b; Schulz & Zabel 2006). En la respiración anaeróbica, los productos de la completa degradación de la materia orgánica son CH_4 y/o CO_2 , H_2 , NH_4^+ , H_2S , PO_4^{3-} , en la cual NO_3^- , Fe(III), Mn (IV), SO_4^{2-} , CO_2 y otras especies reducibles sirven como aceptores finales de electrones en reemplazo del O_2 , pudiendo involucrar un solo organismo o una sucesión de varios microorganismos (Ehrlich & Newman 2008).

El decaimiento de la materia orgánica en ambientes subóxicos y anóxicos puede ser llevado a cabo por consorcios microbianos mutualistas, a través de interacciones sintróficas entre bacterias que resulta en la degradación completa de la materia orgánica a CO_2 y nutrientes inorgánicos (Kristensen 2001, Valdemarsen & Kristensen 2010). Es así como macro-moléculas orgánicas son hidrolizadas a fragmentos más pequeños que son fermentados a alcoholes, ácidos grasos, H_2 , CO_2 y energía (Megonigal et al. 2004). Mediante fermentación secundaria, estos productos son fermentados a acetato y otros ácidos grasos volátiles de bajo peso molecular (Megonigal et al. 2004). Los ácidos grasos volátiles son oxidados por bacterias a CO_2 con la concurrente reducción de un aceptor de electrones externo (Canfield et al. 2005, Valdemarsen & Kristensen 2010) (Fig. 1).

Bajo condiciones subóxicas/anóxicas péptidos y aminoácidos son fermentados a ácidos

carboxílicos volátiles, para finalmente ser convertidos en NH_4^+ y CO_2 mediante la actividad de microorganismos (McInerney 1988). La degradación de amino ácidos bajo condiciones subóxicas/anóxicas comienza con una desaminación, lo cual puede ocurrir por oxidación, reducción, o fermentación (sin la transferencia de electrones) (Barker 1981, McInerney 1988, Andreesen et al. 1989). Los aminoácidos son considerados importantes sustratos orgánicos en procesos asociados a la degradación terminal de la materia orgánica como la reducción de sulfato mediado por bacterias (Boschker et al. 2001, Takii 2003).

Los intermediarios orgánicos reducidos de bajo peso molecular como ácidos carboxílicos volátiles y alcoholes volátiles de cadenas cortas raramente se acumulan producto del rápido reciclamiento, observándose altas concentraciones solamente en sedimentos marinos con alta carga de carbono orgánico (Hansen et al. 1993, Holmer & Kristensen 1992, 1994, Kristensen & Hansen 1995, Holmer & Kristensen 1996). Dentro de estos intermediarios, el acetato es considerado como el principal producto en la fermentación de la materia orgánica, estimándose que es el sustrato orgánico más importante en procesos de degradación terminal de la materia orgánica como desnitrificación, reducción de óxidos metaloides, reducción de SO_4^- y metanogénesis (Christensen 1984, Sowers et al. 1984, Lovley 1991, Holmer & Kristensen 1994, Hansen & Blackburn 1995, Chidthaisong & Conrad 2000).

1.4. Cadena trófica anaeróbica: Fermentación y Sintrofia

La producción de materia orgánica en regiones costeras muestra una fuerte estacionalidad debido a las variaciones en la producción primaria (Dugdale 1972, Bakun & Nelson 1991). Las comunidades microbianas naturales son generalmente diversas y están involucradas en una gran variedad de procesos biogeoquímicos (Boschker et al. 2001). Muchas bacterias heterotróficas degradan y mineralizan materia orgánica compleja, donde muchos intermediarios de bajo peso molecular producidos por bacterias fermentativas juegan un rol importante (Boschker et al. 2001).

Durante la degradación microbiana de la materia orgánica, los polímeros son hidrolizados a monómeros como aminoácidos, azúcares y ácidos grasos antes de ser incorporados por microbios para ser transformados. En ambientes óxicos, se ha determinado que una sola bacteria aeróbica puede oxidar monómeros completamente a CO_2 . En contraste, en ambientes anóxicos, un consorcio de microorganismos es requerido para sucesivamente descomponer los sustratos orgánicos a CO_2 . Microbios fermentadores,

usualmente transforman los monómeros en ácidos grasos de bajo peso molecular, etanol e H_2 . Entre estos productos de fermentación, el acetato es el intermediario más común (Fenchel & Finlay 1995).

La fermentación es un proceso catabólico anaeróbico que genera energía a través de la utilización de un compuesto orgánico en la ausencia de un aceptor de electrones externo. La fermentación de glucosa a ácido láctico por la vía de Embden-Meyerhoff es un ejemplo. Dos átomos de hidrógeno son removidos en un paso de oxidación desde un producto metabólico intermediario, gliceraldehído 3-fosfato, resultando en la formación de 1,3-difosfoglicerato. El par de hidrógenos que son removidos son transferidos a piruvato reduciéndolo a ácido láctico. La fuente de piruvato es la transformación enzimática gradual del previamente formado 1,3-difosfoglicerato. Una variante de esta vía conduce a la formación de etanol y CO_2 . Otro mecanismo de fermentación de glucosa puede conducir al acetato incluida la vía de Etner-Doudoroff, la vía de la pentosa fosfato y la vía de la pentosa fosfato ketolasa (Stryer 1995, Schaechter et al. 2006). Así mismo, una nueva vía glicolítica conducente a la formación de acetato y formato ha sido descubierta en el arqueón *Thermococcuszilligii* (Xavier et al. 1999).

La conversión de energía en la fermentación es producto del nivel de fosforilación del sustrato, el cual casi nunca involucra un sistema de transporte de electrones unido a la membrana plasmática. La fermentación siempre ocurre en el citoplasma de la célula. Procariontes anaerobios facultativos y estrictos son capaces de realizar fermentación, pero es relativamente raro entre microorganismos eucariontes. Ciertos hongos, tales como la levadura *Saccharomyces cerevisiae* son la excepción (Müller 2001).

La fermentación genera muy poca energía comparado con el metabolismo respiratorio, sin embargo este proceso biológico es un componente clave en los procesos de mineralización anaeróbica debido a que la mayoría de los microorganismos no-fermentativos no pueden utilizar monómeros liberados durante la hidrólisis de polímeros (Megonigal et al. 2004), sino que usan los eductos metabólicos semi-reducidos de bajo peso molecular biosintetizados a través de la actividad fermentativa. Como resultado, los fermentadores pueden exceder en número a las bacterias involucradas en respiración anaeróbica terminal en algunos ambientes (Megonigal et al. 2004). Por ejemplo, en sedimentos con alto contenido de sulfuro las bacterias reductoras de sulfato típicamente corresponden al 5% de las bacterias, mientras que la mayoría de las bacterias presentes están involucradas en la hidrólisis de polímeros y en metabolismo fermentativo (Devereux et al. 1996). En la columna de agua una importante fracción de las bacterias halófilas

marinas son anaerobias facultativas las cuales pueden fermentar sustratos orgánicos para crecer anaeróbicamente (Shie et al. 2000). Las bacterias marinas de este tipo son de los géneros *Vibrio* (Baumann et al. 1984), *Photobacterium* (Baumann & Baumann 1984), *Listonella* (MacDonell & Colwell 1985) y *Colwellia* (Deming et al. 1988) de la familia *Vibrionaceae* (Baumann & Schubert 1984). Estas bacterias constituyen entre el 10-50% de total de las bacterias heterotróficas tanto en aguas costeras así como en aguas oceánicas (Simidu & Tsukamoto 1985).

En cultivos puros, bacterias fermentadoras consumen una gran variedad de compuestos orgánicos como azúcares, amino ácidos, purinas, pirimidinas, compuestos aromáticos, y un amplio rango de ácidos orgánicos, para producir un amplio espectro de productos fermentativos como ácidos grasos y alcoholes (de entre 1 a 18 átomos de carbono), H₂, y CO₂ (Schink & Stams 2002). Bajo condiciones metanogénicas los productos de la fermentación son esenciales, en cambio las bacterias reductoras de metales y SO₄⁻ son metabólicamente más versátiles que las arqueas metanogénicas siendo capaces de mineralizar la mayoría de los productos de la fermentación primaria directamente.

1.5. Tendencia de intensificación de fenómenos de hipoxia

Los niveles de O₂ en los océanos influencia el ciclamiento biogeoquímico de los elementos, la distribución de las especies marinas y la economía de muchos países costeros (Stramma et al. 2010, Doney et al. 2012, Stramma et al. 2012). Previa investigación sobre ambientes hipóxicos han sido focalizadas sobre aquellas ubicadas en áreas cerradas donde la hipoxia puede ser exacerbada o inducida por el impacto antropogénico. Condiciones de hipoxia ocurren naturalmente en muchos ambientes costeros con circulación restringida, pero la reciente proliferación de zonas hipóxicas a lo largo de líneas de costa habitadas aparecen ligadas a la recarga de nutrientes de origen antrópico y eutroficación costera (Turner & Rabalais 1994, Diaz & Rosenberg 1995, Cloern 2001, Colman & Bratton 2003).

Observaciones realizadas por Keeling & García (2002) y Stramma et al. (2008) han indicado que algunos conductores climáticos que influyen la formación de “zonas hipóxicas” podrían ser exacerbados, incluyendo temperaturas mayores, cambios en la duración de las precipitaciones, aumento en el nivel del mar y cambios en la intensidad y frecuencia de los vientos y tormentas. El calentamiento en las aguas superficiales, incrementos en episodios de estratificación, disminución en la circulación de retorno

meridional, y reducción en la ventilación de la termoclina son parte de lo esperado bajo el actual escenario de calentamiento global de origen antropogénico, lo cual podría tender a reducir el transporte de aguas superficiales ricas en oxígeno hacia el fondo y así disminuir el inventario de oxígeno de los océanos (Meehl et al. 2007).

El calentamiento de las aguas del océano podría conducir a la disminución de la surgencia de aguas ricas en nutrientes y así reducir la producción exportada de material orgánico y el consumo de O₂ respirable en las aguas sub-superficiales pero, a su vez, tiende a incrementar el tiempo de residencia de las aguas en la profundidad del océano permitiendo de esta forma el aumento de consumo de O₂ (Boesch 2008). En otras zonas, Vargas et al. (2007) propusieron que el calentamiento global ha aumentado el contraste térmico entre la tierra y el océano a lo largo de la costa del norte de Chile y Sur de Perú, intensificando el estrés del viento y la surgencia, resultando en un aumento de la producción primaria durante la condición inter-decadal *El Niño-like*. Este fenómeno fue propuesto en 1990 por Bakun para las zonas de surgencia costera, podría hacer disminuir el contenido de O₂ disuelto por consumo en estas zonas.

Recientes observaciones sobre cambios en la concentración de O₂ oceánico muestran una tendencia hacia la disminución durante las últimas décadas en la región circumpolar, en latitudes medias y altas del Pacífico Norte, en el Pacífico Sur Oriental así como en el Atlántico Norte (Bakun 1990, Emerson et al. 2004). Sin embargo, existen también regiones donde las concentraciones de O₂ han aumentado como en el Océano Índico Sur (McDonagh et al. 2005) y la frontera entre los giros subpolar y subtropical en el Pacífico Norte (Mecking et al. 2008), lo cual podría reflejar una variabilidad natural (Frölicher et al. 2009).

Una de las preguntas sobre el funcionamiento de las Zonas de Mínimo Oxígeno es que si anammox es responsable de una importante fracción de la producción de N₂ (Arrigo 2005, Lam et al. 2009), y no la desnitrificación, ¿Cuáles procesos degradan la materia orgánica en zonas productivas con baja concentración de O₂? La fermentación podría mineralizar una fracción importante de esta materia orgánica. La alta producción primaria y consecuente degradación, así como la irrupción de aguas pobres en O₂ (Wyrtky 1962, Helly & Levin 2004, Fuenzalida et al. 2009), sumado a la presencia de enzimas fermentadoras en la columna de agua del Sistema de Corriente de Humboldt (González & Quiñones 2009) son factores que podrían gatillar procesos de fermentación en el núcleo de la columna de agua de la Zona de Mínimo Oxígeno en la costa del ecosistema de surgencia frente a Concepción.

En este trabajo de tesis investigamos reacciones de fermentación en la columna de agua del ecosistema de surgencia de Chile Central estudiando la variabilidad ambiental de la concentración de metabolitos asociados a sistemas con bajo O_2 en la columna de agua y la determinación experimental de tasas de producción de metabolitos fermentativos. El contexto oceanográfico de esta tesis se completa con el mapeo de la distribución de microorganismos en la columna de agua y ambiente sedimentario usando técnicas de biología molecular y biomarcadores orgánicos característicos de microorganismos anaerobios. Asimismo, examinamos el registro sedimentario estudiando la variación en el contenido de biomarcadores de los últimos 110 años.

1.6. Objetivo General

Estudiar reacciones de fermentación en la columna de agua de la Zona de Mínimo Oxígeno frente a Concepción e interpretar las fluctuaciones de las condiciones de óxido-reducción registradas en el sedimento

1.7. Hipótesis

H₁: La fermentación genera compuestos reducidos de bajo peso molecular en la Zona de Mínimo Oxígeno del ecosistema de surgencia de Chile central

H₂: Metabolitos reducidos producidos por fermentación en la columna de agua en la Zona de Mínimo Oxígeno son utilizados por la comunidad microplanctónica en procesos asociados al ciclamiento terminal del carbono

H₃: El registro sedimentario de los últimos 110 años evidencia una intensificación de las condiciones de hipoxia en el ecosistema de surgencia frente a Concepción, la cual se refleja en el aumento de biomarcadores de metabolismo anaerobio hacia el presente

H₄: Las variaciones estacionales de los niveles de oxigenación en la columna de agua modulan la composición de la estructura comunitaria arqueana en el sitio de estudio

1.8. Objetivos específicos

1. Identificar productos de fermentación en la columna de agua y su variación estacional asociada a la intensificación de la productividad primaria y agotamiento de O_2 en primavera-verano
2. Estudiar el potencial metabolismo fermentativo de la comunidad microbiana de la Zona de Mínimo Oxígeno en el ecosistema de surgencia frente a Concepción
3. Reconstruir los cambios en la intensidad de las condiciones de óxido-reducción durante los últimos 110 años de registro sedimentario provenientes de la Zona de Mínimo Oxígeno frente a Concepción a través del uso de geo-moléculas orgánicas y metales traza
4. Determinar el efecto estacional de las concentraciones de O_2 en la columna de agua sobre la estructura comunitaria de la comunidad arqueana pelágica involucrada en el metabolismo anaerobio



CAPÍTULO 2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. Área de estudio

El área de estudio (Estación 18; 36° 30,8'S 73° 7'W) (Fig. 1) está ubicada ca. 18 millas náuticas desde la línea de costa de Concepción con una profundidad de ca. 90 metros (Fig. 2). La estación 18 es el sitio de la Serie de Tiempo Oceanográfica del Centro de Investigación Oceanográfica en el Pacífico Sur Oriental de la Universidad de Concepción (COPAS, www.copas.udec.cl/esp/investigación/serie/).

2.2. Muestreo

Los cruceros fueron realizados en el marco del proyecto *Iniciativa Microbiana en Bajo Oxígeno frente a Concepción y Oregon* (MILOCO, Fundación Moore, http://mi_loco.coas.oregonstate.edu), asociados a la Serie de Tiempo Oceanográfica del Centro COPAS. Las muestras de agua y sedimento fueron recolectadas a bordo de la L/C Kay-Kay II entre Noviembre 2009 y Enero 2011. Los datos oceanográficos auxiliares de la columna de agua incluyendo temperatura, salinidad, oxígeno, clorofila, amonio, nitrato y nitrito fueron obtenidos desde la base de datos del Centro COPAS.

2.2.1. Muestras de agua

Para la determinación de compuestos volátiles de bajo peso molecular indicadores de actividad ambiental fermentativa en el sitio de estudio, se recolectaron muestras de agua desde noviembre 2009 hasta Enero 2011 desde las profundidades 0, 10, 30, 50, 65 y 80 metros con botellas Niskin de 10 litros. Submuestras de aproximadamente 50 mL de agua (en triplicado) fueron removidas en botellas de vidrio para gases bajo una atmósfera de nitrógeno, y envenenadas inmediatamente con cloruro de mercurio para detener la actividad microbiana. Las botellas fueron selladas con tapones de goma de butilo y guardadas en oscuridad a 4°C hasta su posterior almacenamiento en el Laboratorio de Geoquímica Orgánica.

Para el análisis de biomarcadores lipídicos arqueanos, ca. 100 litros de agua fueron recolectados en Septiembre 2009 (período de surgencia) y Junio 2010 (período de no surgencia) desde la capa óxica (10 m) y la capa sub-óxica (80 m), utilizando una roseta

equipada con botellas Niskin de 10 litros. Las muestras fueron transferidas a contenedores oscuros y filtrados con una bomba peristáltica en el laboratorio a través de filtros de fibra de vidrio de 0,7 μm de tamaño de poro, previamente-combustionados a 450°C por 4 horas.

2.2.2. Muestras de sedimentos

Un testigo de sedimento de aproximadamente 25-cm de longitud fue obtenido con un “box-corer” GOMEX desde sedimentos de la plataforma continental frente a Concepción (Estación 18, 36°30.8'S, 73°7'W) en Febrero 2009 (periodo de surgencia-verano austral). Los primeros 5 cm fueron seccionados continuamente cada 0,5 cm, y el resto del testigo fue muestreado con una resolución de 1 cm. Las muestras fueron almacenadas en placas de Petri y mantenidas congeladas a -18° C hasta su análisis de laboratorio.

2.3. Análisis de lípidos

La extracción de lípidos fue realizada utilizando un versión modificada del método descrito por Bligh & Dyer (1959), sustituyendo cloroformo por diclorometano. Las muestras de sedimento liofilizado (1-5 g) fueron secuencialmente extraídas mediante ultracentrifugación con 30 mL de diclorometano/metanol (1:3 v/v, 2x), diclorometano/metanol (1:1 v/v, 1x) y diclorometano (2x). El extracto de lípidos fue concentrado con un evaporador rotatorio y secado con una pipeta Pasteur con Na_2SO_4 anhidro. El extracto fue dividido en cuatro fracciones mediante una columna cromatográfica de gel de sílica. Los hidrocarburos alifáticos (F1) fueron eluidos con 40 mL de hexano, las cetonas (F2) con 50 mL de tolueno/hexano (1:3 v/v), alcoholes (F3) y los compuestos polares (F4) eluidos con 35 mL de acetato de etilo/metanol/hexano (4:4:1 v/v).

2.3.1. Cromatografía de gas acoplada a espectrometría de masa

Para el análisis de los biomarcadores lipídicos se utilizó un cromatógrafo de gas Agilent 6890N acoplado a un espectrómetro de masa Agilent 5973 Network. Los alcoholes en F3 fueron derivatizados con 25 μL de BSTFA (N,O-bis(trimetilsilil) trifluoroacetamida) y 25 μL de piridina y calentada a 70°C por una hora. Hopanoles, esteroides y mono-alquil glicerol éteres presentes en la fracción F3 fueron analizados utilizando una columna DB-5 de 30 m de longitud (0,5 mm de diámetro y 0,5 μm de grosor de la película), usando He

como gas transportador. El programa de temperatura del horno fue: 60°C (2 min) hasta 150°C a 15°C/min, 320°C a 4°C/min (isotérmico por 34,5 min). Geohopanos y alcanos fueron analizados en la fracción alifática de hidrocarburos (F1) utilizando una columna HP-5 de 30 m de longitud (0,32 mm de diámetro y 0,25 µm de grosor de la película). El programa de la temperatura del horno fue: 80°C (2 min) hasta 130°C a 20°C/min hasta 310°C a 4°C/min. El espectrómetro de masa fue operado en modo de impacto de electrones (70 eV) con la fuente de iones a 250°C. Los espectros de masa fueron obtenidos en modo de escaneo completo (rango de m/z 40-600, tasa de escaneo de 2,6 s⁻¹) y en modo selectivo de iones (, m/z 191 para hopanos y hopanoles).

Las concentraciones de los compuestos fueron determinadas utilizando los estándares internos escualano para los de la fracción F1, y 1-nonadecanol para los de la fracción F3. Los contenidos son expresados por peso seco de sedimento.

2.3.2. Cromatografía líquida de alta presión acoplada a espectrometría de masa. Análisis de biomarcadores lipídicos arqueanos

Las muestras de filtros conteniendo materia orgánica particulada y muestras de sedimento liofilizado fueron secuencialmente extraídas mediante ultra-sonido (3x) con metanol, diclorometano-metanol (1:1, vol/vol) y diclorometano. Los extractos lipídicos fueron concentrados usando un evaporador rotatorio y secados en una pipeta Pasteur con fibra de vidrio previamente combustionada y Na₂SO₄ anhidro. Los lípidos fueron separados en una fracción polar y otra no-polar utilizando una pipeta Pasteur con Al₂O₃ activado, después de una elución con hexano/propanol (99:1 vol/vol) y filtrado a través de un filtro PTFE de 0,45 µm. Las muestras fueron analizadas utilizando cromatografía líquida de alta presión acoplada a espectrometría de masa (Hopmans et al. 2000, Liu et al. 2012). El sistema de cromatografía líquida de alta presión (Agilent serie 1200) consta de un muestreador automático y una bomba binaria unida a un espectrómetro de masa Q-TOF 6520, a través de una interfaz de ionización química a presión atmosférica (Agilent). Las muestras fueron disueltas en 200 µL de hexano/isopropanol (99:1 vol/vol). Glicerol di-alquil glicerol tetra-éteres isoprenoides (iGDGTs) y glicerol di-alquil glicerol tetra-éteres ramificados bacterianos (rGDGTs) fueron separados utilizando una columna PrevailCyano (2,1 x 150 mm, 3mm; Grace, Deerfield, USA), mantenida a 35°C, a un flujo de 0,25 mL/min. El programa de elución fue: 5 min 100% eluyente A (hexano/isopropanol, 99:1 vol/vol) durante 20 min, seguido por un gradiente lineal del 100% del eluyente B por 5

min. La columna fue re-equilibrada con 100% del eluyente Aa 0,6 mL/min por 5 min entre inyecciones. La cuantificación de GDGTs fue realizada mediante la co-inyección de las muestras con el estándar C₄₆GDGT (Huguet et al. 2006).

2.4. Análisis de ácidos grasos volátiles de cadenas cortas y otros compuestos orgánicos volátiles en muestras de columna de agua

2.4.1 Micro-extracción en fase sólida

Se extrajeron 25 mL de agua de cada muestra en triplicado para generar un espacio de cabeza suficiente para efectuar el análisis de micro-extracción de fase sólida acoplado a análisis de cromatografía de gas - espectrometría de masa.

Las muestras fueron depositadas en una placa y llevadas a 30° C bajo agitación constante por aproximadamente 10 minutos hasta alcanzar el equilibrio entre la fase acuosa y la fase gaseosa. Para efectuar la extracción de metabolitos volátiles desde la muestra se utilizó una fibra de 85 µm CarboxenTM/PDMS Stable Flex (SUPELCO) para adsorber compuestos polares y apolares. La fibra fue insertada en el septo de inserción de la botella de gas y expuesta a la fase gaseosa (espacio de cabeza) por 15 minutos para llevar a cabo la adsorción de los compuestos volátiles de cadena corta presentes en las muestras de agua en la fibra. La fibra fue colocada en el puerto de inyección del cromatógrafo de gas y expuesta por 10 minutos a 250°C para la desorción de los metabolitos volátiles ambientales colectados.

2.4.2. Cromatografía de Gas acoplada a Espectrometría de Masa de compuestos volátiles

El análisis fue realizado utilizando un cromatógrafo de gas de la serie Agilent 6890N acoplado a un espectrómetro de masa Agilent 5973 Network. El espectrómetro de masa fue operado en el modo de impacto de electrones (70 eV) con la fuente de iones a 250 °C. Los espectros de masa fueron adquiridos en el modo de escaneo completo (rango m/z 40-600, tasa de escaneo de 2,6s⁻¹) y de monitoreo de iones selectivo, dada las bajas concentraciones (nM) de los metabolitos carboxílicos en la columna de agua. Los iones m/z seleccionados por compuesto fueron: acetato (C2; m/z 43-45-60); isobutirato (C4; m/z 43-73-88); butirato (C4; 41-60-73); isovalerato (C5; m/z 43-60-87); valerato (C5; m/z 41-60-73).

El análisis de los compuestos volátiles cortos (metabolitos indicadores de actividad

fermentativa) fue llevado a cabo utilizando una columna HP-5MS de 30 m de longitud (0,25 mm de diámetro, 0,25µm de grosor de la película), utilizando He como gas transportador. El programa de la temperatura del horno del cromatógrafo fue: 35°C (5 min), 35-230°C (15°C/min), 230°C (3 min).

Las concentraciones de cada compuesto fueron determinadas utilizando una curva de calibración externa con una mezcla de ácidos volátiles (SUPELCO 46975-U) en agua Milli-Q.

2.5. Extracción de ADN desde agua de mar y amplificación mediante PCR de fragmento de 16S rADN arqueano

Las muestras (500 mL) fueron pre-filtradas a través de filtros de 25 µm y concentradas mediante filtración al vacío (<10 cm Hg) sobre filtros de éster de celulosa (tamaño de poro de 0,22 µm; GSWP04700; Millipore). El ADN genómico fue extraído directamente desde filtros descongelados usando un kit de extracción de ADN PowerSoil™ (MoBioLaboratories, USA). Los extractos de ADN genómico fueron almacenados a -20°C hasta sus posterior análisis de PCR-DGGE.

La solución PCR (50 µL) contenía 65 ng de templado de ADN y 5x GoTaqflexi búfer (1x; Promega, USA), una mezcla de desoxi-nucleótido (200µM), solución de MgCl₂ (3,5 mM), primers directos y reversos (1µM cada uno), y polimerasa GoTaq (1,25 U; Promega). Los amplicones (580 pb) necesarios para el subsecuente DGGE, fueron obtenidos con la combinación de primers 344f-GC (Raskin et al., 1994) y el 927r (Kormas et al., 2003), y sus respectivas secuencias (5' a 3') CCGCGCGCGGCGGGCGGGGCGGGGCCCCTACGGGGYGCASCAGGCGy CCCGCCAATTCCTTTAAGTTT. La PCR fue realizada utilizando un termociclador T-personal (Biometra, Göttingen, Alemania) y el programa descrito en Levipan et al. (2012).

2.6. Electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización

Los gels fueron emitidos usando un sistema de detección DCode™ Universal Mutation (Bio-RadLaboratories, USA) de acuerdo a Levipan et al. (2012). Las bandas individuales confiables fueron identificadas utilizando el comando “umbral del punto más alto” del software 1 D Scan EX (v.3.0), el cual remarca el nivel sobre el cual la densidad del *peak* fue considerada como una verdadera banda. Las imágenes del gel fueron

analizadas mediante la asignación de números a cada una de las bandas (Unidades Taxonómicas Operacionales=UTOs) sobre el gel; estos fueron luego marcados como presentes (marca=1) o ausente (marca=0). El marcaje de los patrones de las bandas resultó en una matriz binaria usando el coeficiente de proximidad de Jaccard y el programa PAST (v. 3.01).

2.7. Extracción de ARN desde el agua de mar e hibridación *dotblot*

Siete litros de agua de mar pre-filtrada a través de 25 µm y concentrada mediante filtración al vacío (< 10 cm Hg) utilizando filtros de éster de celulosa (tamaño de poro 0,22 µm, GSWP04700, Millipore). El ARN fue extraído desde los filtros como en Summers (1970) con modificaciones (Levipan et al. 2007a, Quiñones et al. 2009). Los extractos fueron cargados sobre membranas de nitro-celulosa para ácidos nucleicos (Hybond-N; AmershamBio-Sciences, UK), usando un aparato “dotblotting” (Bio-Rad, USA). Los análisis de hibridación en membrana fueron realizados a 44°C mediante la utilización de las pruebas 5’ fin digoxigenin-sondas marcadas (ThermoBiosciences) y el protocolo de Raskin et al. (1994). Las sondas (5’ to 3’) EUB338 (5’-GCTGCCTCCCGTAGGAGT; Amann et al. 1990) y ARCH915 (5’-GTCCTCCCCCGCCAATTCCT; Stahl and Amann 1991), permitieron determinar la concentración de 16S rARN procarionte. Las sondas EURY498 (5’- CTTGCCCRGCCCT; Burggraf et al. 1994) y MS1414 (5’- CTCACCCATACCTCACTCGGG; Raskin et al. 1994) fueron utilizadas para detectar la mayoría de Euryarchaeota y algunos metanógenos, respectivamente.

2.8. Obtención de inóculos y medios de cultivo

Los inóculos fueron obtenidos desde las muestras de agua de mar ambiental obtenidas desde el sitio de estudio durante el crucero realizado en noviembre de 2013. Una vez obtenidas las muestras se procedió a sub-muestrear una botella Niskin desde la profundidad correspondiente al núcleo de la Zona de Mínimo Oxígeno con una jeringa de 10 mL que permitió introducir el inóculo en tubos contenedores al vacío de 10 mL. Estos tubos fueron mantenidos a 4°C y bajo oscuridad hasta su llegada al laboratorio.

Para realizar los experimentos de incubación se preparó agua de mar artificial en frascos de vidrio de 1L previamente auto-clavados por 1 h, la cual contenía por litro de agua destilada: 20 g NaCl; 0,67 g KCl; 2,5 g NaHCO₃; 10 mL solución de vitamina; 10 mL

solución mineral; 20 mL solución mineral RST; 50 mL solución salina. La solución de vitaminas contenía por litro: 2 mg biotín; 2 mg ácido fólico; 10 mg piridoxina-HCl; 5 mg riboflavina; 5 mg tiamina; 5 mg ácido nicotínico; 5 mg ácido pantotéico; 0,1 mg vitamina B12; 5 mg ácido p-aminobenzoico; 5 mg ácido tióctico. La solución mineral contenía por litro: 1,5 g ácido nitriloacético trisodio, 3 g de $MgSO_4$, 0,5 g $MnSO_4 \cdot xH_2O$, 1 g de NaCl, 0,1 g $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,1 g $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 0,1 g $CoCl_2 \cdot 6H_2O$, 0,13 g $ZnCl_2$, 0,01 g $AlK(SO_4)_2 \cdot 12H_2O$, 0,01 g H_3BO_3 , 0,025 g Na_2MoO_4 , 0,025 g $NiCl_2 \cdot 6H_2O$, 0,025 g $Na_2WO_4 \cdot 2H_2O$. Solución mineral RST (por litro): 5 g NH_4Cl , 0,5 g KCL, 0,5 g KH_2PO_4 , 1 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, $CaCl_2 \cdot xH_2O$. Solución salina (por 100 mL): 21,2 g $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, 3,04 g $CaCl_2 \cdot 2H_2O$. El medio fue auto-clavado por 1 h y burbujado por 15 m con N_2 para desplazar cualquier traza de O_2 , posteriormente se agregó 0,001 g de resazurina (como indicador redox). Luego, asépticamente y bajo atmósfera de N_2 se agregó la solución salina al medio.

A cada botella con medio de cultivo (30 mL) se les agregó una alícuota correspondiente al 10 % v/v de inóculo ambiental. Las incubaciones fueron mantenidas a una temperatura constante de 10°C en completa oscuridad dentro de un incubador ShellLab LI 20-2 (USA).

2.9 Estudio del potencial fermentativo anaeróbico mediante inubaciones

Las incubaciones se hicieron en duplicado y bajo condiciones de asepsia en una campana de flujo laminar LABCONCO Clase II Tipo AII, utilizando botellas de vidrio de 50 mL las que fueron previamente esterilizadas en autoclave. Aproximadamente 30 mL de agua de mar artificial esterilizada fueron agregados a cada botella (x3) a los que se agregó glucosa, esterilizada mediante filtración por 0,22 μm , a una concentración final de 40 mM como única fuente de carbono. Ningún aceptor de electrones externo fue agregado en este tratamiento. El medio de cultivo fue burbujado por 5 min con N_2 para remover el posible O_2 presente. Una vez ajustadas las condiciones del tratamiento se procedió a inocular los medios agregando un 10% v/v del medio enriquecido. La botellas fueron tapadas con tapas de butilo pre-esterilizadas y selladas con sellos de aluminio.

Para determinar la tasa de fermentación de glucosa se inhibió la potencial actividad reductora de sulfato y metanogénica en el medio de cultivo mediante la adición de 20 mM de molibdato, 100 μM de $CHCl_3$ (cloroformo) y 200 μM de N1-guanil-1,7-diaminoheptano (GC7) para evitar el consumo de los productos fermentativos por parte de

la comunidad microplanctónica presente en el inóculo. El segundo tratamiento experimental fue llevado a cabo sin agregar los inhibidores.

2.10. Utilización de acetato en procesos de degradación terminal del carbono

Para evaluar el uso de acetato en procesos terminales de degradación del carbono orgánico por parte de la comunidad micro-planctónica proveniente de la Zona de Mínimo Oxígeno del sitio de estudio, se realizaron incubaciones bajo condiciones subóxicas en botellas de vidrio de 50 mL previamente esterilizadas utilizando NO_3^- , óxido de hierro pobremente cristalino Fe(III)_s y SO_4^- como aceptores de electrones externos.

Cada tratamiento se realizó en triplicado además de un control por cada tratamiento (incubación con medio líquido sin inocular) Treinta mL de agua de mar artificial fueron transferidos a botellas de vidrio de 50 mL, a los que se agregó acetato de sodio (NaCH_3COO) a concentración de 20 mM como única fuente de carbono.

Al primer tratamiento se le agregó nitrato de sodio (NaNO_3) a una concentración final de 50 mM como fuente de aceptor de electrones externo para mantener la incubación bajo condiciones desnitrificantes. El segundo tratamiento consistió en agregar Fe(III)_s como aceptor de electrones externo. El Fe(III)_s fue preparado al disolver $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ en agua destilada previamente esterilizada, llevada a una concentración final de 0,4 M que fue llevada cuidadosamente a pH 7 con una solución de NaOH 10 M bajo agitación constante. Para remover el cloruro disuelto se centrifugó la solución a 4000 rpm durante 15 minutos para luego eliminar el sobrenadante. Este paso se repitió 5 veces. El Fe(III)_s se agregó a las botellas de incubación a una concentración de 250 mM para mantener la incubación bajo condiciones reductoras de hierro. Para el tercer tratamiento, se utilizó agua de mar artificial esterilizada con 0,2 g/L de cisteína y 0,5 mg/L de $\text{Na}_2\text{S}_x\text{9H}_2\text{O}$, para producir condiciones altamente reducidas en la solución, y sulfato de sodio (NaSO_4 , 50 mM) como única fuente de aceptor de electrones externos.

Las mediciones de las concentraciones de $\text{Fe(II)}_{\text{aq}}$ se realizaron utilizando el método 1,10 fenantrona, utilizando un kit de medición HACH Company/Hach Lange GMBH y un espectrofotómetro HACH DR-4000, siguiendo las indicaciones del fabricante.

2.11. Producción de metano (CH_4) y dióxido de carbono (CO_2)

La producción de CH_4 y CO_2 se estudió utilizando un cromatógrafo de gas de la serie

Agilent 6890N acoplado a un espectrómetro de masa Agilent 5973 Network. El espectrómetro de masa fue operado en el modo de impacto de electrones (70 eV) con la fuente de iones a 250 °C. Los espectros de masa fueron adquiridos en el modo de escaneo completo (rango m/z 40-600, tasa de escaneo de 2,6s⁻¹). Se utilizó una columna HP-5MS de 30 m de longitud (0,25 mm de diámetro y 0,25µm de grosor de la película) utilizando He como gas transportador. La temperatura del horno del cromatógrafo fue de 37°C (4 min). Estos gases fueron muestreados desde el espacio de cabeza de cada incubación mediante la extracción de 500 µL de gas con una jeringa de gas Hamilton Gastight® 1750. Las concentraciones de cada compuesto fueron determinadas utilizando una curva de calibración externa construida con un estándar de (CH₄)_g a concentraciones conocidas. La identificación de los compuestos se llevó a cabo mediante la interpretación de sus respectivos espectros de masa y por la comparación de ellos con espectros de masa contenidos en la biblioteca NIST del equipo, en la base de datos de NIST (Manion et al. 2008), así como en la literatura.

2.12. Determinación de aminoácidos libres ambientales y en incubaciones

2.12.1 Derivatización e inyección

Las muestras no hidrolizadas (aminoácidos libres) fueron derivatizadas con o-ftaldialdehído (OPA) y acetato de sodio para formar un compuesto fluorescente, lo cual permite la identificación de cada aminoácido. A 1 mL de muestra se le agregaron 60 µL de o-ftaldialdehído bajo agitación continua por 1 minuto. Posteriormente se adicionó 100 µL de acetato de sodio.

2.13. Cromatografía líquida de alta presión acoplada a detector de fluorescencia

El análisis de los aminoácidos libres se realizó con un cromatógrafo líquido de alta presión Shimadzu LC-10AT acoplado a un detector de fluorescencia Shimadzu RF-10Ax1. Los aminoácidos fueron separados con una columna Alltima C18 5u (250mm x4,6 mm). El programa de elución con flujo de 1 mL/min fue: 0,015 min 75% eluyente A (acetato de sodio pH 5,7) y 75% eluyente B (metanol 100%) durante 35 min, 35 min 70 % eluyente A y 30% eluyente B por 8 min, 42 min 50 % eluyente A y 50% eluyente B por 18 min, 60 min 40% eluyente A y 60 % eluyente B por 12 min seguido por un gradiente lineal del

100% del eluyente B por 8 min, 84 min 75% eluyente A y 25% eluyente B por 3 min. La cuantificación de aminoácidos fue realizada mediante la co-inyección de las muestras con el estándar de aminoácidos Pierce N° 20088.

2.14. Cálculos termodinámicos

Los cálculos termodinámicos de las reacciones metabólicas propuestas en el presente trabajo se realizaron mediante el programa Thermodyn[®] (Daamgard & Hanselman 1991), usando constantes físico-químicas de las especies químicas implicadas en los metabolismos estudiados.

2.15. Análisis estadísticos

Los datos obtenidos en el presente estudio fueron tratados estadísticamente utilizando el programa estadístico Statistica 6.0. La homogeneidad de las varianzas se determinó utilizando la prueba de Levene y la normalidad de las variables fue estimada usando la prueba de Shapiro-Wilk. Para determinar diferencias estadísticamente significativas de los datos ambientales se realizó la prueba de ANDEVA no paramétrica de Krukal-Wallis. Para determinar la ocurrencia de asociaciones estadísticas entre las variables de estudio se realizaron pruebas de correlaciones no-paramétricas de Spearman.

CAPÍTULO 3. RESULTADOS

3.1. **Srain, B.**, Sepúlveda, J., Pantoja, S., Summons R., Quiñones, R., Levipan, H.

Archaeal and bacterial assemblages in the Oxygen Minimum Zone of the upwelling ecosystem off Central Chile as determined by organic biomarkers

Ensamblajes de arqueas y bacterias en la Zona de Mínimo Oxígeno del ecosistema de surgencia de Chile central determinados mediante biomarcadores orgánicos

Artículo aceptado en Revista Internacional de Biodiversidad, Oceanología y Conservación (GAYANA). En prensa.

ABSTRACT

Organic biomarkers were used to investigate the influence of seasonal changes in oxygenation and water chemistry on the distribution of archaea and bacteria in the water column and surface sediments of the continental shelf off central Chile (*ca.* 36°S), an area influenced by seasonal upwelling and the development of an oxygen minimum zone. We were interested in establishing if occurrence of archaea and bacteria responds to oxygenation and water chemistry for which we analyzed archaeal isoprenoid (i) and bacterial branched (br) glycerol dialkyl glycerol tetraethers (GDGTs). Our results combined with molecular data from a year round observational program at the same sampling site and depths indicates the occurrence and dominance of the marine pelagic group Thaumarchaeota. Changes in the distribution of iGDGTs might be explained by (i) the presence of archaeal populations in sub-oxic waters, phylogenetically different from those in surface water, (ii) changes in the relative contribution of Euryarchaeota with depth, and (iii) a relationship between Thaumarchaeota and environmental factors other than temperature. Branched GDGTs were more abundant in the upper, oxic layer during the non-upwelling season, may be a result of higher river runoff, whereas their diversity was higher within sub-oxic waters. Our results indicate a vertical segregation of the iGDGTs and brGDGTs, with predominance of archaeal biomarkers during the low productivity season.

Key words: Glycerol dialkyl glycerol tetraethers (GDGTs); archaea; bacteria; oxygen

minimum zone; upwelling; Chile



RESUMEN

Se utilizaron biomarcadores orgánicos en para investigar la influencia de cambios estacionales en los niveles de oxigenación y la química del agua sobre la distribución de arqueas y bacterias en la columna de agua y los sedimentos superficiales de la plataforma continental frente a Chile central, un área influenciada por surgencia estacional asociada al desarrollo de una zona de mínimo oxígeno. Nuestro interés es establecer si la ocurrencia de arquea y bacteria responde a la oxigenación y química del agua para lo cual analizamos glicerol dialquilo glicerol tetra-éteres (GDGTs) isoprenoides arqueanos (i) y ramificados bacterianos (r). Nuestros resultados, combinados con datos moleculares de observaciones durante un año en el mismo lugar y profundidades del sitio de estudio indican la presencia y dominancia del grupo arqueano marino-pelágico Thaumarchaeota. Los cambios observados en la distribución de iGDGTs podrían explicarse por (i) la presencia de poblaciones de arqueas marinas en la capa de agua sub-óxica, filogenéticamente diferentes a las de aguas superficiales, (ii) cambio en la contribución relativa de Euryarchaeota con profundidad, y (iii) una relación entre Thaumarchaeota y factores ambientales distintos a la temperatura. Los GDGTs ramificados fueron más abundantes en la capa óxica superior durante el periodo de no-surgencia, tal vez influenciado por la alta descarga de ríos, mientras que su diversidad fue más alta en el agua sub-óxica. Nuestros resultados indican una segregación vertical de los GDGTs isoprenoides y ramificados, con el predominio de biomarcadores arqueanos durante el periodo de baja productividad.

Palabras clave: Glicerol dialquilo glicerol tetraéteres (GDGTs); arquea, bacteria, zona de mínimo de oxígeno; surgencia; Chile

Archaeal and bacterial assemblages in the Oxygen Minimum Zone of the upwelling ecosystem off Central Chile as determined by organic biomarkers

Ensamblajes de arqueas y bacterias en la Zona de Mínimo Oxígeno del ecosistema de surgencia de Chile central determinados mediante biomarcadores orgánicos

Benjamín Srain^a, Julio Sepúlveda^b, Silvio Pantoja^{c*}, Roger E. Summons^b, Renato A. Quiñones^d, Héctor A. Levipan^{a,e}

^a*Graduate Program in Oceanography, Department of Oceanography, University of Concepción, Concepción, Chile*

^b*Department of Earth, Atmospheric, and Planetary Sciences, Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, USA*

^c*Department of Oceanography and Program COPAS Sur-Austral, University of Concepción, Concepción, Chile*

^d*Department of Oceanography and Interdisciplinary Center for Aquaculture Research (INCAR), University of Concepción, Concepción, Chile*

^e*Present address: Laboratorio de Biología Marina, Facultad de Ecología y Recursos Naturales, Universidad Andrés Bello, Santiago, Chile*

* Corresponding author *E-mail address:* spantoja@udec.cl (S.Pantoja)

ABSTRACT

Organic biomarkers were used to investigate the influence of seasonal changes in oxygenation and water chemistry on the distribution of archaea and bacteria in the water column and surface sediments of the continental shelf off central Chile (*ca.* 36°S), an area influenced by seasonal upwelling and the development of an oxygen minimum zone. We were interested in establishing if occurrence of archaea and bacteria responds to oxygenation and water chemistry for which we analyzed archaeal isoprenoid (i) and bacterial branched (br) glycerol dialkyl glycerol tetraethers (GDGTs). Our results combined with molecular data from a year round observational program at the same sampling site and depths indicates the occurrence and dominance of the marine pelagic group Thaumarchaeota. Changes in the distribution of iGDGTs might be explained by (i) the presence of archaeal populations in sub-oxic waters, phylogenetically different from

those in surface water, (ii) changes in the relative contribution of Euryarchaeota with depth, and (iii) a relationship between Thaumarchaeota and environmental factors other than temperature. Branched GDGTs were more abundant in the upper, oxic layer during the non-upwelling season, may be a result of higher river runoff, whereas their diversity was higher within sub-oxic waters. Our results indicate a vertical segregation of the iGDGTs and brGDGTs, with predominance of archaeal biomarkers during the low productivity season.

Key words: Glycerol dialkyl glycerol tetraethers (GDGTs); archaea; bacteria; oxygen minimum zone; upwelling; Chile

RESUMEN

Se utilizaron biomarcadores orgánicos en para investigar la influencia de cambios estacionales en los niveles de oxigenación y la química del agua sobre la distribución de arqueas y bacterias en la columna de agua y los sedimentos superficiales de la plataforma continental frente a Chile central, un área influenciada por surgencia estacional asociada al desarrollo de una zona de mínimo oxígeno. Nuestro interés es establecer si la ocurrencia de arquea y bacteria responde a la oxigenación y química del agua para lo cual analizamos glicerol dialquil glicerol tetra-éteres (GDGTs) isoprenoides arqueanos (i) y ramificados bacterianos (r). Nuestros resultados, combinados con datos moleculares de observaciones durante un año en el mismo lugar y profundidades del sitio de estudio indican la presencia y dominancia del grupo arqueano marino-pelágico Thaumarchaeota. Los cambios observados en la distribución de iGDGTs podrían explicarse por (i) la presencia de poblaciones de arqueas marinas en la capa de agua sub-óxica, filogenéticamente diferentes a las de aguas superficiales, (ii) cambio en la contribución relativa de Euryarchaeota con profundidad, y (iii) una relación entre Thaumarchaeota y factores ambientales distintos a la temperatura. Los GDGTs ramificados fueron más abundantes en la capa óxica superior durante el periodo de no-surgencia, tal vez influenciado por la alta descarga de ríos, mientras que su diversidad fue más alta en el agua sub-óxica. Nuestros resultados indican una segregación vertical de los GDGTs isoprenoides y ramificados, con el predominio de biomarcadores arqueanos durante el periodo de baja productividad.

Palabras clave: Glicerol dialquil glicerol tetraéteres (GDGTs); arquea, bacteria, zona de

mínimo de oxígeno; surgencia; Chile

1. INTRODUCCIÓN

Isoprenoid (i) and branched (br) glycerol dialkyl glycerol tetraethers (GDGTs) are cell membrane lipids diagnostic of archaea and bacteria, respectively (Langworthy et al. 1983; Hoefs et al. 1997; Hopmans et al. 2004; Zhou et al. 2011; Fietz et al. 2012). These biomarkers have been increasingly used to investigate microbial diversity, biogeochemistry, and terrestrial input into contemporaneous and ancient aquatic systems, as well as for reconstructions of past ocean temperatures by using the TEX₈₆ index (Kuypers et al. 2001; Schouten et al. 2002; Blumenberg et al. 2004; Hopmans et al. 2004; Herfort et al. 2006; Kim et al. 2010; Schouten et al. 2013; Pearson & Ingalls 2013). Archaeal iGDGTs are ubiquitous in marine and freshwater and sediments, as well as in soils (Schouten et al. 2000; Wuchter et al. 2005, Sinninghe Damsté et al. 2012). In the marine realm, GDGTs have been suggested to derive mostly from planktonic Thaumarcheota (De Long et al. 1998; Schouten et al. 2000; Sinninghe Damsté et al. 2002a, 2002b; Wuchter et al. 2005; Turich et al. 2007; Pitcher et al. 2011a), although a contribution from planktonic euryarchaeota and benthic archaea cannot be excluded (Pearson & Ingalls 2013; Lincoln et al. 2014). Core archaeal lipids comprise a diverse group of compounds, including dialkyl glycerol diethers (DGDs), isoprenoid glycerol dialkanol diethers (iGDDs) and iGDGTs containing between 0 and up to 8 cyclopentane moieties and, in the case of crenarchaeol, four pentacyclic moieties and one cyclohexane moiety (Langworthy et al. 1972; Kates 1992; Gambacorta et al. 1994; Schleper et al. 1995; De Rosa 1996; Swain et al. 1997; Shimada et al. 2002; Macalady et al. 2004; Schouten et al. 2007; Liu et al. 2012; Schouten et al. 2013).

The most common iGDGTs in marine environments are the acyclic GDGT-0 and crenarchaeol (Nishihara et al. 1987; Schouten et al. 2000; Sinninghe Damsté et al. 2000; Turich et al. 2007). Although GDGTs 1-4 have been found in enrichment cultures and pure cultures of marine archaea (Wuchter et al. 2004; De la Torre et al. 2008; Schouten et al. 2008; Pitcher et al. 2010), they comprise a minor proportion of the GDGT pool found in marine particulate matter and sediments (Schouten et al. 2000; Schouten et al. 2002; Pitcher et al. 2011b).

Archaea were originally thought to inhabit extreme environments such as those

characterized by high salinity, high temperature, or anoxia (Woese et al. 1978; De Rosa & Gambacorta 1988; De Long 2003). However, non-extremophilic archaea are ubiquitous and abundant in oceanic (Fuhrman 1992; DeLong et al. 1994; Murray et al. 1999; Karner et al. 2001) and coastal (DeLong 1992; Murray et al. 1998a; Pernthaler et al. 2002; Levipan et al. 2007a; Quiñones et al. 2009) regions. The distribution of genes markers and membrane lipids indicates that marine Thaumarchaeota (formerly Marine Group 1 Crenarchaeota, Brochier-Armanet et al. 2008) are ubiquitous in both epipelagic and mesopelagic areas of the water column, although they are more abundant in subsurface water near the base of the photic zone (Sinninghe Damsté et al. 2002a, 2002b; Herndl et al. 2005; Wuchter et al. 2005; Levipan et al. 2007a; 2007b; Turich et al. 2007; Quiñones et al. 2009; Pitcher et al. 2011b). Euryarchaeota also occur in surface, mesopelagic and deep waters, although generally in lower abundances compared to Thaumarchaeota (Massana et al. 1997; Lopez-Garcia et al. 2001; Bano et al. 2004; Moreira et al. 2004).

Since brGDGTs have been shown to be ubiquitous in peat and soil (Schouten et al. 2000; Sinninghe Damsté et al. 2000; Hopmans et al. 2004; Weijers et al. 2006, 2007; Huguet et al. 2010a) as well as in marine and lacustrine environments influenced by terrestrial input (Schouten et al. 2007; Belicka & Harvey 2009; Blaga et al. 2009; Kim et al. 2009; Powers et al. 2010), it is thought that soil bacteria synthesize brGDGTs. However only one brGDGT (brGDGT-I; Fig. 3i) has been identified in two cultures of anaerobic acidobacteria (Sinninghe Damsté et al. 2011). Since high concentrations of brGDGTs are found in sub-oxic-anoxic aquatic environments, it is likely that they are also synthesized by other groups of bacteria (Sinninghe Damsté et al. 2011).

IGDGTs are more abundant in sub-surface oxic water (Huguet et al. 2007; Ingalls et al. 2012), as well as in sub-oxic water, such as the Arabian Sea (Sinninghe Damsté et al. 2002a, 2002b), Black Sea (King et al. 1998; Wakeham et al. 2007), Cariaco Basin (Wakeham et al. 2004, 2012), and the eastern tropical North Pacific (Xie 2013). In these areas, oxygen minimum zones are characterized by dissolved oxygen concentrations lower than $22 \mu\text{mol L}^{-1}$ (sub-oxic conditions) (Helly & Levin 2004). Notably, the distribution of iGDGTs in sub-oxic waters exhibit an elevated contribution of GDGT-2 and -3, thereby yielding TEX₈₆-derived temperature values that largely offset *in situ* temperature (Schouten et al. 2012a, 2012b; Xie 2013). Most studies suggest that pelagic Thaumarchaeota are the most likely biological source of iGDGTs in epipelagic and

mesopelagic environments, including sub-oxic settings (DeLong et al. 1998; Sinninghe Damsté et al. 2002a, 2002b; Francis et al. 2005; Herndl et al. 2005; Wuchter et al. 2005; Pitcher et al. 2011b; Schouten et al. 2012a). However, the potential contribution of euryarchaeota, as well as the role of environmental variables other than temperature on the relative contribution of different iGDGTs, remains controversial. The distribution of iGDGTs in sub-oxic environments suggests that facultative anaerobic organisms involved in the cycling of C and N are potential sources. However, few environmental studies have investigated the spatial and temporal variability of iGDGTs and brGDGTs in settings affected by seasonal variations in O₂ concentration (*e.g.* Lengger et al. 2012; Schouten et al. 2012b).

The eastern tropical South Pacific is characterized by a prominent, intermediate-water oxygen minimum zone, maintained by the combined effect of poorly ventilated waters and high microbial respiration of settling organic matter (Pantoja et al. 2004). Intense biological respiration results from the upwelling of nutrient-rich, oxygen depleted equatorial sub-surface water that enhances biological productivity in surface water (Kamykowski & Zentara 1990; Helly & Levin 2004). The coastal area off central Chile (*ca.* 36 °S), in the southernmost area of intense seasonal upwelling, is one of the most productive areas of the oceans (1-20 g C m⁻² d⁻¹; Montero et al. 2007). In this area, fertilization of surface waters occurs seasonally and is driven by an anti-cyclonic atmospheric circulation regime favoring southwesterly winds, leading to the upwelling of equatorial sub-surface water during austral spring-summer (Sobarzo et al. 2007). Consequently, a seasonal oxygen minimum zone develops over the continental shelf off central Chile during spring and summer, expanding from the water-sediment interface up to the photic zone (Ahumada & Chuecas 1979; Sobarzo et al. 2007). This markedly seasonal oceanographic variability allows the study of spatial and temporal changes in the distribution, composition and abundance of iGDGTs and brGDGTs under varying regimes of nutrient content, productivity and oxygenation. We investigated the distribution of these two lipid classes in oxic surface and seasonally sub-oxic sub-surface waters and surface sediments during the upwelling and non-upwelling seasons off the coast of Concepción, Chile. The goal was to use these two contrasting conditions to assess if the occurrence of archaea and bacteria responds to oxygenation and water chemistry and reflects on vertical and seasonal patterns of the prokaryotic assemblage, and to evaluate whether the GDGT biomarker signal is imprinted in surface sediments. In order to

independently assess Archaeal diversity and abundance, we analyzed PCR-DGGE and 16S rRNA dot blot hybridization in surface and subsurface water samples collected from the study site.

2. METHODS

2.1 SAMPLING

The study area (Station 18; 36°30.8'S 73°7'W) is *ca.* 18 nautical miles from the coastline off Concepción, with a depth of 90 m (Fig. 1). Station 18 is the site of the Oceanographic Time Series maintained by the Center for Oceanographic Research in the eastern South Pacific at University of Concepción (COPAS Center; www.copas.udec.cl/eng/research/serie). The sampling cruises were supported in the framework of the Moore Foundation project “Microbial Initiative in Low Oxygen off Concepción and Oregon (MILOCO; http://mi_loco.coas.oregonstate.edu) and the COPAS Center.

Water samples were collected onboard R/V Kay-Kay II in September 2009 (upwelling season) and June 2010 (non-upwelling season), from water masses of contrasting redox conditions. *Ca.* 100 L of seawater were collected at 10 (oxic-surface layer) and 80 m (seasonal sub-oxic sub-surface layer) depth using a rosette equipped with Niskin bottles. Samples were transferred to darkened carboys and filtered onshore through pre-combusted (450 °C, 4 h) glass fiber filters (0.7 µm, Millipore) with a peristaltic pump. Ancillary data including temperature, salinity, chlorophyll, and O₂ and nutrient concentrations were collected in the whole water column (Fig. 2).

Additionally, a 25 -cm -long sediment core was collected at the same site in February 2009 (summer upwelling season) using a GOMEX BOX corer. In this study, we analyzed the 0-0.25 cm section.

For PCR-DGGE analyses, we collected water samples at 10 and 80 m of depth in January (upwelling season; 2006) and June (non-upwelling season; 2006), and in January, February, March, April, June, July, August, September, October, November 2006 for 16S rRNA dot blot hybridization.

Samples (500 mL) were pre-filtered through 25 µm and concentrated by vacuum filtration (<10 cm Hg) on cellulose ester filters (pore size 0.22 µm; GSWP04700; Millipore). Genomic DNA was extracted directly from the thawed filters using the PowerSoil™ DNA Isolation Kit (MoBio Laboratories, USA). Genomic DNA extracts were stored at -20°C until further PCR-DGGE analyses.

Seven liters of seawater pre-filtered through 25 µm and concentrated by vacuum filtration (< 10 cm Hg) using filters of cellulose ester (pore size 0.22 µm; GSWP04700, Millipore).

2.2 LIPID EXTRACTION AND ANALYSIS

Filters containing particulate organic matter were sequentially extracted by ultrasonication (3x) with methanol, dichloromethane/methanol (1:1, vol:vol) and dichloromethane. Lipid extracts were concentrated using a rotary evaporator and dried over a small Pasteur pipette filled with combusted glass wool and anhydrous Na₂SO₄. Lipids were separated into a non-polar and a polar fractions using a Pasteur pipette filled with activated Al₂O₃, after elution with hexane/dichloromethane (9:1, vol:vol) and dichloromethane and methanol(1:1 vol:vol), respectively. For GDGT analysis, an aliquot of the polar fraction was dissolved in hexane/propanol (99:1, vol:vol) and filtered through a 0.45 µm PFTE filter. Samples were analyzed using high performance liquid chromatography-mass spectrometry (HPLC-MS), following Hopmans et al. (2000). The HPLC-MS system comprised a 1200 Series HPLC system (Agilent Technologies) equipped with an auto-sampler and a binary pump linked to a Q-TOF 6520 mass spectrometer via an atmospheric pressure chemical ionization interface (Agilent Technologies). Samples were dissolved in 200 µl hexane/isopropanol (99:1, vol:vol). The iGDGTs and brGDGTs were separated using a Prevail Cyano column (2.1 x 150 mm, 3 mm; Grace, Deerfield, IL, USA) maintained at 35 °C, at a flow rate of 0.25 ml min⁻¹. The elution program was: 5 min 100% eluent A (hexane/isopropanol, 99:1, vol:vol) in 20 min, followed by a linear gradient to 100% eluent B (hexane/isopropanol, 90:10 vol:vol) at 35 min, and then held at 100% eluent B for 5 min. The column was re-equilibrated with 100% A at a 0.6 ml min⁻¹ for 5 min between injections. Semi quantification of core GDGTs was achieved by co-injection of samples with a C₄₆ GDGT standard (Huguet et al. 2010b). Results are given as GDGTs concentration ± analytical error.

The iGDGTs and brGDGTs (Fig. 3) were identified from their characteristic $[M + H]^+$ ions: GDGT-0 (m/z 1302), GDGT-1 (m/z 1300), GDGT-2 (m/z 1298), GDGT-3 (m/z 1296), GDGT-4 (m/z 1294), crenarchaeol (Cren) and crenarchaeol regio-isomer (Cren') (m/z 1292), brGDGT-III (m/z 1050); brGDGT-IIIb (m/z 1048); brGDGT-IIIc (m/z 1046); brGDGT-II (m/z 1036), brGDGT-IIc (m/z 1032); brGDGT-I (m/z 1022), brGDGT-IIb (m/z 1034), brGDGT-Ib (m/z 1020), brGDGT-Ic (m/z 1018).

TEX₈₆ and TEX^L₈₆ indices for suspended particulate matter (SPM) and surface sediments were calculated as described by Schouten et al. (2002) and Kim et al. (2010):

$$\text{TEX}_{86} = (\text{GDGT-2} + \text{GDGT-3} + \text{Cren}') / (\text{GDGT-1} + \text{GDGT-2} + \text{GDGT-3} + \text{Cren}') \quad (1)$$

$$\text{TEX}_{86}^L = \log [(\text{GDGT-2}) / (\text{GDGT-1} + \text{GDGT-2} + \text{GDGT-3})] \quad (2)$$

Additionally water column TEX₈₆ values were converted to temperature according to Wuchter et al. (2005):

$$\text{TEX}_{86} = 0.017 \times T + 0.29 \quad (3)$$

Sedimentary TEX₈₆ and TEX^L₈₆ values were converted to temperatures \pm (proxy residual error + analytical error) according to Kim et al. (2008):

$$\text{SST} = 56.2 \times \text{TEX}_{86} - 10.8 \quad (4)$$

and Kim et al. (2010):

$$\text{SST} = 67.5 \times (\text{TEX}_{86}^L) + 46.9 \quad (5)$$

In order to assess the overall temporal and spatial variations in iGDGTs we calculated the Ring Index (RI; weighted average number of cyclopentane rings in GDGTs) according to Liu et al. (2011):

Ring Index =

$$[(\% \text{GDGT-1}) + 2(\% \text{GDGT-2}) + 3(\% \text{GDGT-3}) + 5(\% \text{Crenarchaeol} + \text{Cren}')] / 100 \quad (6)$$

Assuming that the average number of cyclopentane rings in the GDGT pool increases with growth temperature (Schouten et al. 2002; Wuchter et al. 2004), we could expect a positive relationship between RI and TEX₈₆ values.

The GDGT-2/GDGT-3 ratio was calculated according to Taylor et al. (2013) in order to evaluate the contribution from archaeal community inhabiting deeper water column during both upwelling and non-upwelling contrasting conditions.

The GDGT-2/crenarchaeol ratio was calculated according to Weijers et al. (2011) in order to evaluate the contribution from Euryarchaeota during both upwelling and non-upwelling conditions.

2.3. DNA EXTRACTION FROM SEAWATER AND PCR AMPLIFICATION OF ARCHAEOAL 16S RDNA FRAGMENT

PCR (50 µL) contained 65 ng of template DNA and 5× GoTaq flexi buffer (1x; Promega, USA), deoxynucleotide mix (200 µmol L⁻¹), MgCl₂ solution (3.5 mmol L⁻¹), primers forward and reverse (1 µmol L⁻¹ each one), and GoTaq polymerase (1.25 U; Promega). Amplicons (580 bp) suitable for subsequent DGGE were obtained with the primer combination 344f-GC (Raskin et al. 1994) and 927r (Kormas et al. 2003) and their respective sequences (5' to 3') are CCGCGCGCGGCGGGCGGGGCGGGGCCCTACGGGGYGCASCAGGCG and CCCGCCAATTCCTTTAAGTTT. The PCR were performed using a T-personal thermocycler (Biometra, Göttingen, Germany) and the program described elsewhere (Levipan et al. 2012).

2.4. DENATURING GRADIENT GEL ELECTROPHORESIS (DGGE)

Gels were cast using a DCodeTM Universal Mutation Detection System (Bio-Rad Laboratories, USA) as in Levipan et al. (2012). Reliable individual bands were identified using the “Peak Height Threshold” command of the 1 Dscan EX software (v.3.0), which

marks the level above which a peak density was considered to be a true band. Gel images were analyzed by assigning numbers to each of the bands (Operational Taxonomic Units = OTUs) on the gel; these were then scored as present (score=1) or absent (score=0). The scoring of banding patterns resulted in a binary matrix containing presence/absence data, which were converted into a similarity matrix using the Jaccard coefficient of proximity and the PAST software (version 3.01).

2.5. RNA EXTRACTION FROM SEAWATER AND DOT BLOT HYBRIDIZATIONS

RNA was extracted from filters as in Summers (1970) with modifications (Levipan et al. 2007a; Quiñones et al. 2009). Extracts were loaded onto nitrocellulose membranes for nucleic acids (Hybond-N; Amersham Bio-Sciences, UK) using a dot blotting apparatus (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Membrane hybridizations analysis was carried out at 44°C by using 5' end digoxigenin-labeled probes (Thermo Biosciences) and the protocol of Raskin et al. (1994). Probes (5' to 3') EUB338 (5'-GCTGCCTCCCGTAGGAGT; Amann et al. 1990) and ARCH915 (5'-GTCCTCCCCCGCCAATTCCT; Stahl & Amann 1991), allowed to determine the prokaryote 16S rRNA concentration. The EURY498 (5'-CTTGCCCRGCCCT; Burggraf et al. 1994) and MS1414 (5'-CTCACCCATACCTCACTCGGG; Raskin et al. 1994) probes were used to detect most Euryarchaeota and some methanogens, respectively.

3. RESULTS

3.1. OCEANOGRAPHIC CONDITIONS

During the upwelling season (September 2009), surface temperature ranged between 11 and 14 °C, with a thermocline located between 10 and 30 m, whereas bottom temperature was *ca.* 10 °C (Fig. 2a). Salinities of *ca.* 34 and 35 psu were found above and below 60 m, respectively (Fig. 2a). Chlorophyll concentration peaked at 10 m (10 mg m⁻³; Fig. 2a) and then rapidly decreased with depth. O₂ concentration varied between 271 and 343 μmol L⁻¹ in the top 5 m, with an oxycline between 5 and 40 m and dropped to 16 μmol L⁻¹ (sub-oxic conditions) in bottom water (Fig. 2b). The presence of a shallow oxycline, coupled with high salinity and low O₂ concentration through part of the water column suggests the presence of upwelled equatorial sub-surface water during this period (Brandshost 1971;

Sobarzo et al. 2007). Under these conditions, NH_4^+ concentration was $< 0.02 \mu\text{mol L}^{-1}$ with maxima at 20 m and in bottom water (Fig. 2b). NO_2^- concentration was $< 0.5 \mu\text{mol L}^{-1}$, with minimum values at 50-60 m, and a maximum concentration in bottom water. NO_3^- concentration up to $35 \mu\text{mol L}^{-1}$ was detected. NO_3^- was not fully exhausted in surface water and increased with depth (Fig. 2b).

During the non-upwelling season (June 2010), temperature was homogeneous around 13°C at the top 60 m and dropped to 12°C near the bottom (Fig. 2c). Salinity was < 33 psu at the surface and increased to 34 psu below 20 m (Fig. 2c). Chlorophyll concentration was highest (1 mg m^{-3}) at the surface, and was not detected below 20 m (Fig. 2c). O_2 concentration was $> 237 \mu\text{mol L}^{-1}$ in the upper 65 m and dropped to $150 \mu\text{mol L}^{-1}$ below 80 m (Fig. 2d). The occurrence of a less saline, warmer, well oxygenated, and less stratified water column compared with the upwelling season indicates the presence of Intermediate Antarctic water (Brandhorst 1971) and a well-mixed water column during this period. NH_4^+ concentration was higher than during the upwelling season and decreased from $0.7 \mu\text{mol L}^{-1}$ at the surface to $0.3 \mu\text{mol L}^{-1}$ in bottom water. NO_3^- varied between 17 and $25 \mu\text{mol L}^{-1}$ from the surface to bottom water, whereas a general decrease in NO_2^- concentration with depth was observed (Fig. 2d).

3.2 SPATIAL AND TEMPORAL VARIATION OF iGDGTs AND BRGDGTs

GDGT-0 and crenarchaeol were the dominant iGDGTs during both seasons and water depths (Fig. 4a, 4b). During the upwelling season, only GDGT-0 (49%), crenarchaeol (50%) and Cren' (0.7%) were detected in surface waters, whereas GDGT-0 (39%), crenarchaeol (52%) and GDGT-1 (5%), GDGT-2 (4%), GDGT-3 (0.4%), and Cren' (0.7%) were found in subsurface sub-oxic water (Fig. 4a). During the non-upwelling season, only GDGT-0 (49%), GDGT-1 (3%), crenarchaeol (48%) and Cren' (0.1%) were detected in surface waters, whereas GDGT-0 (46%), GDGT-1 (3%), GDGT-2 (2%), GDGT-3 (1%), crenarchaeol (48%) and Cren' (0.3%) occurred in subsurface water (Fig. 4b). The degree of cyclization of iGDGTs, expressed as the Ring Index, was higher in the subsurface water during upwelling conditions (*ca.* 3) than during the non-upwelling season (*ca.* 2) (Table 1). The GDGT-2/GDGT-3 ratio in subsurface water was higher during upwelling (*ca.* 9) than non-upwelling (*ca.* 4) conditions (Table 1). The GDGT-

2/crenarchaeol ratio was higher in sub-surface water during upwelling (0.2; Table 1) compared to non-upwelling (0.04; Table 1). In both seasons, archaeal GDGTs were more abundant in subsurface water (80 m), whereas bacterial GDGTs were more abundant in surface water (10 m; Fig. 5a, 5b). During the upwelling season, the concentration of iGDGTs was $0.43 \pm 0.08 \text{ ng L}^{-1}$ in surface water and of $0.91 \pm 0.2 \text{ ng L}^{-1}$ in subsurface water (Fig. 4a). During the non-upwelling season, the concentration of iGDGTs was $2.7 \pm 0.5 \text{ ng L}^{-1}$ in surface water and $36.3 \pm 7.2 \text{ ng L}^{-1}$ in subsurface water (Fig. 4b).

During the upwelling season, only brGDGT-I was found in surface ($0.08 \pm 0.02 \text{ ng L}^{-1}$) and sub-surface ($0.07 \pm 0.01 \text{ ng L}^{-1}$) waters (Fig. 5a), while during non-upwelling conditions, we detected brGDGT-Ic ($0.3 \pm 0.06 \text{ ng L}^{-1}$), brGDGT-I ($0.2 \pm 0.04 \text{ ng L}^{-1}$), and brGDGT-II ($0.1 \pm 0.02 \text{ ng L}^{-1}$) in surface, and brGDGT-III ($0.1 \pm 0.02 \text{ ng L}^{-1}$) in sub-surface waters (Fig. 5b).

Sedimentary iGDGTs were dominated by GDGT-0 (53%) and crenarchaeol (34 %) followed by GDGT-1 (7%), GDGT-2 (4%), GDGT-3 (1%) and Cren' (2%) (Fig. 6a), and their total concentration was of $28.4 \pm 5.7 \mu\text{g (g dry wt.)}^{-1}$ (Fig. 6b). The GDGT-2/GDGT-3 ratio in surface sediment resembled that of subsurface water during the non-upwelling season (*ca.* 4, Table 1).

The distribution of sedimentary brGDGTs was dominated by GDGT-III (46 %), GDGT-I (23%) and GDGT-II (14%). Pentacyclic brGDGTs Iib (8%), Ib (6%), and Ic (2%) were minor components (Fig. 6b). Their total concentration was $0.6 \pm 0.1 \mu\text{g (g dry wt.)}^{-1}$.

3.3. TEX₈₆-DERIVED TEMPERATURES

We compared TEX₈₆- and TEX₈₆^L-derived temperatures from particulate matter and surface sediments, with *in situ* temperature. However, due to the absence of GDGTs -2 and -3 from surface water, temperatures were only calculated for subsurface water. During the upwelling and non-upwelling seasons, TEX₈₆ converted to temperature using eq. 3 ($12 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ and $14 \pm 3 \text{ }^\circ\text{C}$, respectively) were about $2 \text{ }^\circ\text{C}$ higher than *in situ* temperatures (Table 1). In surface sediments, values of $17 \pm 5 \text{ }^\circ\text{C}$ and $15 \pm 7 \text{ }^\circ\text{C}$; were obtained using TEX₈₆ and TEX₈₆^L converted to temperatures using equations 4 and 5, respectively, being 5 and $3 \text{ }^\circ\text{C}$

higher than the reported annual mean SST in the study site (12 °C; Table 1).

3.4. VERTICAL AND SEASONAL VARIABILITY IN THE RELATIVE ABUNDANCE OF ARCHAEL RIBOTYPES IN THE STUDY SITE

At the subsurface suboxic water (80 m depth), the relative contribution of Archaea ranged between ~ 5 and 38 %, and was the highest during the austral summer-spring, specifically in February and September (Fig. 7). The euryarchaeal relative abundance ranged from 0.1 to 5% (see EURY498 in Fig. 7), and a lower contribution of methanogens was detectable only during the January (0.9%) and February (3.9%) months.

In addition, an interesting secondary peak in the relative abundance of Archaea was observed in the winter season at 10 (July) and 80 m (June) of depth (Fig. 7).

3.5. VERTICAL AND SEASONAL SHIFTS IN THE COMPOSITION OF THE ARCHAEL COMMUNITY

The DGGE profiles showed inter and intra-seasonal changes in the epipelagic archaeal communities off Concepción. During summer (upwelling), surface water showed 3 main archaeal ribotypes (OTUs), while in the subsurface water we detected 5 dominant archaeal ribotypes (Fig. 7). Both depths share 60% of the OTUs (Table 2).

During winter (non-upwelling) there were 3 dominant archaeal ribotypes in surface water and 4 in subsurface water yielding a higher percent of similitude in both depths (75%; Fig. 7; Table 2).

A marked inter-seasonal change in the archaeal community composition was more evident in surface than sub-surface water. In surface water, the similitude between summer and winter was 50%, while in sub-surface water the similitude was 80% (Table 2).

4. DISCUSSION

4.1. SPATIAL AND TEMPORAL VARIABILITY OF ARCHAEL GDGTs

IGDGTs concentrations were higher in the deeper sub-surface water compared to surface

water during upwelling and non-upwelling seasons (Figs. 4 a, b). The iGDGTs depth distribution in our study site showed a similar pattern to those found at the equatorial Pacific, northeast Pacific, Santa Monica Basin (Wuchter et al. 2005), the Arabian Sea (Sinninghe Damsté et al. 2002a), and the Cariaco Basin (Wakeham et al. 2004). The seasonal contrast in the iGDGTs abundance observed off Concepción is also consistent with previous reports. A higher abundance of iGDGTs during winter in the North Sea was reported by Wuchter et al. (2005) and Herfort et al. (2006), suggesting that Thaumarchaeota thrive in winter due to lack of competition with phytoplankton for NH_3 (Yamamoto et al. 2012). Similarly, we found the highest abundance of core iGDGTs in suspended particulate matter collected in austral-winter (June 2010, Fig. 4b) when primary production was the lowest (Fig. 2c). Consequently, one could infer that maximum production of iGDGTs off Concepción could correspond to a seasonal bloom of Thaumarchaeota during austral-winter season. This conclusion must be taken with caution, although not completely discarded, since recent evidence has shown that intact iGDGTs are present in the free-living particle size fraction 0.2-0.7 μm , and core iGDGTs are enriched in suspended particles (0.7-60 μm) and aggregates > 60 μm , implying that archaeal biomass quickly becomes attached to particles once organisms are dead or dying (Ingalls et al. 2012). Since turnover time of archaeal cells in the water column is on the order of days (Jones et al. 1996), free core iGDGTs we measured must have derived from living or recently dead archaea inhabiting the water column during winter.

The observed distribution of iGDGTs resembles what is described for cold areas where the iGDGTs distribution is dominated by iGDGT-0 (Fig. 3a; 4a, b) and crenarchaeol (Fig. 3e; 4a, b) (Wuchter et al. 2005). However, an increase of 1-3 cyclopentane-containing iGDGTs was observed during the upwelling season, contrary to the expected increase cyclization with temperature, concluded from environmental observations (De Rosa et al. 1986; Uda et al. 2001; Macalady et al. 2004; Boyd et al. 2011), and cultures of marine Thaumarchaeota (Wuchter et al. 2004; Schouten et al. 2007) and thermophilic Archaea (Gliozzi et al. 1983; Ward et al. 1985; De Rosa & Gambacorta 1988; Uda et al. 2001). The addition of pentacyclic rings in the trans-membrane portions of the lipids imply an enhanced membrane packing and reduced fluidity (Benvegnu et al. 2008) resulting in a molecular adaptive advantage to Archaea thriving in warmer and thermophilic environments, which suggest that the temperature is not the only environmental variable controlling the iGDGTs distribution in the study site. Variations in the distribution of

iGDGTs in marine environments could also respond to nutrient regime and energy stress, as well as to variation in the relative contribution of Thaumarchaeota and Euryarchaeota (Pearson & Ingalls 2013). Possible explanations for this observation are discussed below.

We also observed a higher RI and a larger contribution of GDGT-2 during upwelling, when temperature was generally lower, than during the non-upwelling season (Table 1, Fig. 2a, 2b). When water column TEX₈₆-derived temperature increases, RI values decreased, contrary to the expected positive relationship between these two parameters when water temperature is the main factor controlling the composition and distribution of iGDGTs (Table 1). A similar decoupling has been observed in waters associated with gas hydrates where iGDGTs are derived from methanotrophic archaea (Zhang et al. 2011). This evidence suggests that factors other than temperature might control the distribution of iGDGTs in the seasonal upwelling system off Concepción, and consequently TEX₈₆-derived temperature values. This notion is supported by studies indicating that pelagic Thaumarchaeotal communities vary seasonally in response to oceanographic variability including nutrient concentration and O₂ content (Massana et al. 1997; Murray et al. 1998a, 1998b; Wutcher et al. 2004; Herfort et al. 2007; Pitcher et al. 2011b; Bale et al. 2013). Since it has been suggested that not all planktonic Thaumarchaeota are strict autotrophs (Ouverney & Fuhrman 2000; Ingalls et al. 2006; Pearson & Ingalls 2013), metabolic diversity might also control the number of cyclic moieties due to modification of membrane lipid associated to episodic or chronic energy stress (van de Vossenberg et al. 1998; Mathai et al. 2001; Valentine 2007; Pearson & Ingalls 2013).

We observed that crenarchaeol increased its relative abundance during the upwelling season, mainly within oxygen-deficient waters, concomitant with the intrusion of nutrient-rich, high salinity and low temperature Equatorial Sub-Surface Waters (Figs. 2a, 4a). Crenarchaeol has been isolated in the non-thermophilic group-I crenarchaeota, a subgroup of archaea occurring in seawater and lakes as well as in soils (Sinninghe Damsté et al. 2002b; Koga & Morii 2005; Schouten et al. 2007; Weijers et al. 2007). Recently, Lincoln et al. (2014) reported that MG-II Euryarchaeota are a major source of iGDGTs particularly crenarchaeol in shallow and intermediate waters of North Pacific Subtropical Gyre. It has been suggested that the formation of a cyclohexane ring was an adaptive response of crenarchaeota to relatively low temperature environment in which this group evolved (Sinninghe Damsté et al. 2002b). The increased relative abundance of crenarchaeol could

indicate a relationship between the decreased water column temperatures observed during upwelling. Alternatively, the coincident increase in the relative abundance of crenarchaeol and high ratios GDGT-2/GDGT-3 and GDGT-2/crenarchaeol during upwelling may be the result of an increase of Euryarchaeota in the study site (Table 1; Fig. 7).

Increase in GDGT-2 (Table 1, Fig. 2) has previously been reported in subsurface, sub-oxic water in the Arabian Sea (Schouten et al. 2012), and the eastern tropical North Pacific (Xie 2013), and South Pacific (Sepúlveda et al. 2013). A recent revision of global data sets of suspended organic matter indicates that GDGT-2/GDGT-3 increases with water depth, particularly in water columns affected by O₂-deficiency (Taylor et al. 2013), suggesting that GDGT-derived temperature must therefore consider export dynamics and water depth, whereas a growing body of information suggests that O₂ concentrations should also be taken into account. However, the exact mechanism behind the increased proportion of GDGT-2 in subsurface waters, especially in sub-oxic areas, remains poorly understood. Although our biomarker data does not allow us to gather further insights into the responsible mechanisms, molecular data support three possible explanations (i) phylogenetically different thaumarchaeotal populations (ii) changes in the relative contribution of Euryarchaeota with depth; (iii) a relationship between archaea and environmental factors other than temperature (*e.g.* O₂, nutrients and pH).

DGGE profiles at the study site support the first mechanism, since we have observed that the dominant archaeal ribotypes of surface water were different from those found in the sub-surface water, especially during summer, when subsurface sub-oxic conditions prevailed (Fig. 7, Table 2). In the sub-surface water, a higher number of archaeal OTUs were observed during summer and winter, compared with surface water (Fig.7). This segregation agrees previous reports of Levipan et al. (2012), who described two different archaeal communities inhabiting surface and sub-surface coastal waters off Concepción, and the finding of high diversity of ammonia oxidizing archaea in sub-oxic water off Concepción (Molina et al. 2010). However, the role of upwelling in transporting deeper archaea to surface waters can not be neglected as suggested by Santoro et al. (2010) who found gene copies of deep-water archaea in surface waters of the coastal upwelling region off California.

16S rRNA hybridizations data revealed seasonal and vertical changes in the euryarchaeotal

and methanogens, with the highest contribution during austral summer, supporting our second explanation (changes in the relative contribution of Euryarchaeota with depth) for the increased proportion of GDGT-2 (Table 1) in sub-surface waters. Similarly, Levipan et al. (2007b) found that abundance and occurrence of methylotrophic methanogenic archaea was the highest and almost exclusively during active upwelling (austral spring-summer) agreeing with values of the index GDGT-2/crenarchaeol reported here (Table 1). The latter is consistent with previous finding in other marine ecosystems such as the North Sea (van der Maarel et al. 1999).

Distribution of archaea and iGDGTs can also be influenced by water chemistry and associated biological production at the study site. The highest abundance of iGDGTs during the non-upwelling season when lower photosynthetic production is verified (Fig. 4b) could be the result of ecological decoupling between phytoplankton and pelagic marine archaea. Wuchter et al. (2005) and Herfort et al. (2007) found high abundance of iGDGTs in winter in the North Sea. The underlying mechanism appears to be competition for nutrients since abundance of intact iGDGTs, and Thaumarchaeota 16 rRNA genes and amoA genes showed a seasonal cycle with a maximum during winter in the North Sea (Pitcher et al. 2011a). In the study area, Molina et al. (2010) found that ammonia-oxidizing archaea community changed according to the oxygen content in waters of eastern South Pacific. Turich et al. (2007) reported variability in iGDGTs composition in the water column at different oceanographic settings suggesting that changes in archaeal ecology, nutrient regimes and oceanographic conditions can potentially iGDGTs composition. Even though, we detect the pattern, our data set does not allow disentangling whether one or more variables control iGDGTs variability at the study site.

4.2. ECOLOGICAL SIGNIFICANCE OF TEMPORAL AND VERTICAL DISTRIBUTION OF iGDGTs

The distribution of iGDGTs in the water column off Concepción resembles the characteristic signature found in marine planktonic Thaumarchaeota (Sinninghe Damsté et al. 2002a, 2002b; De la Torre et al. 2008; Schouten et al. 2008). Our biomarker data shown a clear seasonal pattern, with enhanced abundance during the non-upwelling season (austral autumn-winter), particularly in subsurface water coinciding with the molecular data that showed a secondary peak in the archaeal abundance during winter (*e.g.*, June-July) (Fig. 6b, Fig.7). In agreement with this result, Levipan et al. (2007a) and Quiñones

et al. (2009) reported that marine Archaea comprise a significant fraction of the planktonic prokaryotic community in subsurface sub-oxic waters (*ca.* 50% of total prokaryote community), where Thaumarchaeota was the dominant group. This seasonal pattern in Thaumarchaeota abundance is consistent with other coastal settings (Wuchter 2006; Wuchter et al. 2006; Herfort et al. 2007; Pitcher et al. 2011b). Thaumarchaeota are more prominent during winter following phytoplankton blooms, and are negatively correlated with chlorophyll concentration (Murray et al. 1998b). In the North Sea, Thaumarchaeota were less abundant when large phytoplankton (> 3 μm) dominated the algal population, even in the presence of favorable nutrient concentrations (Herfort et al. 2007). Thus, it has been hypothesized that nutrient concentration, together with phytoplanktonic biomass and community structure, can control the population of marine Thaumarchaeota (Herfort et al. 2007). In the study area, a phytoplankton assemblage dominated by large diatoms (> 3 μm) along with high chlorophyll concentration is typically found during the upwelling season (Montero et al. 2007). Conversely, during the non-upwelling season chlorophyll concentration is *ca.* one order of magnitude lower than during the upwelling season, whereas NH_4^+ and NO_2^- were higher (Fig. 2).

In marine sub-oxic waters, the occurrence of NH_4^+ -oxidizing archaea is well correlated with crenarchaeol concentrations (De Long et al. 1998; Schouten et al. 2000). A previous study from the same site (Station 18) indicates that most of the archaeal *amoA* gen belongs to the uncultured cluster A, when sub-oxic conditions and high NH_4^+ concentration prevail (Molina et al. 2010). NH_4^+ concentrations were in average 42 times higher during the non-upwelling period than during upwelling (Fig. 2b, d), yielding a greater ($\text{NH}_4^+ + \text{NO}_2^-$) to P ratio during winter (13 vs. 10 during upwelling) when higher abundance of iGDGTs (Fig. 4) occurs, suggesting that Thaumarchaeota abundance depends on NH_4^+ availability in the water column of the study site.

The ecological role of Thaumarchaeota in the marine N cycle has been shown by the co-occurrence of crenarchaeol and NO_2^- maxima (Massana et al. 1997; Murray et al. 1998a, 1998b; Sinninghe Damsté et al. 2002a) as well as archaeal NH_3 oxidation genes (*amoA*) (Francis et al. 2005; Hallam et al. 2006; Wuchter et al. 2006). Our results support previous molecular data obtained from samples of the same site (Levipan et al. 2007a; Molina et al. 2010) that have detected a role of pelagic NH_3 oxidizing Archaea in N cycling in waters of the eastern South Pacific.

4.3. SPATIAL AND TEMPORAL VARIABILITY OF BACTERIAL GDGTs

The highest concentration and diversity of brGDGTs were found during the non-upwelling season in surface and subsurface waters (Fig. 5b), consistent with enhanced terrestrial input from rivers Itata and Bío-Bío during austral winter, based on their terrestrial biological source (Hopmans et al. 2004; Weijers et al. 2006). However, both the water column vertical distribution as well as the large seasonal differences in diversity (Fig. 5 a, b) suggests that *in situ* production cannot be entirely ruled out. Previous studies have demonstrated *in situ* production in lakes and fjords based on the differences in the degree of methylation and cyclization in soils and the water column (Peterse et al. 2009; Tierney & Russel 2009; Tierney et al. 2010).

Although the effect of diagenesis is not well constrained, their stability under oxic and suboxic conditions in the water column cannot be excluded as a control of brGDGT abundance and distribution. Tierney et al. (2012) found a higher abundance of methylated brGDGTs in a seasonally anoxic and eutrophic suburban lake compared with deeper layers of sediments that were deposited under oxygenated conditions. Similarly, Bechtel et al. (2010) observed that anoxic lakes contained preferentially more methylated over cyclized brGDGTs than oxic lakes. In the seasonal upwelling system off Concepción, the absolute predominance of methylated brGDGTs during upwelling conditions (Fig. 4C) could be reflecting the loss of cyclized brGDGTs as result of the exposure to oxygen during austral winter. Alternatively, it could reflect that the organisms synthesizing brGDGTs are sensitive to variations in water column redox, modifying their brGDGTs lipid composition as response to the environmental redox changes of the study site, or by seasonal changes of bacterial producer brGDGTs community structure with changes in the whole oceanographic conditions of water column off Concepción. These uncertainties remain unconstrained at the moment.

5. CONCLUSIONS

A seasonal pattern in the distribution and composition of i and brGDGTs was found in the upwelling ecosystem off Concepción where an Oxygen Minimum Zone develops during austral summer. This pattern reflects the distribution of archaea –traumarcheota in the area

as compared with a year round observation of rDNA and rRNA molecular data. The fractional abundances of iGDGTs showed that Euryarchaeota was most prominent during upwelling conditions. The highest abundance and diversity of iGDGTs occurred in sub-surface water during non-upwelling conditions. During upwelling conditions, a higher relative contribution of GDGT-2 was found in sub-surface, sub-oxic water, leading to discrepancies between TEX₈₆-derived and *in situ* temperatures. Similarly, TEX₈₆-derived temperatures from surface sediments yielded values that exceeded seasonal and year averages in surface and subsurface water. Additionally, the distribution of iGDGTs in surface sediments over the continental shelf off Concepción might be biased by the seasonal input of iGDGTs from Euryarchaeota during the upwelling season as well as by soil archaea during the low productivity season in austral fall-winter. The highest abundance of brGDGTs occurred during non-upwelling conditions (austral fall-winter), particularly in surface water.

ACKNOWLEDGEMENTS

This research was funded by the Center for Oceanographic Research in the eastern South Pacific (COPAS), the Gordon and Betty Moore Foundation, the COPAS Sur-Austral Program (PFB-31), and the MIT International Science and Technology Initiatives (MIT-MISTI-Chile). B. S. acknowledges the Ministry of Education's MECESUP Program UCO-0602, the Department of Atmospheric, Earth and Planetary Sciences at MIT, and the Fulbright Chilean Commission for supporting a research visit to the Massachusetts Institute of Technology. We acknowledge the support provided by the COPAS Oceanographic Time Series off Concepción, the crew of the L/C Kay-Kay II, and the personnel of the Marine Organic Geochemistry Laboratory at UDEC and the Geobiology Group at MIT for laboratory assistance. This manuscript was greatly improved by the constructive comments of the Associate Editor, reviewer Dr. Carne Huguet, and one anonymous reviewer. The Hanse-Wissenschaftskolleg (HWK) in Delmenhorst, Germany, provided support to SP for part of the editorial work.

REFERENCES

Ahumada, R., & Chuecas, L. 1979. Algunas características hidrográficas de la Bahía Concepción (36°40' S - 73°02'W) y áreas adyacentes, Chile. *Gayana Miscelánea (Chile)* 8: 1-56.

Amann, R.I., Binder, B.J., Olson, R.J., Chisholm, S.W., Devereux, R., & Stahl, D.A. 1990. Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. *Applied Environmental Microbiology* 56: 1919-1925.

Bale, N.J., Villanueva, L., Hopmans, E.C., Schouten, S., & Sinninghe Dmesté, J.S., 2013. Different seasonality of pelagic and benthic Thaumarchaeota in the North Sea. *Biogeosciences Discussions* 10: 12593-12624.

Bano, N., Ruffin, S., Ransom, B., & Hollibaugh J.T. 2004. Phylogenetic composition of Arctic Ocean archaeal assemblages and comparison with antarctic assemblages. *Applied Environmental Microbiology* 70: 781-789.

Belicka L.L., & Harvey, H.R. 2009. The sequestration of terrestrial organic carbon in Arctic Ocean sediments: a comparison of methods and implications for regional carbon budgets. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 73: 6231-6248.

Bechtel, A., Smittenberg, R., Bernasconi, S., & Schubert, C. 2010. Distribution of branched and isoprenoid tetraether lipids in an oligotrophic and a eutrophic Swiss lake: Insights into sources and GDGT-based proxies. *Organic Geochemistry* 41: 822-832.

Benvegnu, T., Lemiègre, L., & Cammas-Marion, S. 2008 Archaeal Lipids: Innovative Materials for Biotechnological Applications. *European Journal of Organic Geochemistry*: 4724-4744.

Blaga, C.I., Reichart, G.J., Heiri, O., & Sinninghe Damsté, J.S. 2009. Tetraether membrane lipid distributions in water-column particulate matter and sediments: a study of 47 European lakes along a north-south transect. *Journal of Paleolimnology* 41: 523-540.

Blumenberg, M., Seifert, R., Reitner, J., Pape, T., & Michaelis, W. 2004. Membrane lipid patterns typify distinct anaerobic methanotrophic consortia. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 101: 11111-11116.

Boyd, E., Pearson, A., Pi, Y., Li, W.J., Zhang, Y., He, L., Zhang, C.L., & Geesey, G. 2011. Temperature and pH controls on glycerol dibiphytanyl glycerol tetraether lipid composition in the hyperthermophilic crenarchaeon *Acidilobus sulfurireducens*. *Extremophiles* 15: 59-65.

Brandhorst, W. 1971. Condiciones oceanográficas estivales frente a la costa de Chile. *Revista de Biología Marina* 3: 45-48.

Brochier-Armanet, C., Boussau, B., Gribaldo, S., & Forterre, P. 2008. Mesophilic Crenarchaeota: proposal for a third archaeal phylum, the Thaumarchaeota. *Nature Reviews Microbiology* 6: 245-252.

Burggraf, S., Mayer, T., Amann, R., Schadhauer, S., Woese, C.R., & Stetter, K.O. 1994. Identifying *Archaea* with rRNA-targeted oligonucleotide probes. *Applied Environmental Microbiology* 60: 3112-3119.

De la Torre, J.R., Walker, C.B., Ingalls, A.E., Könneke, M., & Stahl, D.A. 2008. Cultivation of a thermophilic ammonia oxidizing archaeon synthesizing crenarchaeol. *Environmental Microbiology* 10: 810-818.

DeLong, E.F. 1992. Archaea in coastal marine environments. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 89: 5685-5689.

DeLong, E.F., Wu, K.Y., Prézelin, B.B., & Jovine, R.V.M. 1994. High abundance of Archaea in Antarctic marine picoplankton. *Nature* 371: 695-697.

DeLong, E.F., King, L.L., Massana, R., Cittone, H., Murray, A., Schleper, C., & Wakeham, S.G. 1998. Dibiphytanyl ether lipids in nonthermophilic crenarchaeotes. *Applied and Environmental Microbiology* 64: 1133-1138.

DeLong, E.F. 2003. Oceans of Archaea. *American Society for Microbiology News* 69 (10): 503-511.

De Rosa, M., Gambacorta, A., & Gliozzi, A. 1986. Structure, biosynthesis, and physicochemical properties of archaeobacterial lipids. *Microbiology Reviews* 50: 70-80.

De Rosa, M. 1996. Archaeal lipids: structural features and supramolecular organization. *Thin Solid Films* 284(285):13-17.

De Rosa, M., & Gambacorta, A. 1988. The lipids of archaeobacteria. *Progress in Lipid Research* 27: 153-175.

Fietz, S., Huguet, C., Bendle, J., Escala, M., Gallacher, C., Herfort, L., Jamieson, R., Martínez-García, A., McClymont, E.L., Peck, V.L., Prahl, F.G., Rossi, S., Rueda, G., Sanson-Barrera, A., & Rosell-Melé, A. 2012. Co-variation of crenarchaeol and branched GDGTs in globally-distributed marine and freshwater sedimentary archives. *Global and Planetary Change* 92(93): 275-285.

Francis, C.A., Roberts, K.J., Beman, M., Santoro, A.E., & Oakley, B.B. 2005. Ubiquity and diversity of ammonia-oxidizing archaea in water columns and sediments of the ocean. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 102: 14683-14688.

Fuhrman, J.A., McCallum, K., & Davis, A.A. 1992. Novel major archaeobacterial group from marine plankton. *Nature* 356: 148-149.

Gliozzi, A., Paoli, G., De Rosa, M., & Gambacorta, A. 1983. Effect of isoprenoid cyclization on the transition temperature of lipids in thermophilic archaeobacteria. *Biochimica et Biophysica Acta* 735: 234-242.

Hallam, S.J., Mincer, T.J., Schleper, C., Preston, C.M., Roberts, K., Richardson, P.M., & DeLong, E.F. 2006. Pathways of carbon assimilation and ammonia oxidation suggested by environmental genomic analyses of marine Crenarchaeota. *Plos Biology* 4: 520-536.

Helly, J.J., & Levin, L.A. 2004. Global distribution of naturally occurring marine hypoxia on continental margins. *Deep-Sea Research I* 51: 1159-1168.

Herndl, G.J., Reinthaler, T., Teira, E., van Aken, H., Pernthaler, C.V.A., & Pernthaler, J. 2005. Contribution of Archaea to total prokaryotic production in the deep Atlantic Ocean. *Applied and Environmental Microbiology* 71: No.5.

Herfort, L., Schouten, S., Boon, J.P., Woltering, M., Baas, M., Weijers, J.W.H., & Sinninghe Damsté, J.S. 2006. Characterization of transport and deposition of terrestrial organic matter in the southern North Sea using the BIT index. *Limnology and Oceanography* 51: 2196-2205.

Herfort, L., Schouten, S., Abbas, B., Veldhuis, M.J.W., Coolen, M.J.L., Wuchter, C., Boon, J.P., Herndl, G.J., & Sinninghe Damsté, J.S. 2007. Variations in spatial and temporal distribution of Archaea in the North Sea in relation to environmental variables. *FEMS Microbiology and Ecology* 62: 242-267.

Hoefs, M.J.L., Schouten, S., King, L., Wakeham, G., de Leeuw, J.W., & Sinninghe Damsté, J.S. 1997. Ether lipids of planktonic archaea in the marine water column. *Applied Environmental Microbiology* 63: 3090-3095.

Hopmans, E.C., Schouten, S., Pancost, R.D., van der Meer, M.T.J., & Sinninghe Damsté, J.S. 2000. Analysis of intact tetraether lipids in archaeal cell material and sediments by high performance liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *Rapid Communication in Mass Spectrometry* 14: 585-589.

Hopmans, E.C., Weijers, J.W.H., Schefuß, E., Herfort, L. Sinninghe Damsté, J.S., & Schouten, S. 2004. A novel proxy for terrestrial organic matter in sediments based on branched and isoprenoid tetraether lipids. *Earth and Planetary Sciences Letters* 224: 107-116.

Huguet, C., Schimmelmann, A., Thunell, R., Lourens, L.J., Damste, J.S.S., & Schouten, S. 2007. A study of the TEX₈₆ paleothermometer in the water column and sediments of the Santa Barbara Basin, California. *Paleoceanography* 22.

Huguet, A., Fosse, C., Laggoun-Defarge, F., Toussaint, M.L. & Derenne, S. 2010a. Occurrence and distribution of glycerol dialkyl glycerol tetraethers in a French peat bog. *Organic Geochemistry* 41: 559-572.

Huguet, C., Martens-Habbena, W., Urakawa, H., Stahl, D, A., & Ingalls, A.E. 2010b. Comparison of extraction methods for quantitative analysis of core and intact polar glycerol dialkyl glycerol tetraethers (GDGTs) in environmental samples. *Limnology and Oceanography Methods* 8: 127-145.

Ingalls, A.E., Shah, S.R., Hansman, R.L., Aluwihare, L.I., Santos, G.M., Druffel, E.R.M., & Pearson, A. 2006. Quantifying archaeal community autotrophy in the mesopelagic ocean using natural radiocarbon. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 103: 6442-6447.

Ingalls, A.E., Huguet, C., & Truxal, L.T. 2012. Distribution of intact and core membrane lipids of archaeal glycerol dialkyl glycerol tetraethers among size-fractionated particulate organic matter in Hood Canal, Puget Sound. *Applied Environmental Microbiology* 78: 1480-1490.

Jones, D.R., Karl, D.M., & Laws, E.A. 1996. Growth rates and production of heterotrophic bacteria and phytoplankton in the North Pacific subtropical gyre. *Deep-Sea Research I*

43(10): 1567-1580.

Kamykowski, D., & Zentara, S. 1990. Hypoxia in the world ocean as recorded in the historical data set. *Deep-Sea Research* 37: 1861-1874.

Karner, M., DeLong, E.F., & Karl, D.M. 2001. Archaeal dominance in the mesopelagic zone of the Pacific Ocean. *Nature* 409: 507-510.

Kates, M. 1992. Archaeobacterial lipids: structure, biosynthesis and function. *Biochemical Society Symposium* 58: 51-72.

Kim, J.H., Schouten, S., Hopmans, E.C., Donner, B., & Sinninghe Damsté, J.S. 2008. Global core-top calibration of the TEX₈₆ paleothermometer in the ocean. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 72: 1154-1173.

Kim, J.H., Buscail, R., Bourrin, F., Palanques, A., Sinninghe Damsté, J.S., Bonnin, J., & Schouten, S. 2009. Transport and depositional process of soil organic matter during wet and dry storms on the Têt inner shelf (NW Mediterranean). *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* 273: 228-238.

Kim, J.H., van der Meer, J., Schouten, S., Helmke, P., Willmott, V., Sangiorgi, F., Koç, N., Hopmans, E.C., & Sinninghe Damsté, J.S. 2010. New indices and calibrations derived from distribution of crenarchaeal isoprenoidal tetraether lipids. Implications for past sea surface temperature. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 74: 4639-4654.

Koga, Y., & Morii, H. 2005. Recent advances in structural research on ether lipids from archaea including comparative and physiological aspects. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 69: 2019-34.

Kormas, A.K., Smith, D.C., Edgcomb, V., & Teske, A. 2003. Molecular analysis of deep subsurface microbial communities in Nankai Through sediments (ODP Leg 190, Site 1176). *FEMS Microbiology Ecology* 45: 115-125.

King, L.L., Pease, T.K., & Wakeham, S.G. 1998. Archaea in Black Sea water column particulate matter and sediments - evidence from ether lipid derivatives. *Organic Geochemistry* 28: 667-688.

Kuypers, M.M.M., Blokker, P., Erbacher, J., Kinkel, H., Pancost, R.D., Schouten, S., & Sinninghe Damsté, J.S. 2001. Massive expansion of marine Archaea during mid-Cretaceous oceanic anoxic events. *Science* 293: 92-94.

Langworthy, T.A., Smith, P.F., & Mayberry, W.R. 1972. Lipids of thermoplasma acidophilum. *Journal of Bacteriology* 112: 1193-1200.

Langworthy, T.A., Holzer, G., Zeikus, J.G., & Tornabene, T.G. 1983. Iso- and anteiso-branched glycerol diethers of the thermophilic anaerobe *Thermodesulfobacterium commune*. *Systematic and Applied Microbiology* 4: 1-17.

Lengger, S.K., Hopmans, E.C., Reichart, G.J., Nierop, K.G.C., Sinninghe Damsté, J.S., & Schouten, S. 2012. Intact polar and core glycerol dibiphytanyl glycerol tetraether lipids in the Arabian Sea oxygen minimum zone. Part II: Selective preservation and degradation in sediments and consequences for the TEX₈₆. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 98: 244-258.

Levipan, H.A., Quiñones, R.A., & Urrutia, H. 2007a. A time series of prokaryote secondary production in the oxygen minimum zone of the Humboldt current system, off central Chile. *Progress in Oceanography* 75: 531-549.

Levipan, H.A., Quiñones, R.A., Johansson, H.E., & Urrutia, H. 2007b. Methylophilic methanogens in the water column of an upwelling zone with a strong oxygen gradient off Central Chile. *Microbes and Environment* 22: 268-278.

Levipan, H.A., Alarcón, W.O., & Saldías, G.S. 2012. Fingerprinting analysis of the prokaryote community along a marine-freshwater transect in central-southern Chile.

Annals of Microbiology 62: 1121-1140.

Lincoln, S.A., Brenner, W., Eppley, J.M., Church, M.J., Summons, R.E., & DeLong, E.F. 2014. Planktonic Euryarchaeota are significant source of archaeal tetraether lipids in the ocean. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA 111(27): 9858-9863.

Liu, X., Lipp, J.S., & Hinrichs, K.U. 2011. Distribution of intact and core GDGTs in marine sediments. Organic Geochemistry 42: 368-375.

Liu, X., Summons, R.E., & Hinrichs, K.U. 2012. Extending the known range of glycerol ether lipids in the environment: structural assignments based on MS/MS fragmentation patterns. Rapid Communications in Mass Spectrometry 26: 2295-2302.

Lopez-Garcia, P., Moreira, D., Lopez-Lopez, A., & Rodriguez-Valera, F. 2001. A novel haloarchaeal-related lineage is widely distributed in deep oceanic regions. Environmental Microbiology 3: 72-78.

Macalady, J.L., Vestling, M.M., Baumler, D., Boekelheide, N., Kaspar, C.W., & Banfield, J.F. 2004. Tetraether-linked membrane monolayers in *Ferroplasma* spp.: a key to survival in acid. Extremophiles 8: 411-419.

Massana, R., Murray, A.E., Preston, C.M., & DeLong, E.F. 1997. Vertical distribution and phylogenetic characterization of marine planktonic Archaea in the Santa Barbara Channel. Applied and Environmental Microbiology 63:50-56.

Mathai, J.C., Sprott, G.D. & Zeidel, M.L. 2001. Molecular mechanisms of water and solute transport across archaeobacterial lipid membranes. Journal of Biological Chemistry. 276: 27266-27271.

Molina, V., Belmar, L., & Ulloa, O. 2010. High diversity of ammonia-oxidizing archaea in permanent and seasonal oxygen-deficient waters of the eastern South Pacific. Environmental Microbiology 12: 2459-2465.

Montero, P., Daneri, G., Cuevas, L.A., González, H.E., Jacob, B., Lizárraga, L., & Menschel, E. 2007. Productivity cycles in the coastal upwelling area off Concepción: The importance of diatoms and bacterioplankton in the organic carbon flux. *Progress in Oceanography* 75: 518-530.

Moreira, D., Rodriguez-Valera, F., & Lopez-Garcia, P. 2004. Analysis of a genome fragment of a deep-sea uncultivated Group II euryarchaeote containing 16S rDNA, a spectinomycin-like operon and several energy metabolism genes. *Environmental Microbiology* 6: 959-69.

Murray, A.E., Preston, C.M., Massana, R., Taylor, L.T., Blakis, A., Wu, K., & DeLong, E.F. 1998a. Seasonal and spatial variability of bacterial and archaeal assemblages in the coastal waters near Anvers Island, Antarctica. *Applied Environmental Microbiology* 64: 2585-2595.

Murray, A.E., Blakis, A., Massana, R., Strawzewski, S., Passow, U., Alldredge, A., & DeLong, E.F. 1998b. A time series assessment of planktonic archaeal variability in the Santa Barbara Channel. *Aquatic Microbial Ecology* 20: 129-145.

Murray, A.E., Blakis, A., Massana, R., Strawzewski, S., Passow, U., Alldredge, A. & DeLong, E.F. 1999. A time series assessment of planktonic archaeal variability in the Santa Barbara Channel. *Aquatic Microbial Ecology* 20: 129-145.

Nishihara, M., Morri, H., & Koga, Y. 1987. Structure determination of a quartet of novel tetraether lipids from *Methanobacterium thermoautotrophicum*. *Journal of Biochemistry* 101: 1007-1015.

Ouverney, C.C., & Fuhrman, J.A. 2000. Marine planktonic Archaea take up amino acids. *Applied and Environmental Microbiology* 66: 4829-4833.

Pantoja, S., Sepúlveda, J., & González, H.E. 2004. Decomposition of sinking proteinaceous material during fall in the oxygen minimum zone off northern Chile. *Deep-Sea Research I* 51: 55-70.

Pearson, A., & Ingalls, A.E. 2013. Assessing the use of Archaeal lipids as marine environmental proxies. *Annual Review of Earth and Planetary Sciences* 41: 359-384.

Pernthaler, A., Preston, C.M., Pernthaler, J., DeLong, E.F., & Amann, R. 2002. Comparison of fluorescence labeled oligonucleotide and polynucleotide probes for the detection of pelagic marine Bacteria and Archaea. *Applied Environmental Microbiology* 68: 661-667.

Peterse, F., Kim, J.H., Schouten, S., Klitgaard-Kristensen, D., Koç, N., & Sinninghe Damsté, J.S. 2009. Constraints on the application of the MBT/CBT palaeothermometer at high latitude environments (Svalbard, Norway). *Organic Geochemistry* 40: 692-699.

Pitcher, A., Rychlic, N., Hopmans, E.C., Spieck, E., Rijpstra, W.I.C., Ossebaar, J., Schouten, S., Wagner, M., & Sinninghe Damsté, J.S. 2010. Crenarchaeol dominates the membrane lipids of *Candidatus Nitrososphaera gargensis*, a thermophilic Group I.1b Archaeon. *ISME Journal* 4: 542-552.

Pitcher, A., Wuchter, C., Siedenberg, K., Schouten, S., & Sinninghe Damsté, J.S. 2011a. Crenarchaeol tracks winter blooms of ammonia-oxidizing Thaumarchaeota in the coastal North Sea. *Limnology and Oceanography* 56: 2308-2318.

Pitcher, A., Hopmans, E.C., Mosier, A.C., Park, S.J., Rhee, S.K., Francis, C.A., Schouten, S., & Sinninghe Damsté, J.S. 2011b. Core and intact polar glycerol dibiphytanyl glycerol tetraether lipids of ammonia-oxidizing Archaea enriched from marine and estuarine sediments. *Applied and Environmental Microbiology* 77: 3468-3477.

Powers, L., Werne, J.P., Vanderwoude, A.J., Damsté, J.S.S., Hopmans, E.C., & Schouten, S. 2010. Applicability and calibration of the TEX₈₆ paleothermometer in lakes. *Organic Geochemistry* 41: 404-413.

Quiñones, R.A., Levipan, H.A., & Urrutia, H. 2009. Spatial and temporal variability of planktonic archaeal abundance in the Humboldt Current System off Chile. *Deep-Sea Research II* 56: 1073-1082.

Raskin, L., Stromley, J.M., Rittmann, B.E., Sthal, B.E. 1994. Group-specific 16S rRNA

hybridization probes to describe natural communities of methanogens. *Applied Environmental Microbiology* 60: 1232-1240.

Santoro, A.E., Casciotti, K.L., & Francis, C.A. 2010. Activity, abundance and diversity of nitrifying archaea and bacteria in the central California Current. *Environmental Microbiology* 12: 1989-2006.

Schleper, C., Puehler, G., Holz, I., Gambacorta, A., Janekovic, D., Santarius, U., Klenk, H.P., & Zillig, W. 1995. "Picrophilus gen. nov., fam. nov.: a novel aerobic heterotrophic, thermoacidophilic genus and family comprising archaea capable of growth around pH 0". *Journal of Bacteriology* 177(24): 7050-7059.

Schouten, S., Hopmans, E.C., Pancost, R.D., & Sinninghe Damsté, J.S. 2000. Widespread occurrence of structurally diverse tetraether membrane lipids: Evidence for the ubiquitous presence of low-temperature relatives of hyperthermophiles. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97: 14421-14426.

Schouten, S., Hopmans, E.C., Schefuß, E., & Sinninghe Damsté, J.S. 2002. Distributional variations in marine crenarchaeotal membrane lipids: a new tool for reconstructing ancient sea water temperatures? *Earth and Planetary Science Letters* 204: 265-274.

Schouten, S., Van Der Meer, M.T.J., Hopmans, E.C., Rijpstra, W.I.C., Reysenbach, A.L., Ward, D.M., et al. 2007. Archaeal and bacterial glycerol dialkyl glycerol tetraether lipids in hot springs of Yellowstone National Park. *Applied Environmental Microbiology* 73: 6181-6191.

Schouten, S., Hopmans, E.C., Baas, M., Boumann, H., Standfest, S., Könneke, M., Stahl, D.A., & Sinninghe Damsté, J.S. 2008. Intact membrane lipids of *Candidatus Nitrosopumilus maritimus*, a cultivated representative of the cosmopolitan Mesophilic Group I Crenarchaeota. *Applied and Environmental Microbiology* 74: 2433-2440.

Schouten, S., Irene, W., Rijpstra, C., Durisch-Kaiser, E., Schubert, C.J., & Sinninghe Damsté, J.S. 2012a. Distribution of glycerol dialkyl glycerol tetraether lipids in the water column of Lake Tanganyika. *Organic Geochemistry* 53: 34-37.

Schouten, S., Pitcher, A., Hopmans, E.C., Villanueva, L., van Bleijswijk, J., & Sinninghe Damsté, J.S. 2012b. Intact polar and core glycerol dibiphytanyl glycerol tetraether lipids in the Arabian Sea oxygen minimum zone: I. Selective preservation and degradation in the water column and its consequences for the TEX86. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 98: 228–243.

Schouten, S., Hopmans, E.C., & Sinninghe Damsté, J.S. 2013. The Organic geochemistry of glycerol dialkyl glycerol tetraether lipids. *Organic Geochemistry* 54: 19-61.

Sepúlveda, J., Schubotz, F., Matys, E., Pantoja, S., Lange, C., & Summons, R.E. 2013. Vertical and spatial distribution of intact and core archaeal lipids in response to oxygenation gradients. 26th International Meeting on Organic Geochemistry, book of abstracts 1: 151-152.

Shimada, H., Nemoto, N., Shida, Y., Oshima, T., & Yamagishi, A. 2002. Complete polar lipid composition of *thermoplasma acidophilum* HO-62 determined by High-Performance Liquid Chromatography with Evaporative Light-Scattering Detection. *Journal of Bacteriology* 184: 556-563.

Sinninghe Damsté, J.S., Hopmans, E.C., Pancost, R.D., Schouten, S., & Geenevasen, J.A.J. 2000. Newly discovered non-isoprenoid dialkyl diglycerol tetraether lipids in sediments. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications* 23: 1683-1684.

Sinninghe Damsté, J.S., Rijpstra, W.I.C., Hopmans, E.C., Prahl, F.G., Wakeham, S.G., & Schouten, S., 2002a. Distribution of membrane lipids of planktonic Crenarchaeota in the Arabian Sea. *Applied and Environmental Microbiology* 68: 2997-3002.

Sinninghe Damsté, J.S., Schouten, S., Hopmans, E.C., van Duin, A.C.T., & Geenevasen, J.A.J. 2002b. Crenarchaeol: the characteristic core glycerol dibiphytanyl glycerol tetraether membrane lipid of cosmopolitan pelagic crenarchaeota. *The Journal of Lipid Research* 43: 1641-1651.

Sinninghe Damsté, J.S., Rijpstra, W.I.C., Hopmans, E.C., Weijers, J.W.H., Foesel, B.U., Overmann, J., & Dedysh, S.N. 2011. 13,16-Dimethyl octacosanedioic acid (iso-diabolic acid), a common membrane-spanning lipid of Acidobacteria subdivisions 1 and 3. *Applied Environmental Microbiology* 77: 4147-4154.

Sinninghe Damsté, J.S., Rijpstra, W.I.C., Hopmans, E.C., Jung, M.Y., Kim, J.G., Rhee, S.K., Stieglmeier, M., & Schleper, C. 2012. Intact Polar and Core Glycerol Dibiphytanyl Glycerol Tetraether Lipids of Group I.1a and I.1b Thaumarchaeota in Soil. *Applied Environmental Microbiology*, doi:10.1128/AEM.01681-12.

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. *Progress in Oceanography* 75: 363-382.

Stahl, D.A., & Amann, R. 1991. Development and application of nucleic acid probes. In *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*. E. Stackebrandt and M. Goodfellow, editors. John Wiley and Sons Ltd., Chichester, UK. 205-248.

Summers, W.C. 1970. A simple method for extraction of RNA from *E. coli* utilizing diethylpyrocarbonate. *Analytical Biochemistry* 33: 459-463.

Swain, M., Brisson, J.R., Sprott, G.D., Cooper, F.P., & Patel, G.B. 1997. Identification of beta-L-gulose as the sugar moiety of the main polar lipid *Thermoplasma acidophilum*. *Biochimica et Biophysica Acta Lipids and Lipid Metabolism* 1345: 56-64.

Taylor, K.W.R., Huber, M., Hollis, C.J., Hernandez-Sanchez, M.T., & Pancost, R.D. 2013.

Re-evaluating modern and Paleogene GDGT distributions: Implications for SST reconstructions. *Global and Planetary Change* doi: 10.1016/j.gloplacha.2013.06.011.

Tierney, J.E., & Russell, J.M. 2009. Distributions of branched GDGTs in a tropical lake system: Implications for lacustrine application of the MBT/CBT paleoproxy. *Organic Geochemistry* 40: 1032-1036.

Tierney, J.E., Russell, J.M., Eggermont, E., Hopmans, C., Verschuren, D., & Sinninghe Damsté, J.S. 2010. Environmental controls on branched tetraether lipid distributions in tropical East African lake sediments. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 74: 4902-4918.

Tierney, J.E., Schouten, S., Pitcher, A., Hopmans, E., & Sinninghe Damsté, J.S. 2012. Core and intact polar glycerol dialkyl glycerol tetraethers (GDGTs) in Sand Pond Warwick, Rhode island (USA): Insights into the origin of lacustrine GDGTs. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 77: 561-581.

Turich, C., Freeman, K.H., Bruns, M.A., Conte, M., Jones, A.D., & Wakeham, S.G. 2007. Lipids of marine Archaea: Patterns and provenance in the water-column and sediments. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 71: 3272-3291.

Uda, I., Sugai, A., Itoh, Y.H., & Itoh, T. 2001. Variation on molecular species of polar lipids from *Thermoplasma acidophilum* depends on growth temperature. *Lipids* 36: 103-105.

Valentine, D.L. 2007. Adaptations to energy stress dictate the ecology and evolution of the Archaea. *Nature Reviews Microbiology* 5: 316-323.

van der Maarel, M.J.E.C., Artz, R.R.E., Haanstra, R., & Forney, L.J. 1998. Association of marine archaea with the digestive tracts of two marine fish species. *FEMS Microbiology Letters* 173: 189-194.

van de Vossenberg, J.L.C.M., Driessen, A.J.M. & Konings, W.N. 1998. The essence of being extremophilic: the role of the unique archaeal membrane lipids. *Extremophiles* 2: 163-170.

Wakeham, S.G., Hopmans, E.C., Schouten, S., & Sinninghe Damsté, J.S. 2004. Archaeal lipids and anaerobic oxidation of methane in euxinic water columns: a comparative study of the Black Sea and Cariaco Basin. *Chemical Geology* 205: 427-442.

Wakeham, S.G., Amann, R., Freeman, K.H., Hopmans, E.C., Jørgensen, B.B., Putnam, I.F., Schouten, S., Sinninghe Damsté, J.S., Talbot, H.M., & Woebken, D. 2007. Microbial ecology of the stratified water column of the Black Sea as revealed by a comprehensive biomarker study. *Organic Geochemistry* 38: 20170-2097.

Wakeham, S.G., Turich, C., Schubotz, F., Podlaska, P., Li, X.L., Varela, R., Astor, Y., Sáenz, J.P., Rush, D., Sinninghe Damsté, J.S., Summons, R.E., Scranton, M., Taylor, G.T., & Hinrichs, K-U. 2012. Biomarkers, chemistry and microbiology show chemoautotrophy in a multilayer chemocline in the Cariaco Basin. *Deep-Sea Research I* 63: 133-156.

Ward, D.M., Brassell, S.C., & Eglinton, G. 1985. Archaeobacterial lipids in hot-spring microbial mats. *Nature* 318: 656-659.

Weijers, J.W.H., Schouten, S., Hopmans, E.C., Geenevasen, J.A.J., David, O.R.P., Coleman, J.M., Pancost, R.D., & Sinninghe Damsté, J.S. 2006. Membrane lipids of mesophilic anaerobic bacteria thriving in peats have typical archaeal traits. *Environmental Microbiology* 8: 648-657.

Weijers, J.W.H., Schouten, S., van den Donker, J.C., Hopmans, E.C., & Sinninghe Damsté, J.S. 2007. Environmental controls on bacterial tetraether membrane lipid distribution in soils. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 71: 703-713.

Weijers, J.W.H., Lima, K.H.L., Aquilina, A., Sinninghe Damsté, J.S., & Pancost, R.D. 2011. Biogeochemical controls on glycerol dialkyl glycerol tetraether lipid distributions in sediments characterized by diffusive methane flux. *Geochemistry Geophysics Geosystems* 12: Q10010. <http://dx.doi.org/10.1029/>.

Woese, C.R., Magrum, L.J., & Fox, G.E. 1978. Archaeobacteria. *Journal of Molecular*

Evolution 11: 245-252.

Wuchter, C., Schouten, S., Coolen, M.J.L., & Sinninghe Damsté, J.S. 2004. Temperature dependent variation in the distribution of tetraether membrane lipids of marine Crenarchaeota: implications for TEX₈₆ paleothermometry. *Paleoceanography* 19: PA4028, doi:10.1029/2004PA001041.

Wuchter, C., Schouten, S., Wakeham, S.G., & Sinninghe Damsté, J.S. 2005. Temporal and spatial variation in tetraether membrane lipids of marine Crenarchaeota in particulate organic matter: Implications for TEX₈₆ paleothermometry, *Paleoceanography* 20: PA3013.

Wuchter, C.W., 2006. Ecology and Membrane Lipid Distribution of Marine Crenarchaeota: Implications for TEX₈₆ Paleothermometry. PhD Thesis, University of Utrecht. <<http://igitur-archive.library.uu.nl/dissertations/2006-0412-200011/full.pdf>>.

Wuchter, C.W., Schouten, S., & Wakeham, S.G. 2006. Archaeal tetraether membrane lipid fluxes in the northeastern Pacific and the Arabian Sea: Implications for TEX₈₆ paleothermometry. *Paleoceanography* 21: PA4208, doi:10.1029/2006PA001279.

Xie, S., 2013. Organic Geochemical Studies of Microbial Lipids and Carbon Flow in Oxygen-Deficient Marine Environments. PhD thesis, University of Bremen, Germany.

Yamamoto, M., Shimamoto, A., Fukuhara, T., Tanaka, Y., & Ishizaka, J. 2012. Glycerol dialkyl glycerol tetraethers and TEX₈₆ index in sinking particles in the western North Pacific. *Organic Geochemistry* 53: 52-62.

Zhang, Y.G., Zhang, C.L., Liu, X.L., Li, L., Hinrichs, K.U., & Noakes, J.E. 2011. Methane Index: a tetraether archaeal lipid biomarker indicator for detecting the instability of marine gas hydrates. *Earth and Planetary Science Letters* 307: 525-534.

Zhou, H.D., Hu, J.F., Ming, L.L., Peng, P.A., & Zhang, E. 2011. Branched glycerol dialkyl glycerol tetraethers and paleoenvironmental reconstruction in Zoigê peat sediments during the last 150 years. *Chinese Science Bulletin* 56: 2456-2463.

FIGURE CAPTIONS

FIGURE 1: Location of the study site in the upwelling area off Concepción in Central Chile (36°S 73°W).

FIGURA 1: Ubicación del sitio de estudio en el area de surgencia de Chile Central (36°S 73°W).

FIGURE 2: Vertical distribution of chlorophyll, temperature, salinity, oxygen, ammonium, nitrite and nitrate during upwelling (September 2009; a-b) and non-upwelling (June 2010; c-d) seasons. Information of the COPAS Center Time Series Oceanographic Station 18 is available at www.copas.udec.cl/eng/research/serie/.

FIGURA 2: Distribución vertical de clorofila, temperatura, salinidad, oxígeno, amonio, nitrito y nitrato durante las estaciones de surgencia (Septiembre 2009; a-b) no-surgencia (Junio 2010; c-d). La información de la Serie de Tiempo de la Estación 18 del Centro COPAS está disponible en: www.copas.udec.cl/esp/investigacion/serie/.

FIGURE 3: Molecular structure of isoprenoid and branched GDGTs mentioned in this study. a: GDGT-0; b, GDGT-1; c, GDGT-2; d, GDGT-3; e, crenarchaeol; f, brGDGT-III; g, brGDGT-II; h, brGDGT-I; i, brGDGT-IIb; j, brGDGT-Ib; k, brGDGT-Ic. Numbers 0-3 represents isoprenoid GDGTs with 0 to 3 pentacyclic rings. Roman numbers III, II, I, IIb, Ib and Ic indicate branched GDGTs with different numbers of methyl groups and pentacyclic rings.

FIGURA 3: Estructura molecular de GDGTs isoprenoides y ramificados mencionados en el presente estudio. a: GDGT-0; b, GDGT-1; c, GDGT-2; d, GDGT-3; e, crenarchaeol; f, brGDGT-III; g, brGDGT-II; h, brGDGT-I; i, brGDGT-IIb; j, brGDGT-Ib; k, brGDGT-Ic. Los números 0-3 representan GDGTs isoprenoides con 0 y 3 anillos penta-cíclicos. Los números romanos III, II, I y Ic indican GDGTs ramificados con diferente número de grupos metilos y anillos penta-cíclicos.

FIGURE 4: Relative and absolute concentrations of isoprenoid GDGTs during the (a)

upwelling and (b) non-upwelling seasons.

FIGURA 4: Concentraciones relativas y absolutas de GDGTs isoprenoides durante las estaciones de (a) surgencia y (b) no-surgencia.

FIGURE 5: Relative and absolute concentrations of branched GDGTs during the (a) upwelling and (b) non-upwelling seasons.

FIGURA 5: Concentraciones relativas y absolutas de GDGTs ramificados durante las estaciones de (a) surgencia y (b) no-surgencia.

FIGURE 6: Relative contribution and absolute concentration of (a) isoprenoid and (b) branched GDGTs in a top-core sediment sample at Station 18.

FIGURA 6: Contribución relativa y concentración absoluta de los GDGTs (a) isoprenoides y (b) ramificados en una muestra superficial de un testigo de sedimento en la Estación 18.

FIGURE 7: Abundance of total archaeal ribotypes (ARCH915, domain-specific probe), most crenarchaeota (CREN499, able to recognize representatives of thaumarchaeota initially classified as ‘Marine Group 1 crenarchaeota’), most euryarchaeota (EURY498) and some versatile methanogens (MS1414) at 10 and 80 m depth in the st.18 as determined by quantitative dot-blot 16S rRNA hybridizations. The abundances are expressed as a percentage of prokaryote rRNA that was determined by adding archaeal rRNA plus (ARCH915) bacterial one (EUB338). Months (2006) marked with asterisks show the upwelling-favorable period in the study area. No samples were available in May. Other gaps correspond to dates when the target groups were below detection limit. A comparative denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) profile analysis of archaeal 16S rDNA gene is shown for January and June (2006) at both depths. Arrows show bands that were reliably selected for similarity analysis by using the 1Dscan EX software.

FIGURA 7: Abundancias totales de los ribo-tipos arqueanos (prueba del dominio-específico ARCH915), la mayoría de las crenarchaeotas (CREN499, capaz de reconocer representantes de thaumarchaeota, inicialmente clasificados como “Grupo Marino 1 crenarchaeota”), la mayoría de las euryarchaeotas (EURY498) y algunos metanógenos

versátiles (MS1414) a 10 y 80 m de profundidad en la est. 18 determinados mediante hibridaciones cuantitativas de dot-blot 16S rARN. Las abundancias son expresadas como el porcentaje del rARN procarionte total, el cual fue determinado por la adición del rARN arqueano (ARCH915) más uno bacteriano (EUB338). Los meses etiquetados con asteriscos muestran el periodo favorable de surgencia en el área de estudio (2006). No hubieron muestras disponibles en Mayo. Los otros espacios vacíos corresponden a las fechas cuando los grupos objetivos estuvieron bajo el límite de detección. Un análisis de perfil comparativo de electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización de genes 16S rADN arqueanos son mostrados en Enero y Junio (2006) para ambas profundidades. Las flechas muestran las bandas que fueron seleccionadas confiablemente para el análisis de similitud utilizando el programa 1Dscan EX.

TABLE 1. Comparison between *in situ* TEX_{86}^L and TEX_{86} derived temperature, the Ring Index, and the GDGT-2/ GDGT-3 ratio and GDGT-2/crenarqueol in suspended particles and surface sediments during upwelling and non-upwelling seasons off Concepción (36°S). iGDGTs 2 and 3 were under detection limit in the surface layer.

TABLA 1: Comparación entre temperaturas derivadas *in situ* desde TEX_{86}^L , el Índice de Anillos y las razones GDGT-2/GDGT-3 y el GDGT-2/crenarqueol en partículas suspendidas y sedimento superficial durante las estaciones de surgencia y no-surgencia frente a Concepción (36°S). iGDGTs 2 y 3 estuvieron bajo el límite de detección en la capa superficial

TABLE 2. Similarity matrix using the Jaccard coefficient of proximity for DGGE banding patterns of archaeal 16S rDNA PCR amplicon obtained from surface and sub-surface waters off Concepción (36°S) during upwelling (January 2006) and non-upwelling (June 2006) seasons.

TABLA 2: Matriz de similitud usando el coeficiente de proximidad de Jaccard para los

patrones de bandas de EGGD archaeal 16S rDNA PCR amplificados obtenidos de aguas superficiales y sub-superficiales de la zona de estudio frente a Concepción (36°S) en época de surgencia (Enero 2006) y no surgencia (Junio 2006).

FIGURES

FIGURE 1

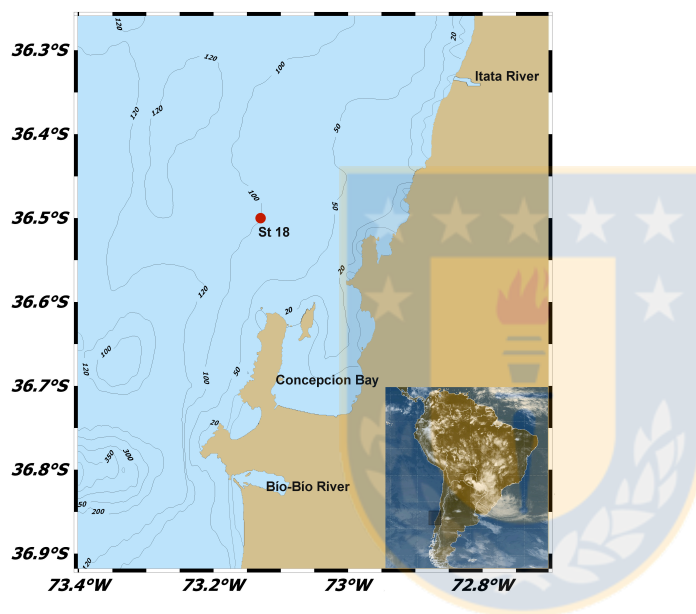


FIGURE 2

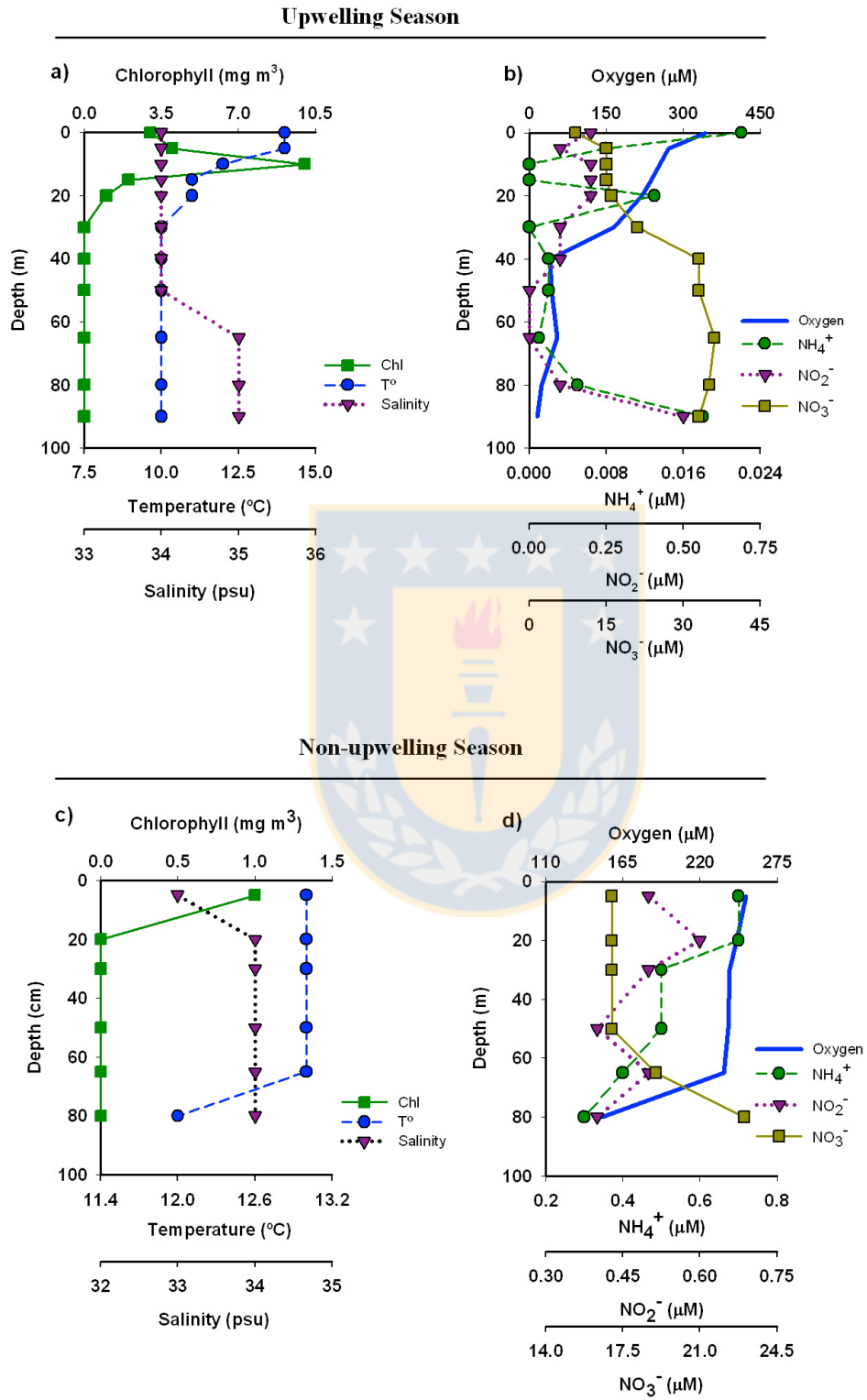
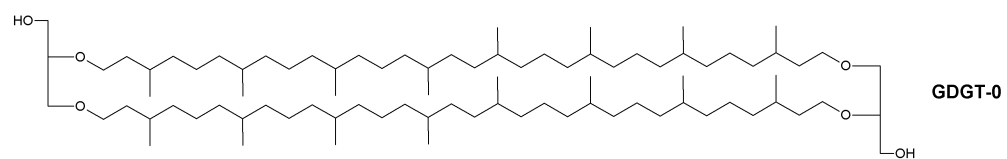
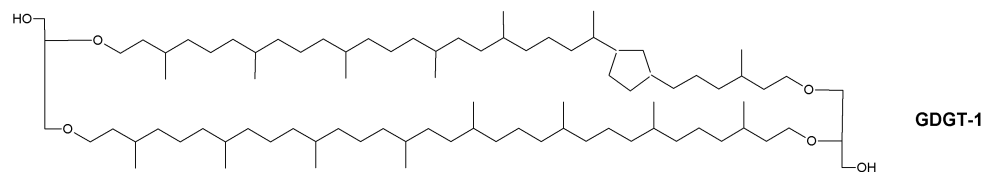


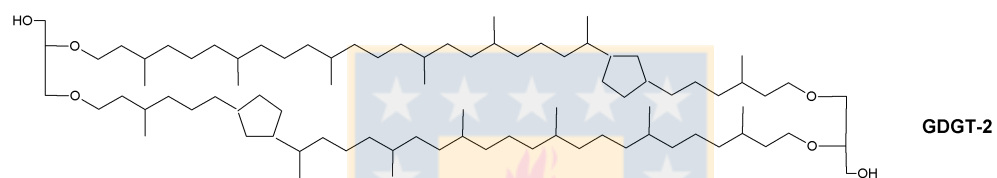
FIGURE 3



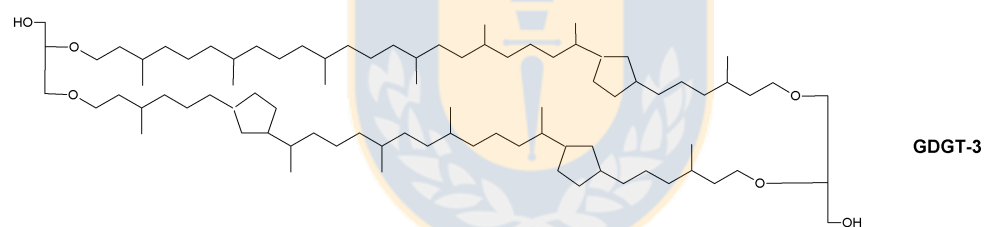
3a



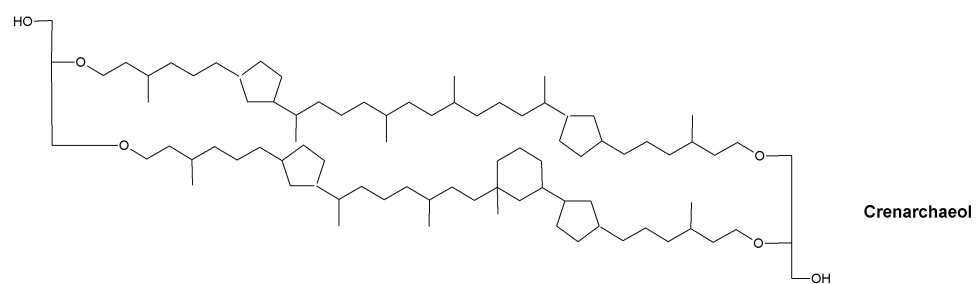
3b



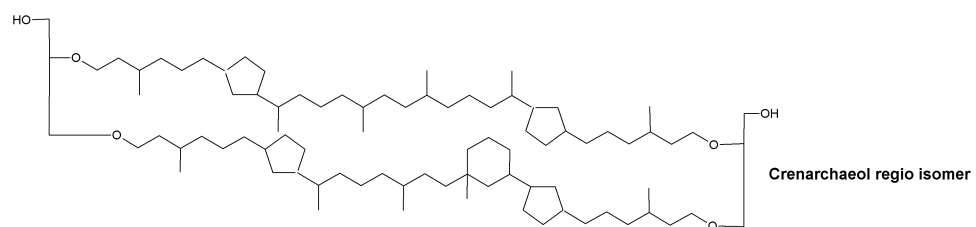
3c



3d



3e



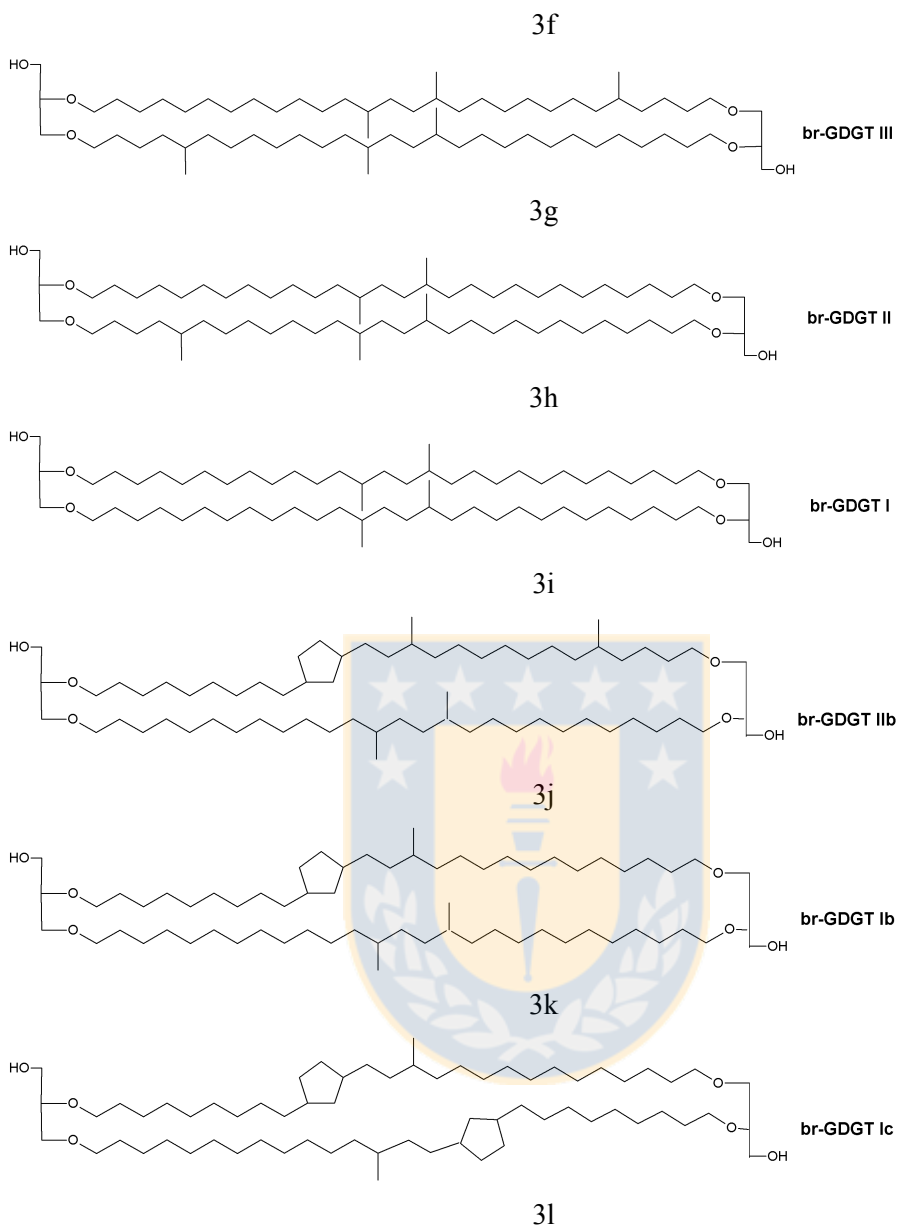


FIGURE 4

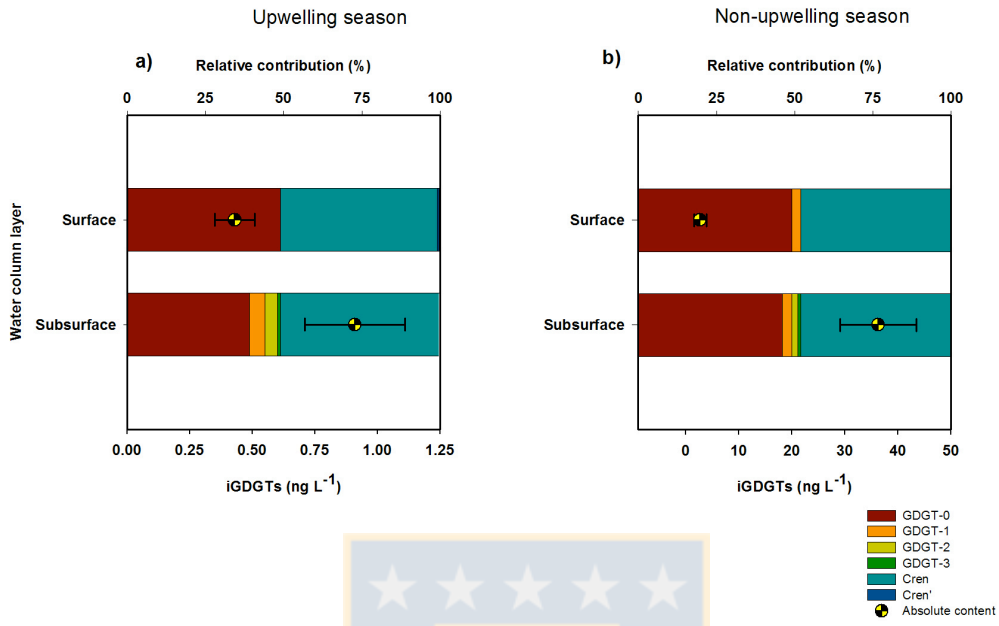


FIGURE 5

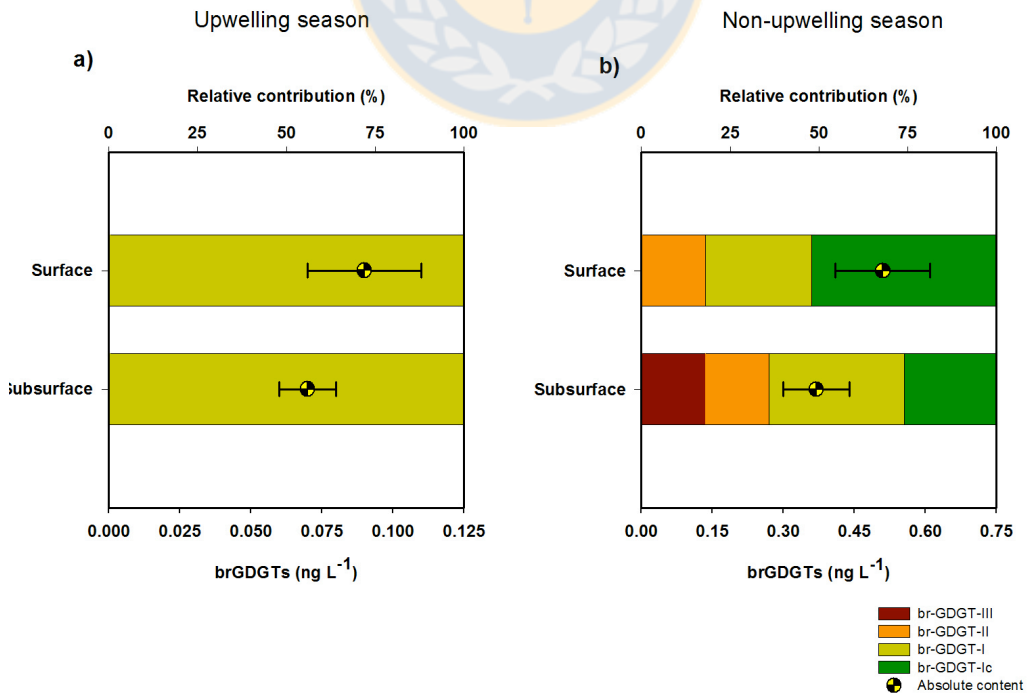


FIGURE 6

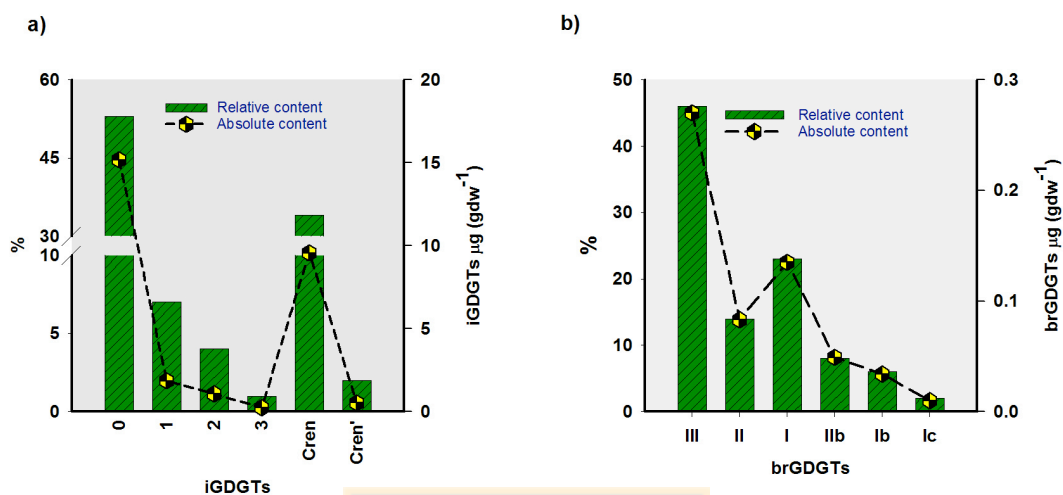


FIGURE 7

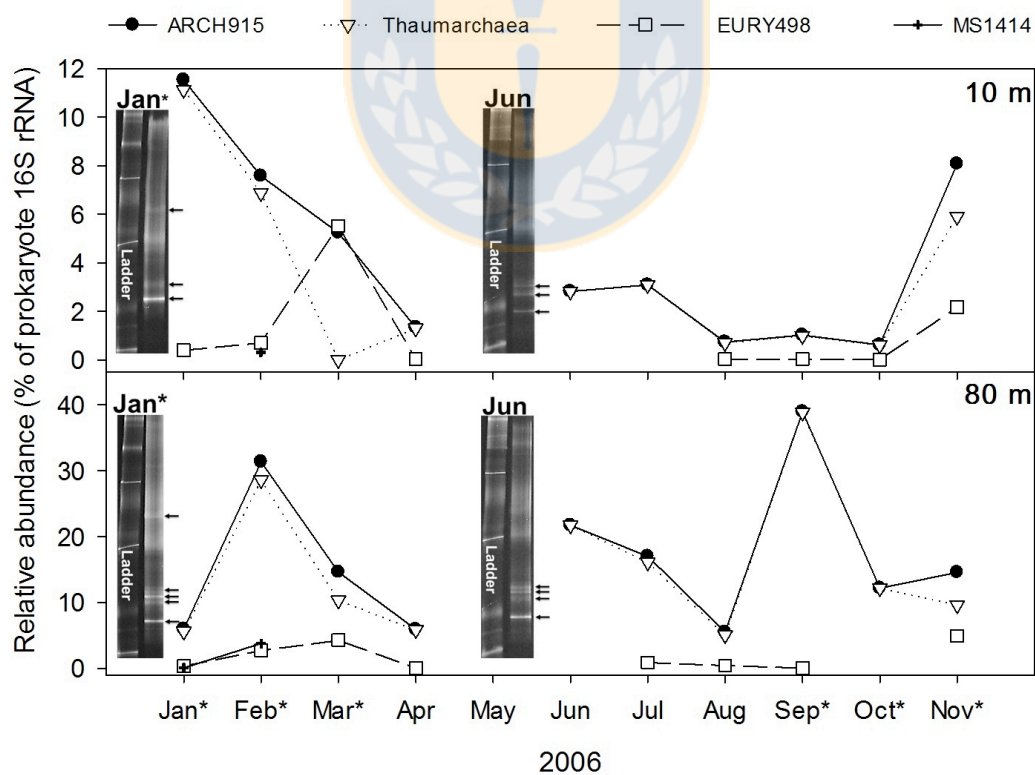


TABLE 1. Comparison between *in situ* TEX_{86}^L and TEX_{86} derived temperature, the Ring Index, and the GDGT-2/ GDGT-3 ratio and GDGT-2/crenarqueol in suspended particles and surface sediments during upwelling and non-upwelling seasons off Concepción (36°S). iGDGTs 2 and 3 were under detection limit in the surface layer.

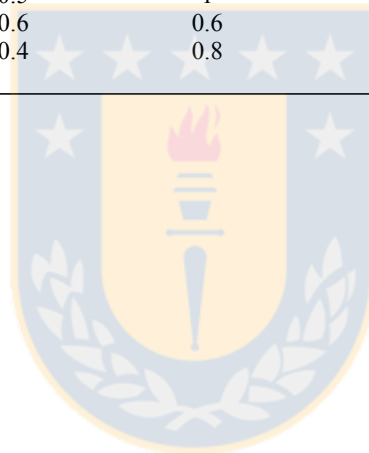
TABLA 1: Comparación entre temperaturas derivadas *in situ* desde TEX_{86}^L , el Índice de Anillos y las razones GDGT-2/GDGT-3 y el GDGT-2/crenarqueol en partículas suspendidas y sedimento superficial durante las estaciones de surgencia y no-surgencia frente a Concepción (36°S). iGDGTs 2 y 3 estuvieron bajo el límite de detección en la capa superficial

Upwelling Season						
	In situ T (°C)	SPM- TEX_{86}	SPM- TEX_{86} T (°C) ¹	Ring Index ²	(GDGT-2/GDGT-3) ³	(GDGT-2/Crenarchaeol) ⁴
Surface	12	ND	ND	ND	ND	ND
Subsurface	10	0.49	12	3	9	0.04
Non-upwelling Season						
	In situ T (°C)	SPM- TEX_{86}	SPM- TEX_{86} T (°C) ¹	Ring Index ²	(GDGT-2/GDGT-3) ³	(GDGT-2/Crenarchaeol) ⁴
Surface	13	ND	ND	ND	ND	ND
Subsurface	12	0.52	14	2	4	0.2
Surface sediment						
TEX_{86}	TEX_{86}^L	TEX_{86} T (°C) ²	TEX_{86}^L T (°C) ³	Ring Index ⁴	(GDGT-2/GDGT-3) ⁵	(GDGT-2/Crenarchaeol) ⁶
0.5	-0.5	17	15	2	4	0.1

TABLE 2. Similarity matrix using the Jaccard coefficient of proximity for DGGE banding patterns of archaeal 16S rDNA PCR amplicon obtained from surface and sub-surface waters off Concepción (36°S) during upwelling (January 2006) and non-upwelling (June 2006) seasons.

TABLA 2: Matriz de similitud usando el coeficiente de proximidad de Jaccard para los patrones de bandas de EGGD archaeal 16S rDNA PCR amplificados obtenidos de aguas superficiales y sub-superficiales de la zona de estudio frente a Concepción (36°S) en época de surgencia (Enero 2006) y no surgencia (Junio 2006).

	January 10 m	June 10 m	January 80 m	June 80 m
January 10 m	1	0.5	0.6	0.4
June 10 m	0.5	1	0.6	0.8
January 80 m	0.6	0.6	1	0.8
June 80 m	0.4	0.8	0.8	1



3.2. Cambios interdecadales en la intensidad de la Zona de Mínimo Oxígeno frente a Concepción, Chile

Srain, B., Pantoja, S., Sepúlveda, J., Lange, C.B., Muñoz, P., Summons, R., J., McKay, M. Salamanca. Inter-decadal changes in intensity of the Oxygen Minimum Zone off Concepción, Chile. Manuscrito enviado a la revista Biogeosciences

We reconstructed oxygenation changes in the Oxygen Minimum Zone of the upwelling ecosystem off Concepción (36°S), Chile, using inorganic and organic proxies in a sediment core covering the last ca.110 years of sedimentation in this area. Authigenic enrichments of Mo, U and Cd were observed between ca. 1935–1971 CE indicating a prolonged period of more reduced conditions in bottom waters and surface sediments. Significant positive correlations ($p < 0.05$; Spearman) between redox sensitive metals, algal sterols, biomarkers of anaerobic microorganisms, and archaeal glycerol dialkyl glycerol tetraether indicated a coupling among bottom water oxygen depletion, and increased primary and export production, suggesting that the period with low O₂ of ca. 35 years, follows low frequency inter-decadal variation of the Pacific Decadal Oscillation, which may have resulted in O₂ depletion over the entire continental shelf off Concepción. Taken together with the concurrent increase in sedimentary molecular indicators of anaerobic microbes allow us to suggest that the prokaryote community has been influenced by changes in oxygenation of the water column.

Key words: Oxygen Minimum Zone, upwelling, organic biomarkers, redox sensitive metals, prokaryote community, Pacific Decadal Oscillation, Chile

Resumen

Nosotros reconstruimos cambios en la oxigenación en la Zona de Mínimo Oxígeno en el ecosistema de surgencia frente a Concepción (36°S) utilizando indicadores inorgánicos y orgánicos en un testigo sedimentario cubriendo ca. los últimos 110 años de sedimentación en esta área. Enriquecimientos autigénico de Mo, U y Cd fueron observados ca. Entre 1935-1971 CE indicando un prolongado periodo de condiciones más reducidas en el agua de fondo y los sedimentos superficiales. Correlaciones significativas positivas ($p < 0,05$; Spearman) entre metales sensitivos a oxido-reducción, esteroides de algas, biomarcadores de microorganismos anaeróbicos y glicerol dialquilo glicerol tetra-éteres arqueanos indicaron un acoplamiento entre el agotamiento de O_2 en el agua de fondo y una incrementada producción primaria y exportada, sugiriendo que el periodo con bajo O_2 de ca. 35 años, sigue a la variación interdecadal de baja frecuencia de la Oscilación Decadal del Pacífico, la cual pudo haber resultado en agotamiento de O_2 sobre la totalidad de la plataforma continental frente a Concepción. Tomado en conjunto con el aumento simultáneo de los indicadores moleculares sedimentarios de microbios anaeróbicos nos permite sugerir que la comunidad procarionte ha sido influenciada por los cambios en oxigenación de la columna de agua.

Palabras clave: Zona de Mínimo Oxígeno, surgencia, biomarcadores orgánicos, metales sensibles a oxido-reducción, comunidad procarionte, Oscilación Decadal del Pacífico, Chile.

Inter-decadal changes in the intensity of the Oxygen Minimum Zone off Concepción, Chile (~36°S) over the last century

Benjamín Srain¹, Silvio Pantoja^{2, 3}, Julio Sepúlveda^{4,*}, Carina Lange^{2,3}, Praxedes Muñoz⁵, Roger E. Summons⁴, Jennifer McKay⁶, Marco Salamanca³

[1] {Graduate Program in Oceanography, Department of Oceanography, University of Concepción, Concepción, Chile}

[2] {Department of Oceanography and Center for Oceanographic Research in the eastern South Pacific (COPAS Sur-Austral), University of Concepción, Concepción, Chile}

[3] {Center for Oceanographic Research in the eastern South Pacific (COPAS Sur-Austral), University of Concepción, Concepción, Chile}

[4] {Department of Earth, Atmospheric, and Planetary Sciences, Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, USA}

[5] {Facultad de Ciencias del Mar y Centro de Estudios Avanzados en Zonas Áridas (CEAZA), Universidad Católica del Norte, Coquimbo, Chile}

[6] {College of Earth, Ocean, and Atmospheric Sciences, Oregon State University, Corvallis, OR, USA}

[*]{now at: Department of Geological Sciences and Institute of Arctic and Alpine Research, University of Colorado, Boulder, USA}

Correspondence to: S. Pantoja (spantoja@udec.cl)

Abstract

We reconstructed oxygenation changes in the Oxygen Minimum Zone of the upwelling ecosystem off Concepción (36°S), Chile, using inorganic and organic proxies in a sediment core covering the last ca.110 years of sedimentation in this area. Authigenic enrichments of Mo, U and Cd were observed between ca. 1935–1971 CE indicating a prolonged period of more reduced conditions in bottom waters and surface sediments. Significant positive correlations ($p < 0.05$; Spearman) between redox sensitive metals, algal sterols, biomarkers of anaerobic microorganisms, and archaeal glycerol dialkyl glycerol tetraether indicated a coupling among bottom water oxygen depletion, and increased primary and export production, suggesting that the period with low O₂ of ca. 35 years, follows low frequency inter-decadal variation of the Pacific Decadal Oscillation, which may have resulted in O₂ depletion over the entire continental shelf off Concepción. Taken together with the concurrent increase in sedimentary molecular indicators of anaerobic microbes allow us to suggest that the prokaryote community has been influenced by changes in oxygenation of the water column.

Key words: Oxygen Minimum Zone, upwelling, organic biomarkers, redox sensitive metals, prokaryote community, Pacific Decadal Oscillation, Chile

1. Introduction

Oxygen Minimum Zones (OMZs) are epipelagic and mesopelagic subsurface layers of suboxic waters (e.g., $\leq 22 \mu\text{M O}_2$) found along eastern boundary currents such as the Eastern Tropical North and South Pacific, and the Benguela current, as well as the Arabian Sea and the Equatorial Pacific, where upwelling of nutrient-rich waters promotes elevated primary production and O_2 consumption through microbial respiration (Wyrtky, 1962; Helly and Levin, 2004; Paulmier and Ruiz-Pino, 2009). Due to the presence of strong redox gradients, reducing conditions and active microbial communities connecting the cycling of carbon, nitrogen, sulfur and other elements, OMZs are considered remnants of a past anoxic ocean due to their similarities with Archaean prokaryotic biota (Ulloa et al., 2012; Wright et al., 2012).

Waters overlaying the continental shelf of central Chile become seasonally depleted in O_2 during austral spring and summer when the area is fed by the poorly oxygenated Peru-Chile Countercurrent. In austral autumn and winter the shelf waters become oxygenated due to the input of Subantarctic waters (Ahumada and Chuecas, 1979; Sobarzo et al., 2007). Inter-annual phenomena such as the El Niño Southern Oscillation (ENSO) can also impact oxygenation of south Pacific waters (Blanco et al., 2002; Carr et al., 2002; Levin et al., 2002). In central-southern Chile, the upper edge of the OMZ deepens during El Niño thus allowing greater oxygenation of bottom waters (Gutiérrez et al., 2000; Neira et al., 2001; Escribano et al., 2004). Analyzing a sedimentary record from northern Chile, Vargas et al. (2007) related changes in coastal upwelling and biological production with variations in the Pacific Decadal Oscillation (PDO), characterized by an ENSO-like interdecadal variability in the Humboldt Current System. During the cold phase of the PDO, primary

production intensifies in response to upwelling and fertilization of the upper ocean (Mantua et al., 1997, 2002; Cloern et al., 2007), leading to enhanced oxygen consumption in the water column (Wyrky, 1962; Sarmiento et al., 1998; Helly and Levin, 2004). Since patterns of biological production and oxygenation of the water column during PDO cycles resemble those of ENSO (Vargas et al., 2007), we hypothesize that variations at the scale of the PDO promote chemical and biological changes in the OMZ off central-southern Chile.

Past redox variations can be analyzed using trace elements in sediments since redox sensitive metals are less soluble under reducing conditions resulting in authigenic enrichment in low oxygen and high organic matter environments (Algeo and Maynard, 2004; McManus et al., 2005). This chemical behavior makes uranium (U), molybdenum (Mo), and cadmium (Cd) useful paleoredox and paleoproductivity proxies (Algeo and Maynard, 2004; McManus et al., 2005; Riquier et al., 2005).

In the past decade, an abundant and diverse microbial community has been detected in OMZ waters off central and northern Chile (Stevens and Ulloa, 2008; Farías et al., 2009; Quiñones et al., 2009; Canfield et al., 2010; Molina et al., 2010; Levipan et al., 2012; Srain et al., in press). Temporal and compositional variations in this microbial community can be studied by analyzing their cell membrane lipids (biomarkers) preserved in the sedimentary record, as has been done for other OMZ areas of the world ocean (Schouten et al. 2000a; Arning et al., 2008; Rush et al., 2012).

We studied redox sensitive metals and organic biomarkers in a 110-year sedimentary record from the OMZ within the upwelling ecosystem off Concepción, central-

southern Chile (36°S), to infer changes in biological production and oxygenation of the water column. Our goal was to assess whether the intensity of the OMZ has varied over the past century in response to ocean/atmosphere circulation patterns, and whether this has affected the prokaryote community.

2. Methods

2.1. Sampling

A 25-cm-long sediment core was collected from the continental shelf off Concepción (Station 18, 36°30.8'S, 73°7'W, Fig. 1) in austral summer (February 2009) using a GOMEX box corer onboard R/V Kay-Kay II. The top 5 cm were sectioned on board every 0.5 cm, whereas the rest of the core was sampled at 1 cm resolution. Samples were stored in glass petri plates and kept frozen at -18°C until laboratory analysis. Sampling was carried out in the framework of the grant “Microbial Initiative in Low Oxygen off Concepción and Oregon” (http://mi_loco.coas.oregonstate.edu), and the Oceanographic Time Series Program of the Center for Oceanographic Research in the eastern South Pacific (COPAS) at University of Concepción (www.copas.udec.cl/research/serie). Ancillary water column information was obtained from the database of the COPAS Center.

2.2. Sedimentary redox potential and organic carbon

Redox potential was measured in the top 15 cm of the sediment core using a redox potential sensor (Hanna) with an accuracy of ± 0.1 mV. Sedimentary organic carbon was determined by high temperature oxidation using a NA 1500 Carlo Erba elemental analyzer. Inorganic carbon was removed by putting the samples into an Ag cup and then fuming with concentrated HCl. After this, the samples were dried

overnight at ca. 60°C and then wrap the Ag cup into a tin cup for analysis.

2.3. Geochronology

^{210}Pb activities were determined in sediment core sections by Alpha spectrometry of its daughter ^{210}Po using ^{209}Po as a yield tracer (Flynn, 1968). The activities were quantified until 1σ error was achieved in a Canberra Quad Alpha Spectrometer. The ages (CE, common era) were established according the constant rate of supply model (CRS, Appleby and Oldfield, 1978), which considers the unsupported ^{210}Pb inventories ($^{210}\text{Pb}_{\text{xs}}$). Geochronology of the sediment core was established through the best fit of curves of the ages obtained from the CRS model and three ^{14}C control points from longer cores retrieved in 2006 at the same sampling site (Muñoz et al., 2012, core VG06-2). Radiocarbon ages were converted to calendar years before present using calibration curve MARINE09 (Reimer et al., 2009) and applying a $\text{DR}=137\pm 164$ years and 2σ confidence interval (Supplementary material, Table S1).

2.4. Trace metal analysis

Trace metals molybdenum (Mo), uranium (U), and cadmium (Cd) were analyzed in an Agilent 7500ce Inductively Coupled Plasma-MS. Aluminum was determined in a Perkin Elmer Analyst 700 Atomic Absorption Spectrometer. Sediment samples were prepared using sequential acid digestion (HNO_3 , HCl , HClO_4 , HF) until total dissolution. Analytical blanks were determined following the above procedure using 18.0 MΩ water and subtracted from sample measurements. Accuracy and precision of measurements were assessed by the analysis of the National Research Council of Canada reference material MESS-3. Excess metal (Me_{xs}) was calculated as $[\text{Me}_{\text{sample}}] - ((\text{Me}/\text{Al})_{\text{earth}} \times [\text{Al}_{\text{sample}}])$. $(\text{Me}/\text{Al})_{\text{earth}}$ corresponds to an average ratio values for

Biobío river (Fig. 1) in central-southern Chile (JM Muratli, pers. comm.).

2.5. Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) of biomarkers

The extraction of lipids (i.e., hopanes, hopanols, sterols, and mono-*O*-alkyl-glycerol ethers – MAGEs) from sediments was carried out according to Bligh and Dyer (1959), substituting chloroform with dichloromethane. Freeze-dried sediment samples (1-5 g) were sequentially extracted by ultra-sonication with 30 ml dichloromethane/methanol (1:3 v/v, 2X), (1:1 v/v, 1X), and dichloromethane (2X). The lipid extract was concentrated with a rotary evaporator and dried with anhydrous Na₂SO₄. Lipid extracts were then divided into four fractions by column chromatography using silica gel. Aliphatic hydrocarbons (F1) were eluted with 40 ml hexane, ketones (F2) were eluted with 50 ml toluene/hexane (1:3 v/v), alcohols (F3) eluted with 50 ml ethyl-acetate/hexane (1:9 v/v), and polar compounds (F4) eluted with 35 ml ethyl-acetate/methanol/hexane (4:4:1 v/v).

Samples were analyzed in an Agilent 6890 GC series coupled to an Agilent 5972 MS. The alcohol fraction (F3) was previously derivatized with 80 µL BSTFA (N,O-bis(trimethylsilyl) trifluoroacetamide) and 40 µL TMCS (trimethylchlorosilane) at 70°C for 1 h. Hopanols, sterols and MAGEs were analyzed with a 30 m DB-5 column (0.5 mm ID, 0.25 µm film thickness) using He as carrier gas. The GC oven temperature program was: 60°C (2 min) to 150°C at 15°C/min, to 320°C (held 34.5 min) at 4°C/min. Hopanes were analyzed in the aliphatic hydrocarbon fraction (F1) using a 30 m HP-5 column (0.32 mm ID, 0.25 µm film thickness). GC oven temperature program was: 80°C (2 min) to 130°C at 20°C/min, to 310°C at 4°C/min. The MS was operated in electron impact mode (70 eV) with the ion source at 250°C.

Mass spectra were acquired in both full scan mode (m/z range 40-600, scan rate 2.6/s) and selective ion-monitoring mode (SIM, m/z 191 for hopanes and hopanols). Concentrations of individual alcohols and aliphatic hydrocarbons were based on those of internal standards 1-nonadecanol and squalene, and were transformed to contents by normalization by organic carbon content.

2.6. Analysis of glycerol dialkyl glycerol tetraethers (GDGTs) by High Performance Liquid Chromatography - Atmospheric Pressure Chemical Ionization – Mass Spectrometry (HPLC-APCI-MS)

Sedimentary material was sequentially extracted by ultrasonication (3x) with methanol, dichloromethane-methanol (1:1, vol/vol), and dichloromethane. Lipid extracts were concentrated using a rotary evaporator and dried over a small Pasteur pipette filled with combusted glass wool and anhydrous Na_2SO_4 . Lipids were separated into non-polar and polar fractions using a Pasteur pipette filled with activated Al_2O_3 , after elution with hexane/dichloromethane (9:1, vol/vol) and dichloromethane/ methanol (1:1 vol/vol), respectively. An aliquot of the polar fraction was dissolved in hexane/propanol (99:1 vol/vol) and filtered through a 0.45 μm PFTE filter. HPLC-MS analysis followed Hopmans et al. (2000) and Liu et al. (2012) using an Agilent Technologies 1200 Series HPLC equipped with an auto-sampler and a binary pump, linked to a Q-TOF 6520 mass spectrometer via an atmospheric pressure chemical ionization interface (Agilent Technologies). Samples were dissolved in 200 μl hexane/isopropanol (99:1 vol/vol). GDGTs were separated using a Prevail Cyano column (2.1 x 150 mm, 3 mm; Grace, USA) maintained at 35 $^\circ\text{C}$ and a flow rate of 0.25 ml/ min. The elution program was: 5 min 100% eluent A (hexane/isopropanol, 99:1, vol/vol), followed by a linear gradient to 100% eluent B

(hexane/isopropanol, 90:10 vol/vol) in 35 min, and then held at 100% eluent B for 5 min. Quantification of core GDGTs was achieved by co-injection of samples with a C₄₆GDGT as internal standard (Huguet et al., 2006).

2.7. Statistical analysis

Homogeneity of variances was assessed using the Levene's test, whereas normality was determined using a Shapiro-Wilk test. Non-parametric Spearman correlations were calculated between selected variables in order to determine statistical associations with significance < 0.05 (Software Statistica, version 12).

3. Results

3.1. Oceanographic setting of the study site

During austral fall and winter (April to August), temperature ranged between 11 and 12 °C in the upper 20 m of the water column, and between 10 and 11° C below 65 m depth (Fig. 2A). Surface salinity varied between 32 and 33 above 20 m, and was 34 below this depth (Fig. 2B). Chlorophyll concentration varied between 0.3 and 1.4 mg m⁻³ with higher values in the top 20 m (Fig. 2C). Oxygen concentration varied between 170 and 205 µM in the top 20 m, and lower than 22 µM (suboxia) below 60 m depth (Fig. 2D).

During austral spring and summer (September to March) surface temperature ranged between 13 and 15 °C, decreasing to 10 °C below 84 m depth (Fig. 2A). Salinity varied between 31 and 34.5 in the whole water column (Fig. 2B). Chlorophyll *a* concentrations up to 53 mg m⁻³ were measured in surface waters (Fig. 2C). Oxygen concentration ranged between 114 and 217 µM in surface waters. Suboxic waters

(i.e., $<22 \mu\text{M}$) occur below ca. 20 m (Fig. 2D), which is significantly shallower than in austral fall-winter when dissolved O_2 values lower than $22 \mu\text{M}$ below ca. 60 m depth.

3.2. Sedimentary redox potential and organic carbon

Redox potential decreased from -176 mV at the water-sediment interface to -325 mV below 3 cm, indicating predominance of reducing conditions in near-surface sediments at the time of sampling during austral summer (Fig. 2E), consistent with the occurrence of $5 \mu\text{M} \text{O}_2$ in bottom waters of (Fig. 2D). A surface fluffy layer with a *Thioploca* mat was observed at the sediment-water interface. Organic carbon content varied between 2 to 4 wt.% (Fig. 2E).

3.3. Geochronology

$^{210}\text{Pb}_{\text{xs}}$ activity was detected down to 23 cm in the core where reached background values of $0.80 \pm 0.02 \text{ dpm g}^{-1}$. The geochronology was estimated using CE ages from $^{210}\text{Pb}_{\text{xs}}$ inventories (Supplementary material, Table S1) transformed to Cal BP years and calibrated ages from radiocarbon measurements values fitted a polynomial curve ($r^2 0.99$) allowing to adjust ages at the bottom of the core, that generates errors with the CRS model (Binford, 1990). A recent sedimentation rate of $0.24 \pm 0.02 \text{ cm yr}^{-1}$ was established and an exponential decreased is observed due to sediment compaction (Fig. 2F). Thus, the core represents ca. 110 years of sedimentation at Site 18.

3.4. Redox sensitive trace metals

Redox sensitive metals are most enriched in the interval ca. 1935–1970 CE (Figs.

3A, B, C; black bar). Excess molybdenum (Mo_{xs}) content ranged between 2.5 and 6.5 ppm (Fig. 3A), showing a similar vertical distribution as uranium (U_{xs}) that ranged between 1.1 to 4.1 ppm (Fig. 3B), and Cd_{xs} , which ranged between 1.9 and 0.8 ppm (Fig. 3C). Enrichments of Mo_{xs} , U_{xs} , and Cd_{xs} exhibited a significant correlation among each other (R_s : 0.6; $p < 0.05$) indicating lower O_2 depletion conditions in the bottom waters and sediments at this time. In comparison, the periods 1905–1919 CE and 1979–2005 CE showed lower contents of redox-sensitive metals (Figs. 3A-C; white bars), and presumably more oxygenated bottom waters and sediments.

3.5. Algal sterols

Sterols $\text{C}_{27}^{\Delta 5}$, $\text{C}_{28}^{\Delta 5}$, $\text{C}_{29}^{\Delta 5}$ and $\text{C}_{30}^{\Delta 22}$ were identified through the fragmentation pattern of their trimethylsilyl (TMS) derivatives. The presence of $\text{C}_{27}^{\Delta 5}$ -sterol (m/z 458 $[\text{M}]^+$) was confirmed due to the detection of fragments m/z 129, m/z 329 and 368. $\text{C}_{28}^{\Delta 5}$ -sterol (m/z 472 $[\text{M}]^+$) showed a base peak fragment at m/z 129, as well as m/z 343 and m/z 382. $\text{C}_{29}^{\Delta 5}$ -sterol (m/z 486 $[\text{M}]^+$) was identified by prominent m/z fragments at 357 and 396. Prominent fragments m/z 69, m/z 271, m/z 359 and m/z 500 $[\text{M}]^+$ confirmed the presence of $\text{C}_{30}^{\Delta 22}$ dinosterol. The sterol content ranged between 1029 and 12164 $\mu\text{g} (\text{g } \text{C}_{\text{org}})^{-1}$ with maximum values in surface sediments (Fig. 4A). Sterols correlated positively with U_{xs} (R_s : 0.4, $p < 0.05$).

3.6. Archaeal GDGTs

GDGTs were identified by their molecular ion and elution pattern: GDGT-0 (1302 $[\text{M}+\text{H}]^+$), GDGT-I (1300 $[\text{M}+\text{H}]^+$), GDGT-II (1298 $[\text{M}+\text{H}]^+$), GDGT-III (1296 $[\text{M}+\text{H}]^+$), and GDGT-V and GDGT-V' (1292 $[\text{M}+\text{H}]^+$ known as crenarchaeol and crenarchaeol regioisomer). The concentration of GDGTs varied between 1094 and

5423 $\mu\text{g (g C}_{\text{org}})^{-1}$ (Fig. 4B), with elevated values at the base core and between ca. 1947 and 1975 CE (Fig. 4B). A positive correlation was found between GDGTs concentration and U_{xs} content ($R_s: 0.6; p < 0.05$).

3.7. Geohopanoïd composition and abundance

C_{27} -trisorhopene (22,29,30 trisorhop-17,(21)- ene) was identified based on its molecular ion fragment m/z 368 $[\text{M}^+ - 2\text{H}^+]$ and fragments m/z 191 and 231 indicating unsaturation at the ring system (Table 1). Three diploptene isomers were identified according with their mass spectra, hop-13,18-ene, neohopene, and hop-22,29-ene (Fig. 5A, Table 1). The C_{30} hopene diploptene was identified based on its molecular ion (m/z 410 $[\text{M}^+]$) and diagnostic ions m/z 395, 299 and 191 (Fig. 5A, Table 1). A homologous series of C_{31} to C_{35} hopanes with the $\alpha\beta$ configuration were identified through m/z 191 in the hydrocarbon fraction (Fig. 5A). Homohopanes C_{31} , C_{33} , C_{34} , and C_{35} were present as epimers S and R (Fig. 5A, Table 1), whereas C_{32} hopane occurred as epimer R (Fig. 5A; Table 1). C_{27} norhopene, and hopanes C_{30} and C_{31} were the only compounds with $\beta\beta$ configuration (Fig. 5A, Table 1). C_{31} hopane showed the highest relative abundance in the homohopane homologous series, with S and R $17\alpha,21\beta$ homohopane as predominant compound, followed by C_{33} and C_{34} (Fig. 5A).

$17\beta,21\beta$ hopanol (C_{30}), $17\beta,21\beta$ homohopanol (C_{31}), $17\beta,21\beta$ bishomohopanol (C_{32}), and $17\beta,21\beta$ trishomohopanol (C_{33}) were identified detecting m/z 191 and their molecular ions ($[\text{M}]^+$ m/z 500, m/z 514, m/z 528, and m/z 542) (Fig. 5B, Table 1). The most abundant hopanol was homologue C_{32} (Fig. 5B).

C_{27} -trisorhopene ranged between 0.03 and 1.1 $\mu\text{g (g C}_{\text{org}})^{-1}$. Maximum values occurred between ca. 1935 and 1970 CE (Fig. 4C), whereas minimum values were observed during periods 1905–1928 CE and 1980–2005 CE (Fig. 4C). C_{27} -trisorhopene correlated positively with U_{xs} and Cd_{xs} (R_s : 0.5; $p < 0.05$). Content profile of C_{31} hopanol varied between 1.1 and 3.7 $\mu\text{g (g C}_{\text{org}})^{-1}$, and reached the highest value during period 1935–1970 CE (Fig. 4D). Positive correlations between C_{31} hopanol, Mo_{xs} , and Cd_{xs} were observed (R_s : 0.6 and 0.4 respectively; $p < 0.05$). In contrast, C_{32} hopanol anticorrelated with C_{31} hopanol and U_{xs} (R_s : -0.5, $p < 0.05$; Fig. 4E).

3.8. Mono-O-alkyl glycerol ethers (MAGEs) indicators of fermentative and sulfate reducing bacteria

Mass spectra of MAGEs showed a base peak fragment of m/z 205 characteristics of monoalkyl glycerol-TMS compounds, which corresponds to cleavage between carbons 1 and 2 of the glycerol moiety, and fragment m/z 445 $[\text{M}+\text{H}-\text{CH}_3]^+$ that corresponds to a loss of methyl group. We identified C_{16} -MAGE with molecular ion m/z 460 $[\text{M}]^+$, C_{17} -MAGE with m/z 474 $[\text{M}]^+$, and C_{18} -MAGE with m/z 488 $[\text{M}]^+$.

The content of MAGEs (sum of C_{16} , C_{17} , and C_{18} MAGEs) varied between 9 and 628 $\mu\text{g (g C}_{\text{org}})^{-1}$ (Fig. 4F). MAGEs content remained low during the period 1901–1928 CE with an average concentration of 50 $\mu\text{g (g C}_{\text{org}})^{-1}$ (Fig. 4F). From ca. 1935 CE, MAGEs concentrations increased reaching the highest content in surface sediments (Fig. 4F). MAGEs correlated positively with Mo_{xs} (R_s : 0.4, $p < 0.05$) and Cd_{xs} (R_s : 0.6, $p < 0.05$).

4. Discussion

4.1 Patterns of redox depositional conditions, primary and exported production

We interpret variations in contents of sedimentary redox sensitive metals as changes in oxygenation of bottom waters and surface sediments. This interpretation is coincident with previous observations by Muñoz et al. (2012) for the same sampling site, and authigenic enrichments of Mo over the Oregon shelf associated with O₂ depletion and increased primary productivity (Erhardt et al., 2014). U and Mo authigenic enrichment occur under O₂-depleted conditions (Eriksson and Helz, 2000; Siebert et al., 2003; Algeo and Tribovillard, 2009). Cd is an element that becomes enriched in sediments in the presence of pore water sulfide as export production increases (Tribovillard et al., 2004, 2006). We interpret Cd enrichment in sediments as indicative of higher export production from the water column.

Variations in the abundance of total algal sterols (sum of C₂₇^{Δ5}, C₂₈^{Δ5}, C₂₉^{Δ5} and C₃₀^{Δ22}) are considered to represent changes in primary and export production to the sediment. Changes in the abundance of isoprenoidal GDGTs are used as an indication of variations in ammonia oxidation by marine pelagic archaea (De Long et al., 1998; Schouten et al., 2000b; Turich et al., 2007; Lincoln et al., 2014). The preservation of C₂₇-trisorhopene is favored in anoxic and euxinic environments, and during upwelling events (Grantham et al., 1980; Schouten et al., 2001), and is considered an indicator of anaerobic microbial degradation (Volkman et al., 1983; Duan et al., 1996; Duan, 2000; Peters et al., 2005).

Fluctuations in bacterial hopanes and hopanols are related to variations in bacterial groups (Ourisson and Albrecht, 1992; Innes et al., 1998; Rohmer et al., 1984; Talbot et al., 2007). MAGEs C₁₆, C₁₇, and C₁₈ mono-*O*-alkyl glycerol ethers are present in fermentative and sulfate reducing bacteria (Langworthy et al., 1983; Langworthy and Pond, 1986; Ollivier et al., 1991), although this biological source does not appear to be unique (Hernández-Sanches et al., 2014). That said, the statistical relationship found between MAGEs ($R_s < 0.05$) and reducing conditions in the core collected from 18 St. is explained as changes in abundance and occurrence of bacteria involved in microaerophilic and anaerobic metabolism, in response to variations in water column oxygenation over the continental shelf off Concepción.

The downcore distribution of inorganic and organic proxies reveal a period of ca. 35 years between ca. 1935 and 1970 CE (Figs. 3 and 4; black bar) when redox sensitive metals (Fig. 3), sterols (Fig. 4A), GDGTs (Fig. 4B), C₂₇ trisnorhopene (Fig. 4C), C₃₁ hopanol (Fig. 4D), and MAGEs (Fig. 4F) were higher. Taken together, these patterns allow us to infer that water column O₂ was comparatively lower than during those periods immediately above and below, in association with enhanced primary production reflected in increase of sterols and GDGTs contents (Fig. 4A). Likewise, two periods with relatively more ventilated and oxygenated conditions are evident between ca. 1901 and 1919 CE, and between ca. 1979 and 2005 CE (Figs. 4 and 5). Both of these periods were characterized by low metal enrichments (Fig. 3), a lower content of bacterial biomarkers related to oxygen depleted conditions such as C₂₇ trisnorhopene, C₃₁ hopanol, and MAGEs (Figs. 4C, 4D, 4F), and lower organic matter fluxes evidenced by low contents of sedimentary sterols (Fig. 4A) and GDGTs (Fig. 4B).

We suggest that from ca. 1935–1970 CE there was higher export production, and that this export is responsible for the increase in phytoplankton sterols (Fig. 4A), concurrent with an increase in Cd (Fig. 3) and GDGTs (Fig. 4B). An enhanced sinking of organic matter leads to a subsequent increase in O₂ consumption by microbial degradation, potentially depleting O₂ in the water column (Helly and Levin, 2004; Canfield, 2006) and sediments. Such conditions lead to Mo, U and Cd enrichment sediments. Higher GDGTs content during this same time period (Fig. 4B) may reflect better preservation favored by severe O₂ depletion. The positive correlation between sterols, GDGTs, and U enrichments support this conclusion, since U enrichment occurs under low O₂ concentration and/or high organic matter deposition (Dezileau et al., 2002; Tribouvillard et al., 2006; Muñoz et al., 2012). Schouten et al. (2004) and Zonneveld et al. (2010) reported that GDGTs preservation is lower in oxygenated than in suboxic-anoxic settings.

4.2. Changes in microbial communities in response to redox variation

Hopanols C₃₁ and C₃₂ are used to analyze changes in the bacterial community structure because they are the diagenetic products of bacteriohopanetetrols (BHPs) (Rohmer et al., 1984; Innes et al., 1997, 1998; Talbot et al., 2003), which in turn can have different bacterial sources (Talbot et al., 2003). The hopanol content was dominated by C₃₂ hopanol whose predominance in recent sediments has been previously reported (Buchholz et al., 1993; Innes et al., 1997, 1998; Talbot et al., 2003).

An increase in C₃₁ hopanol content between ca. 1935 and 1970 CE (Fig. 4D) is indicative of low oxygen if analyzed in light of the positive correlation between Mo_{xs}

and Cd_{xs} (R_s : 0.6 and 0.4 respectively; $p < 0.05$). The content of C_{32} hopanol, a diagenetic product of BHTs (Innes et al., 1998; Talbot et al., 2003), mostly produced by heterotrophic aerobic bacteria (Rohmer et al., 1984), exhibited a slight decrease (Fig. 4E) concurrent with the enrichment of C_{31} hopanol (Fig. 4D) and redox sensitive metals (Fig. 3). Observed changes in abundance and distribution of C_{31} - and C_{32} hopanols in concomitance with past variations of oxygen in the water column at the study site are consistent with previous findings by Saenz et al. (2011) and Kharbush et al. (2013). These authors found that the abundance and structural diversity of BHPs, the biological sources of hopanoids, increase with decreasing oxygen in the water column of the Peruvian margin, Arabian Sea, Cariaco Basin, and in the Eastern Tropical North Pacific.

Trisnorhopanes are bacterial lipid markers associated with upwelling and anoxic depositional environments, although its biological source has not yet been identified (Schouten et al., 2001; Peters et al., 2005). The highest C_{27} trisnorhopene (Fig. 4C) contents occurred during the period of high primary production and O_2 depletion, suggesting a relationship between its abundance and upwelling-favorable conditions and anaerobic bacterial activity, as previously suggested (Grantham et al., 1980; Duan et al., 1996; Duan, 2000; Schouten et al., 2001).

The sedimentary content of MAGEs was also higher in the period 1935–1970 CE and in the topmost sediments (Fig. 4F). MAGEs have been detected in sediments from upwelling regions of Namibia, Peru, and central-southern Chile and are attributed to the occurrence of sedimentary sulfate reducing bacteria (Arning et al., 2008). The presence of sulfate reducing bacteria has been previously documented as

well for coastal waters of Chile (Canfield et al., 2010) and Peru (Finster and Kjeldsen, 2010).

4.3. Forcing of variations in the intensity of OMZ in central-southern Chile

The combined records of redox-sensitive metals and biomarkers suggest the occurrence of enhanced reducing conditions, both in the water column and at the sediment-water interface, from ca. 1935 until 1970 CE (Figs. 3 and 4), that roughly coincide with a cool (negative) phase of the Pacific Decadal Oscillation (PDO) (Fig. 4G). This suggests a link between changes in continental shelf oxygenation off Concepción and the PDO cycle, with alternating phases of decreased (1901–1930 and 1979–1997 CE) and enhanced upwelling (ca. 1935 to 1970 CE). The PDO is a recurring pattern of ocean-atmosphere variability in which the Pacific central gyre cools down while the eastern margin warms up, with phases that last between two and three decades (Mantua et al., 1997, 2002). The PDO plays a major role in decadal-scale oceanographic variability in the Pacific Ocean (Mantua et al., 1997, 2002; White and Cayan, 1998; Johnson and McPhaden, 1999). During cool or negative phase, the western Pacific becomes warmer while parts of the eastern Pacific become colder. The reverse pattern occurs during warm or positive phase.

Periods of favorable upwelling conditions off central Chile may have been triggered by an enhanced thermal contrast between the sea-surface and land during negative phases of the PDO (Bakun, 1990; Vargas et al., 2007). Negative correlations between PDO index values with algal sterols (Figs. 4A, 4G; R_s : -0.3; $p < 0.05$) and GDGTs (Figs. 4B, 5G; R_s : -0.2, $p < 0.05$) suggest an inverse relationship between the

PDO and primary and export production at the study site, at least during the last 110 years. Interdecadal variations of enhanced coastal-upwelling conditions, recorded in sediments obtained from Mejillones Bay (23°S) during the last century, have been previously reported by Vargas et al. (2007). These authors suggested that decreased anomalous sea surface temperatures during interdecadal ENSO-like conditions might have exacerbated the land-sea thermal contrast, which in turn intensified the wind stress responsible of upwelling events.

Negative correlations between sedimentary C₂₇-trisnorhopene, C₃₁ hopanol, MAGEs, and PDO values ($R_s = -0.3, -0.4, 0.3, -0.2$, respectively; $p < 0.05$) and a positive correlation between C₃₂ hopanol ($R_s = 0.3$) and PDO suggest that this wide-basin climatic anomaly has an impact on local oceanographic conditions off Concepción that in turn modulate the structure of the prokaryotic community. Bacterial C₃₁ hopanol and MAGEs derive from microorganisms associated with marked chemoclines and redox gradients (Rohmer et al. 1984; Innes et al., 1998; Sinninghe Damsté et al., 2004; Fisher et al., 2005; Blumenberg et al., 2006) showed an inverse correlation with PDO index (R_s : -0.4 with C₃₁ hopanol, -0.3 with MAGEs, $p < 0.05$). Thus, positive PDO phases (warm) were likely associated with a decrease in wind-driven upwelling, greater oxygenation, decreased primary productivity, and a concomitant decrease of microorganisms associated with low oxygen. Reverse conditions must have dominated during negative PDO phases, with more upwelling and primary production.

Previous studies in the Pacific Basin have evidenced connections between the PDO and variations in marine ecosystems, including perturbations in commercially

important fish populations, salmon catches and stocks, and recruitments of ground-fish stocks (Kawasaki, 1991; Adkinson et al., 1996; Yasuda et al., 1997; Hollowed et al., 1998; Peterman et al., 1998). Deutsch et al. (2011) reported that decadal climate oscillations could cause nutrient depletion for photosynthesis due to enhanced nitrogen removal in the marine water column during the positive phase of PDO (warmer surface water). Here, we show the effects of the PDO on the structure of the planktonic prokaryotic community based on bacterial and archaeal biomarkers. Significant negative correlations were detected between the PDO and C₃₁ hopanol ($R_s = -0.4$, $p < 0.05$), and GDGTs ($R_s = -0.2$, $p < 0.05$). Microaerophilic methanotrophic bacteria that flourish under high methane and low oxygen environments (Hanson and Hanson, 1996) could be a biological precursor of the observed C₃₁ hopanol in the sedimentary record (Rohmer et al., 1984; Talbot et al., 2001). Higher content of sedimentary C₃₁ hopanol during the cold (negative) phase of PDO from ca. 1930–1970 (Figs. 4D, 4G) could be the result low oxygen concentrations in the water column that could have favored the presence of methanotrophic bacteria along the oxycline, where comparatively high methane and low oxygen concentrations prevail (Scranton and Brewer, 1977; Fariás et al., 2009), and where micro-aerophilic methane oxidation occurs (Blumenberg et al. 2007; Fariás et al., 2009; Berndmeyer et al., 2013). At Station 18, Fariás et al. (2009) found that dark chemoautotrophy related to aerobic oxidation of methane occurs in the oxycline mainly during active upwelling. In addition, the relatively higher content of GDGTs during the negative phase of the PDO (Fig. 5B, 5G) could be indicative of enhanced outgassing of N₂O to the atmosphere, since marine ammonia oxidizing archaea have been suggested as responsible for a great proportion of oceanic N₂O production (Santoro et al., 2011).

5. Conclusions

Our main goal was to assess the use of redox sensitive metals and organic biomarkers in the sedimentary record on the shelf off Concepción, Chile (36°S) as proxies for changes in the intensity of the Oxygen Minimum Zone over the past century, and how these changes may have affected the microbial planktonic community. Our conclusions are summarized as follows:

- 1) Sedimentary sensitive redox metals and organic biomarkers indicate interdecadal variations in the intensity (oxygenation) of the Oxygen Minimum Zone during the last 110 years.
- 2) Inorganic and organic sedimentary proxies reveal that enhanced O₂-depleted conditions dominated from ca. 1935 to 1970 CE and were synchronously with more favorable upwelling conditions.
- 3) We suggest that variations in the Pacific Decadal Oscillation could be the physical mechanism controlling interdecadal variations of redox conditions in the coastal upwelling ecosystem off Concepción, influencing the composition of the microbial community, and that negative phases of the PDO correlate with decreased oxygenation on the inner continental shelf off Concepción

Author contributions

The study was initiated and designed by BS and SP. BS carried out field work and sample preparation. BS, JS, and JM performed chemical analysis, and PM and MS did geochronology. All data analysis, including statistical analysis, was done by BS advised by SP, CBL, JS and RES. All authors contributed to data interpretation and general discussion. BS wrote the manuscript with major inputs from SP, JS and CBL.

Acknowledgements

This research was funded by the Center for Oceanographic Research in the eastern South Pacific (COPAS, grant # PFB-31), the Gordon and Betty Moore Foundation (MI_LOCO Project, Oregon_Concepción, grant # 1661), the COPAS Sur-Austral Program (PFB-31), and the MIT International Science and Technology Initiatives (MIT-MISTI-Chile). Additionally, Fondecyt grant #1061214 funded radiocarbon analysis. BS acknowledges a student fellowship from the Ministry of Education's MECESUP grant UCO0602, the Department of Atmospheric, Earth and Planetary Sciences of MIT, the Fulbright Chilean Commission, and the MI_LOCO Project for supporting a research visit to MIT. SP acknowledges support from the Hanse Wissenschaftskolleg, Delmenhorst (Germany). We acknowledge the support provided by the COPAS Oceanographic Time Series St. 18 off Concepción. We are grateful to the crew of the L/C Kay-Kay II for help during sampling, the personnel of the Marine Organic Geochemistry Laboratory at UDEC and Geobiology Laboratory at MIT for analytical assistance. We thank Prof. Dr. Renato Quiñones for providing sedimentary redox data.

References

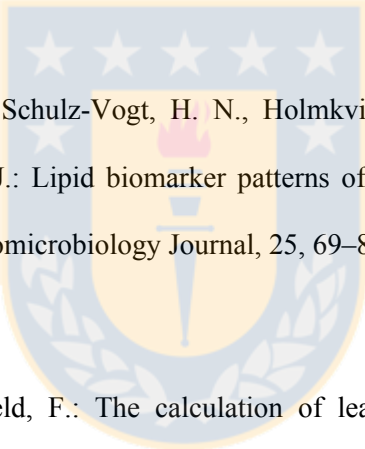
Adkison, M. D., Peterman, R. M., Lapointe, M. F., Gillis, D. M., and Korman, J.: Alternative models of climatic effects on sockeye salmon *Oncorhynchus nerka*) productivity in Bristol Bay, Alaska and Fraser River, British Columbia, *Fisheries Oceanography*, 5, 137–152, 1996.

Ahumada, R., and Chuecas, L.: Algunas características hidrográficas de la Bahía Concepción (36°40' S - 73°02'W) y áreas adyacentes, Chile, *Gayana Miscelánea*

(Chile) 8,1–56, 1979.

Algeo, T. J., and Maynard, J. B.: Trace-element behavior and redox facies in core shales of Upper Pennsylvanian Kansas-type cyclothems, *Chemical Geology*, 206, 289–318, 2004.

Algeo, T. J., and Tribovillard, N.: Environmental analysis of paleoceanographic systems based on molybdenum-uranium covariation, *Chemical Geology*, 268, 211–225, 2009.



Arning, E. T., Birgel, D., Schulz-Vogt, H. N., Holmkvist, L., Jorgensen, B. B., Larson, A., and Peckman, J.: Lipid biomarker patterns of phosphogenic sediments from upwelling regions, *Geomicrobiology Journal*, 25, 69–82, 2008.

Appleby, P. G. and Oldfield, F.: The calculation of lead-210 dates assuming a constant rate of supply of unsupported ^{210}Pb to the sediment, *Catena*, 5, 1–8, 1978.

Bakun, A.: Global climate change and intensification of coastal ocean upwelling, *Science*, 247, 198–201, 1990.

Berndmeyer, C., Thiel, V., Schmale, O., and Blumenberg, M.: Biomarkers for aerobic methanotrophy in the water column of the stratified Gotland Deep (Baltic Sea), *Organic Geochemistry*, 55, 103–111, 2013.

Binford, M.: Calculation and uncertainty analysis of ^{210}Pb dates for PIRLA project lake sediments cores, *Journal of Paleolimnology*, 3, 253–267, 1990.

Bligh, E. G., and Dyer, W. J.: A rapid method of total lipid extraction and purification, *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 37, 911–917, 1959.

Blanco, J. L., Carr, M. E., Thomas, A. C., and Strub, P. T.: Hydrographic conditions off northern Chile during the 1996-1998 La Niña and El Niño events, *Journal of Geophysical Research*, 107(C3), 3017, 2002.

Blumenberg, M., Krüger, M., Nauhaus, K., Talbot, H. M., Oppermann, B. I., Seifert, R., Pape, T., and Michaelis, W.: Biosynthesis of hopanoids by sulfate-reducing bacteria (genus *Desulfovibrio*), *Environmental Microbiology*, 8, 1220–1227, 2006.

Blumenberg, M., Seifert, R., and Michaelis, W.: Aerobic methanotrophy in the oxic–anoxic transition zone of the Black Sea water column, *Organic Geochemistry*, 38, 84–91, 2007.

Buchholz B., Laczko E., Pfennig N., Rohmer M., and Neunlist, S.: Hopanoids of a recent sediment from Lake Constance as eutrophication markers, *FEMS Microbiology and Ecology*, 102, 217–223, 1993.

Canfield, D. E.: Models of oxic respiration, denitrification and sulfate reduction in zones of coastal upwelling, *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 70, 5753–5765, 2006.

Canfield, D. E., Stewart, F. J., Thamdrup, B., De Brabandere, L., Dalsgaard, T., DeLong, E. F., Revsbech, N. P., and Ulloa, O.: A cryptic sulfur cycle in oxygen-minimum-zone waters off the Chilean coast, *Science*, 330 (6009), 1375–1378, 2010.

Carr, M. E., Strub, P. T., Thomas, A., and Blanco, J. L.: Evolution of 1996-1999 La Niña and El Niño conditions off the western coast of South America: a remote sensing perspective, *Journal of Geophysical Research*, 107(C12), 3236, 2002.

Cloern, J.M., Jassby, A.D., Thompson, J, K., and Hieb, K. A.: A cold phase of the East Pacific triggers new phytoplankton blooms in San Francisco Bay, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104, 18561–18565, 2007.

Coolen M. J. L., Talbot H. M., Abbas B. A., Ward C., Schouten S., Volkman J. K., and Sinninghe Damsté J. S.: Sources for sedimentary bacteriohopanepolyols as revealed by 16S rDNA stratigraphy, *Environmental Microbiology*, 10, 1783–1803, 2008.

DeLong, E. F., King, L. L., Massana, R., Cittone, H., Murray, A., Schleper, C., and Wakeham, S. G.: Dibiphytanyl ether lipids in nonthermophilic crenarchaeotes. *Applied and Environmental Microbiology* 64, 1133–1138, 1998.

Deutsch, C., Brix, H., Ito, T., Frenzel, H., and Thompson, L.: Climate-Forced Variability of Ocean Hypoxia, *Science*, 333, 336–339, 2011.

Dezileau, L., Bareilleb, G., and Reyss, J. L.: Enrichissement en uranium authigènedans les sédiments glaciaires de l'océan Austral. *Comptes Rendus Geoscience* 334, 1039–1046, 2002.

Duan, Y., Luo, B., Xu, Y., and Ma, L.: Composition and geochemical significance of biomarkers in marine sediments from Nansha Islands waters, the South China Sea, *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 27, 258–263, 1996.

Duan, Y.: Organic geochemistry of recent marine sediments from the Nansha Sea, China, *Organic Geochemistry*, 31, 159–167, 2000.

Erhardt, A. M., Reimers, C. E., Kadko, D., and Paytan, A.: Records of trace metals in sediments from the Oregon shelf and slope: Investigating the occurrence of hypoxia over the past several thousand years, *Chemical Geology*, 382, 32–43, 2014.

Erickson, B. E., and Helz, G. R.: Molybdenum (VI) speciation in sulfidic waters: stability and lability of thiomolybdates, *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 64, 1149–1158, 2000.

Escribano, R., Daneri, G., Farías, L., Gallardo, V. A., González, H. E., Gutiérrez, D., Lange, C. B., et al.: Biological and chemical consequences of the 1997-1998 El Niño in the Chilean coastal upwelling system: a synthesis, *Deep Sea Research II*, 51, 2389–2411, 2004.

Fariás, L., Fernández, C., Faúndez, J., Cornejo, M., Alcaman, M.E.: Chemolithoautotrophic production mediating the cycling of the greenhouse gases N₂O and CH₄ in an upwelling system, *Biogeosciences*, 6, 3053–3069, 2009.

Finstler, K. W., and Kjeldsen, K. U.: *Desulfovibrio oceani* subsp. *oceani* sp. nov., subsp. nov. and *Desulfovibrio oceani* subsp. *galateae* subsp. nov., novel sulfate-reducing bacteria isolated from the oxygen minimum zone off the coast of Peru, *Antonie van Leeuwenhoek* 97, 221–229, 2010.

Fischer, W. W., Summons, R. E., and Pearson, A. P.: Targeted genomic detection of biosynthetic pathways: anaerobic production of hopanoid biomarkers by a common sedimentary microbe, *Geobiology*, 3, 33–40, 2005.

Flynn, W. W.: The determination of low levels of polonium-210 in environmental materials, *Analytica Chimica Acta*, 43, 221–227, 1968.

Grantham P. J. and Douglas A. G.: The nature and origin of sesquiterpenoids in some Tertiary fossil resins. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 44, 1801–1810, 1980.

Gutiérrez, D., Gallardo, V. A., Mayor, S., Neira, C., Vásquez, C., Sellanes, J., Rivas, M., Soto, A., Carrasco, F., and Baltazar, M.: Effects of dissolved oxygen and fresh organic matter on the bioturbation potential of macrofauna in sublittoral sediments off central Chile, during the 1997-98 El Niño, *Marine Ecology Progress Series*, 202,

81–99, 2000.

Hanson, R.S., and Hanson, T. E.: Methanotrophic bacteria, *Microbiological Reviews* 60, 439–471, 1996.

Helly, J. J., and Levin, L. A.: Global distribution of naturally occurring marine hypoxia on continental margins, *Deep-Sea Research I*, 51, 1159–1168, 2004.

Hernandez-Sanchez, M. T., Homoky, W. B., and Pancost, R. D.: Occurrence of 1-*O*-monoalkyl glycerol ether lipids in ocean waters and sediments, *Organic Geochemistry*, 66, 1–13, 2014.

Hinrichs, K-U., Hmelo, L. R., and Sylva, S. P.: Molecular Fossil Record of Elevated Methane Levels in Late Pleistocene Coastal Waters, *Science*, 299, 1214–1217, 2003.

Hollowed, A. B., Hare, S. R., and Wooster, W.S.: Pacific-Basin climate variability and patterns of Northeast Pacific marine fish production. p. 89–104. In *Proceedings of the 10th ‘Aha Huliko’ a Hawaiian Winter Workshop on Biotic Impacts of Extratropical Climate Variability in the Pacific*, ed. by G. Holloway, P. Muller and D. Henderson. NOAA Award No. NA67RJ0154, SOEST Special Publication, 1998.

Huguet, C., E. Hopmans, C., Febo-Ayala, W., Thompson, D. H., Sinninghe Damsté, J. S., and Schouten, S.: An improved method to determine the absolute abundance of glycerol dibiphytanyl glycerol tetraether lipids, *Organic Geochemistry*, 37, 1036–1041, 2006.

Innes, H. E., Bishop, A. N., Head, I. M., and Farrimond, P.: Preservation and diagenesis of hopanoids in recent lacustrine sediments of Priest Pot, England, *Organic Geochemistry*, 26, 565–576, 1997.

Innes, H. E., Bishop, A. N., Fox, P. A., Head, I. M., and Farrimond, P.: Early diagenesis of bacterio-hopanoids in recent sediments of Lake Pollen, Norway, *Organic Geochemistry*, 29, 1285–1295, 1998.

Johnson, G. C., and McPhaden, M. L.: Interior pycnocline flow from the subtropical to the equatorial Pacific Ocean, *Journal of Physical Oceanography*, 29, 3073–3089, 1999.

Kharbush, J. J., Ugalde, J. A., Shane, L. H., Allen, E. E., and Aluwihare, L. I.: Composite Bacterial Hopanoids and Their Microbial Producers across Oxygen Gradients in the Water Column of the California Current, *Applied Environmental Microbiology*, 79, 7491–7501, 2013.

Kawasaki, T., Tanaka, S., Toba, Y., and Taniguchi, A.: Long-term variability of pelagic fish population and their environmental, Pergamon Press, Tokyo, Japan. 402 pp, 1991.

Langworthy, T. A., Holzer, G., Zeikus, J. G., and Tornabene, T. G.: Iso- and anteiso-

branched glycerol diethers of the thermophilic anaerobe *Thermodesulfotobacterium commune*, *Systematic and Applied Microbiology*, 4, 1–17, 1983.

Langworthy, T. A., and Pond, J. L.: Archaeobacterial ether lipids and chemotaxonomy, *Systematic and Applied Microbiology*, 7, 253-257, 1986.

Levin, L. A., Rathburn, A. E., Neira, C., Sellanes, J., Muñoz, P., Gallardo, V., and Salamanca, M.: Benthic processes on the Perú margin: A transect across the oxygen minimum zone during the 1997-1998 El Niño, *Progress in Oceanography*, 53, 1–27, 2002.

Levipan, H. A., Alarcón, W. O., and Saldías, G. S.: Fingerprinting analysis of the prokaryote community along a marine-freshwater transect in central-southern Chile, *Annals of Microbiology*, 62, 1121–1140, 2012.

Lincoln, S. A., Brenner, W., Eppley, J. M., Church, M. J., Summons, R. E., and DeLong, E. F.: Planktonic Euryarchaeota are significant source of archaeal tetraether lipids in the ocean, *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 111(27), 9858–9863, 2014.

Mantua, N. J., Hare, S. R., Zhang, Y., Wallace, J. M., and Francis, R. C.: A Pacific decadal climate oscillation with impacts on salmon, *Bulletin of the American Meteorological Society*, 78, 1069–1079, 1997.

Mantua, N. J., and Hare, S. R.: The Pacific Decadal Oscillation, *Journal of*

Oceanography, 58, 35–44, 2002.

McManus, J., Berelson, W. M., Klinkhammer, G. P., Hammond, D. E., Holm, C.: Authigenic uranium: relationship to oxygen penetration depth and organic carbon rain, *Geochimica et Cosmochimica Acta* 69, 95–108, 2005.

Molina, M., Belmar, L., and Ulloa, O.: High diversity of ammonia-oxidizing archaea in permanent and seasonal oxygen-deficient waters of the eastern South Pacific, *Environmental Microbiology*, 12(9), 2450–2465.

Muñoz, P., Dezileau, L., Cardenas, L., Sellanes, J., Lange, C.B., Inostroza, J., Muratli, JJ., and Salamanca, M.: Geochemistry of trace metals in shelf sediments affected by seasonal and permanent low oxygen conditions off central Chile, SE Pacific (~36°S). *Continental Shelf Research*, 33, 51–68, 2012.

Neira, C., Sellanes, J., Soto, A., Gutierrez, D., and Gallardo, V. A.: Meiofauna and sedimentary organic matter off Central Chile: response to changes caused by the 1997-1998 El Niño, *Oceanologica Acta*, 24, 313–328, 2001.

Ollivier, B., Hatchikian, C. E., Prensier, G., Guezennec, J., and Garcia, J. L.: *Desulfohalobium retbaense* gen. nov. sp. nov., a halophilic sulfatereducing bacterium from sediments of a hypersaline lake in Senegal, *International Journal of Systematic Bacteriology*, 41, 74–81, 1991.

Ourisson, G., and Albrecht, P.: Hopanoids. 1. Geohopanoids: the most abundant

natural products on Earth? *Accounts of Chemical Research*, 25, 398–402, 1992.

Paulmier, A., and Ruiz-Pino, D.: Oxygen minimum zones (OMZs) in the modern ocean, *Progress in Oceanography*, 80, 113–128, 2009.

Peterman, R. M., Pyper, B. J., Lapointe, M. F., Adkison, M. D., and Walters, C. J.: Patterns of covariation in survival rates of British Columbia and Alaskan sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*) stocks, *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 55, 2503–2517, 1998.

Peters, K.E., Walters, C. C., and Moldowan, J. M.: *The Biomarker Guide, Second Edition, Volume II, Biomarkers and Isotopes in Petroleum Systems and Earth History*, United Kingdom at the Cambridge University Press, 684 pp, 2005.

Reimer, P. J., Baillie, M. G. L., Bard, E., Bayliss, A., Beck, J. W., Blackwell, P. G., Bronk, Ramsey, C., Buck, C. E., Burr, G.S., Edwards, R. L., Friedrich, M., Grootes, P. M., Guilderson, T. P., Hajdas, I., Heaton, T. J., Hogg, A. G., Hughen, K. A., Kaiser, K. F., Kromer, B., McCormac, F. G., Manning, S.W., Reimer, R. W., Richards, D. A., Southon, J. R., Talamo, S., Turney, C. S. M., van der Plicht, J., and Weyhenmeyer, C. E.: IntCal09 and Marine09 radiocarbon age calibration curves, 0–50,000 years cal BP, *Radiocarbon*, 51(4), 1111–50, 2009.

Riquier, L., Tribovillard, N., Averbuch, O., Joachimski, M. M., Racki, G., Devleeschouwer, X., El Albani, A., and Riboulleau, A.: Productivity and bottom water

redox conditions at the Frasnian–Famennian boundary on both sides of the Eovariscan Belt: constraints from trace-element geochemistry. In: Over, D.J., Morrow, J.R., Wignall, P.B. (Eds.), *Understanding Late Devonian and Permian–Triassic Biotic and Climatic Events: Towards an Integrated Approach: Developments in Palaeontology and Stratigraphy*. Elsevier Pub. Co., pp. 199–224, 2005.

Rohmer, M., Bouvier-Nave, P., and Ourisson, G.: Distribution of hopanoid triterpenes in prokaryotes, *Journal of General Microbiology*, 130, 1137–1150, 1984.

Rush, D., Hopmans, E. C., Wakeham, S. G., Schouten, S., and Sinninghe Damsté, J. S.: Occurrence and distribution of laderane oxidation products in different oceanic regimes, *Biogeosciences*, 9, 2407–2418, 2012.

Saenz, J., Summons, R., Eglinton, T. I., and Wakeham, S. G.: Distribution of bacteriohopanepolyols in marine anoxic environments: new constraints on the provenance of hopanoids in the marine geologic record, *Organic Geochemistry*, 42, 1322–1351, 2011.

Santoro, A. E., Buchwald, C., McIlvin, M. R., and Casciotti, K. L.: Isotopic Signature of N₂O Produced by Marine Ammonia-Oxidizing Archaea, *Science*, 333, 1282–1285, 2011.

Sarmiento, J. L., Hughes, T. M. C., Stouffer, R. J. and Manabe, S.: Simulated response of the ocean carbon cycle to anthropogenic climate warming. *Nature* 393, 245–249, 1998.

Schouten, S., Hoefs, M. J. L., and Sinninghe Damsté, J. S.: A molecular and stable carbon isotopic study of lipid in late Quaternary sediments from the Arabian Sea, *Organic Geochemistry*, 31(6), 509-532, 2000a.

Schouten, S., Hopmans, E. C., Pancost, R. D., and Sinninghe Damsté, J. S.: Widespread occurrence of structurally diverse tetraether membrane lipids: evidence for the ubiquitous presence of low-temperature relatives of hyperthermophiles, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 97, 14421–14426, 2000b.

Schouten, S., de Loureiro, M. R. B., Sinninghe Damsté, J. S., and de Leeuw, J. W.: Molecular biogeochemistry of Monterrey sediments, Napoles Beach, California. I: distributions of hydrocarbons and organic sulfur compounds In: *The Monterrey Formation: From Rocks to molecules* (C.M. Isaacs and J. Rullkötter, eds.), Columbia University Press, New York, pp. 150–74, 2001.

Schouten, S., Hopmans, E. C., and Sinninghe Damsté, J. S.: The effect of maturity and depositional redox conditions on archaeal tetraether lipid palaeothermometry, *Organic Geochemistry*, 35, 567–571, 2004.

Scranton, M. I. and Brewer, P. G.: Occurrence of methane in the near-surface waters of the western subtropical North Atlantic, *Deep-Sea Research*, 24, 127–138, 1977.

Siebert, C., Nägler, T. F., von Blanckenburg, F., and Kramers, J. D.: Molybdenum isotope records as a potential new proxy for paleoceanography, *Earth and Planetary Science Letters* 211, 159–171, 2003.

Sinninghe Damsté, J. S., Rijpstra, W. I. C., Schouten, S., Fuerst, J. A., Jetten, M. S. M., and Strous, M.: The occurrence of hopanoids in planctomycetes: Implications for the sedimentary biomarker record, *Organic Geochemistry*, 35, 561–566, 2004.

Sobarzo, M., Shearman, K., and Lentz, S.: Near-inertial motions over the continental shelf off Concepcion, central Chile, *Progress in Oceanography*, 75, 348–362, 2007.

Strain, B., Sepúlveda, J., Pantoja, S., Summons, R. E., Quiñones, R. A., Levipan, H. A.: Archaeal and bacterial assemblages in the Oxygen Minimum Zone of the upwelling ecosystem off Central Chile as determined by organic biomarkers, *International Journal of Biodiversity, Oceanology and conservation*, in press, 2014,

Stevens, H., and Ulloa, O.: Bacterial diversity in the oxygen minimum zone of the eastern tropical South Pacific, *Environmental Microbiology*, 10(5), 1244–1259, 2008.

Talbot, H. M., Watson, D. F., Murrell, J. C., Carter, J. F., and Farrimond, P.: Analysis of intact bacteriohopanepolyols from methanotrophic bacteria by reversed-phase high-performance liquid chromatography-atmospheric pressure chemical

ionisation mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, 921, 175–185, 2001.

Talbot, H. M., Watson, D. F., Pearson, E. J., and Farrimond, P.: Diverse biohopanoid compositions of non-marine sediments, *Organic Geochemistry*, 34: 1353–1371, 2003.

Talbot, H. M., and Farrimond, P.: Bacterial populations recorded in diverse sedimentary biohopanoid distributions, *Organic Geochemistry*, 38, 1212–1225, 2007.

Talbot, H. M., Handley, L, Spencer-Jones, C. L., Dinga, B. J, Schefuß, E., Mann, P. J., Poulsen, J. R., Spencer, R. G. M., Wabakanghanzi, J. N., and Wagner, T.: Variability in aerobic methane oxidation over the past 1.2 Myrs recorded in microbial biomarker signatures from Congo fan sediments. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 133, 387–401, 2014.

Tribovillard, N., Riboulleau, A., Lyons, T., and Baudin, F.: Enhanced trapping of molybdenum by sulfurized organic matter of marine origin as recorded by various Mesozoic formations, *Chemical Geology*, 213, 385–401, 2004.

Tribovillard, N., Algeo, T. J., Lyons, T., and Riboulleau, A.: Trace metals as paleoredox and paleoproductivity proxies: an update, *Chemical Geology*, 232, 12–32, 2006.

Turich, C., Freeman, K. H., Bruns, M. A., Conte, M., Jones, A. D., and Wakeham, S. G.: Lipids of marine Archaea: Patterns and provenance in the water-column and sediments, *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 71, 3272–3291, 2007.

Ulloa, O., Canfield, D.E., DeLong, E.F., Letelier, R.M., and Stewart, F.J.: Microbial oceanography of anoxic oxygen minimum zones, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(40), 15996–16003, 2012.

Vargas, G., Pantoja, S., Rutillant, J., Lange, C. B., and Ortlieb, L.: Enhancement of coastal upwelling and interdecadal ENSO-like variability in the Peru-Chile Current since late 19th century, *Geophysical Research Letters*, 34, L13607, doi: 10.1029/2006GL028812, 2007.

Volkman, J. K., Alexander, R., Kagi, R. I., and Rullkötter, J.: GC-MS characterisation of C27 and C28 triterpanes in sediments and petroleum, *Geochimica et Cosmochimica Acta* 47, 1033–1040, 1983.

White, W. B., and Cayan, D. R.: Quasi-periodicity and global symmetries in interdecadal upper ocean temperature variability, *Journal of Geophysical Research*, 103, 21335–21354, 1998.

Wright, J. D., Kishori, M., Konwar, M., and Hallam, S. J.: Microbial ecology of expanding oxygen minimum zones, *Nature Reviews Microbiology*, 10, 381–394, 2012.

Wyrski, K.: The oxygen minima in relation to ocean circulation, *Deep-Sea Research*, 9, 11–23, 1962.

Yasuda, T., and Hanawa, K.: Decadal changes in the mode waters in the midlatitude North Pacific, *Journal of Physical Oceanography*, 27, 858–870, 1997.

Zonneveld, K. A. F., Versteegh, G. J. M., Kasten, S., Eglinton, T. I., Emeis, K. C., Huguet, C., Koch, B. P., de Lange, G. J., de Leeuw, J. W., Middelburg, J. J., Mollenhauer, G., Prahl, F., Rethemeyer, J., and Wakeham, S.: Selective preservation of organic matter in marine environments: processes and impact on the fossil record, *Biogeosciences*, 7, 483–511, 2010.

Table 1. Compounds identified in the m/z 191 mass chromatogram of aliphatic hydrocarbon and alcohol fractions from shelf sediments off Concepción (36°S)

Table 1: Compounds identified in the m/z 191 mass chromatogram of the aliphatic fraction hydrocarbon and alcohol fraction from the shelf sediments off Concepción (36°S)			
<i>Hopananes</i>			
Symbol	Component	Number of carbon atoms	Molecular weight
1	17 α -22,29,30-trinorhopane	27	370
2	22,29,30-trinor-hop-17(21)-ene	27	368
3	17 β -22,29,30-trinorhopane	27	370
4	17 α ,21 α -30-norhopane	29	398
5	17 β ,21 β -norhopene	27	368
6	17 β ,21 β -hopane	30	412
7	Neohop-13(18)-ene	30	410
8	17 α ,21 β -hopene	30	410
9	Hop-22(29)-ene	30	410
10	17 α ,21 β -homohopane (R)	31	426
11	Diploptene	30	410
12	17 α ,21 β -bishomohopane (R)	32	440
13	17 β ,21 β -homohopane	31	426
14 _{SR}	17 α ,21 β -trishomohopane (S-R)	33	454
15 _{SR}	17 α ,21 β -tetrahomohopane (S-R)	34	468
16 _{SR}	17 α ,21 β -pentakishomohopane (S-R)	35	482
<i>Hopanols</i>			
17	17 β ,21 β -hopanol	30	500
18	17 β ,21 β -homohopanol	31	514
19	17 β ,21 β -bishomohopanol	32	528
20	17 β ,21 β -trishomohopanol	33	542

Figures

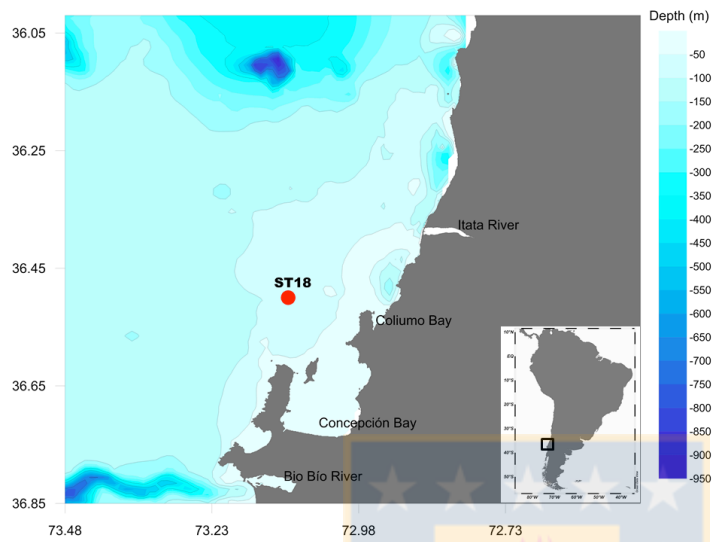


Figure1. Location of sampling site Station 18 in the upwelling ecosystem off Concepción, central-southern Chile. Bathymetry in shades of blue, scale on right-hand side.

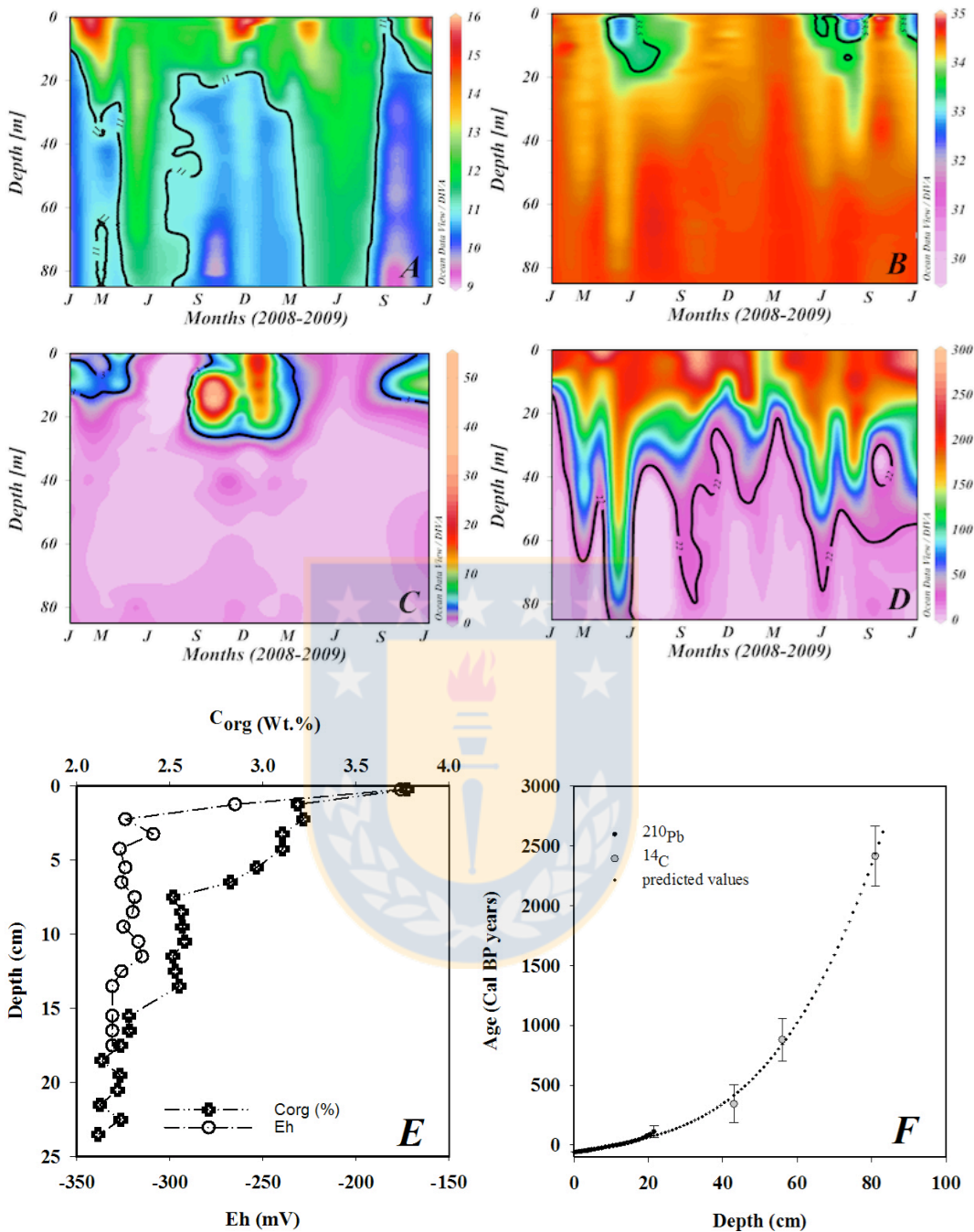


Figure 2. Oceanographic variability in the water column off Concepción (36°S) from January 2008 to January 2009: A) temperature (°C); B) salinity (psu); C) chlorophyll (mg m⁻³); D) dissolved O₂ (μM); and E) redox potential and organic carbon content in the sediment core recovered from Station18 in February 2009 (austral summer).

Data collected by the Center for Oceanographic Research in the eastern South Pacific at the Oceanographic Time Series Station 18 (www.copas.udec.cl/eng/research/serie/). Data for Fig. 2E was provided by Dr. R Quiñones. F) Geochronology estimated from $^{210}\text{Pb}_{\text{xs}}$ inventories (black line) and ^{14}C measurements \pm standard deviation. All ages are expressed as years before present (1950). Dotted line shows the predicted values from the curve ($r^2 = 0.99$).

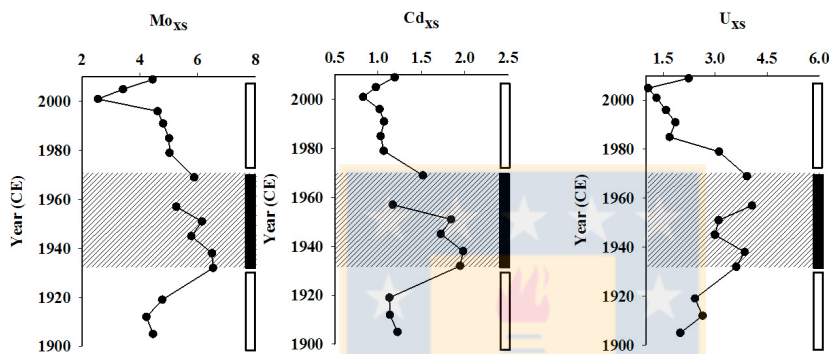


Figure 3. Downcore excess content of redox sensitive metals A) Mo, B) U, and C) Cd. Shaded area and black bars corresponds to a period of ca. 35 years of enhanced authigenic precipitation of redox sensitive metals compared to periods of higher oxygenation (white bars) and low authigenic precipitation. C.E. = Common Era.

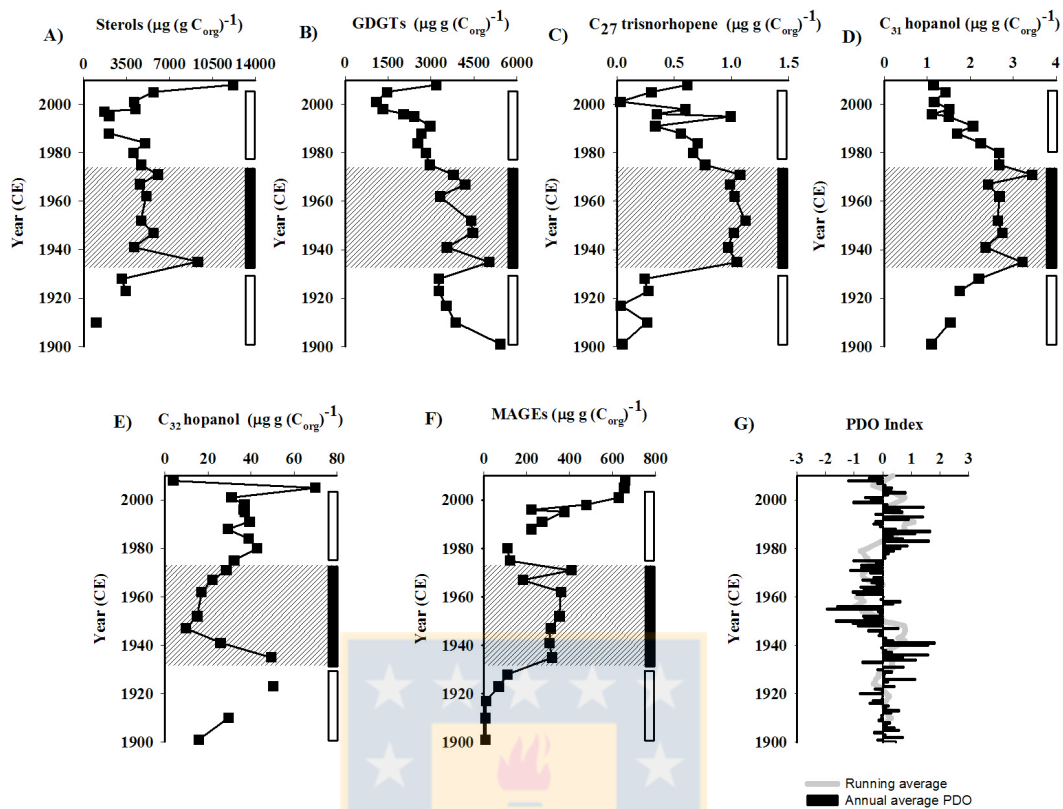


Figure 4. Downcore content of A) sterols, B) archaeal GDGTs, C) C_{27} -TNH, geo-hopanol, D) C_{31} hopanol, E) geo-hopanol C_{32} hopanol, F) MAGEs, and G) Pacific Decadal Oscillation index (<http://jisao.washington.edu/pdo/PDO.latest>). Units are micrograms per gram organic carbon. Shaded area and vertical bars, and chronology as in Fig. 3.

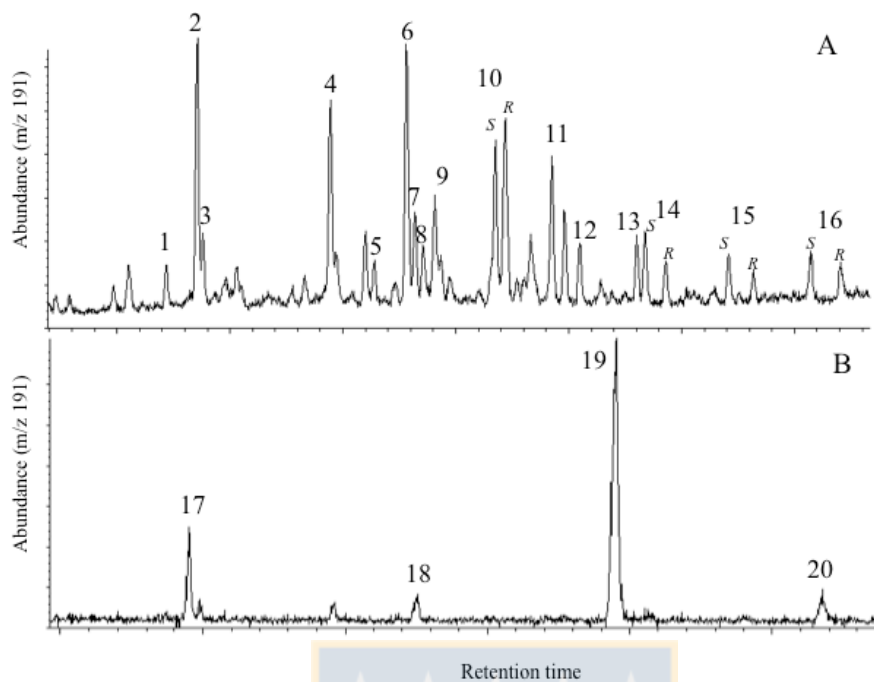


Figure 5. Representative GC-MS chromatograms of m/z 191 of A) aliphatic hydrocarbons, and B) TMS-derivatized alcohols from shelf sediments off Concepción (36°S). Numbers identify molecules as listed in Table 1, and S, R are epimers of the hopane series.

3.3 Distribución de ácidos grasos volátiles de cadena corta indicadores de actividad metabólica fermentativa en la columna de agua de la Zona de Mínimo Oxígeno del ecosistema de surgencia de Chile central

Distribution of short chain volatile fatty acids indicators of fermentative metabolic activity in the water column of the Oxygen Minimum Zone in the coastal upwelling ecosystem off central Chile

Resumen

En ambientes marinos subóxicos y anóxicos la degradación de la materia orgánica es realizada por consorcios microbianos mutualistas, en la cual las interacciones sintróficas entre diferentes tipos de microbios intervienen y donde la fermentación constituye un paso metabólico intermedio fundamental. Ambientes subóxicos y anóxicos se encuentran principalmente en sedimentos marinos, en agregados orgánicos-inorgánicos pelágicos, en aguas de cuencas anóxicas, y en las Zonas de Mínimo Oxígeno. En este trabajo estudiamos el potencial fermentativo de la comunidad microbiana pelágica de las aguas deficientes en O_2 sobre la plataforma continental frente a Concepción ($36^\circ S$), así como la potencial utilización de metabolitos semi-reducidos producidos por organismos fermentadores en la degradación terminal anaeróbica de materia orgánica. Para esto analizamos las concentraciones de ácidos grasos volátiles de bajo peso molecular tanto en incubaciones con ensamblajes microbianos de la Zona de Mínimo Oxígeno bajo condiciones de suboxia, así como su distribución ambiental vertical y temporal en la zona de surgencia costera de Chile central. Esta información fue complementada con cálculos de consistencia termodinámica para determinar si la fermentación es un metabolismo favorable para la obtención de energía bajo las condiciones ambientales del sitio de estudio. Acetato, isobutirato e isovalerato fueron detectados en la columna de agua con concentraciones que variaron entre $0,02$ y $2 \mu M$. El acetato fue el ácido carboxílico de cadena corta más abundante en la columna de agua mostrando una abundancia relativa del 77%. Un claro patrón vertical y temporal en la ocurrencia y abundancia de los ácidos carboxílicos volátiles fue observado. Las concentraciones de acetato e isobutirato fueron significativamente más altas durante primavera-verano, así como dentro de la capa de agua más agotada en O_2 (Rs: $p < 0,05$; Kruskal-Wallis, $p < 0,05$). La energía libre de formación

(ΔG_r) para la fermentación de glucosa (-283 kJ/mol glucosa), reducción no asimilativa de Fe(III)_s , acetotrófica (-98 kJ/mol acetato) y reducción no asimilativa de SO_4^- acetotrófica (-103 kJ/mol acetato), indicaron la viabilidad termodinámica de estos metabolismos bajo las condiciones ambientales del sitio de estudio. Las incubaciones para determinar fermentación anaerobia de glucosa a acetato y etanol y la fermentación anaerobia de aminoácidos a ácidos carboxílicos volátiles (C_2 , C_3 , C_4 , C_5) demostraron la versatilidad metabólica fermentativa de la comunidad microbiana del sitio de estudio. Bajo condiciones desnitrificantes, el ensamble microbiano del inóculo ambiental fermentó 23% de la glucosa entregada como fuente de carbono y energía indicando que la fermentación de materia orgánica puede ser llevada a cabo aún bajo las condiciones de oxido-reducción del sitio de estudio. La tasa constante de producción de acetato y etanol obtenida desde nuestros experimentos nos permitió estimar que la Zona de Mínimo de Oxígeno del Pacífico Sur Oriental puede producir diariamente 4000 ± 1000 toneladas de C como acetato y etanol. Se estimó un flujo de energía de 6 ± 2 terajoules d^{-1} de energía catabólicamente útil desde la fermentación de glucosa a acetato. Se observó experimentalmente una posible actividad sintrófica a partir de la fermentación de glucosa, donde posiblemente metanogénesis autotrófica y el consumo mixotrófico de etanol oxidado con CO_2 como aceptor de electrones fueron observadas. Las incubaciones de acetato con Fe(III)_s y SO_4^- como aceptores externos de electrones con agua subóxica del sitio de muestreo demostró que la oxidación total de carbono orgánico mediante la utilización de metabolitos fermentativos tales como la reducción no asimilativa de Fe(III)_s y SO_4^- , pueden ser llevados a cabo por la comunidad microplanctónica pelágica que habita la Zona de Mínimo Oxígeno de Chile Central, acoplado biológicamente los ciclos del C, Fe y S en bajas concentraciones de O_2 .

Palabras clave: Fermentación, ácidos carboxílicos volátiles, acetato, Zonas de Mínimo Oxígeno, ZMO, Concepción, Chile

Abstract

Decay of organic matter in suboxic/anoxic marine environments is carried out by mutualistic microbial consortia, in which syntrophic interactions between different types of microbes are involved where fermentation is a key intermediate metabolic step. Suboxic/anoxic environments occur mainly in marine sediments, inside pelagic organic-inorganic aggregates, anoxic basins, and in Oxygen Minimum Zones. High supply of labile organic matter coupled with conditions of severe O₂ depletion in the water column of the study site make this ecosystem an environment for the occurrence of terminal processes of organic matter degradation, where anaerobic fermentative metabolism can play a central role. In this work, we studied fermentative potential of the pelagic microbial community inhabiting low O₂ waters in the continental shelf off Concepción (36 °S) and the potential use of semi-reduced metabolites produced by fermenting organisms during anaerobic complete degradation of organic material. For this, we analyzed the vertical and temporal distribution of the concentrations of volatile fatty acids of low molecular weight in the water column as indicators of anaerobic fermentation activity of the Oxygen Minimum Zone of the coastal upwelling off Concepción and complement these with thermodynamic consistency measurements in order to determine whether fermentation is a favourable metabolism to gain metabolic energy under the environmental conditions of the study site. Acetate, isobutyrate and isovalerate were detected in the water column with concentrations ranging between 0.02 μM and 2 μM. Acetate was the most abundant short chain carboxylic acid in the water column showing a relative abundance of 77%. A clear vertical and temporal pattern in the occurrence and abundance of volatile carboxylic acids was observed. The concentrations of acetate and isobutyrate were significantly higher during the spring-summer season, as well as within the O₂-depleted water layer (Rs: p<0.05; Kruskal-Wallis, p<0.05). Significant correlations between physical and chemical oceanographic variables and concentrations of volatile carboxylic acids were also observed (Spearman, p < 0.05). The free energy of formation (ΔG_r) for glucose fermentation (-283 kJoules/mol substrate), acetotrophic desassimilative Fe(III)_s reduction (-98 kJoules/mol substrate) and acetotrophic desassimilative SO₄⁻ reduction (-103 kJoules/mol substrate) indicated thermodynamic feasibility of such metabolism under the environmental conditions of the study site. Incubations to determine anaerobic fermentation of glucose to ethanol and acetate and amino acid anaerobic fermentation to volatile carboxylic acids (C₂,

C3, C4, C5) demonstrated the fermentative metabolic versatility of microbial community of the study site. Under denitrifying conditions the microbial assemblage contained in the environmental inoculum fermented 23% of glucose delivered as a source of carbon and energy, indicating that the fermentation of organic matter can be performed under redox conditions of the study site. The constant rate of production of acetate and ethanol obtained from our experiments allowed us to estimate that Oxygen Minimum Zone Eastern South Pacific can produce daily 4000 ± 1000 tons of C as acetate and ethanol. We estimated an energy flow of $6 \pm 2 \text{ d}^{-1}$ terajoules of catabolically useful energy from glucose fermentation to acetate. We observed experimentally a possible syntrophic activity from glucose fermentation, where autotrophic methanogenesis and a mixotrophic oxidation of ethanol with CO_2 as electron acceptor were observed. Incubations of acetate with Fe(III)_s and SO_4^- as external electron acceptors during with suboxic water of study site showed that complete oxidation of organic carbon using fermentative metabolites, such as desassimilative reduction of Fe(III)_s and SO_4^- can be carried out by the pelagic-microbial community inhabiting the Oxygen Minimum Zone of Central Chile coupling biologically C, Fe and S cycles in low O_2 concentrations.

Keywords: Fermentation, volatile carboxylic acids, acetate, Oxygen Minimum Zones, OMZ, Concepción, Chile

3.1. Introducción

En ambientes agotados en O_2 , los organismos sintróficos participan en la completa degradación de la materia orgánica (Schink et al. 2002, 2006) en la cual un único sustrato es consumido por la acción concertada de dos o más organismos, los cuales son incapaces de consumir el sustrato individualmente (Schink et al. 2002). En ambientes marinos con bajo O_2 (subóxico/anóxico), el decaimiento de la materia orgánica es realizado por consorcios microbianos mutualistas en el cual las interacciones sintróficas entre diferentes tipos de bacterias intervienen en la degradación total de la materia orgánica a CO_2 , H_2O y nutrientes inorgánicos (Kristensen 2001). El primer paso bioquímico funcional de estas asociaciones consiste en el rompimiento de macro-moléculas orgánicas en moléculas más pequeñas mediante hidrólisis extracelular microbiana, las cuales son posteriormente fermentadas en principalmente ácidos grasos volátiles de bajo peso molecular, alcoholes volátiles, e H_2 (Finke et al. 2007, Valdemarsen & Kristensen 2010). En el siguiente paso, microbios respiradores anaerobios y arqueas metanogénicas oxidan estos metabolitos fermentados a CO_2 (Muyzer & Stams 2008). Es por ello que el metabolismo fermentativo juega un papel clave en esta asociación sintrófica anaerobia, suministrando metabolitos semi-reducidos que actúan como fuente final de C y energía en los procesos terminales de la degradación de la materia orgánica, tales como la reducción desasimilativa de $Mn(IV)_s$ y $Fe(III)_s$, reducción de SO_4^- y metanogénesis (Jørgensen 1982). Se ha detectado la utilización de ácidos carboxílicos cortos en el metabolismo heterotrófico facultativo por parte de bacterias “anammox” con la consecuente reducción de NO_3^- a $N_{2(g)}$ (desnitrificación) (Jetten et al. 2009; Kartal et al. 2012). Es por ello que la actividad de degradación anaeróbica terminal de la materia orgánica en el ambiente se encuentra balanceada con la actividad fermentativa por lo que las concentraciones ambientales de los metabolitos intermediarios fermentativos permanecen usualmente en bajas concentraciones en el rango nM a límite inferior μM (Christensen & Blackburn 1982, Hansen et al. 1993, Wu & Scranton 1994, Wellsbury & Parkes 1995, Canuel & Martens 1996).

La fermentación es un proceso anaeróbico de óxido-reducción en la cual la oxidación del sustrato está acoplada a la reducción de otro sustrato o un intermediario derivado de la oxidación, donde la diferencia en el potencial de óxido-reducción entre el sustrato y el producto final provee la energía necesaria para la producción de ATP. En la mayoría de los metabolismos fermentativos, el mismo sustrato es usado como agente reductor y oxidante, mientras que en algunos microorganismos fermentadores de

aminoácidos, un aminoácido es oxidado y otro es reducido mediante una reacción fermentativa que se denomina reacción de Stickland (Stickland 1934, Nisman 1954, Müller 2001). La reacción oxidativa está acoplada a la fosforilación a nivel de sustrato, mientras que la reacción de reducción usualmente no (Müller 2001). Los productos finales de la fermentación son excretados hacia el exterior de la célula (Gottschalk & Peinemann 1992). En la fermentación el sustrato orgánico es oxidado parcialmente, y por lo tanto sólo una pequeña cantidad de la energía almacenada en el sustrato es conservada (Müller et al. 2001).

La fermentación es una forma de metabolismo antigua que debió haber evolucionado junto con la aparición de material orgánico sobre el planeta bajo condiciones reducidas propicias para la formación de moléculas orgánicas en la hidrósfera y atmósfera (Morse & MacKenzie 1998, Wilde et al. 2001). Ambientes marinos reducidos y agotados en O₂ pueden ser encontrados en el océano moderno, en sedimentos marinos superficiales ricos en materia orgánica, en las Zonas de Mínimo Oxígeno del Pacífico Nororiental Tropical, el Mar de Arabia y el Pacífico Suroriental (Helly & Levin 2004), y en cuerpos de agua cerrados anóxicos (Cuenca de Cariaco, Mar Negro).

Las Zonas de Mínimo Oxígeno son capas de aguas sub-superficiales sub-óxicas de cientos de metros de profundidad ubicadas en el Pacífico Nororiental Tropical, el Mar de Arabia y el Pacífico Suroriental (Helly & Levin 2004), caracterizadas por alta producción fotosintética, la cual es remineralizada en la columna de agua, lo que a su vez es agudizado por una débil ventilación (Wyrtsky 1962, Helly & Levin 2004, Fuenzalida et al. 2009). Zonas de Mínimo Oxígeno estacionales son también conocidas como en aguas de la plataforma continental del ecosistema de surgencia frente a Chile central.

El área costera frente a Chile central (ca. 36°S, Fig. 1) es una zona de intensa surgencia estacional que resulta en una de las áreas más productivas del océano global (1-20 g C/m²d, Montero et al. 2007). La fertilización de las aguas superficiales ocurre estacionalmente, la cual es conducida por un régimen de circulación atmosférica anticiclónica que favorece los vientos del suroeste, produciendo el afloramiento del agua ecuatorial sub-superficial durante la primavera-verano austral (Sobarzo 2007). La respiración aeróbica microbiana desarrolla una Zona de Mínimo Oxígeno estacional sobre la plataforma continental frente a Chile central durante la primavera y el verano, extendiéndose desde la interfaz agua-sedimento hasta la zona fótica (Ahumada & Chuecas 1979, Sobarzo et al. 2007).

Bajo estas condiciones, una diversa comunidad microbiana dominada por el

metabolismo sub-óxico es detectado en sedimentos superficiales (Fossing et al. 1995, Thamdrup & Canfield 1996, Ferdelman et al. 1997, Farías 1998, Schulz et al. 1999, Farías et al. 2004, Divya et al. 2011). En la columna de agua suprayacente, los metabolismos terminales anaeróbicos estricto o facultativo tales como desnitrificación bacteriana, oxidación anaeróbica de NH_4^+ y reducción de SO_4^- ocurre en esta área (Castro-González et al. 2005, Canfield et al. 2010). La oxidación aeróbica de CH_4 es uno de los metabolismos microaerófilos reportados para este ecosistema (Farías et al. 2009).

Un alto suministro de materia orgánica lábil sumado a condiciones de agotamiento severo de O_2 en la columna de agua del sitio de estudio hacen que este ecosistema sea un ambiente propicio para la ocurrencia de micro-nichos anaerobios, donde el metabolismo fermentativo anaeróbico puede ocupar un rol central en la mineralización de la materia orgánica en sedimentación a través de la columna de agua.

En este trabajo estudiamos el potencial fermentativo de la comunidad microbiana pelágica de las aguas deficientes en O_2 del ecosistema de surgencia frente a Concepción en el Sistema de Corrientes de Humboldt, así como la potencial utilización de metabolitos semi-reducidos en la degradación terminal anaeróbica de material orgánico. Para esto analizamos la ocurrencia vertical y temporal de ácidos grasos volátiles de bajo peso molecular como indicadores de actividad fermentativa anaerobia en la columna de agua de la Zona de Mínimo Oxígeno del ecosistema de surgencia frente a Concepción y complementamos estas mediciones con el análisis molecular de productos orgánicos (alcoholes, ácidos grasos volátiles) durante incubaciones anaeróbicas. Los procesos metabólicos propuestos en este trabajo fueron analizados por consistencia termodinámica a través de la estimación de las energías libres de las reacciones.

3.2. Material y Métodos

3.2.1. Área de estudio

El área de estudio (Estación 18; $36^\circ 30,8'S$ $73^\circ 7'W$) está ubicada a ca. 18 millas náuticas desde la línea de costa de Concepción a una profundidad de ca. 90 metros (Fig.1). La Estación 18 es el sitio de la Serie de Tiempo Oceanográfica del Centro de Investigación Oceanográfica en el Pacífico Sur Oriental de la Universidad de Concepción (COPAS, www.copas.udec.cl/esp/investigación/serie/).

3.2.2. Muestreo

Los cruceros fueron realizados en el marco del proyecto de la Fundación Moore *Iniciativa Microbiana en Bajo Oxígeno fuera de Concepción y Oregon* (MILOCO, http://mi_loco.coas.oregonstate.edu), asociado a la Serie de Tiempo Oceanográfica del Centro COPAS. Las muestras de agua fueron recolectadas a bordo de la L/C Kay-Kay II entre Noviembre 2009 y Enero 2011. Los datos oceanográficos auxiliares de la columna de agua incluyendo temperatura, salinidad, O₂, clorofila, NH₄⁺, NO₂⁻ y NO₃⁻ fueron obtenidos desde la base de datos del Centro COPAS.

3.2.3. Muestras de agua

Para analizar compuestos volátiles de bajo peso molecular se recolectaron muestras de agua desde noviembre 2009 hasta febrero 2011 desde las profundidades 0, 10, 30, 50, 65, y 80 metros con botellas Niskin de 10 litros. Submuestras de 50 mL de agua (en triplicado) fueron removidas en botellas de vidrio para gases bajo una atmósfera de N₂, y envenenadas inmediatamente con cloruro de mercurio para detener la actividad microbiana. Las botellas fueron selladas con tapones de goma de butilo y guardadas en oscuridad a 4°C hasta su posterior almacenamiento en el Laboratorio de Geoquímica Orgánica.

3.2.4. Obtención de inóculos y medios de cultivo

Los inóculos fueron obtenidos desde una submuestra de la botella Niskin desde la profundidad correspondiente al núcleo de la Zona de Mínimo Oxígeno con una jeringa de 10 mL que permitió introducir el inóculo en tubos contenedores al vacío de 10 mL BD[®]. Estos tubos fueron mantenidos a 4°C y bajo oscuridad hasta su llegada al laboratorio.

Para realizar los experimentos de incubación se preparó agua de mar artificial en frascos de vidrio de 1 L previamente auto-clavados por 1 h, la cual contenía por litro de agua Milli-Q: 20 g NaCl; 0,67 g KCl; 2,5 g NaHCO₃; 10 mL solución de vitamina; 10 mL solución mineral; 20 mL solución mineral RST; 50 mL solución salina. La solución de vitaminas contenía por litro: 2 mg biotín, 2 mg ácido fólico, 10 mg piridoxina-HCl, 5,0 mg

riboflavina, 5 mg tiamina, 5 mg ácido nicotínico; 5 mg ácido pantoteico, 0,1 mg vitamina B12, 5 mg ácido p-aminobenzoico, 5 mg ácido tióctico. La solución mineral contenía por litro: 1,5 g ácido nitriloacético trisodio, 3 g de $MgSO_4$, 0,5 g $MnSO_4 \cdot H_2O$, 1 g de $NaCl$, 0,1 g $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,1 g $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 0,1 g $CoCl_2 \cdot 6H_2O$, 0,13 g $ZnCl_2$, 0,01 g $AlK(SO_4)_2 \cdot 12H_2O$, 0,01 g H_3BO_3 , 0,025 g Na_2MoO_4 , 0,025 g $NiCl_2 \cdot 6H_2O$, 0,025 g $Na_2WO_4 \cdot 2H_2O$. Solución mineral RST (por litro): 5 g NH_4Cl , 0,5 g KCl , 0,5 g KH_2PO_4 , 1 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, $CaCl_2 \cdot H_2O$. Solución salina (por 100 mL): 21,2 g $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, 3,04 g $CaCl_2 \cdot 2H_2O$. El medio fue auto-clavado por 1 h y burbujado por 15 m con N_2 para desplazar cualquier traza de O_2 , posteriormente se agregó 0,001 g de resazurina (como indicador redox). Luego, asépticamente y bajo atmósfera de N_2 se agregó la solución salina al medio. Las incubaciones fueron mantenidas a $10^\circ C$ durante el tiempo experimental.

3.2.5. Análisis de ácidos grasos volátiles de cadenas cortas y otros compuestos orgánicos volátiles en muestras de columna de agua

3.2.5.1. Micro-extracción en fase sólida

Todas las muestras de agua para este análisis fueron procesadas como se describió anteriormente en la sección 3.2.1. En el laboratorio se extrajeron 25 mL de agua de cada muestra y sus respectivas réplicas para generar un espacio de cabeza suficiente para efectuar el análisis de micro-extracción de fase sólida acoplado a análisis de cromatografía de gas - espectrometría de masa.

Las muestras fueron depositadas en una placa y llevadas a $30^\circ C$ bajo agitación constante por aproximadamente 10 minutos hasta alcanzar el equilibrio entre la fase acuosa y la gaseosa. Para efectuar la micro-extracción en fase sólida se utilizó una fibra de $85 \mu m$ CarboxenTM/PDMS Stable Flex (SUPELCO) para absorber compuestos polares y apolares. La fibra fue insertada en la septa de inserción de la botella de gas y expuesta a la fase gaseosa (espacio de cabeza) por 15 minutos para llevar a cabo la adsorción de los compuestos volátiles de cadena corta presentes en las muestras de agua en la fibra. La fibra fue colocada en el puerto de inyección del cromatógrafo de gas y expuesta por 10 minutos a $250^\circ C$ para la desorción de los metabolitos volátiles ambientales colectados.

3.2.5.2. Cromatografía de Gas acoplada a Espectrometría de Masa

El análisis fue realizada utilizando un cromatógrafo de gas de la serie Agilent 6890N acoplado a un espectrómetro de masa Agilent 5973 Network. El espectrómetro de masa fue operado en el modo de impacto de electrones (70 eV) con la fuente de iones a 250 °C. Los espectros de masa fueron adquiridos en el modo de escaneo completo (rango m/z 40-600, tasa de escaneo de 2,6s⁻¹) y de monitoreo de iones selectivo, dada las bajas concentraciones (nM) de los metabolitos carboxílicos en la columna de agua. Los iones m/z seleccionados por compuesto fueron: acetato (C2; m/z 43-45-60); isobutirato (C4; m/z 43-73-88); butirato (C4; 41-60-73); isovalerato (C5; m/z 43-60-87); valerato (C5; m/z 41-60-73).

El análisis de los compuestos volátiles cortos fue llevado a cabo con una columna HP-5MS de 30 m de longitud (0,25 mm de diámetro; 0,25µm de grosor de la película), utilizando He como gas transportador. El programa de la temperatura del horno del cromatógrafo fue: 35°C (5 min); 35-230°C a 15°C/min; 230°C (3 min).

Las concentraciones de cada compuesto fueron determinadas utilizando una curva de calibración externa con una mezcla de ácidos volátiles (SUPELCO 46975-U) en agua Milli-Q.

3.2.6. Estudio del potencial fermentativo mediante incubaciones anaeróbicas inoculadas con la microbiota proveniente de la Zona de Mínimo Oxígeno

Las incubaciones se hicieron en duplicado y bajo condiciones de asepsia en una campana de flujo laminar LABCONCO Clase II Tipo AII, utilizando botellas de vidrio de 50 mL las que fueron previamente auto-clavadas, esterilizadas y mantenidas a 10°C. Aproximadamente 30 mL de agua de mar artificial esterilizada fueron agregados a cada botella (x3) a las que se agregó glucosa, esterilizada mediante filtración por 0,22 µm, a una concentración final de 40 mM como única fuente de carbono. Ningún aceptor de electrones externo fue agregado en este tratamiento. El medio de cultivo fue burbujado por 5 min con N₂ para remover el posible O₂ presente. Una vez ajustadas las condiciones del tratamiento se procedió a inocular los medios agregando un 10% v/v de agua proveniente del núcleo de la Zona de Mínimo Oxígeno. La botellas fueron tapadas con tapas de butilo pre-esterilizadas y selladas con sellos de aluminio.

Para determinar la tasa de fermentación de glucosa se inhibió la potencial actividad reductora de SO₄⁻ y metanogénica en el medio de cultivo mediante la adición de 20 mM de molibdato, 100 µM de CHCl₃ (cloroformo) y 200 µM de N1-guanyl-1,7- diaminoheptano

(GC7) para evitar el consumo de los productos fermentativos por parte de la comunidad microplanctónica presente en el inóculo. El segundo tratamiento experimental para estudiar actividad sintrófica *in vitro* fue llevado a cabo sin inhibidores.

Para evaluar la eficiencia de la fermentación de glucosa bajo condiciones desnitrificantes se realizó un experimento de incubación con glucosa como fuente de C (20mM) y NaNO_3^- (50 mM) como aceptor de electrones. Esta incubación se realizó en duplicado y bajo las mismas condiciones descritas para los experimentos de fermentación de glucosa.

Para el estudio de la degradación fermentativa de aminoácidos se realizaron incubaciones (x3) en oscuridad con agua de mar artificial esterilizada y inoculada con agua proveniente del núcleo de la Zona de Mínimo Oxígeno (10% v/v), sin O_2 y libre de aceptores de electrones externos. Se agregaron alanina, treonina, fenilalanina, leucina, ornitina y glutamato (10 mM de cada amino ácido) como únicas fuentes de carbono.

3.2.7. Estudio de la utilización de acetato en procesos de degradación terminal de moléculas orgánicas

Se realizaron incubaciones bajo condiciones anaeróbicas utilizando, Fe(III)_s y SO_4^- como aceptores de electrones externos. Al agua de mar artificial utilizada en los experimentos de reducción de SO_4^- se le agregó 5% v/v de solución reductora ($\text{Na}_2\text{Sx}5\text{H}_2\text{O}$ y cisteína). Cada tratamiento se realizó en triplicado. Treinta mL de agua de mar artificial fueron transferidos a botellas de vidrio de 50 mL, a los que se agregó acetato de sodio (NaCH_3COO) a concentración de 40 mM como única fuente de carbono y energía.

El primer tratamiento consistió en agregar Fe(III)_s como aceptor de electrones externo. El Fe(III)_s fue preparado al disolver $\text{FeCl}_3\text{x}6\text{H}_2\text{O}$ en agua destilada previamente esterilizada, llevada a una concentración final de 0,4 M que fue llevada cuidadosamente a pH 7 con NaOH 10M bajo agitación constante. Para remover el cloruro disuelto se centrifugó la solución a 4000 rpm durante 15 minutos para luego eliminar el sobrenadante. Este paso se repitió 5 veces. El Fe(III)_s se agregó a las botellas de incubación a una concentración de 250 mM para mantener la incubación bajo condiciones reductoras de Fe(III)_s . Para el tercer tratamiento, se utilizó agua de mar artificial esterilizada con 0,2 g/L de cisteína y 0,5 mg/L de $\text{Na}_2\text{Sx}9\text{H}_2\text{O}$, para producir condiciones altamente reducidas en la solución, y sulfato de sodio (NaSO_4 , 50 mM) como única fuente de aceptor de electrones externos.

Las mediciones de las concentraciones de $\text{Fe(II)}_{\text{aq}}$ se realizaron llevando a cabo el método 1,10 Fenantrona, utilizando un kit de medición HACH Company/Hach Lange GMBH y un espectrofotómetro HACH DR-4000, siguiendo las indicaciones del fabricante.

3.2.8. Producción de metano (CH_4) y dióxido de carbono (CO_2)

La producción de CH_4 y CO_2 durante las incubaciones se verificó utilizando un cromatógrafo de gas de la serie Agilent 6890N acoplado a un espectrómetro de masa Agilent 5973 Network. El espectrómetro de masa fue operado en el modo de impacto de electrones (70 eV) con la fuente de iones a 250 °C. Los espectros de masa fueron adquiridos en el modo de escaneo completo (rango m/z 40-600, tasa de escaneo de $2,6\text{s}^{-1}$). Se utilizó una columna HP-5MS de 30 m de longitud (0,25 mm de diámetro y 0,25 μm de grosor de la película) utilizando He como gas transportador. La temperatura del horno del cromatógrafo fue de 37°C (4 min). Estos gases fueron muestreados desde el espacio de cabeza de cada incubación mediante la extracción de 500 μL de gas con una jeringa de gas Hamilton Gastight® 1750. Las concentraciones de cada compuesto fueron determinadas utilizando una curva de calibración externa construida con un estándar de $(\text{CH}_4)_\text{g}$. La identificación de los compuestos se llevó a cabo mediante la interpretación de sus respectivos espectros de masa y por la comparación con espectros de masa contenidos en la biblioteca NIST del equipo y en la literatura.

3.2.9. Determinación de aminoácidos libres en muestras de la columna de agua y de cultivo

Los aminoácidos libres fueron derivatizadas con *o*-phthaldialdehído (OPA) y acetato de sodio para formar un compuesto fluorescente, lo cual permite la detección de cada aminoácido. A 1 mL de muestra se agregaron 60 μL de *o*-ftaldialdehído bajo agitación continua por 1 minuto. Posteriormente se adicionó 100 μL de acetato de sodio.

El análisis de los aminoácidos libres se realizó con un cromatógrafo líquido de alta presión Shimadzu LC-10AT acoplado a un detector de fluorescencia Shimadzu RF-10Ax1. Los aminoácidos fueron separados con una columna Alltima C18 5u (250mm x4,6 mm). El programa de elución con flujo de 1 mL/min fue: 0,015 min 75% eluyente A (acetato de sodio pH 5,7) y 75% eluyente B (metanol 100%) durante 35 min, 35 min 70 % eluyente A y 30% eluyente B por 8 min, 42 min 50 % eluyente A y 50% eluyente B por 18 min, 60 min 40% eluyente A y 60 % eluyente B por 12 min seguido por un gradiente lineal del

100% del eluyente B por 8 min, 84 min 75% eluyente A y 25% eluyente B por 3 min. La cuantificación de aminoácidos fue realizada mediante la co-inyección de las muestras con el estándar de aminoácidos Pierce N° 20088.

3.2.10 Cálculos termodinámicos

Los cálculos termodinámicos de las reacciones metabólicas propuestas en el presente trabajo se realizaron mediante el programa Thermodyn[®] (Daamgard & Hanselmann 1991), usando constantes físico-químicas de las especies químicas implicadas en los metabolismos estudiados.

3.2.10 Tasas aparentes de producción y degradación de acetato

La tasa constante aparente de primer orden de producción de acetato desde la fermentación anaeróbica de glucosa (k en t^{-1}) fue calculada a partir de los datos obtenidos en los experimentos de incubación. Los valores de k fueron obtenidos mediante el ajuste matemático de la ecuación $P = -C_0 e^{-kt} + C_0$, donde C_0 es la concentración de sustrato al $t(0)$ y P es la concentración de producto en el tiempo.

La tasa constante aparente de degradación (k t^{-1}) de acetato con $Fe(III)_s$ y SO_4^- fue obtenida mediante la pendiente de la recta del gráfico \ln [sustrato] vs. tiempo.

3.2.11 Análisis estadísticos

Los datos obtenidos en el presente estudio fueron tratados estadísticamente utilizando el software estadístico Statistica 6.0. La homogeneidad de las variancias se determinó utilizando la prueba de Levene y la normalidad de las variables fue estimada usando la prueba de Shapiro-Wilk. Para determinar diferencias estadísticamente significativas de los datos ambientales se realizó la prueba de ANOVA no paramétrica de Kruskal-Wallis. Para determinar la ocurrencia de asociaciones estadísticas entre las variables de estudio se realizaron pruebas de correlaciones no-paramétricas de Spearman.

3.3.3 Resultados

3.3.1 Condiciones oceanográficas

Durante la estación de otoño-invierno (Mayo-Agosto 2010) la temperatura de la capa superficial de la columna de agua varió entre 11 y 13°C, y entre 10 y 12°C bajo los 65 m (Fig. 2A). La salinidad superficial mostró valores entre las 33 y los 34 psu (Fig. 2B). Los valores de fluorescencia variaron entre 0,5 y 1,2 V en la capa superficial, en la cual se observaron los valores más altos (Fig. 2C). En los primeros 30 m, la concentración de O₂ promedio fue de 246 μM, mientras que bajo los 65 m el promedio fue de 85 μM (Fig. 2D). Las concentraciones superficiales de NH₄⁺ variaron entre 0,03 y 0,79 μM y entre 0,02 y 0,63 μM bajo los 65 m (Fig. 2E). La concentración máxima de PO₄⁻ en la capa superficial durante otoño-invierno fue de 3,1 μM y la mínima de 1,3 μM. Bajo los 65 m, las concentraciones de PO₄⁻ varió entre 2 y 4 μM (Fig. 2F). Las concentraciones de aminoácidos libres en la columna de agua promediaron 0,08 μM variando entre 0,001 y 0,2 μM durante el periodo de estudio (Fig. 2G).

En las estaciones de primavera-verano del periodo de estudio la temperatura superficial alcanzó valores máximos de 15°C, mientras que en la capa más profunda la temperatura no superó los 11°C (Fig. 2A). La salinidad fue de 35 psu en promedio en la columna de agua durante el periodo estival (Fig. 2B). La concentración de clorofila fue notablemente más alta en este periodo con valores máximos de fluorescencia de ca. 8,5 V principalmente en los primeros 25 m de la columna de agua (Fig. 2C). Sobre los 20 m de profundidad la columna de agua mostró una concentración promedio de O₂ de 190 μM y bajo los 30 m se observó una abrupta disminución en las concentraciones de O₂ alcanzando los 3 μM (Fig. 2D). Las máximas concentraciones de NH₄⁺ se encontraron bajo los 70 m alcanzando un máximo de 4 μM, aunque un máximo secundario de 3 μM fue observado sobre los 20 m durante Diciembre de 2010 y Enero de 2011 (Fig. 2E). Por su parte, un claro aumento en las concentraciones de PO₄⁻ bajo los 20 m fue observado durante esta estación, alcanzando valores por sobre los 3,5 μM (Fig. 2 F). Las mayores concentraciones de aminoácidos libres fueron detectadas durante el verano de 2011 donde los valores variaron entre 0,1 y 2,1 μM (Fig. 2G).

3.3.2 Composición, abundancia, distribución vertical y temporal de ácidos carboxílicos volátiles

Se detectaron tres ácidos carboxílicos volátiles (acetato, isobuirato, isovalerato) y

su distribución y abundancia en la columna de agua del sitio de estudio mostraron un claro patrón vertical y temporal. Acetato fue el ácido carboxílico volátil dominante durante todo el periodo de estudio, dando cuenta del 78% del total (Fig. 3A). Isobutirato alcanzó una abundancia relativa de 39% (Fig. 3A). La cuantificación de la detección episódica de isoalerato dio cuenta del 0,3 %, constituyéndose como un ácido carboxílico traza en el sitio de estudio.

Durante el periodo otoño-invierno las concentraciones de ácidos carboxílicos volátiles no superaron 1 μM en la columna de agua (Fig. 4A). Durante el periodo primavera verano, los valores promedio sobre los 60 m fueron de 2,2 μM . Bajo los 60 m, los valores variaron entre los 0,7 y 4,1 μM y alcanzó su mayor concentración durante Febrero-Marzo 2010 y Enero 2011 (Fig. 4A). Las concentraciones de acetato variaron entre 0,1 y 2,5 μM incrementándose bajo los 50 m hasta los 80 m principalmente durante los meses de primavera-verano (Fig. 4B). El isobutirato presentó una distribución vertical y temporal diferente a la del acetato. La ocurrencia de isobutirato se vio restringida principalmente a los meses de Noviembre de 2009 a Mayo de 2010 y sus concentración promedio fue de 0,2 μM (Fig. 4C).

Correlaciones estadísticamente significativas entre la distribución y abundancia de ácidos carboxílicos volátiles y parámetros físico-químicos del sitio de estudio fueron encontradas en el presente trabajo. Los ácidos carboxílicos volátiles se correlacionaron positivamente con aminoácidos libres, NH_4^+ , y fluorescencia. Correlaciones negativas se observaron entre los ácidos carboxílicos volátiles, O_2 y temperatura (Tabla 1). Acetato se correlacionó positivamente con aminoácidos libres, NH_4^+ y fluorescencia y negativamente con O_2 y la temperatura (Tabla 1). Por su parte, isobutirato mostró correlación positivas sólo con los aminoácidos libres y PO_4^- . Correlación negativa entre el isobutirato y la temperatura fue observada (Tabla 1).

Para determinar si existen diferencias significativas en las concentraciones de ácidos carboxílicos volátiles con respecto a las condiciones de oxigenación en la columna de agua, los datos obtenidos se dividieron arbitrariamente en dos grupos: i) condiciones óxicas: $> 22 \mu\text{M}$; ii) condiciones subóxicas: $< 22 \mu\text{M}$, determinándose que existen diferencias significativas entre las concentraciones de ácidos carboxílicos volátiles y condiciones de óxido-reducción (Kruskal-Wallis; $p < 0,05$) (Tabla 2).

Para determinar el efecto de la estacionalidad sobre la distribución de los ácidos

carboxílicos volátiles los datos fueron agrupados en i) estación de otoño-invierno: Mayo-Agosto, ii) estación de primavera verano: Noviembre-2009; Septiembre-Diciembre-2010 y Enero-2011. Las concentraciones de acetato fueron significativamente distintas con respecto a la estacionalidad (Kruskal-Wallis; $p < 0,05$) (Tabla 2). Sin embargo, las concentraciones de isobutirato no mostraron diferencias significativas en relación a la estacionalidad (Kruskal-Wallis; $p > 0,05$) (Tabla 2).

3.3.3. Termodinámica ambiental del metabolismo fermentativo pelágico y de la actividad acetotrófica en el sitio de estudio

El valor ΔGr calculado para la reacción de fermentación de glucosa bajo condiciones ambientales de la Zona de Mínimo Oxígeno fue de -283 kJ/mol sustrato (Eq. 1, Tabla 3). Para la desnitrificación acetotrófica se obtuvo un valor $\Delta Gr = -3310$ kJ/mol sustrato (Eq. 2, Tabla 3), y la reacción de la reducción no-asimilativa de Fe(III)_s entregó un valor $\Delta Gr = -98$ kJ/mol sustrato (Eq. 3, Tabla 3), y la reacción correspondiente a la reducción acetotrófica de SO_4^- produjo un $\Delta Gr = -103$ kJ/mol sustrato (Eq. 4, Tabla 3).

3.3.4. Determinación experimental del potencial metabólico fermentativo de la comunidad micro-planctónica del sitio de estudio

3.3.4.1. Fermentación de glucosa

Un activo metabolismo fermentativo fue observado en las incubaciones anaeróbicas con glucosa como única fuente de carbono y energía, en ausencia de aceptores de electrones externos. Los principales metabolitos fermentativos semi-reducidos detectados en las incubaciones fueron acetato y etanol (Fig. 5A y 6A) (Ecs. 1 y 2; Tabla 4).

El espectro de masa de acetato mostró los fragmentos m/z 43, m/z 45 y m/z 60 $[M^+]$, diagnósticos para este ácido carboxílico volátil (Fig. 5A). Sus concentraciones variaron entre 1 y 13 mM (Fig. 5B). Durante los dos primeros días de incubación se observó un leve incremento en las concentraciones de acetato producido alcanzando a 3 mM al segundo día (Fig. 5B). Hacia el sexto día de incubación se alcanzó la concentración máxima de 13 mM (Fig. 5B). El espectro de masa de etanol produjo los fragmentos iónicos m/z 31 y m/z 45 $[M^+]$, iones característicos para la identificación de este alcohol volátil

(Fig. 6A). Su evolución durante el período de incubación fue similar a la del acetato, aunque el máximo alcanzó 3 mM. Las concentraciones fueron del rango de 0,14 a 2,9 mM de etanol fermentativamente producido (Fig. 6B).

El pH bajó desde 8,2 a 5,5 pH (Figs. 5B y 6B). La energía libre de formación (ΔGr) para la fermentación acetogénica durante la incubación aumentó durante el transcurso de la incubación desde un valor de ΔG -537 kJ/mol sustrato hasta los -375 kJ/mol sustrato (Fig. 5B). Por su parte, los valores de ΔGr para la fermentación etanoligénica mostraron una tendencia hacia el aumento durante el periodo de incubación y sus valores variaron desde -464 kJ/mol sustrato a -297 kJ/mol sustrato (Fig. 6B).

La tasa constante k obtenida para la acetogénesis fue de $0,04 \pm 0,008 \text{ d}^{-1}$ (Tabla 4), y considerando las concentraciones ambientales de glucosa para agua marina costera resultó en una tasa de producción $0,9 \pm 0,2 \text{ mg-C acetato L}^{-1} \text{ d}^{-1}$. Por su parte la fermentación etanoligénica mostró un k de $0,01 \pm 0,001 \text{ d}^{-1}$ (Tabla 4) y una tasa de producción de $0,3 \pm 0,05 \text{ mg-C etanol L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ (Tabla 4).

La fermentación de glucosa a acetato bajo condiciones desnitrificantes produjo $2,2 \pm 0,8 \text{ mM}$ de acetato hacia el final de la incubación (Fig. 7A). La ecuación estequiométrica de la fermentación de glucosa a acetato bajo condiciones desnitrificantes es:



De acuerdo a la ecuación de la reacción, la fermentación de 2,4 mM de glucosa generó 4×10^{-4} atmósferas de CO_2 al final de la incubación (Fig. 7B).

La ecuación estequiométrica de la oxidación de glucosa con NO_3^- como oxidante fue:



De acuerdo a la ecuación de la reacción, la oxidación de 8 mM de glucosa con 38 mM de NO_3^- produjo 2×10^{-3} atmósferas de CO_2 al final de la incubación (Fig. 7B).

De acuerdo al balance estequiométrico y de masa, en total se fermentaron y oxidaron 10,4 mM de glucosa. Un 23% de la glucosa fue fermentada a acetato y un 77% fue oxidada a CO_2 mediante desnitrificación (Fig. 7B).

3.3.4.2. Fermentación de aminoácidos

Los aminoácidos agregados como sustratos en las incubaciones fueron degradados rápidamente al primer día de experimentación. Sin embargo, se observó una relativa degradación preferencial de ornitina y leucina que disminuyeron a ca., 0,35 mM (Fig. 8A). Los aminoácidos alanina y la treonina fueron los menos degradados después de un día de incubación (Fig. 8A), disminuyendo a cerca de 5 mM hacia el segundo día de incubación (Fig. 8A), mientras que leucina comenzó a disminuir a partir del cuarto día de incubación (Fig. 8A). Fenilalanina fue degradada durante los dos primeros días de incubación, sin embargo, hacia el cuarto día su concentración se incrementó, llegando a 7 mM (Fig. 8A), similar al ácido glutámico (Fig. 8A).

La cromatografía líquida nos reveló la producción de aminoácidos que no fueron agregados al principio del experimento. Es así, como por ejemplo, se observó la aparición de 3,4 mM de glicina hacia el último día de incubación (Fig. 8B). Varias moléculas conteniendo aminas primarias (presumiblemente amino ácidos) que no pudieron ser identificados mostraron un apreciable producción también hacia el final del experimento llegando a los 4,7 mM (Fig. 8A). Por otra parte, una efímera producción de valina fue observada durante el segundo día de incubación alcanzando los 0,02 mM (Fig. 8B). La formación de histidina también fue evidenciada durante el cuarto día manteniendo una concentración de ca. 0,1 mM hasta el final del tratamiento indicando posiblemente que una vez formada no fue posteriormente degradada (Fig. 8B).

3.3.4.3. Producción de ácidos carboxílicos volátiles desde la fermentación de aminoácidos

La cromatografía de gases mostró la producción de 6 ácidos carboxílicos volátiles desde la fermentación de aminoácidos: acetato (C2), propionato (C3), isobutirato (C4, ramificado), butirato (C4), isovalerato (C5, ramificado) y valerato (C5) (Fig. 9A). Los espectros de masa mostraron claramente los iones m/z 43, m/z 45 y m/z 60 [M^+] diagnósticos para el acetato (Fig. 9B), m/z 28, m/z 45, m/z 74 [M^+] para propionato (Fig. 9C), m/z 43, m/z 72, m/z 88 [M^+] para isobutirato (Fig. 9D), m/z 43, m/z 60, m/z 73, m/z 88 [M^+] diagnósticos de butirato (Fig. 9E), m/z 43, m/z 60, m/z 87 de isovalerato (Fig. 9F), y los iones m/z 41, m/z 60 y m/z 73 para valerato (Fig. 9G).

El acetato fue el ácido carboxílico volátil dominante con una concentración promedio de 6 mM, seguido por isobutirato con 4 mM en todos los experimentos (Fig.

10A). La producción de acetato se mantuvo constante durante el periodo de incubación, mientras que isobutirato mostró un incremento lineal durante el periodo de incubación (Fig. 10A). La producción de propionato llegó a su máximo hacia el último día de incubación con 5 mM (Fig. 10A). El butirato alcanzó los 4 mM al octavo día para luego disminuir levemente (Fig. 10A). El isovalerato mostró una producción más irregular con valores que variaron entre los 3 mM y los 4,5 mM (Fig. 10A). A su vez, la producción de valerato alcanzó los 6 mM hacia el último día de incubación (Fig. 10A). La evolución en los valores de pH mostraron que el medio pasó desde condiciones iniciales levemente alcalinas a condiciones más ácidas, debido al aumento de las presiones parciales de CO₂ durante la incubación (Fig. 10B).

Para la producción de acetato desde la fermentación de amino ácidos se obtuvo una tasa constante k de $0,02 \pm 0,003 \text{ d}^{-1}$ lo que representa una tasa de producción de $0,02 \pm 0,003 \text{ mg-C acetato L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ (Tabla 4).

3.3.5. Actividad sintrófica *in vitro*

Durante el transcurso de estas incubaciones, se observó una aparente dinámica sintrófica por parte de la comunidad microbiana contenida dentro del microcosmos experimental, la cual se inició con la fermentación de glucosa a acetato y etanol durante los cinco primeros días (Fig. 11A). La producción de acetato comenzó inmediatamente después de un día de incubación llegando a una concentración de 0,2 mM (Fig. 11A) y se apreció un abrupto aumento en la concentración de acetato al sexto día (1,5 mM). La concentración de acetato se mantuvo relativamente constante hasta el día 13 (Fig. 11A) y posteriormente disminuyó a 0,7 mM hacia el último día de incubación (Fig. 11A). Por su parte, la actividad fermentativa etanoligénica mostró una evolución similar a la de la acetogénesis hasta el quinto día de incubación, donde alcanzó una concentración de 2,2 mM (Fig. 11A). Hacia el séptimo día de incubación se pudo apreciar un fuerte incremento en la concentración de etanol, alcanzando un valor de 8 mM (Fig. 11A). Sin embargo, un día después, la concentración de etanol sufrió una fuerte disminución llegando a un valor de 1,8 mM (Fig. 11A), concentración que se mantuvo relativamente estable hasta el final del experimento (Fig. 11A). Se detectó un aumento en la presión parcial de CH₄ al sexto día de incubación, durante el cual alcanzó un valor de $2 \times 10^{-6} \text{ atm}$ (Fig. 11A). Hacia el sexto día se evidenció una leve baja en la presión parcial de CH₄ para luego incrementarse fuertemente hacia el decimotercero día de incubación donde la presión parcial de CH₄

llegó a 2×10^{-6} (Fig. 11A). Hacia el día 15 de incubación se observó una sorpresiva caída en la presión parcial de CH_4 llegando a un valor de 1×10^{-7} atm (Fig. 11A). Los valores de presión parcial de CO_2 mostraron la ocurrencia de un abrupto aumento durante sexto día de incubación con un valor de 6×10^{-6} atm (Fig. 11B). A partir del séptimo día se observó una sostenida disminución en la presión parcial de CO_2 llegando a 1×10^{-6} atm hacia el décimo quinto día de incubación (Fig. 11B). Una disminución inicial (0-2 días) en el valor de pH fue observada, llegando a un valor de pH 6 (Fig. 11C). Sin embargo, durante el resto del periodo de incubación, los valores de pH se mantuvieron entre 7 y 8 (Fig. 11C).

3.3.6 Consistencia termodinámica de la actividad metabólica sintrófica durante las incubaciones

Para la actividad fermentativa acetogénica, se obtuvo un $\Delta\text{Gr} = -480$ kJ/mol sustrato (Ec. 1, Tabla 5); para la etanoligénesis se obtuvo un $\Delta\text{Gr} = -276$ kJ/mol sustrato (Ec. 2, Tabla 5); la fermentación de etanol a acetato obtuvo $\Delta\text{Gr} = -18$ kJ/mol sustrato (Ec. 5, Tabla 5), el metabolismo mixotrófico acetogénico mostró un valor calculado de $\Delta\text{Gr} = -273$ kJ/mol sustrato (Ec. 6, Tabla 5); el ΔGr para la metanogénesis acetoclástica fue de -89 kJ/mol sustrato (Ec. 7, Tabla 5)

3.3.7 Acetotrofia asociada a metabolismo de degradación terminal de carbono orgánico

Para estudiar la utilización de los metabolitos fermentativos por parte de la comunidad microbiana en la degradación terminal del carbono orgánico se realizaron incubaciones con acetato como fuente de C y energía con los aceptores de electrones Fe(III)_s y SO_4^- .

3.3.7.1 Reducción no asimilativa acetotrófica de Fe(III)_s

La oxidación de acetato y el concomitante incremento en la producción de CO_2 y Fe(II)_{aq} fueron observados en las incubaciones inoculadas con Fe(III)_s como aceptor de electrones (Fig. 12A, D). La concentración inicial de acetato fue de 40 mM la que decayó a 11 mM en 35 días de incubación (Fig. 12A). Concurrentemente, la presión parcial de CO_2 alcanzó un valor de 2×10^{-3} atm en 35 días de incubación (Fig. 12B). La producción final

de $\text{Fe(II)}_{\text{aq}}$ fue de 98 mM (Fig. 12C). Del mismo modo, durante el periodo de incubación, el pH disminuyó a pH 5,5 (Fig. 12C).

La tasa constante k para la oxidación de acetato con $\text{Fe(III)}_{\text{s}}$ fue $-0,036 \pm 0,009 \text{ d}^{-1}$ (Fig. 13) desde la cual se obtuvo una tasa de degradación de acetato de $0,32 \pm 0,08 \text{ mg-C acetato L}^{-1} \text{ d}^{-1}$.

3.3.7.2 Reducción acetotrófica de SO_4^-

Durante el periodo de incubación se observó una sostenida disminución en las concentraciones de acetato desde 40 mM a 10 mM al final de la incubación, revelando un activo consumo de acetato con SO_4^- como aceptor de electrones externo (Fig. 14A) y aumento de la presión parcial de CO_2 (Fig. 14B). Un sostenido incremento en las presiones parciales de CO_2 fue observado durante el periodo de incubación llegando a $2 \times 10^{-3} \text{ atm}$ en 35 días (Fig. 14B). Durante la incubación el pH se tornó medianamente alcalino alcanzando un valor de 9 en el medio de incubación (Fig. 14C). La cromatografía de gas de la fase gaseosa evidenció la presencia de hidrógeno sulfurado (HS^- , pH 5,5-7,5), confirmado por el espectro de masa de la señal asociada al HS^- , la cual mostró un fragmento iónico m/z 34 $[\text{M}]^+$ correspondiente a su peso molecular (Fig. 14D), y su aumento durante la incubación (Fig. 14E).

Desde estos experimentos se obtuvo una tasa constante k de $-0,01 \pm 0,001 \text{ d}^{-1}$ para la oxidación de acetato con SO_4^- como aceptor de electrones (Fig. 13), lo cual derivó en una tasa de degradación de acetato mediante la reducción de SO_4^- de $0,16 \pm 0,02 \text{ mg-C acetato L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ para el sitio de estudio. Los valores k para el consumo de acetato obtenidos en el presente estudio (Fig. 13), son consistentes con valores reportados previamente para el consumo de acetato en ambientes pelágicos marinos (Wu et al. 1997, Ho et al. 2002).

3.4 Discusión

3.4.1 Distribución vertical y temporal de los ácidos carboxílicos volátiles como evidencia de metabolismo fermentativo microbiano

Uno de los metabolismos heterotróficos importantes en ambientes agotados de oxígeno es la fermentación de la materia orgánica con la concomitante producción de metabolitos semi-reducidos de bajo peso molecular, los cuales son utilizados por los

microbios implicados en la degradación terminal de la materia orgánica como desnitrificación, reducción de metales, reducción de SO_4^- , y metanogénesis acetoclástica (Lovley & Phillips 1989, Conrad 1999, Megonigal et al. 2004). Sin embargo, la mayoría del conocimiento respecto de la degradación anaeróbica de material orgánico está enfocado a ambientes sedimentarios particularmente sobre la reducción de NO_3^- , Fe(III)_s , Mn(IV)_s , SO_4^- y metanogénesis (Megonigal et al. 2004). Por el contrario, escasos trabajos acerca de actividad fermentativa pelágica han sido realizados (Mopper & Kieber 1991, Albert et al. 1995, Wu et al. 1997, Ho et al. 2002, Riemann & Azam 2002, González & Quiñones 2009).

En el sistema de surgencia costera de Chile central (36°S) el pionero trabajo de González y Quiñones (2009) ha sido la única investigación focalizada en el potencial fermentativo de la comunidad procarionte del sitio de estudio. Estos investigadores reportaron a través del estudio de la actividad potencial enzimática que la comunidad micro-planctónica que habita la Zona de Mínimo Oxígeno está metabólicamente activa, y encontraron evidencia de la presencia y actividad de enzimas específicamente implicadas en el metabolismo fermentativo anaerobio como piruvato-oxidoreductasa, lactato dehidrogenasa y etanol dehidrogenasa. La actividad de la enzima piruvato oxidoreductasa en la comunidad microplanctónica de la Zona de Mínimo Oxígeno sugiere la utilización potencial fermentativa de compuestos nitrogenados como aminoácidos para complementar a los carbohidratos como fuente de energía con la demanda de N (González & Quiñones 2009).

La actividad fermentativa fue evidenciada por la ocurrencia de ácidos carboxílicos volátiles en la columna de agua del sitio de estudio en donde sólo acetato e isobutirato, así como ocurrencias episódicas de isovalerato fueron detectados en la columna de agua en relativamente bajas concentraciones (nM a unos pocos μM , Fig. 4). Las concentraciones de ácidos carboxílicos volátiles en este estudio fueron menores a aquellas determinadas previamente en el Mar Negro y la Cuenca del Cariaco (Albert et al. 1995, Ho et al. 2002), pero levemente más altas a aquellas reportadas en la columna de agua de Long Island Sound (Wu et al. 1997).

Baja diversidad de ácidos carboxílicos volátiles han sido reportadas previamente en ambientes pelágicos. Por ejemplo, Albert et al. (1995) reportaron la ocurrencia de formato, acetato y lactato en la columna de agua del Mar Negro con concentraciones que variaron entre 200 nM y 13 μM . En la columna de agua de la Cuenca del Cariaco, Ho et al. (2002) detectaron activa producción y consumo de acetato, concluyendo que en la capa

subóxica/anóxica la fermentación de una porción de la biomasa producida quimioautotróficamente puede ser una importante fuente de ácidos carboxílicos volátiles. Las concentraciones de acetato reportadas para la columna de agua de la Cuenca de Cariaco variaron entre $< 1 \mu\text{M}$ a un máximo de $30 \mu\text{M}$, aunque este máximo fue detectado episódicamente revelando un posible desbalance entre la producción y el consumo de acetato (Mopper & Kieber 1991, Ho et al. 2002).

Aunque las concentraciones de ácidos carboxílicos volátiles en la columna de agua del sitio de estudio mostraron un claro patrón vertical y temporal, sus concentraciones nunca mostraron una diferencia de más de $4 \mu\text{M}$ en sus concentraciones durante el periodo de estudio (Fig. 4), lo que sugiere un balance entre la producción fermentativa de estos metabolitos y su consumo por parte de microorganismos implicados en la degradación terminal de la materia orgánica. Esto es coincidente con la observación de ca. 50% del acetato producido (Σ (fermentación de glucosa y amino ácidos; Tabla 4) puede ser oxidado mediante la reducción acetotrófica de Fe(III)_s y SO_4^- (Tabla 5). Billen et al. (1980) sugirieron que las concentraciones de los sustratos orgánicos lábiles usualmente permanecen bajas debido a una rápida respuesta de la utilización microbiana a los cambios en la producción de los sustratos. La columna de agua del sitio de estudio contiene una bien desarrollada Zona de Mínimo Oxígeno, la cual es mantenida por factores físicos y biológicos (Sobarzo et al. 2007, Fuenzalida et al. 2009, Ulloa & Pantoja 2009), los cuales propician la ocurrencia de una diversa comunidad microbiana que obtiene energía mediante el metabolismo anaeróbico facultativo o estricto asociado a la degradación terminal de la materia orgánica (Castro-González et al. 2005, Canfield et al. 2010). Estas comunidades pueden estar utilizando los metabolitos semi-reducidos producidos mediante la fermentación de material orgánico exportado desde la capa fótica o producto de la fermentación de alguna fracción de la productividad secundaria, manteniendo un balance entre producción y el consumo de metabolitos fermentativos en el sitio de estudio.

3.4.2 Relación entre la distribución vertical y temporal de los ácidos carboxílicos volátiles y condiciones oceanográficas en el sitio de estudio

La distribución temporal y vertical de ácidos carboxílicos volátiles mostraron un claro patrón vertical y temporal tanto en su distribución como en su abundancia con altos valores en la capa más profunda y durante la estación de primavera-verano austral (Fig. 4 A, B, C). Investigaciones previas han sugerido que comunidades bacterianas heterotróficas

de sistemas costeros y oceánicos pueden obtener energía mediante el metabolismo fermentativo de manera facultativa en condiciones de alta disponibilidad de materia orgánica y agotamiento de O₂ severo (Hochachka & Somero 1984, Simidu & Tsukamoto 1985, Shie et al. 2000, Riemann & Azam 2002). Ho et al. (2002, 2004) reportaron una significativa variabilidad vertical y temporal de la producción y consumo terminal de acetato asociado a cambios en el grado de aporte de carbono orgánico mediado por producción primaria en la capa fótica o por un aumento de la productividad secundaria en las capas más profundas de la columna de agua de la Cuenca del Cariaco. Wu et al. (1997) mostraron que la producción y consumo de acetato en la columna de agua y los sedimentos superficiales de Long Island Sound estuvieron significativamente correlacionados al suministro de materia orgánica proveniente de floraciones estacionales de fitoplancton en la estación de primavera-verano. En el Mar Negro, Albert et al. (1995) reportaron una correlación entre el grado de oxigenación de la columna de agua y la distribución de los ácidos carboxílicos volátiles.

En el sitio de estudio, durante la estación de primavera-verano austral, las condiciones oceanográficas físicas propician la ocurrencia de eventos de surgencia estacional, que levantan la isolínea de 22 µM de concentración de O₂ en la columna de agua hacia las capas más someras, extendiendo verticalmente la Zona de Mínimo Oxígeno, incluso exponiendo episódicamente la capa fótica a condiciones de suboxia (Sobarzo et al. 2007). Estas condiciones de agotamiento de O₂ son exacerbadas por un significativo aumento de la productividad primaria durante el periodo de surgencia estacional (Daneri et al. 2000, Montero et al. 2007), condiciones observadas durante nuestro estudio (Fig. 2 C, D). Concomitantemente se observaron las mayores concentraciones de ácidos carboxílicos volátiles, sugiriendo la existencia de una relación entre estas condiciones oceanográficas y la ocurrencia de la fermentación de alguna fracción de la materia orgánica proveniente de la productividad primaria o secundaria del sitio de estudio (Tabla 1). Una columna de agua con una alta carga de material orgánico hundiéndose a través de ella, además de un fuerte agotamiento en los niveles de O₂ pueden propiciar además la existencia de micro-nichos anóxicos con alto contenido de materia orgánica donde una trama trófica anaerobia heterotrófica puede operar y donde comunidades microbianas fermentadoras podrían jugar un rol intermedio primordial en la degradación terminal de la materia orgánica en la columna de agua. Estos micro-nichos pueden estar presentes por ejemplo en agregados orgánicos. Uno de los componentes de estos agregados orgánicos pelágicos son las diatomeas (Thorthon 2002), las cuales son el componente dominante del fitoplancton en el

área de estudio (Montero et al. 2007, Sanchez et al. 2012). Los agregados orgánicos proveen un amplio rango de micro-ambientes para diferentes metabolismos anaerobios en el ambiente homogéneo de la columna de agua (Silver et al. 1978). Estos agregados son colonizados rápidamente por bacterias y otros organismos heterotróficos debido a que son altamente enriquecidos en nutrientes orgánicos e inorgánicos (Simon et al. 2002). Posiblemente, la actividad fermentativa del sitio de estudio ocurre dentro de estos micro-ambientes pelágicos liberando hacia la columna de agua una fracción de los ácidos carboxílicos volátiles que no alcanzan a ser completamente consumidos por otros componentes microbianos heterótrofos presentes en dichos micro-ambientes.

3.4.3 Consistencia termodinámica de la actividad fermentativa acoplada a degradación de materia orgánica en la columna de agua

Las reacciones químicas catalizadas por los microorganismos producen cantidades altamente variables de energía. La energía libre (G) de una reacción es la energía liberada por mol de reactante, la cual es utilizada para realizar trabajo (Jørgensen 2006). Se considera que si la liberación de energía es menor a 20 KJ/mol de sustrato es insuficiente para la formación de ATP, siendo así incapaces de generar energía metabólicamente útil (Hoehler et al. 1998).

La energía libre de formación para la fermentación de glucosa bajo condiciones ambientales (ΔGr) fue -283 kJ/mol de glucosa (Tabla 3), suficientes para la conservación de energía para los microorganismos implicados en este proceso. Las concentraciones de glucosa reportadas para columnas de agua marinas (Azam & Hodson 1981), así como la concentración de HCO_3^- en el océano (Pilson 1998) y concentración de ácidos carboxílicos volátiles encontrados en este trabajo soportan termodinámicamente la ocurrencia de la fermentación de carbohidratos en el sitio de estudio. Riemann & Azam (2002) estudiaron la distribución y la cinética del consumo del amino-azúcar N-acetyl-D-glucosamina encontrando que de un total de 78 aislados bacterianos pelágicos marinos costeros, 60 fueron capaces de la captura de N-acetyl-D-glucosamina a través de los sistemas de fosfoenol-piruvato:NAG fosfotransferasa principalmente entre organismos anaerobios facultativos o estrictos, especialmente fermentadores (Romano et al. 1970, 1979). La enzima fosfoenol-piruvato:NAG fosfotransferasa es especialmente importante para microorganismos que habitan ambientes subóxicos y que realizan glicólisis. Este descubrimiento indicó que el valor adaptativo del metabolismo fermentativo en el

ambiente pelágico es potencialmente significativo, dándole a las bacterias pelágicas marinas la capacidad de colonizar micro-ambientes como nieve marina, los cuales pueden experimentar periódicamente limitaciones severas de O₂ (Riemann & Azam 2002).

La capacidad metabólica de fermentar glucosa bajo condiciones anaeróbicas por parte de la comunidad microbiana del área de estudio fue demostrada experimentalmente (Figs. 5B y 6B). Sin embargo, los organismos fermentadores utilizan una amplia gama de monómeros fermentables entre ellos azúcares (hexosas, pentosas, tetrasas), alcoholes, ácidos orgánicos, aminoácidos, purinas y pirimidinas (Müller, 2001) por lo que la utilización de glucosa en este estudio es considerada solo como modelo.

La comunidad microbiana, efectivamente fermentó glucosa a acetato y etanol (Figs. 5B y 6B) y según la estequiometría de la ecuación de la fermentación de glucosa también H₂ (Ec.1 en tabla 4) indicando la ocurrencia de al menos la fermentación etanoligénica y homoacetogénica. El etanol es el mayor producto del metabolismo anaerobio de bacterias y levaduras del género *Zymomonas* (Müller et al 2001). Este tipo de fermentación puede ser realizada a través de la vía de la glicólisis a piruvato, el cual es descarboxilado a acetaldehído y CO₂. Esta reacción es catalizada por la enzima piruvato descarboxilasa asociada a la fermentación de alcohol en levaduras. Luego el acetaldehído es reducido a etanol con la producción de NADH₂ (Müller, 2001).

La producción bacteriana de etanol es realizada a través de la vía de Etner-Doudoroff, la cual produce 2 moles de piruvato por mol de glucosa que es luego descarboxilado por la piruvato descarboxilasa a acetaldehído para luego ser reducido a etanol (Müller 2001). Etanol es también un producto de otras fermentaciones. Muchas bacterias del ácido láctico, enterobacterias y clostridia producen considerables cantidades de etanol como producto final reducido para mantener el balance de óxido-reducción interno. En estos casos, Acetil-CoA es reducido vía acetaldehído a etanol por la enzima acetaldehído deshidrogenasa y la etanol deshidrogenasa (Müller 2001). La ocurrencia, actividad y cinética de las hidrogenasas en la comunidad microbiana del sitio de estudio fue reportada previamente por González & Quiñones (2009).

La formación heterotrófica de acetato observada en nuestros experimentos (Fig. 5B) indica inequívocamente que la comunidad microbiana proveniente del sitio de estudio posee la capacidad de obtener energía y biomasa a través del metabolismo fermentativo heterotrófico (Tabla 5).

De acuerdo a las tasas de producción de metabolitos fermentativos obtenidos en el presente trabajo (Tabla 3) y al volumen estimado para la Zona de Mínimo Oxígeno del

Pacífico Sur Oriental (e.g., $1,5 \times 10^6$ Km³; Fuenzalida et al. 2009) se estimó un flujo de carbono a través de la fermentación de glucosa de 18000 ± 4000 toneladas de carbono (Σ acetato-etanol) d⁻¹. Sin embargo, es importante considerar que en Zonas de Mínimo Oxígeno, en términos termodinámicos, el metabolismo heterotrófico más favorable es la desnitrificación, a través de la cual grandes cantidades de NO₃⁻ son reducidos a N₂O y N₂ (Codispoti et al. 2001, Lam et al. 2011), por lo que nuestra estimación podría estar sobreestimada. Esta observación hizo imperativo calcular el rendimiento del metabolismo fermentativo bajo condiciones desnitrificantes en orden a obtener una estimación más realista del potencial fermentativo de la comunidad microbiana en el sitio de estudio.

La tasa de desnitrificación calculada desde los experimentos de incubación resultó en una tasa de $10 \text{ nM N}_{2(g)} \text{ d}^{-1}$ en la columna de agua. Este valor es similar a los valores reportados por Kalvage et al. (2013) para aguas superficiales costeras de la Zona de Mínimo Oxígeno del Pacífico Tropical Suroriental y está en el rango de valores de aguas superficiales oceánicas de la Zona de Mínimo Oxígeno del Pacífico Tropical Suroriental (Fariás et al. 2009). Esta consistencia nos permitió una más fiable interpretación de nuestros datos.

De acuerdo a los datos arrojados desde las incubaciones “desnitrificadoras”, se estimó que un 23% del carbono orgánico suministrado fue fermentado a acetato y un 77% fue oxidado a CO₂ mediante la reducción de NO₃⁻ (Figs. 7A, 7B), por lo tanto, en términos más realistas se estima que aproximadamente una cuarta parte de la glucosa disuelta en la columna de agua del sitio de estudio puede ser potencialmente catabolizado a través del metabolismo fermentativo. Esto implica que en la Zona de Mínimo Oxígeno del Pacífico Sur Oriental se pueden producir 4000 ± 1000 toneladas de carbono (Σ acetato -etanol) d⁻¹ a través de la fermentación.

En términos energéticos y de acuerdo al cálculo termodinámico de la fermentación de glucosa a acetato bajo condiciones ambientales de la ZMO del Pacífico Sur Oriental y utilizando las concentraciones de glucosa descritas para columnas de agua costeras (Ittekkott et al. 1981), se obtuvo que la energía libre de formación de la reacción es de -283 kJ/mol glucosa en el sitio de estudio (Tabla 3).

Estequiométricamente, se necesita 1 mol de glucosa para producir un mol de acetato y 1 mol de glucosa para producir 2 moles de etanol por lo que la razón entre consumo y producción es de 1:1 y 1:2 respectivamente. De acuerdo a las tasas de producción ambiental de acetato y etanol para el sitio de estudio (Tabla 4) se puede estimar

que la producción de energía catabólicamente útil mediante la fermentación de glucosa es de 6 ± 2 terajulios d^{-1} en la Zona de Mínimo Oxígeno del Pacífico Sur Oriental. Esto equivale al 2% de la energía eléctrica total (doméstica e industrial) utilizada en Chile diariamente.

3.4.4 Metabolismo fermentativo de aminoácidos y su implicancia ambiental en el ciclo del carbono y el nitrógeno del sitio de estudio

La Zona de Mínimo Oxígeno del Sistema de Corrientes de Humboldt sostiene una alta tasa catabólica de material proteico proveniente de la productividad primaria fitoplanctónica, donde el material polimérico proteico es hidrolizado a aminoácidos los cuales son incorporados por la comunidad microbiana (Pantoja et al. 2004, Pantoja et al. 2009).

La producción de ácidos carboxílicos volátiles producidos (Fig. 10A), la disminución del pH y producción CO_2 (Fig. 10B) en las incubaciones de agua proveniente de la Zona de Mínimo Oxígeno y con aminoácidos como única fuente de carbono y energía indican que la comunidad microbiana del sitio de estudio es capaz de fermentar el material proteico particulado.

Los datos experimentales obtenidos sugieren que la potencial vía catabólica operando en la degradación de estas moléculas orgánicas es la reacción de Stickland, la cual acopla la oxidación de un aminoácido y la reducción de otro. Esta vía entregaría una ventaja termodinámica a los microbios fermentadores de aminoácidos de la Zona de Mínimo Oxígeno frente a Concepción, dado que, mediante este tipo de fermentación evitan utilizar los iones de hidrógeno producidos como aceptores de electrones con la consecuente producción de gas H_2 (Nisman 1954). Por el contrario, en la fermentación desacoplada de aminoácidos, un solo aminoácido es utilizado como dador y aceptor de electrones con la consiguiente producción de H_2 gas, por lo que necesitan la presencia de un procarionte-consumidor de H_2 , usualmente bacterias reductoras de sulfato y/o arqueas metanogénicas, para mantener termodinámicamente viable la fermentación de aminoácidos (Conrad et al., 1989; Schink & Stams, 2006). En nuestras incubaciones no detectamos la formación de HS^- ni CH_4 por lo que presumiblemente no hubo producción de gas H_2 , corroborando la vía de Stickland como mecanismo fermentativo de los aminoácidos en nuestros experimentos.

La producción de ácidos carboxílicos volátiles y sus diferentes longitudes en sus cadenas de carbono en el medio experimental indica la utilización de aminoácidos tanto como dadores de electrones, así como aceptores de electrones (Fig. 10A). En la fermentación Stickland, el aminoácido dador de electrones es oxidado a un ácido carboxílico un carbono más corto que el aminoácido original (Baker 1981). Es así como en nuestra incubación observamos la producción de acetato (C2), probablemente como producto de la oxidación fermentativa de alanina (C3) (Fig. 9A). Del mismo modo, se observó la síntesis de valerato (C5), posiblemente como producto de oxidación de la leucina (C6) (Fig. 9A). Por el contrario, el aminoácido aceptor de electrones es reducido a un ácido carboxílico volátil con la misma longitud del aminoácido original (Baker 1981). Este mecanismo puede ser el responsable de la síntesis del butirato (C4) producto de la reducción de treonina (C4) o valerato (C5) como posible metabolito reducido del glutamato (C5).

Del mismo modo, la disminución del pH indica que la reacción es acidogénica (Fig. 10B), posiblemente tanto por la producción de ácidos carboxílicos volátiles y/o CO_2 , así como por la producción de NH_4^+ como producto de la desaminación de los aminoácidos presentes en el medio de incubación (Nisman 1954, Baker 1981).

La potencial producción de NH_4^+ y ácidos carboxílicos volátiles mediante fermentación de aminoácidos en la Zona de Mínimo Oxígeno del área de estudio, puede tener una significativa implicancia en la biogeoquímica del C y el N. El NH_4^+ puede ser utilizado por comunidades microbianas quimiolitotróficas de la columna de agua de zonas de mínimo oxígeno como fuente de electrones, fijando a su vez carbono, como por ejemplo, la oxidación microaerofílica de NH_4^+ por arqueas pelágicas marinas (Venter et al. 2004, Könneke et al. 2005, Francis et al. 2007) y la oxidación anaerobia de amonio (anammox) (Thamdrup et al. 2006, Kuypers et al. 2006).

3.4.5. Actividad sintrófica de la comunidad microbiana en función del metabolismo fermentativo

La sintrofia es un proceso realizado a través de una interacción metabólica entre asociaciones microbianas, tales como la degradación de compuestos orgánicos complejos bajo condiciones anóxicas (Morris 2013).

Existen muchas definiciones para sintrofia (Schink 1997, Schink 2002, McInerney et al. 2009, Stams & Plugge 2009). Sin embargo, para este estudio nos basaremos en la

propuesta por Schink et al. (2002), en la cual se reconoce como sintrofia a la relación en la cual los microorganismos implicados en esta asociación dependen uno de otro debido a razones energéticas y realizan juntos un proceso de fermentación, proceso que ninguno de ellos por sí solo pueden realizar.

La incubación con glucosa de la comunidad microbiana presente en el inóculo obtenido desde la capa subóxica/anóxica mostró una sostenida actividad fermentadora durante los primeros 5 días donde acetato y etanol fueron detectados como eductos fermentativos (Ecs. 1, 2 en Tabla 4, Fig. 10A). Al sexto día de incubación se detectó una significativa producción de CH_4 (Fig. 10A). La metanogénesis lleva a cabo la formación de CH_4 desde moléculas de cadenas cortas de carbono (C1, C2) (Morris et al. 2013). Los microorganismos sintróficos dependen de la actividad arqueana metanogénica, quienes son los principales responsables de la eficiente remoción de H_2 y formato en ausencia de otros aceptores terminales de electrones, mientras que los metanógenos, necesitan obligadamente a los microorganismos fermentadores para la producción de sus eductos metabólicos (Morris et al. 2013). En nuestro experimento no se observó una disminución en la concentración de acetato a medida que las concentraciones de CH_4 fueron aumentando entre los días 6 y 13 (Fig. 10A) lo que nos lleva a inferir que la metanogénesis observada fue sostenida por la oxidación de H_2 fermentativamente producido con la consecuente reducción de CO_2 (Ec. 3 en Tabla 5). Concurrentemente detectamos una disminución de ca. 86 %, en las presiones parciales de CO_2 a partir del sexto día (Fig. 10B). Si la metanogénesis hidrogenotrófica operó de acuerdo a nuestra predicción, las presiones parciales de H_2 debieron haberse mantenidas bajas durante el experimento, favoreciendo termodinámicamente la fermentación continua de glucosa a acetato durante el periodo de incubación. Aún cuando la concentración de acetato disminuyó levemente hacia el decimoquinto día de incubación la producción de acetato se mantuvo hasta el final del experimento (Fig. 10A).

Una vía metabólica alternativa para la producción de acetato en la incubación pudo ser la formación autotrófica de acetato con H_2 como dador de electrones y el CO_2 como aceptor final (Ec. 4 en Tabla 5) (Drake 1994). Aunque la formación de CH_4 desde H_2/CO_2 (Ec.4 en Tabla 5) es termodinámicamente más favorable (Megonigal 2004) la acetogénesis autotrófica no puede ser completamente descartada.

De acuerdo a estos resultados se podría sugerir que una fracción del acetato detectado en el sitio de estudio (Fig. 3A) podría potencialmente provenir de la fijación procarionte de carbono mediante la utilización de H_2 y CO_2 a través de acetogénesis

autotrófica (Wood & Ljungdahl 1991, Drake 1994, Drake et al. 2006). La presencia de una activa asimilación procarionte de CO₂ en oscuridad ha sido observada en una gran variedad de ambientes marinos asociados a la presencia de redoxclinas (Taylor et al. 2001, Zopf et al. 2001, Pimelov & Neretin 2006, Jost et al. 2008), incluido el sistema de surgencia frente a Concepción (Farías et al. 2009).

Observando la producción de etanol, acetato y CO₂ se pueden generar dos hipótesis de metabolismos sintróficos. La primera es que la ocurrencia persistente de acetato hasta el final del experimento podría ser producto de la fermentación de etanol a acetato e H₂ generando así una fuente de electrones para la actividad metanogénica observada. Sin embargo bajo las condiciones reales de la incubación el valor del ΔGr fue de -12 kJ/mol glucosa (Ec. 5 en Tabla 5) indicando que mediante este metabolismo los microorganismos no pueden obtener energía metabólicamente útil para la formación de ATP. La segunda hipótesis considera que los microorganismos presentes en el inóculo son capaces de crecer mixotróficamente, es decir oxidando el etanol producido mediante la fermentación de glucosa reduciendo CO₂ a acetato (Ec. 6 en Tabla 5). El ΔGr para esta reacción bajo las condiciones experimentales fue -273 kJ/mol etanol (Tabla 5), indicando que este fue un metabolismo mediante el cual los microorganismos conservaron energía. Observando la evolución de las concentraciones de etanol y CO₂ en función del tiempo durante el experimento se puede observar un comportamiento virtualmente similar de ambos compuestos (Fig. 10A) sugiriendo una relación de óxido-reducción.

Estas observaciones contribuyen al entendimiento del funcionamiento de los ensamblajes microbianos marinos para aportar al flujo de energía, carbono y otros nutrientes en el océano. La mixotrofia, una combinación de modos mediante los cuales un organismo puede obtener energía y carbono, tales como la capacidad de cambiar entre la autotrofia y la quimioheterotrofia está recientemente reconocida como uno de los mayores componentes microbianos del océano (Christopher et al. 2004).

3.4.6. Acetotrofia asociada a metabolismo de degradación terminal de carbono orgánico

Uno de los objetivos primordiales de este trabajo fue determinar el rol de la fermentación en el ciclamiento terminal del C y su acoplamiento con otros elementos de importancia biogeoquímica en la columna de agua del área de estudio. En los experimentos previamente discutidos se pudo comprobar que la comunidad microbiana del sitio de estudio posee la capacidad metabólica para fermentar materiales orgánicos como

monosacáridos y amino ácidos. Este proceso puede proporcionar sustratos reducidos de bajo peso molecular como acetato, que pueden ser utilizados por la comunidad microbiana implicada en procesos terminales de degradación de materia orgánica en el sitio de estudio.

La evidencia experimental demostró que acetato puede ser utilizado por microorganismos provenientes de la Zona de Mínimo Oxígeno frente a Concepción, tanto en la reducción no asimilativa de Fe(III)_s como de SO_4^- (Figs. 12 A, B, C; 13 A, B, C). Del mismo modo, se demostró que ambos metabolismos son termodinámicamente posibles en la porción suboxica/anoxica de la columna de agua frente a Concepción y que los microorganismos pueden conservar energía mediante la oxidación de acetato con aceptores de electrones distintos al O_2 (Tabla 3). Los valores k observados en este trabajo (Fig. 11) son similares a aquellos previamente reportados para la oxidación anaeróbica de acetato en la columna de agua de Long Island Sound, así como en la columna de agua de la Cuenca del Cariaco (Wu et al. 1997; Ho et al., 2004), lo cual entrega una mayor robustez a nuestros resultados.

El acetato fue oxidado a CO_2 en presencia de Fe(III)_s activamente durante la incubación (Fig. 11 A, B). En la incubación control (no inoculado) no se evidenciaron disminuciones significativas de la concentración de acetato ni tampoco se observó una sostenida producción de CO_2 (Fig. 11 A, B) por lo que inferimos que la oxidación de acetato fue producto de actividad biológica. Tampoco se evidenció la precipitación de alguna fase sólida de hierro en las incubaciones inoculadas, aunque sí se observó a ojo desnudo la disolución de Fe(III)_s . Esto fue corroborado mediante la cuantificación de Fe(II)_{aq} al final del experimento, la cual indicó que ca. 45% del óxido de hierro precipitado fue reducido biológicamente a Fe(II)_{aq} (Fig. 11 C). La disminución en el pH pudo ser debido a la producción de CO_2 durante la oxidación del acetato (Fig. 11 B). De acuerdo a la tasa de oxidación de acetato mediante la reducción de hidróxido de hierro calculada en este trabajo y de acuerdo a cálculos estequiométricos se puede inferir que mediante este metabolismo se pueden remineralizar 14 nmoles de $\text{Fe(III)}_s \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ para formar 14 nmoles de $\text{Fe(II)}_{aq} \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ biodisponible. Si las concentraciones de hierro precipitado reportadas para el agua de mar son 100 nmoles L^{-1} (Achterberg et al. 2001, Gledhill & Buck 2012), entonces la reducción acetotrófica bacteriana de hierro precipitado en la columna de agua del sitio de estudio podría dar cuenta del 14% del reciclamiento de hierro no biodisponible sobre la plataforma continental frente a Concepción.

A concentraciones ambientales de acetato y hierro precipitado en la columna de agua del sitio de estudio, la energía libre de formación para la reducción acetotrófica de hierro

es baja (Tabla 3) pero suficiente para la conservación de energía. Sin embargo nuestros experimentos evidencian algún tipo de estrategia metabólica/bioquímica para maximizar la obtención de energía catabólicamente activa a través de este metabolismo. Es así como nosotros notamos que estequiométricamente, la cantidad de acetato oxidado no da cuenta de la producción de hierro ferroso, a pesar de la evidente disolución total del hierro férrico precipitado (observación a ojo desnudo), por lo que es altamente probablemente la ocurrencia de un paso intermedio en la especiación del hierro. Si esto es así, es posible que los microbios presentes en el inóculo disuelvan el hierro férrico precipitado primero a $\text{Fe(III)}_{\text{aq}}$, para luego reducir este ion a $\text{Fe(II)}_{\text{aq}}$. Si este fuese el mecanismo, la energía libre de formación se incrementaría 8 veces con respecto al calculado mediante la reducción directa del hierro férrico precipitado a $\text{Fe(II)}_{\text{aq}}$, llegando a un valor de -899 kJ/mol sustrato. Sin embargo, esta inferencia es tomada como una hipótesis que debe ser comprobada con más trabajo de campo y análisis experimentales.

La clave observación de que los microbios pueden reducir aceptores de electrones sólidos fue el punto de partida para el estudio de la reducción no asimilativa de aceptores extracelulares (Ritcher et al. 2012). Los primeros descubrimientos sobre procesos respiratorios mediante la transferencia de electrones hacia la superficie celular fueron la respiración de Fe(III) y Mn(IV) en las bacterias *Shewanella* y *Geobacter* (Lovley 1991, Lovley & Phillips 1988). Estudios previos han sugerido que la reducción respiratoria del Fe(III) contribuye masivamente a la oxidación de fuentes de C orgánico en una gran variedad de ambientes anaerobios (Lovley 1991, Thamdrup et al. 2000).

Grandes cantidades de Mn y Fe son depositadas en los márgenes continentales mediante el aporte fluvial (Martin & Meybeck 1979, Poulton & Raiswell 2000). Dado que, la costa de Chile central es caracterizada por una alta descarga fluvial (Dávila et al. 2002, Sobarzo et al. 2007), podemos inferir que esta descarga podría estar suministrando grandes cantidades de Fe en su forma oxidada y en su fase precipitada tanto en la columna de agua, así como en los sedimentos del sitio de estudio. Este hierro puede ser aprovechado por la comunidad procarionte que habita la Zona de Mínimo Oxígeno frente a Concepción, para oxidar C con su consecuente disolución, liberándolo a la columna de agua y dejándolo biodisponible para el fitoplancton, lo cual podría sostener un activo ciclamiento de Fe y C mediado por bacterias en la columna de agua acoplado a la productividad primaria y secundaria. Esto es consistente con nuestros resultados experimentales, en los cuales se demostró la capacidad bioquímica de la microbiota de la Zona de Mínimo Oxígeno para la disolución de Fe(III) , bajo condiciones de agotamiento de O_2 y valores de pH del agua de

mar (Fig. 11C). Balzano (2009) detectó la liberación de Fe y Mn disuelto desde agregados marinos hacia el entorno acuático experimental, mediado por actividad bacteriana. Berg et al. (2013) detectaron la capacidad heterotrófica bacteriana de reducir metales en su fase sólida tales como el Fe y el Mn en la columna de agua del Mar Báltico utilizando acetato como fuente de C y energía. Por otra parte, Luef et al. (2013) determinaron que la ocurrencia planctónica de las bacterias reductoras de Fe es posible gracias a la formación de microagregados ricos en Fe y materia orgánica donde estas bacterias pueden tener contacto directo con las partículas de óxidos de hierro haciendo posible su reducción.

La capacidad metabólica de reducir SO_4^- con acetato como dador de electrones y la consecuente producción de HS^- por parte la comunidad microbiana pelágica del sitio de estudio fue demostrada en este trabajo (Figs. 13 A, B, C, D, E). La degradación de materia orgánica mediante fermentación a pequeñas moléculas como ácidos carboxílicos volátiles, entre ellos acetato es clave dado que estos compuestos son los principales sustratos para la reducción de SO_4^- (Jørgensen 2006).

Estudios sobre la ocurrencia así como tasas de reducción de SO_4^- en el ecosistema de surgencia de Chile central han sido llevados a cabo principalmente en sedimentos (Thamdrup & Canfield 1996, Ferdelman et al. 1997, Zopfi et al. 2008). Recientemente, se han identificado un grupo de Gamaproteobacterias afiliadas con simbioses oxidadores de sulfuros en la Zona de Mínimo Oxígeno de la costa de Chile (Canfield et al. 2010). Del mismo modo se ha aislado un microorganismo reductor de sulfato desde las aguas de la Zona de Mínimo Oxígeno de la costa del Perú (Finster & Kjeldsen 2010). Nuestro trabajo experimental añade más evidencia sobre la biogeoquímica del S acoplada al C en este sistema. Nosotros observamos que bajo condiciones anaerobias-reducidas la comunidad microbiana oxidó activamente acetato a CO_2 (Fig. 12 A, B), así como la ocurrencia de HS^- en las incubaciones, consistente con la ocurrencia de reducción de SO_4^- con acetato (Fig. 12 D, E). Estos resultados apoyan la existencia de un activo pero críptico ciclo del S en la Zona de Mínimo Oxígeno de la costa de Chile central (Canfield et al. 2010, Finster & Kjeldsen 2010) ya que no se detectó HS^- ambiental, incluso en el centro de la Zona de Mínimo Oxígeno.

La alcalinidad alcanzada durante el transcurso de la incubación (Fig. 12C) y la aparente precipitación de carbonato de calcio abren un interesante flanco de investigación. El rol primario de los microorganismos en los procesos de precipitación ha sido atribuido a su habilidad para crear un ambiente alcalino (alto pH y alta concentración de C inorgánico disuelto) a través de varias actividades fisiológicas (Castanier et al. 1999, Douglas &

Beveridge 1998). La precipitación de carbonatos puede ser promovida por la reducción no asimilativa de SO_4^- , la cual es realizada por bacterias reductoras de SO_4^- (Hammes & Verstraete 2002). Estas bacterias aumentan la alcalinidad reduciendo iones SO_4^- y consumiendo moléculas orgánicas (Braissant et al. 2007). Esta precipitación mediante esta vía ocurre en agua de mar (Morita 1980), formaciones geológicas (Peckman et al. 1999) y durante el tratamiento biológico de residuos mineros ácidos (Kaufman et al. 1996). Bajo estas circunstancias, la materia orgánica es oxidada por bacterias reductoras de SO_4^- liberando HS^- y CO_2 . Como resultado de un bajo número de Reynolds, las bacterias quedan rodeadas por una delgada capa de agua la cual físicamente crea micro-ambientes formando una interfaz entre la célula y el ambiente externo en el cual diferente pH, C inorgánico disuelto y iones Ca pueden participar favoreciendo la precipitación de CaCO_3^- (Hammes & Verstraete 2002).

La reducción de SO_4^- afecta la formación de minerales de carbonato de varias formas. Primero, la reducción de SO_4^- produce un incremento en el pH alterando el índice de saturación y así la precipitación de carbonato (Lyons et al. 1984, Walter et al. 1993, Visscher & Stolz 2005). Segundo, cuando las bacterias reductoras de SO_4^- utilizan ácidos orgánicos (e.g. acetato, lactato) como dadores de electrones para el crecimiento, la disponibilidad de iones Ca libres puede incrementarse debido a la remoción de ácidos carboxílicos unidos al Ca (Bosak 2005, Dupraz & Visscher 2005). Tercero, las bacterias reductoras de SO_4^- alteran la inhibición cinética de la formación de dolomita mediante la remoción de iones SO_4^- , (Wright 1999, Warthmann et al. 2000, van Lith et al. 2003, Wright & Wacey 2005).

La precipitación de CaCO_3^- por parte de la comunidad microbiana que habita la Zona de Mínimo Oxígeno implicada en la reducción no asimilativa de SO_4^- nos puede llevar a un nuevo entendimiento del ciclo del C en estas zonas, como por ejemplo su rol en el secuestro de C mediante la precipitación de minerales carbonatados.

3.5 Conclusiones

1. La distribución vertical y temporal de ácidos carboxílicos volátiles en la columna de agua frente a Concepción sugiere la ocurrencia de una activa comunidad microbiana capaz de fermentar materia orgánica generando metabolitos semi-reducidos que pueden ser utilizados por otros componentes microbianos implicados en la degradación terminal de la materia orgánica en la columna de agua frente a Concepción (36°S).

2. Correlaciones significativas entre la distribución vertical y temporal de ácidos carboxílicos en la columna de agua y estacionalidad y la concentración de O₂ sugieren una dependencia de factores ambientales para la ocurrencia de actividad fermentativa, posiblemente llevada a cabo por microorganismos fermentadores facultativos.
3. El estudio experimental demostró que la comunidad microbiana pelágica es metabólicamente capaz de realizar metabolismo fermentativo sobre carbohidratos y material proteico, produciendo ácidos carboxílicos volátiles y etanol como sus principales productos metabólicos.
4. Se demostró que el metabolismo fermentativo es termodinámicamente posible en la Zona de Mínimo Oxígeno bajo las condiciones ambientales del sitio de estudio.
5. Se observó que el flujo del C y energía puede ser llevado a cabo mediante actividad sintrófica por la comunidad microplanctónica, donde la fermentación es componente clave.
6. Procesos terminales de degradación de materia orgánica mediante la utilización de metabolitos fermentativos, tales como la reducción asimilativa de Fe(III)_s y SO₄⁻ pueden ser realizados por la comunidad microplanctónica pelágica que habita la zona Zona de Mínimo Oxígeno, acoplado biológicamente los ciclos del carbono, Fe y S.

3.6 Referencias

- Ahumada, R., & L. Chuecas 1979. Algunas características hidrográficas de la Bahía de Concepción (36°40'S; 73°02'W) y áreas adyacentes, Chile. *Gayana Miscelánea* 8: 1-56.
- Albert, D.B., C. Taylor, & C.S. Martens. 1995. Sulfate reduction rates and low molecular weight fatty acids concentrations in the water column and surficial sediments of The Black Sea. *Deep Sea Research Part I* 42: 1239-1260.
- Andreesen, J.R. 2004. Glycine reductase mechanism. *Current Opinion in Chemical Biology* 8: 454-61.
- Arnosti, C., B.B. Jørgensen, J. Sageman, & B. Thamdrup. 1998. Temperature dependence of microbial degradation of organic matter in marine sediments: polysaccharide hydrolysis, oxygen consumption, and sulfate reduction. *Marine Ecology Progress Series* 165: 59-70.

Arrhenius, S. 1889. Ober die Reaktionsgeschwindigkeit bei der Inversion von Rohrzucker durch Säuren. *Zeitschrift für Physikalische Chemie* 4: 226-248.

Azam, F., & R.E. Hodson. 1981. Multiphasic kinetics for D-glucoseuptake by assemblages of natural marine bacteria. *Marine Ecology Progress Series*. 6, 213-222.

Balzano, S., P.J. Statham, R.D. Pancost, & J.R. Lloyd. 2009. Role of microbial populations in the release of reduced iron to the water column from marine aggregates. *Aquatic Microbial Ecology*, 54: 291-303.

Barker, H.A. 1981. Amino acid degradation by anaerobic bacteria. *Annual Review of Biochemistry* 50: 23-40.

Berg, C., S. Beckmann, G. Jost, M. Labrenz, & K. Jürgens. 2013. Acetate-utilizing bacteria at an oxic-anoxic interface in the Baltic Sea. *FEMS Microbiology Ecology* 85: 251-261.

Billen, G., C. Joris, J. Wijnant, & G. Gillain. 1980. Concentration and microbiological utilization of small organic molecules in the Scheldt estuary, the Belgian coastal zone of the North Sea and the English Channel. *Estuarine and Coastal Marine Science* 11: 279-294.

Bosak, T. 2005. Laboratory models of microbial biosignatures in carbonate rocks. PhD Thesis, California Institute of Technology, Pasadena, CA, USA, p. 134

Boyd, P.W. et al. 2000. A mesoscale phytoplankton bloom in the polar Southern Ocean stimulated by iron fertilization. *Nature* 407: 695-702.

Boyd, P.W. et al. 2004. The decline and fate of an iron-induced subarctic phytoplankton bloom. *Nature* 428: 549-553.

Boyd, E., A. Pearson, Y. Pi, W.J. Li, Y.G. Zhang, & L. He, et al. 2011. Temperature and pH controls on glycerol dibiphytanyl glycerol tetraether lipid composition in the hyperthermophilic crenarchaeon *Acidilobus sulfurireducens*, *Extremophiles* 15: 59-65
10.1007/s00792-010-0339-y.

Braissant, O., A.W. Decho, C. Dupraz, C. Glunk, K.M. Przekop, & P.T. Visscher. 2007. Exopolymeric substances of sulfate-reducing bacteria: interactions with calcium at alkaline pH and implication for formation of carbonate minerals. *Geobiology* 5: 401-411.

Brandhorst, W. 1971. Condiciones oceanográficas estivales frente a la costa de Chile. *Revista de Biología Marina* 14 (3): 45-84.

Brooks, J.M., D.F. Reid, & B.B. Bernard. 1981. Methane in the upper water column of the Northwestern Gulf of Mexico. *Journal of Geophysical Research* 86: 11029-11040.

Burke Jr., R.A., Reid, D.F., Brooks, J.M., & D.M. Lavoie. 1983. Upper water column methane geochemistry in the eastern tropical North Pacific. *Limnology and Oceanography* 28: 19-32.

Brunhuber, N., & J. Blanchard. 1994. *The Biochemistry and Enzymology of Amino-Acid*

Dehydrogenases. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 29 (6): 415-467.

Canfield, D.E., F.J. Stewart, B. Thamdrup, L. De Brabandere, T. Dalsgaard, E.F. DeLong, N.P. Revsbech, & O. Ulloa. 2010. A cryptic sulfur cycle in oxygen-minimum-zone waters off the Chilean coast. *Science* 330: 1375-1378.

Canuel, E.A., & C. S. Martens. 1996. Reactivity of recently deposited organic matter: Degradation of lipid compounds near the sediment–water interface. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 60: 1793-18.

Castanier, S., G. Le Metayer-Level, & J.P. Perthuisot. 1999. Ca-carbonates precipitation and limestone genesis - the micro-biogeologist point of view. *Sedimentary Geology* 126: 9-23.

Castro-González, M.G., L. Braker, L. Fariás & O. Ulloa. 2005. Communities of *nirS*-type denitrifiers in the water column of the oxygen minimum zone in the eastern South Pacific. *Environmental Microbiology* 7: 1298-1306.

Coale, K.H., K.S. Johnson, S.E. Fitzwater, R.M. Gordon, et al. 1996. A massive bloom induced by an ecosystem-scale iron fertilization experiment in the equatorial Pacific Ocean. *Nature* 383: 495-500.

Codispoti L.A., J.A., Brandes, J.P., Christensen, A.H., Devol, S.W.A., Naqvi, H.W., Paerl, & T., Yoshinari. 2001. The oceanic fixed nitrogen and nitrous oxide budgets: Moving targets as we enter the Anthropocene? *Scientia Marina* 65:85-105.

Conrad R., Mayer H. P., and Wüst M. 1989. Temporal change of gas metabolism by hydrogen-syntrophic methanogenic bacterial associations in anoxic paddy soil. *FEMS Microbiology and Ecology* 62: 265-274.

Crill, P.M., & C.S. Martens. 1987. Biogeochemical cycling in an organic-rich coastal marine basin .6.temporal and spatial variations in sulfate reduction rates. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 51: 1175-1186.

Cutter, G.A. & C.F. Krahfors. 1988. Sulfide in surface waters of the Western Atlantic Ocean. *Geophysical Research Letters*. 15: 1393-1396.

Christensen, D., & T.H. Blackburn. 1982. Turnover of ¹⁴C-labeled acetate in marine sediments. *Marine Biology*. 71: 193-201.

Conrad, R. 1999. Contribution of hydrogen to methane production and control of hydrogen concentrations in methanogenic soils and sediments [review]. *FEMS Microbiology Ecology* 28: 193-202.

Cornell, R.M., & U. Schwertmann. 2003. *The Iron Oxides: Structures, Properties, Reactions, Occurrences and Uses*. Wiley-VCH, Weinheim.

Costa, E., J. Perez, & J.U. Kreft. 2006. Why is metabolic labour divided in nitrification?

Trends in Microbiology 14: 213-219.

Daneri G, V. Dellarosa, R. Quiñones, B. Jacob, P. Montero & O. Ulloa. 2000. Primary production and community respiration in the Humboldt Current System off Chile and associated oceanic areas. *Marine Ecology Progress Series*. 197, 41-49.

Dávila, P.M., D. Figueroa, & E. Müller. 2002. Freshwater input into the coastal ocean and its relation with the salinity distribution off austral Chile (35–55°S). *Continental Shelf Research* 22: 521-534.

de Vlardar, H. 2012. Amino acid fermentation at the origin of genetic code. *Biology Direct* 7: 6.

Divya, B., A. Parvathi, P.A. Loka Bharathi, & S. Nair. 2011. 16S rRNA-based bacterial diversity in the organic-rich sediments underlying oxygen deficient waters of eastern Arabian Sea. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 27: 2821-2833.

Douglas, S., & T.J.Beveridge. 1998. Mineral formation by bacteria in natural microbial communities. *FEMS Microbiology Ecology*. 26: 79-88.

Drake, H.L. 1994. Introduction to acetogenesis. En: *Acetogenesis*. Drake, H.L. (ed). New York: Chapman and Hall, 3-60.

Drake, H.L., K. Küsel, & C. Matthies (2006), Acetogenic prokaryotes. En: *The Prokaryotes*, Dworkin, M., Falkow, S., Rosenber, E., Schleifer, K.H., and Stackebrandt, E. (eds): Springer, 354-420.

Dupraz, C., & P.T. Visscher. 2005. Microbial lithification in marine stromatolites and hypersaline mats. *Trends in Microbiology* 13: 429-438.

Fariás, L. 1998. Potential role of bacterial mats in the nitrogen budget of marine sediments: the case of *Thioploca* spp. *Marine Ecology Progress Series* 170: 291-292.

Fariás, L., M. Graco, & O. Ulloa. 2004. Temporal variability of nitrogen cycling in continental-shelf sediments of the upwelling ecosystem off central Chile. *Deep-Sea Research Part II-Topical Studies in Oceanography* 51 (20-21): 2491-2505.

Fariás, L., C. Fernández, J. Faúndez, M. Cornejo, M.E. Alcaman. 2009. Chemolithoautotrophic production mediating the cycling of the greenhouse gases N₂O and CH₄ in an upwelling ecosystem. *Biogeosciences* 6: 3053-3069

Ferdelman, T.G., C. Lee, S. Pantoja, J. Harder, B.M. Bebout, & H. Fossing. 1997. Sulfate reduction and methanogenesis in *Thioploca*-dominated sediment off the coast of Chile. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 61: 3065-3079.

Fey, A., & R. Conrad. 2000. Effect of temperature on carbon and electron flow and on the archaeal community in methanogenic rice field soil. *Applied Environmental Microbiology* 66: 4790-4797.

Finke N., V. Vandieken, & B.B. Jørgensen. 2007. Acetate, lactate, propionate, and

isobutyrate as electron donors for iron and sulfate reduction in Arctic marine sediment, Svalbard. *FEMS Microbiology Ecology* 59: 10-22.

Finke, N., & B.B. Jørgensen. 2008. Response of fermentation and sulfate reduction to experimental temperature changes in temperate and Arctic marine sediments. *ISME Journal* 2: 815-829; doi:10.1038/ismej.2008.20.

Finster, K.W., & K.U. Kjeldsen. 2010. *Desulfovibrio oceani* subsp. *oceani* sp. nov., subsp. nov. and *Desulfovibrio oceani* subsp. *galateae* subsp. nov., novel sulfate-reducing bacteria isolated from the oxygen minimum zone off the coast of Peru. *Antonie van Leeuwenhoek* 97: 221-229.

Fonknechten, N., S. Chaussonnerie, S., & Tricot et al. 2010. *Clostridium sticklandii*, a specialist in amino acid degradation: revisiting its metabolism through its genome sequence. *BMC Genomics* 11: 555.

Fossing H., V.A. Gallardo, B.B. Jorgensen, M. Huettel, L.P. Nielsen, H. Schulz, D. Canfield, S. Foster, R. Glud, J. Gundersen, J. Kuever, N. Ramsing, A. Teske, B. Thandrup, & O. Ulloa. 1995. Concentration and transport of nitrate by the mat-forming sulphur bacterium *Thioploca*. *Nature*: 374, 713-715.

Francis, C.A., K.J. Roberts, J.M. Beman, A.E. Santoro, & B.B. Oakley. 2005. Ubiquity and diversity of ammonia oxidizing archaea in water columns and sediments of the ocean. *Proceedings of National Academic of Sciences USA*, 102: 14683-14688.

Fuenzalida, R., W. Schneider, J. Garces-Vargas, L. Bravo, & C. Lange. 2009. Vertical and horizontal extension of the oxygen minimum zone in the eastern South Pacific Ocean. *Deep-Sea Reserach II* 56: 992-1003.

Fuchsman, C.A., J.B. Kirkpatrick, W.J. Brazleton, J.W. Murray, & J.T. Staley. 2011. Metabolic strategies of free-living and aggregate associated bacterial communities inferred from biological and chemical profiles in the Black Sea sub-oxic zone. *FEMS Microbiology Ecology*: 78, 586-603.

Glud, R.N., O. Holby, F. Hofmann, & D.E. Canfield. 1998. Benthic mineralization in Arctic sediments (Svalbard). *Marine Ecology Progress Series*. 173: 237-251.

González, H.E., G. Daneri, J.L. Iriarte, B. Yannicelli, E. Menschel, C. Barría, S. Pantoja & L. Lizárraga. 2009. Carbon fluxes within the epipelagic zone of the Humboldt Current system off Chile: the significance of euphausiids and diatoms as key functional groups for the biological pump. *Progress in Oceanography* 83: 217-227.

González, R.R., & R.A. Quiñones. 2009. Common catabolic enzyme patterns in a microplankton community of the Humboldt Current System off northern and central-south Chile: Malate dehydrogenase activity as an index of water-column metabolism in an oxygen minimum zone. *Deep Sea Research II* 56: 1095-1104.

Gottschalk, G., & S. Peinemann. 1992. The anaerobic way of life. En: *The Prokaryotes*, 300-311, Berlin: Springer-Verlag.

- Hammes, F., & W. Verstraete. 2002. Key roles of pH and calcium metabolism in microbial carbonate precipitation. *Reviews in Environmental Sciences Bio/Technology*. 1: 3-7.
- Hansen, L.S., M. Holmer, & T.H. Blackburn. 1993. Mineralization of organic nitrogen and carbon (fish food) added to anoxic sediment microcosms: Role of sulfate reduction. *Marine Ecology Progress Series* 102: 199-204.
- Hutchins, D.A., & K.W. Bruland. 1998. Iron-limited diatom growth and Si:N uptake ratios in a coastal upwelling regime. *Nature* 393: 561-564.
- Helly, J.J., & Levin, L.A. 2004. Global distribution of naturally occurring marine hypoxia on continental margins. *Deep-Sea Research I* 51: 1159-1168.
- Ho, T.Y., M.I. Scranton, & G.T. Taylor. 2002. Acetate cycling in the water column in the Cariaco Basin: Seasonal and vertical variability and implication for carbon cycling. *Limnology and Oceanography* 47: 1119-1128.
- Ho T. Y., G.T. Taylor, Y. Astor, R. Varela, E. Muller-Karger, & M.I. Scranton. 2004. Vertical and temporal variability of redox zonation in the water column of the Cariaco Basin: implications for organic carbon oxidation pathways. *Marine Chemistry* 86: 89-104.
- Hochachka, P.W., & G.N. Somero. 1984. Temperature Adaptation. En: *Biochemical adaptations* (eds P. W. Hochacka & G. N. Somero), 355-449, Princeton, NJ: Princeton University Press.
- Hoehler, T. M., M.J. Alperin, D.B. Albert, & C.S. Martens. 1998. Thermodynamic control on hydrogen concentrations in anoxic sediments. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 62: 1745-1756.
- Isaksen, M.F., & B.B. Jørgensen. 1996. Adaptation of psychrophilic and psychrotrophic sulfate-reducing bacteria to permanently cold marine environments. *Applied Environmental Microbiology* 62: 408-414.
- Jørgensen, B.B. 1982. Mineralization of organic matter in the sea bed – the role of sulfate reduction. *Nature* 296: 643-645.
- Jørgensen, B.B., & J. Sørensen. 1985. Seasonal cycles of O₂, NO₃⁻ and SO₄²⁻ reduction in estuarine sediments: The significance of a nitrate reduction maximum in Spring. *Marine Ecology Progress Series* 24: 65-74.
- Jost, G., M.V. Zubkov, E. Yakushev, M. Labrenz, & K. Jurgens. 2008. High abundance and dark CO₂ fixation of chemolithotrophic prokaryotes in anoxic water of the Baltic Sea. *Limnology & Oceanography* 53: 14-22.
- Kaufman, E.N., M.H. Little, & P.J. Selvaraj. 1996. Recycling of FGD gypsum to calcium carbonate and elemental sulphur using mixed sulphate-reducing bacteria with sewage digest as carbon source. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 66: 365-374.
- Knoblauch, C., & B.B. Jørgensen. 1999. Effect of temperature on sulphate reduction,

growth rate and growth yield in five psychrophilic sulphate-reducing bacteria from Arctic sediments. *Environmental Microbiology* 1: 457-467.

Könneke, M., A.E. Bernhard, J.R. de la Torre, C.B. Walker, J.B. Waterbury, & D.A. Stahl. 2005. Isolation of an autotrophic ammonia-oxidizing marine archaeon. *Nature* 437: 543-546.

Kuypers, M.M., G. Lavik, D. Woebken, M. Schmid, B.M. Fuchs, & R. Amann, et al. 2005. Massive nitrogen loss from the Benguela upwelling system through anaerobic ammonium oxidation. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 102: 6478-6483.

Jørgensen, B.B. 2006. Bacteria and marine biogeochemistry. *Marine Geochemistry*, 2nd Edn. eds H. D. Schulz and M. Zabel (Springer-Verlag), 169-206.

Kappler, A., & K.L. Straub. 2005. Geomicrobiological cycling of iron. *Reviews in Mineralogy and Geochemistry*. 59: 85-108.

Kristensen, E., & M. Holmer. 2001. Decomposition of plant materials in marine sediment exposed to different electron acceptors (O_2 , NO_3^- , and SO_4^{2-}), with emphasis on substrate origin, degradation kinetics, and the role on bioturbation. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 65: 419-433.

Lam, P., & Kuypers, M.M. 2011. Processes in oxygen minimum zones. *Annual Review of Marine Science* 3: 317-345.

Lengeler, J.W., G. Drews, & H.G. Schlegel. 1999. *The biology of the prokaryotes*, Thieme, Stuttgart, Germany, 205-206.

Levipan, H.A., R.A. Quiñones, H.E. Johansson, & H. Urrutia. 2007. Methylophilic Methanogens in the Water Column of an Upwelling Zone with a Strong Oxygen Gradient off Central Chile. *Microbes and Environments*, 22, 268-278.

Lovley, D.R. & Phillips, E.J.P. 1989. Requirements for a microbial consortium to completely oxidize glucose in Fe-(III) reducing sediments. *Applied Environmental Microbiology* 55: 3234-3226.

Lovely, D.R. 1991. Dissimilatory Fe(III) and Mn(IV) reduction. *Microbiology Reviews* 55: 259-287.

Lovley, D.R., & E.J.P. Phillips. 1988. Novel mode of microbial energy metabolism: organic carbon oxidation coupled to dissimilatory reduction of iron or manganese. *Applied Environmental Microbiology* 54: 1472-1480.

Luef, B., S.C. Fakra, R. Csencsits, et al. 2013. Iron-reducing bacteria accumulate ferric oxyhydroxide nanoparticle aggregates that may support planktonic growth. *ISME Journal* 7: 338-50.

Lyons, W.B., D.T. Long, M.E. Hines, H.E. Gaudette, & P.B. Armstrong. 1984.

- Calcification of cyanobacterial mats in Solar Lake, Sinai. *Geology* 12: 623-626.
- Martin, J.M., & M. Meybeck. 1979. Elemental mass-balance of material carried by major world rivers. *Marine Chemistry* 7: 106-173.
- Martin, J.H., & S.E. Fitzwater. 1988. Iron deficiency limits phytoplankton growth in the northeast Pacific subarctic. *Nature* 331: 341-343.
- Martin, J.H., K.H. Coale, K.S. Johnson, & S.E. Fitzwater, et al. 1994. Testing the iron hypothesis in ecosystems of the equatorial Pacific Ocean. *Nature* 371: 123-129.
- Megonigal, J.P., M.E. Hines, & P.T. Visscher. 2004. Anaerobic metabolism: Linkage to trace gases and aerobic processes, 317-424 in Schlesinger, W.H. (Editor). *Biogeochemistry*. Elsevier-Pergamon, Oxford, UK.
- McInerney, M.J., J.R. Sieber, & R.P. Gunsalus. 2009. Syntrophy in anaerobic global carbon cycles. *Current Opinion in Biotechnology* 20: 623-632.
- Montero, P., G. Daneri, L.A. Cuevas, H.E. Gonzalez, B. Jacob, L. Lizarraga, & E. Menschel. 2007. Productivity cycles in the coastal upwelling area off Concepción: the importance of diatoms and bacterioplankton in the organic carbon flux. *Progress in Oceanography* 75: 518-530.
- Mopper, K., & D. Kieber. 1991. Distribution and biological turnover of dissolved organic compounds in the water column of the Black Sea. *Deep Sea Research* 38: 1021-1047.
- Morita, R.Y., 1980. Calcite precipitation by marine bacteria. *Geomicrobiology Journal* 2: 63-82
- Morris, B.E.L., R. Henneberger, H. Huber, & C. Moissl-Eichinger. 2013. Microbial syntrophy: interaction for the common good. *FEMS Microbiology Reviews* 37: 384-406.
- Morse, J.W., & F.T. Mackenzie. 1998. Hadean Ocean carbonate geochemistry. *Aquatic Geochemistry* 4: 301-319.
- Müller, V. 2001. Bacterial Fermentation. *Encyclopedia of Life Sciences & Nature Publishing Group* 1-7.
- Müller, M. 2003. Energy metabolism. Part I: anaerobic protozoa. *Molecular Medical Parasitology*, 125-139. Edited by J. Marr, T. Nilsen & R. Komunieki. London: Academic Press.
- Muyzer, G., & A.J., Stams. 2008. The ecology and biotechnology of sulphate-reducing bacteria. *Nature Reviews Microbiology* 6(6): 441-454.
- Nedwell, D.B. 1999. Effect of low temperature on microbial growth: lowered affinity for substrates limits growth at low temperature. *FEMS Microbiology Ecology* 30: 101-111.

- Nisman, B. 1954. The Stickland Reaction. *Bacteriological Reviews* 18: 16-42.
- Pantoja, S., J. Sepúlveda, & H. González. 2004. Decomposition of sinking proteinaceous material during fall in the oxygen minimum zone off northern Chile. *Deep-Sea Research I* 51: 55-70.
- Pantoja, S., P. Rossel, R. Castro, L.A. Cuevas, G. Daneri, & C. Córdova. 2009. Microbial degradation rates of small peptides and amino acids in the OMZ of Chilean coastal waters. *Deep-Sea Research II* 56: 1055-1062.
- Peckman, J., J. Paul, & V. Thiel. 1999. Bacterially mediated formation of diagenetic aragonite and native sulphur in Zechstein carbonates (Upper Permian, central Germany). *Sedimentary Geology*. 126: 205-222.
- Pilson, M.E.Q. 1998. *An Introduction to the Chemistry of the Sea*, Prentice Hall, Inc. Upper Saddle River, NJ. 431 pp.
- Pimenov, N.V., & Neretin, L. 2006. Composition and activities of microbial communities involved in carbon, sulfur, nitrogen and manganese cycling in the oxic/anoxic interface of the Black Sea, edited by: Neretin, L. N., Past and present Water Column Anoxia. NATO Science Series: IV: Earth and Environmental Sciences 501-502.
- Pomeroy, L.R., & Wiebe, W.J. 2001. Temperature and substrates as interactive limiting factors for marine heterotrophic bacteria. *Aquatic Microbial Ecology* 23: 187-204.
- Poulton, S.W., & R. Raiswell. 2000. Solid phase associations, oceanic fluxes and the anthropogenic perturbation of transition metals in world river particulates. *Marine Chemistry* 72: 17-31.
- Ratkowsky, D.A., J. Olley, T.A. McMeekin, & A. Ball. 1982. Relationship between temperature and growth rate of bacterial cultures. *Journal of Bacteriology*. 149: 1-5.
- Riemann, L., & F. Azam. 2002. Widespread N-acetyl-*d*-glucosamine uptake among pelagic marine bacteria and its ecological implications. *Applied Environmental Microbiology*, 68: 5554-5562.
- Romano, A.H., S.J. Eberhard, S.L. Dingle, & T.D. McDowell. 1970. Distribution of the phosphoenolpyruvate:glucose phosphotransferase system in bacteria. *Journal of Bacteriology* 104: 808-813.
- Romano, A., H.J.D. Trifone, & Brustolon, M. 1979. Distribution of the phosphoenolpyruvate:glucose phosphotransferase system in fermentative bacteria. *Journal of Bacteriology* 139: 93-97.
- Sánchez, G.E., C.B. Lange, H.E. González, G. Vargas, P. Muñoz, C. Cisternas, & S. Pantoja. 2012. Siliceous microorganisms in the upwelling center off Concepción, Chile (36S): Preservation in surface sediments and downcore fluctuations during the past 150 years. *Progress in Oceanography* 92 (95): 50-65.
- Sagemann, J., B.B. Jørgensen, & O. Greif. 1998. Temperature dependence and rates of

sulfate reduction in cold sediments of Svalbard, Arctic Ocean. *Geomicrobiology Journal* 15: 85-100.

Schink, B. 1997. Energetics of syntrophic cooperations in methanogenic degradation. *Microbiology and Molecular Biology Review* 61: 262-280.

Schink, B., & A.J.M. Stams. 2002. Syntrophism Among Prokaryotes. En: *The Prokaryotes, An Evolving Electronic Resource for the Microbiological Community*, release 3.8. Edited by M. Dworkin, K.H. Schleifer & E. Stackebrandt. New York: Springer.

Schink, B. 2006. Microbially Driven Redox Reactions in Anoxic Environments: Pathways, Energetics, and Biochemical Consequences. *Engineering in Life Sciences* 6: 228-233.

Schneeberger, A., J. Frings, & B. Schink. 1999. Net synthesis of acetate from CO₂ by *Eubacterium acidaminophilum* through the glycine reductase pathway. *FEMS Microbiology Letters* 177: 1-6.

Schulz, H.N., T. Brinkhoff, T.G. Ferdelman, M.H. Marine, A. Teske, & B.B. Jorgensen. 1999. Dense populations of a giant sulfur bacterium in Namibian shelf sediments. *Science* 284: 493-495.

Seto, B. 1980. The Stickland reaction. En: *Diversity in Bacterial Respiratory Systems*. Edited by: Knowles C. Boca Raton: CRC Press, 2: 50-64.

Shieh, W.Y., A.L. Chen, & H.H. Chiu. 2000. *Vibrio aerogenes* sp. nov., a facultatively anaerobic, marine bacterium that ferments glucose with gas production, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 50: 321-329.

Silver, M.W., A.L. Shanks, & J.D. Trent. 1978. Marine snow: microplankton habitat and source of small-scale patchiness in pelagic populations. *Science* 201: 371-373

Simidu, U. & K. Tsukamoto. 1985. Habitat segregation and biochemical activities of marine members of the family *Vibrionaceae*. *Applied Environmental Microbiology* 50: 781-790.

Simon, M., H.P. Grossart, B. Schweitzer, & H. Ploug. 2002. Microbial ecology of organic aggregates in aquatic ecosystems. *Aquatic Microbial Ecology* 28: 175-211.

Sobarzo, M., K. Shearman & S. Lentz. 2007. Near-inertial motions over the continental shelf off Concepcion, central Chile. *Progress in Oceanography* 75: 348-362.

Shanks, A.L., & M.L. Reeder. 1993. Reducing microzones and sulfide production in marine snow. *Marine Ecology Progress Series* 96: 43-47.

Stams, A.J.M., & C.M. Plugge. 2009. Electron transfer in syntrophic communities of anaerobic bacteria and archaea. *Nature Reviews Microbiology* 7: 568-577.

Stickland, L.H. 1934. Studies in the metabolism of the strict anaerobes (genus *Clostridium*): The chemical reactions by which *Cl. sporogenes* obtains its energy. *Biochemical Journal* 28: 1746-1759.

- Straub, K.L., M. Benz, & B. Schink. 2001. Iron metabolism in anoxic environments at near neutral pH. *FEMS Microbiology Ecology* 34: 181-186.
- Taylor, G.T., M. Iabichella, H. Tung-yuan, M. Scranton, R. Thunell, F. Muller-Karger, & R. Varela. 2001. Chemoautotrophy in the redox transition zone of the Cariaco Basin: A significant midwater source of organic carbon production. *Limnology and Oceanography* 46: 148-163.
- Thamdrup, B., & D.E. Canfield. 1996. Pathways of carbon oxidation in continental margin sediments off central Chile. *Limnology and Oceanography* 41: 1629-1650.
- Thamdrup, B., & S. Fleischer. 1998. Temperature dependence of oxygen respiration, nitrogen mineralization, and nitrification in Arctic sediments. *Aquatic Microbial Ecology*, 15: 191-199.
- Thamdrup, B. 2000. Bacterial manganese and iron reduction in aquatic sediments. *Advances in Microbial Ecology* 16: 41-84.
- Thamdrup, B., & R. Escobedo. 2006. Anaerobic ammonium oxidation in the oxygen-deficient waters off northern Chile. *Limnology & Oceanography* 51: 2145-2156.
- Thornton, D.C.O. 2002. Diatom aggregation in the sea: Mechanisms and ecological implications. *European Journal of Phycology* 37: 149-161.
- Thullner, M., P. Regnier, P. Van Cappellen. 2007. Modeling microbially induced carbon degradation in redox-stratified subsurface environments: concepts and open questions. *Geomicrobiology Journal* 24: 139-155.
- Tsuda, A., et al. 2003. A mesoscale iron enrichment in the western subarctic Pacific induces a large centric diatom bloom. *Science* 300: 958-961.
- Ulloa, O., & S. Pantoja. 2009. The oxygen minimum zone of the eastern South Pacific. *Deep-Sea Research II* 56: 987-991.
- Valdemarsen T., & E. Kristensen. 2010. Degradation of dissolved organic monomers and short-chain fatty acids in sandy marine sediment by fermentation and sulfate reduction. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 74: 1593-1605.
- Van Lith, Y., R. Warthmann, C. Vasconcelos, & J.A. McKenzie. 2003. Microbial fossilization in carbonate sediments: a results of the bacterial surface involvement in dolomite precipitation. *Sedimentology* 50: 237-245.
- Venter, J.C., K. Remington, J.F. Heidelberg, A.L. Halpern, D. Rusch, & J.A. Eisen, et al. 2004. Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso Sea. *Science*, 304: 66-74.
- Visscher, P.T., J.F. Stolz. 2005. Microbial mats as bioreactors: populations, processes, and products. *Palaeogeography Palaeoclimatology Palaeoecology* 219: 87-100.
- Walter, L.M., Bischof, S.A., Patterson, W.P., & T.W. Lyons. 1993. Dissolution and

recrystallization in modern shelf carbonates: evidence from pore water and solid phase chemistry. *Philosophical Transactions of Royal Society London A* 344: 27-36.

Wellsbury P. & R.J. Parkes. 1995. Acetate bioavailability and turnover in an estuarine sediment. *FEMS Microbiology Ecology* 17: 85-94.

Wellsbury, P., K. Goodman, T. Barth, B.A. Cragg, S.P. Barnes, & R.J. Parkes. 1997. Deep marine biosphere fuelled by increasing organic matter availability during burial and heating. *Nature* 388: 573-576.

Westermann, P. 1992. The effect of temperature on the metabolism of hydrogen and butyrate in a temperate swamp ecosystem. *Suo* 43: 289-292.

Westrich, J.T., R.A. Berner. 1988. The effect of temperature on rates of sulfate reduction in marine sediments. *Geomicrobiology Journal* 6: 99-117.

Wiebe, W.J., Sheldon, W.M., & Pomeroy, L.R. 1993. Evidence for an enhanced substrate requirement by marine mesophilic bacterial isolates at minimal growth temperatures. *Microbiology Ecology* 25: 151-159.

Wilde, S. A., J.W. Valley, W.H. Peck, & C.M. Graham. 2001. Evidence from Detrital Zircons for the Existence of Continental Crust and Oceans on the Earth 4.4 Gyr Ago. *Nature* 409: 175-178.

Wood, H.G., & L.G. Ljungdahl. 1991. Autotrophic Character of the Acetogenic Bacteria. En: *Variations in Autotrophic Life*. Shively, J.M., and Barton, L.L. (eds). New York: Academic Press, 201-250.

Warthmann, R., Y. van Lith, C. Vasconcelos, J.A. McKenzie, A.M. Karpoff. 2000. Bacterially induced dolomite precipitation in anoxic culture experiments. *Geology* 28: 1091-1094.

Wright, D.T. 1999. The role of sulfate-reducing bacteria and cyanobacteria in dolomite formation in distal ephemeral lakes of the Coorong region, South Australia. *Sedimentary Geology* 126: 147-157.

Wright, D.T, & Wacey, D. 2005. Precipitation of dolomite using sulphate-reducing bacteria from the Coorong Region, South Australia: significance and implications, *Sedimentology* 52: 987-1008.

Wu HG, M.I. Scranton .1994. Cycling of some low-molecular-weight volatile fatty-acids in a permanently anoxic estuarine basin. *Marine Chemistry* 47: 97-113.

Wu, H.M. Green., & M.I.S. Cranton. 1997. Acetate cycling in the water column and surface sediment of Long Island Sound following a bloom. *Limnology and Oceanography* 42: 705-713.

Wyrтки, K. 1962. The oxygen minima in relation to ocean circulation. *Deep-Sea Research* 9: 11-23.

Zopfi, J., T.G. Ferdelman, B.B. Jorgensen, A. Teske, & B. Thamdrup. 2001. Influence of water columns dynamics on sulfide oxidation and other major biogeochemical processes in the chemocline of Mariager Fjord (Denmark). *Marine Chemistry* 74: 29-51.

Figuras

Figura 1

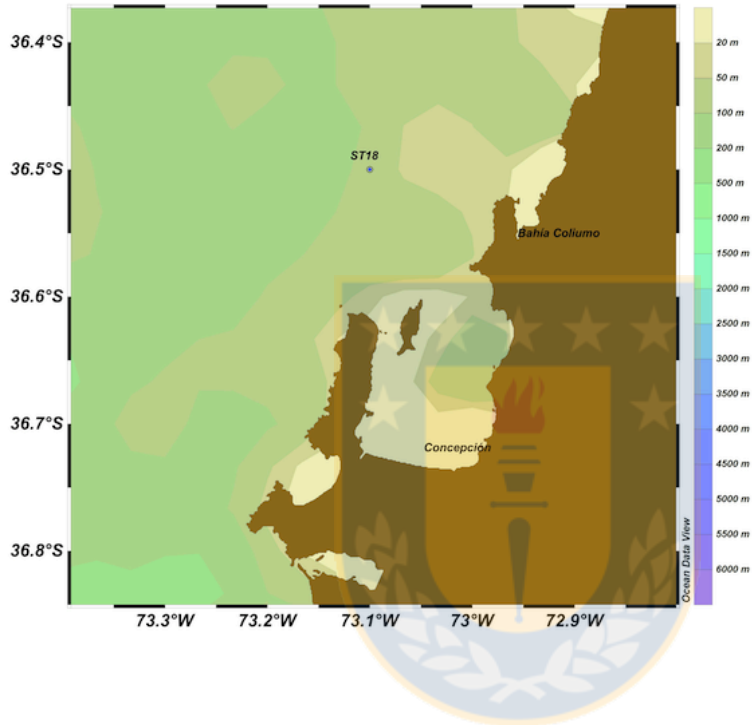
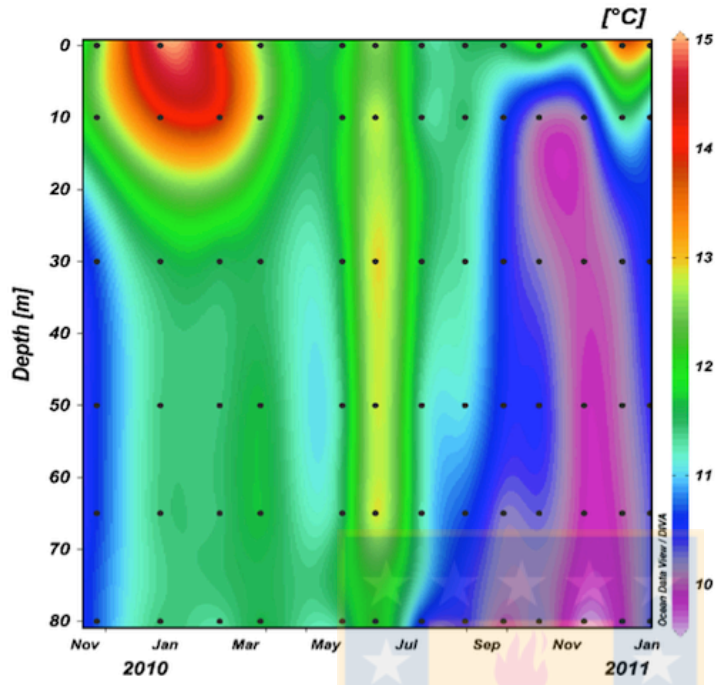
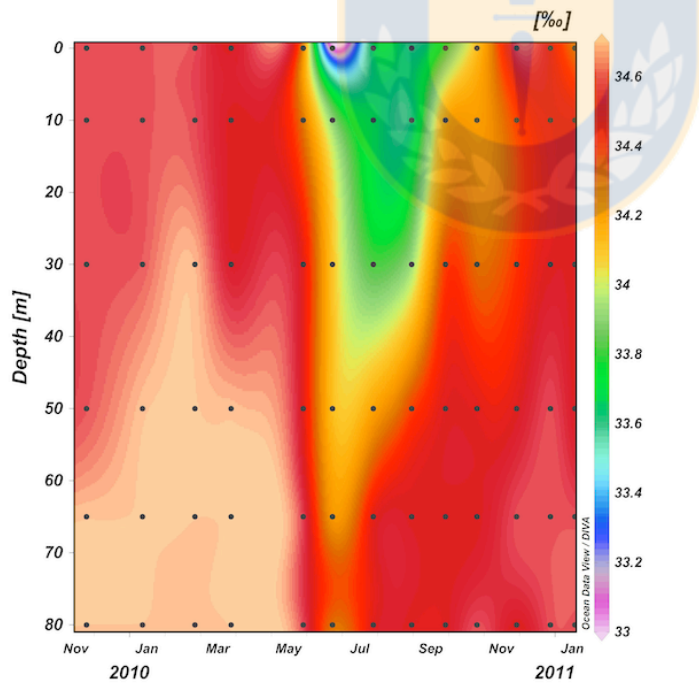


Figura 2

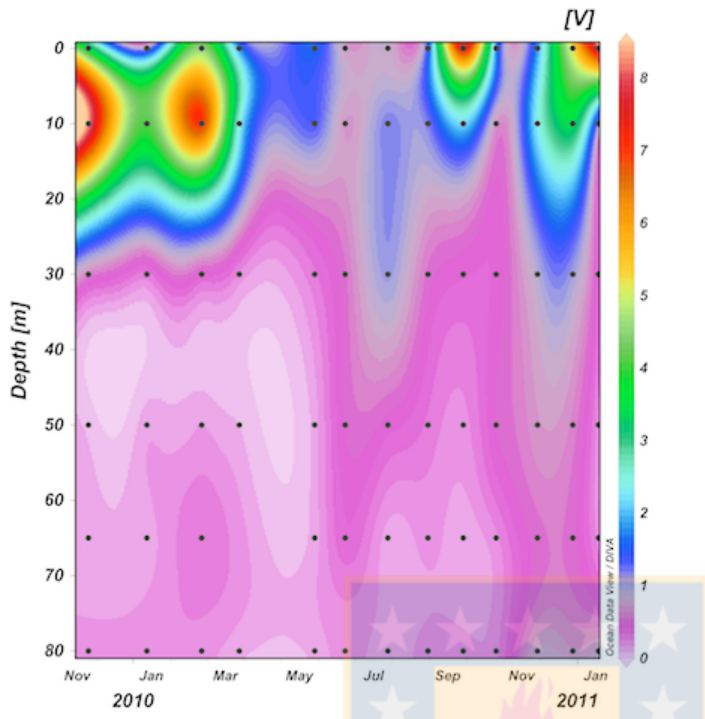
A)



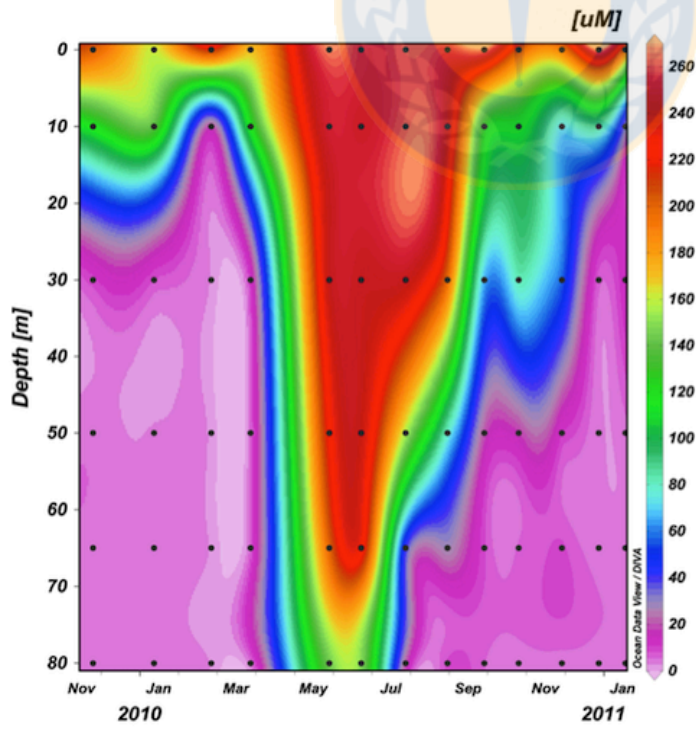
B)



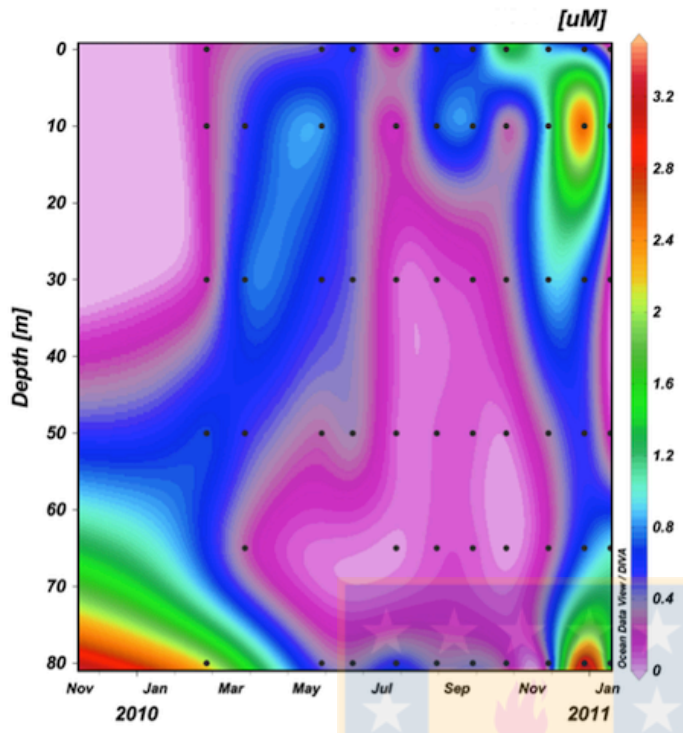
C)



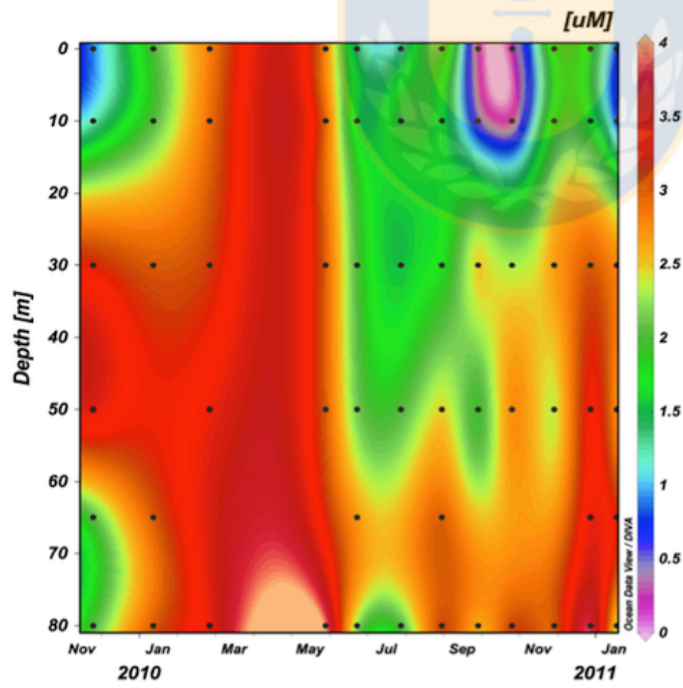
D)



E)



F)



G)

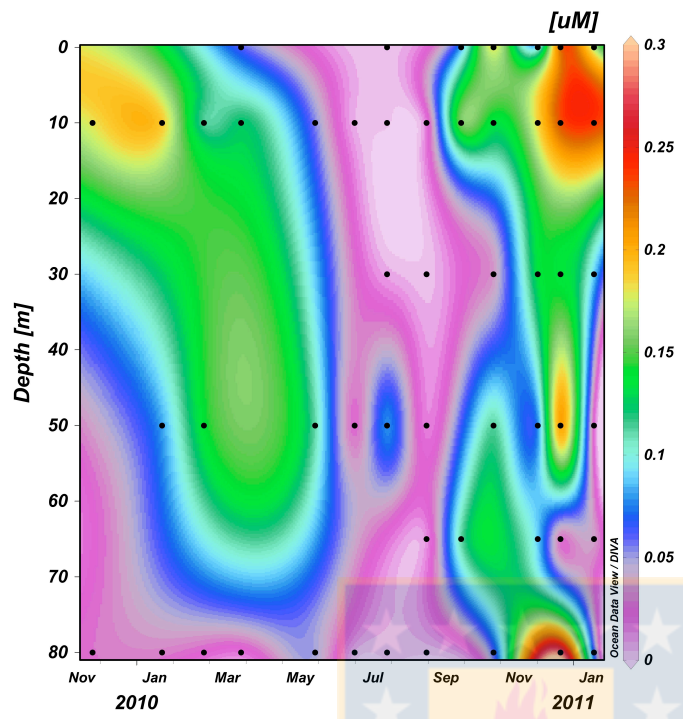


Figura 3

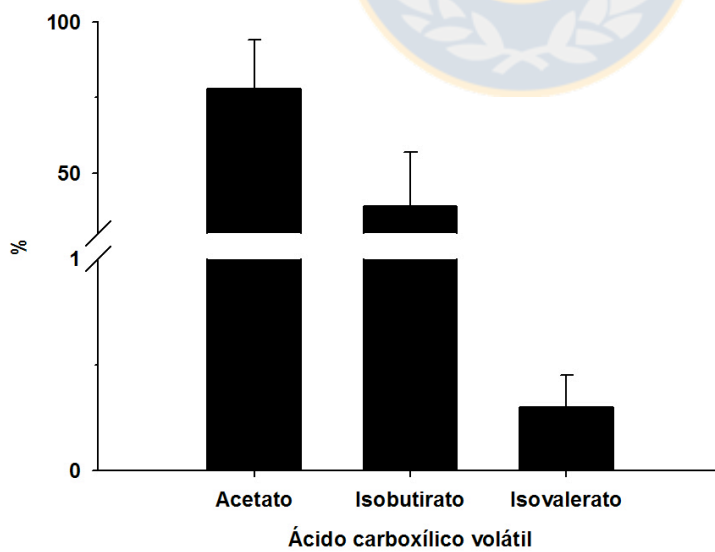
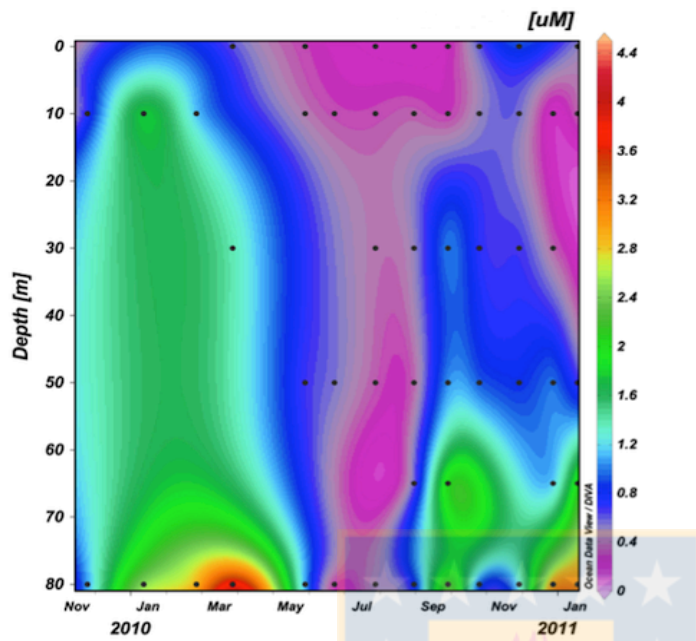
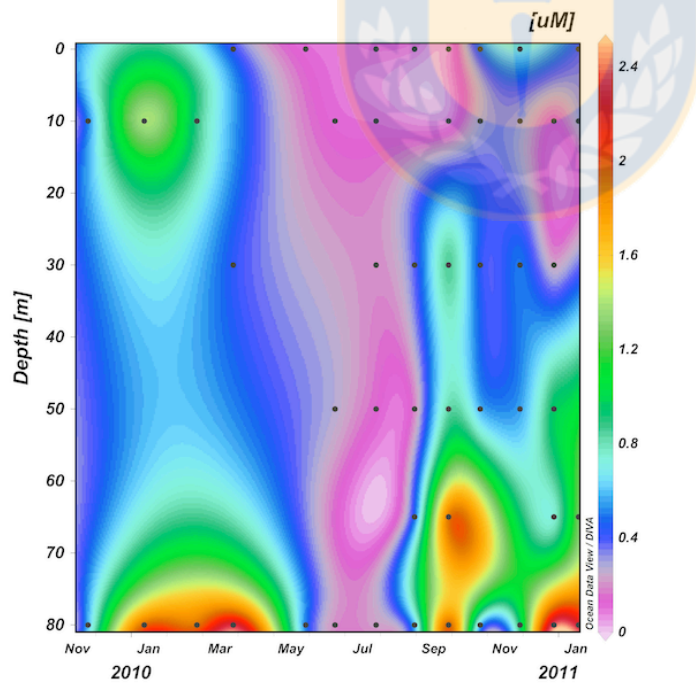


Figura 4

A)



B)



C)

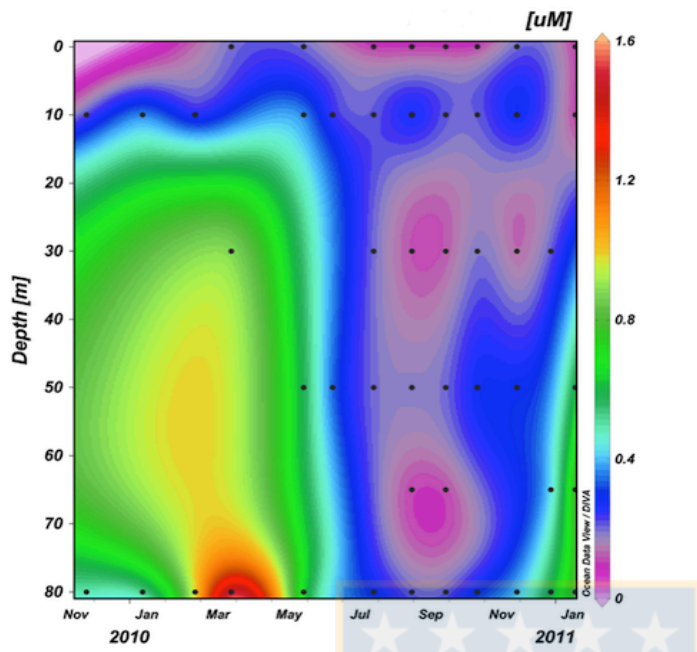
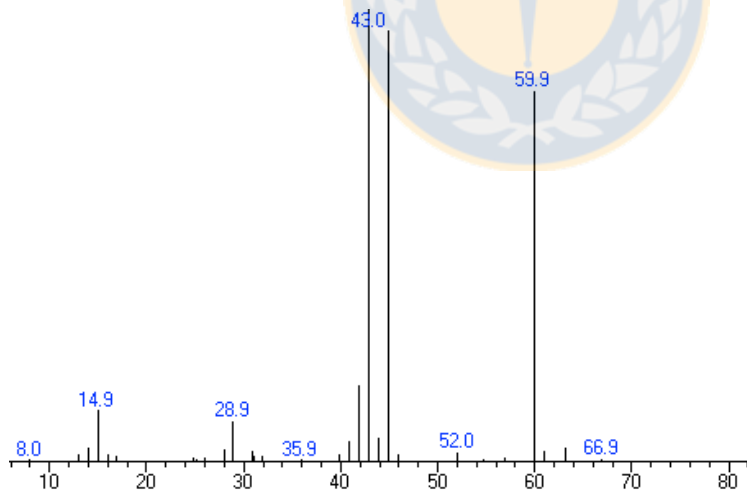


Figura 5

A)



B)

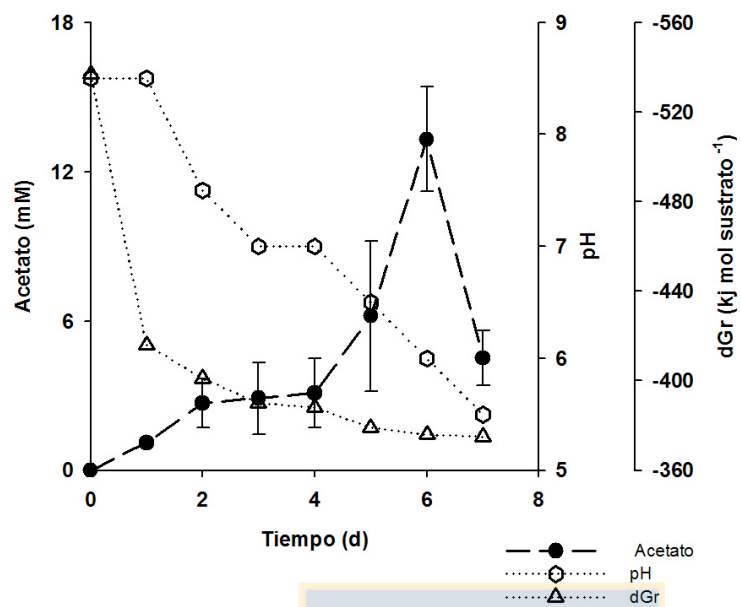
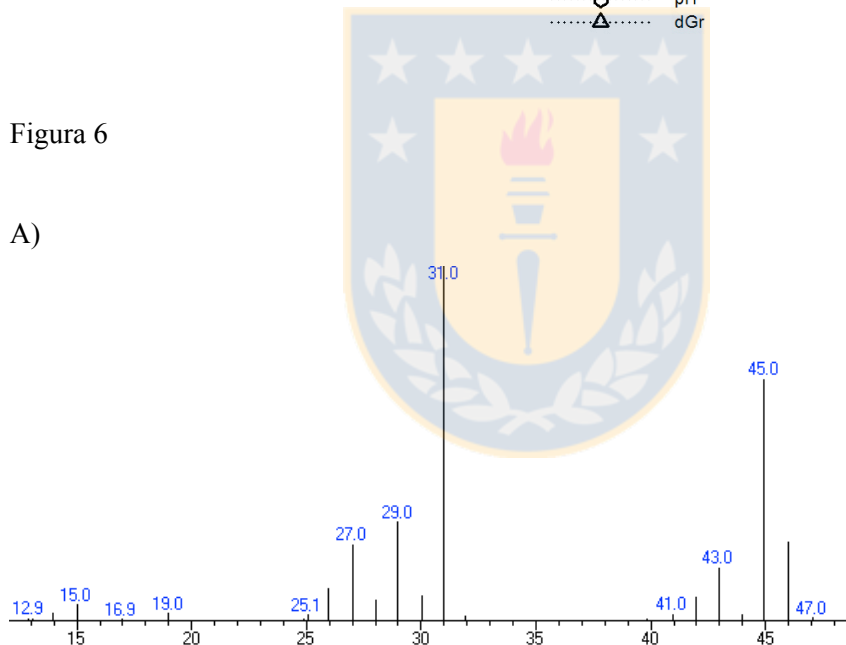


Figura 6

A)



B)

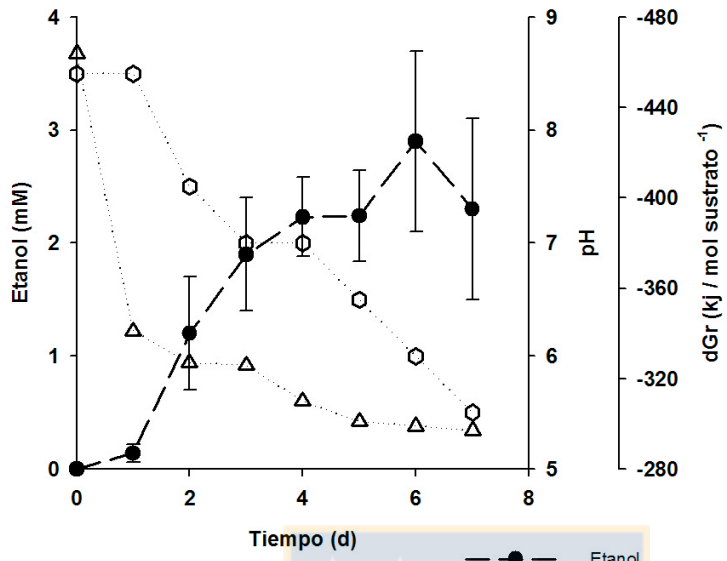


Figura 7

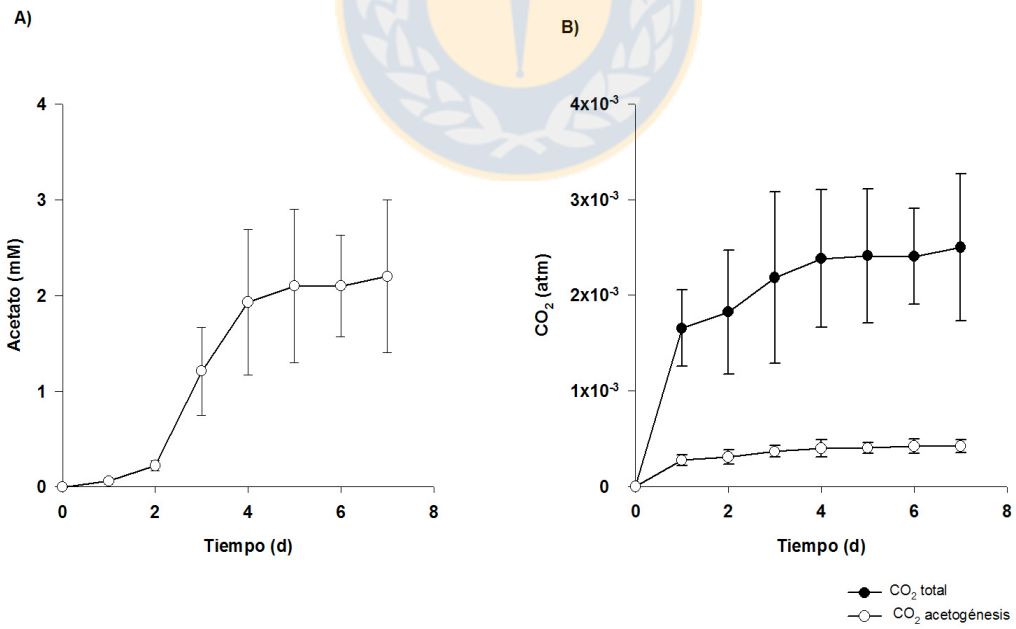
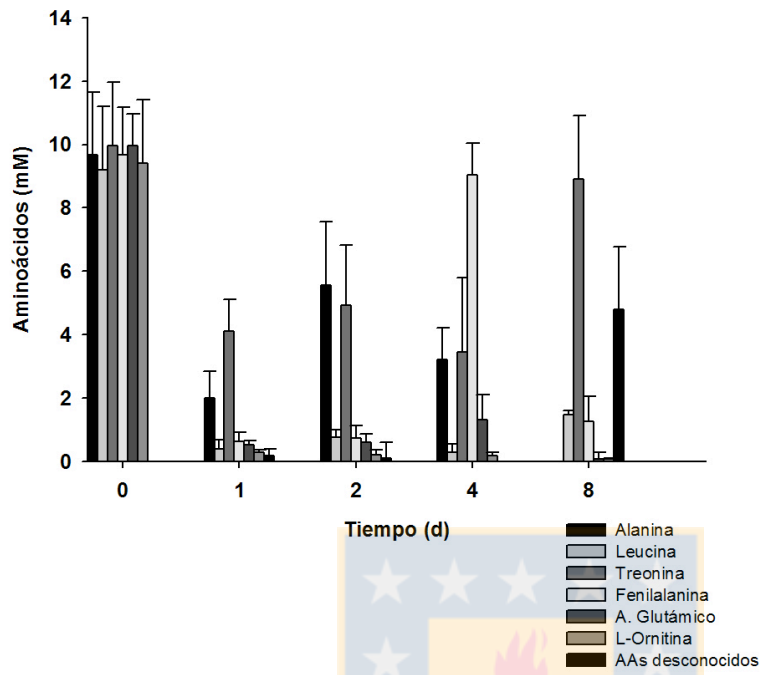


Figura 8

A)



B)

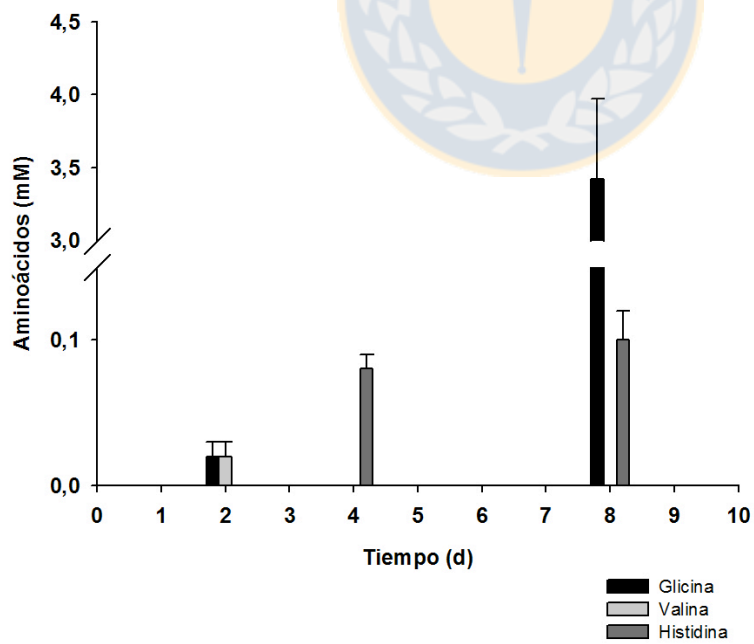
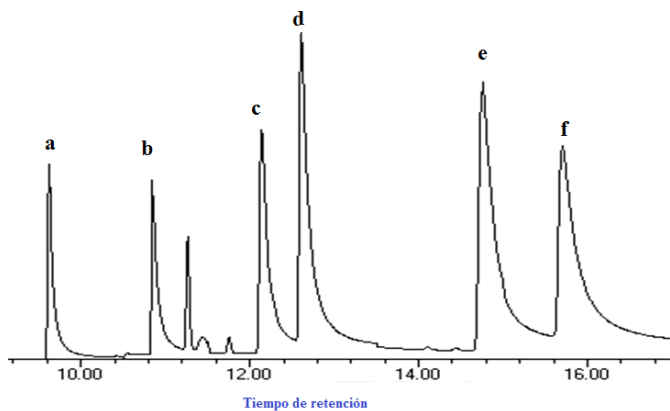
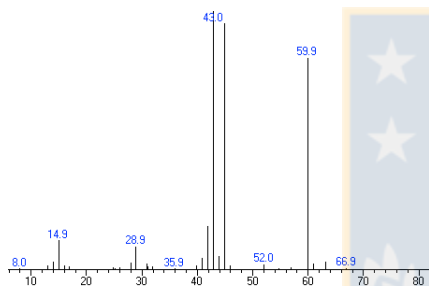


Figura 9

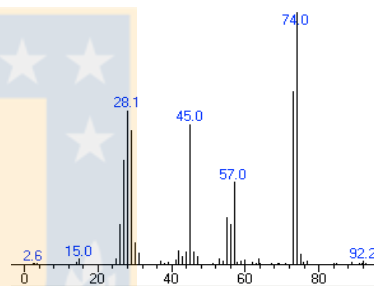
A)



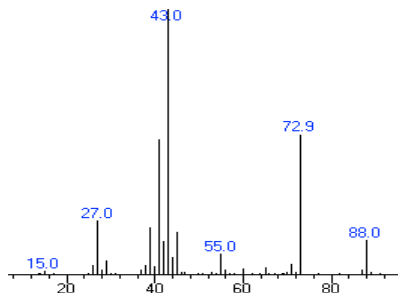
B)



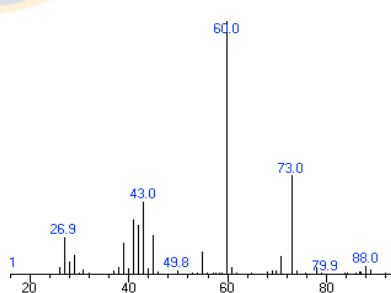
C)



D)



E)



F)

G)

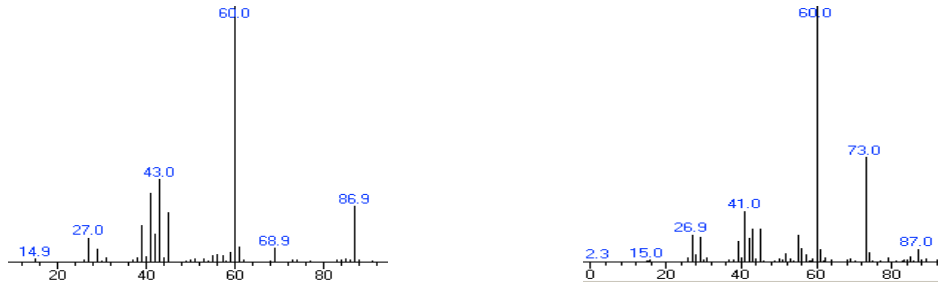
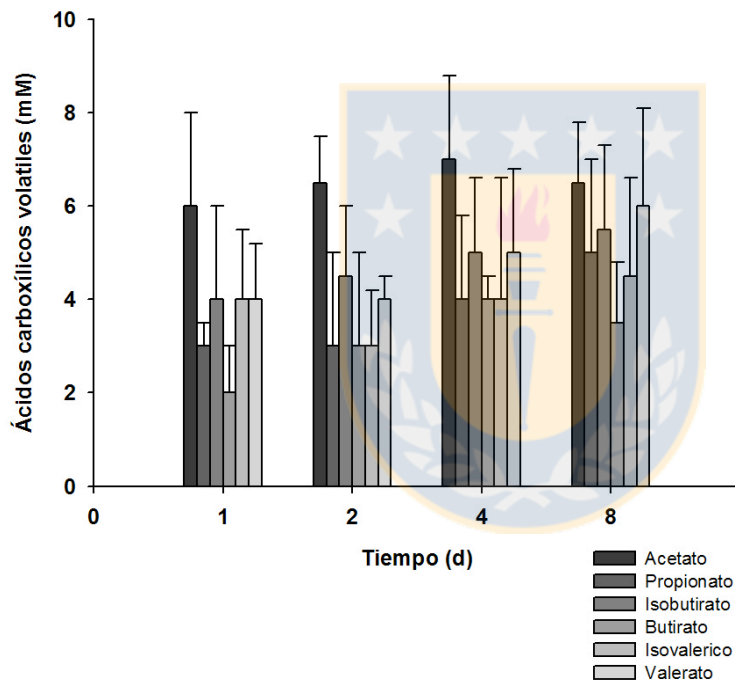


Figura 10

A)



B)

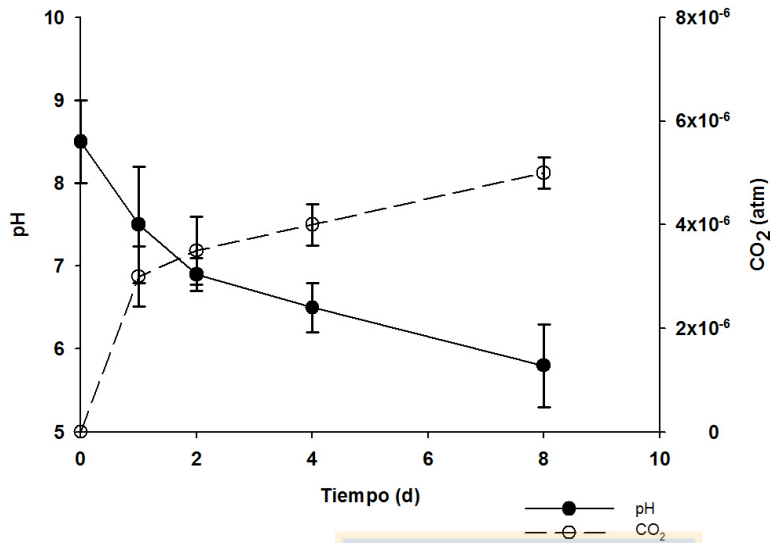


Figura 11

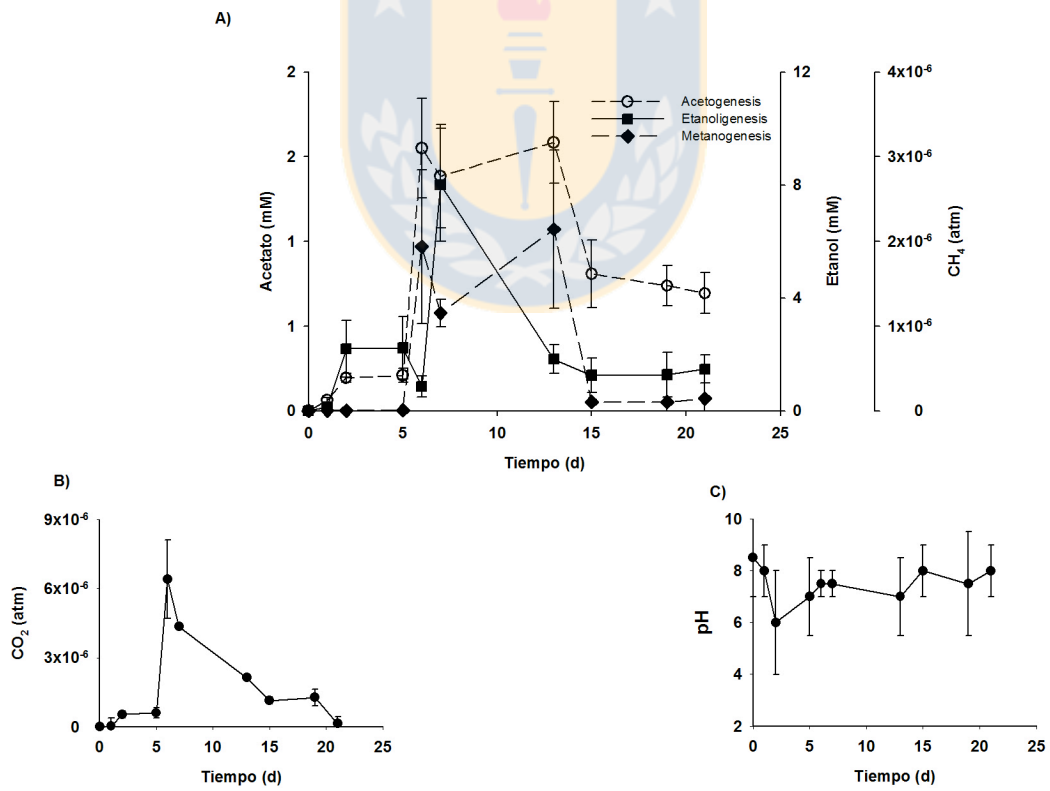
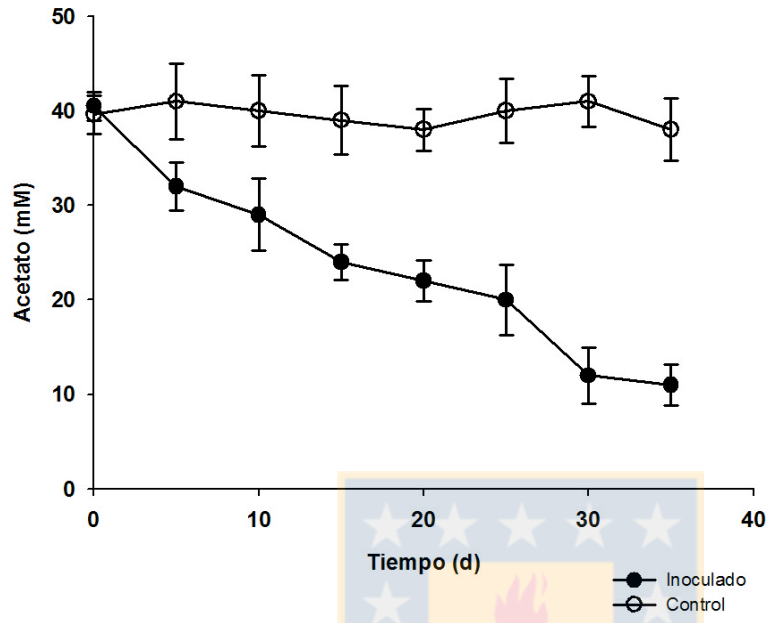
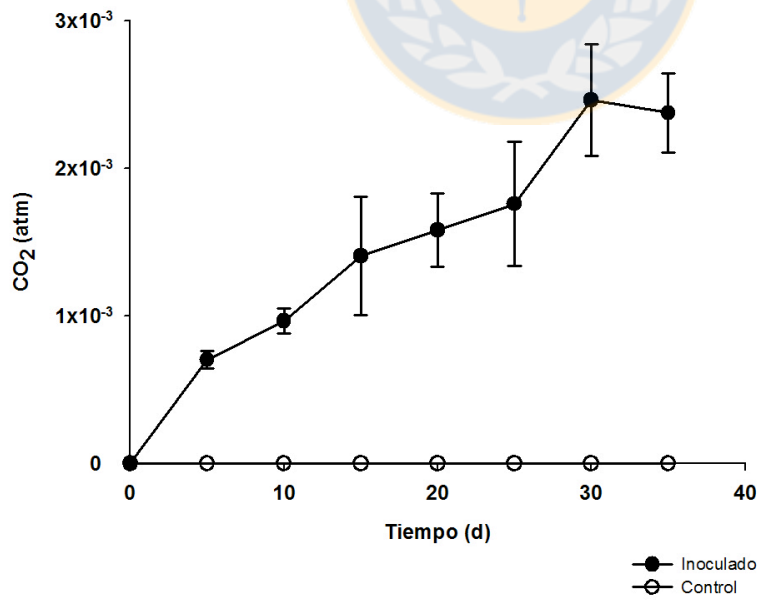


Figura 12

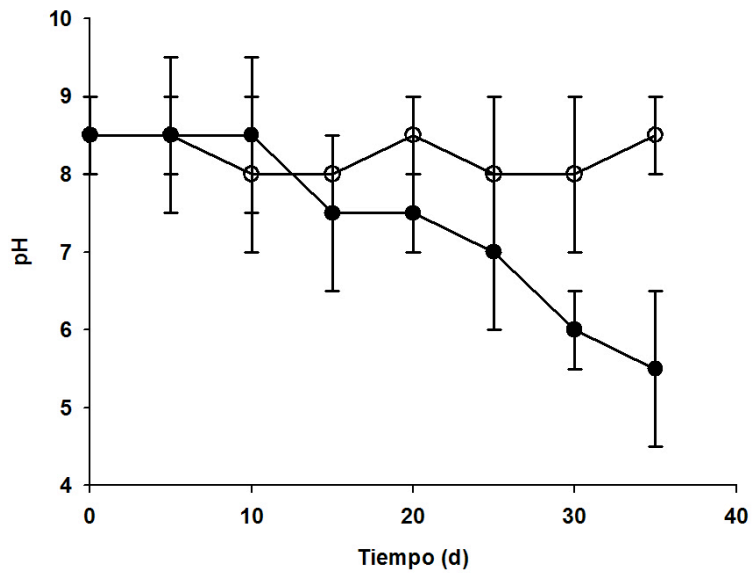
A)



B)



C)



D)

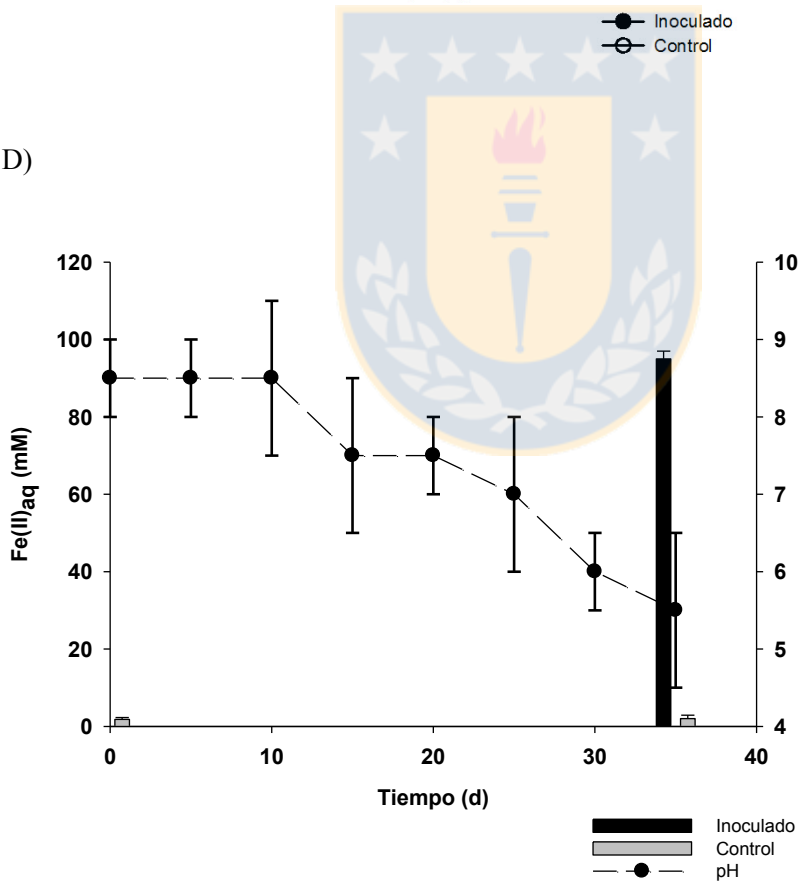


Figura 13

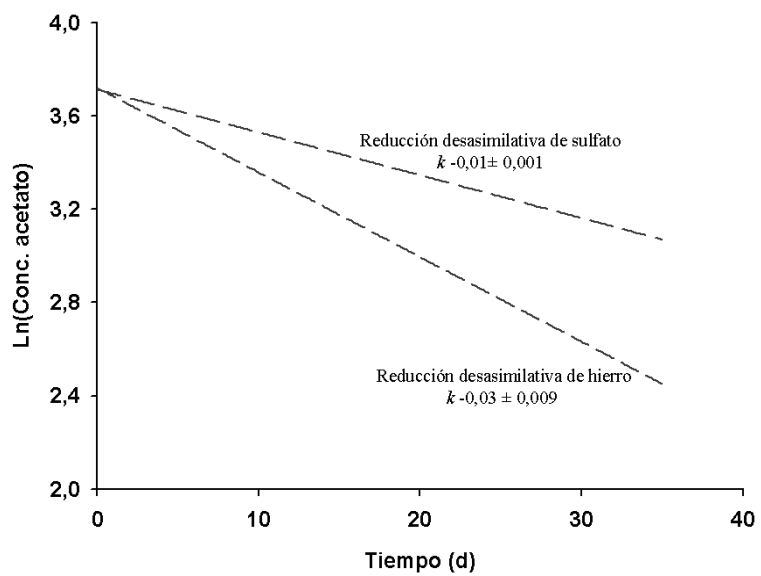
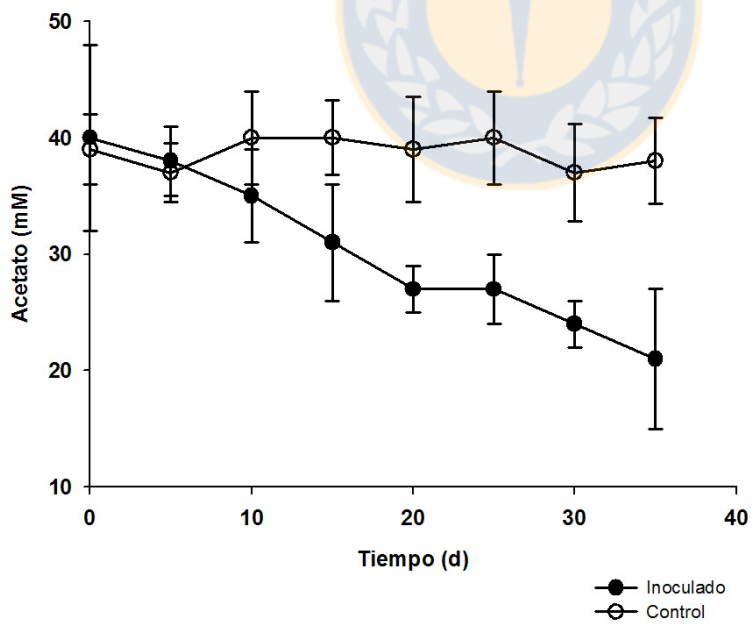
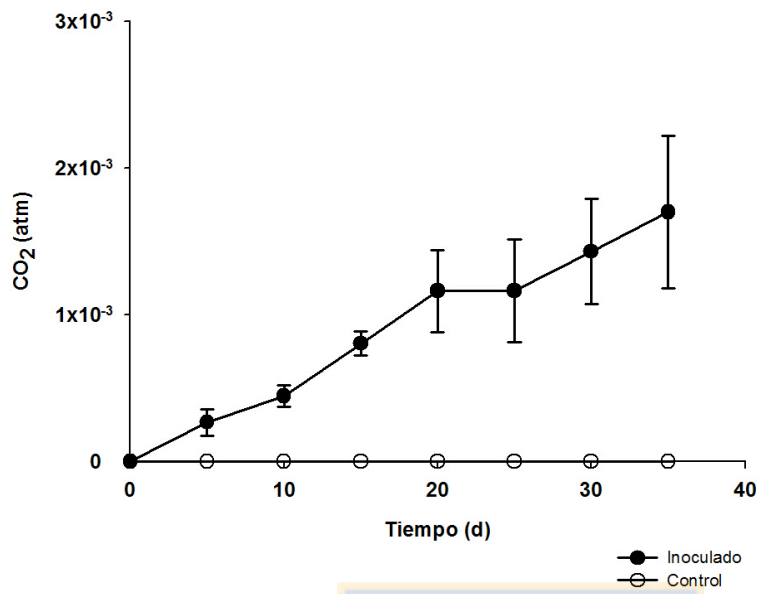


Figura 14

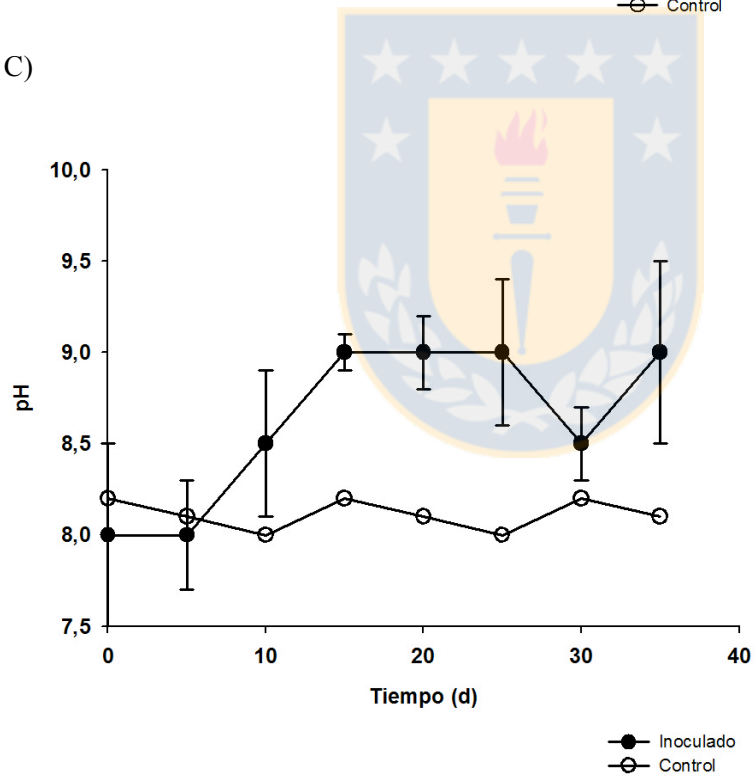
A)



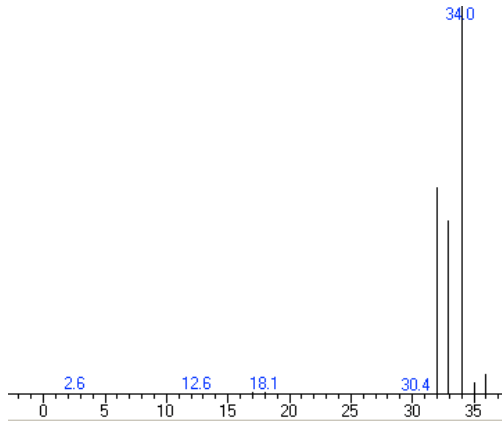
B)



C)



D)



E)

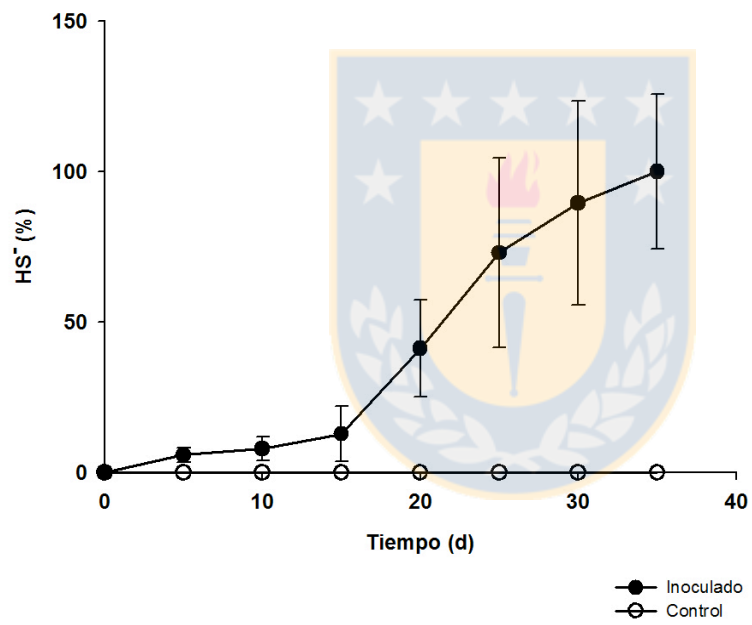


Tabla 1

	Acetato	Isobutirato	AGVs	Aas	NH ₄ ⁺	NO ₃ ⁻	PO ₄ ⁻	O ₂	T	S	Fluorescencia
Acetato	1	*0,6	*0,9	*0,3	*0,2	0,1	0,2	*-0,3	*-0,3	0,1	*0,3
Isobutirato	*0,7	1	*0,8	*0,3	0,2	0,0	*0,2	0,1	*-0,3	0,1	0,2
AGVs	*0,9	*0,8	1	*0,3	*0,2	0,1	0,2	*-0,3	*-0,4	0,2	*0,2
Aas	*0,3	*0,3	*0,3	1	*0,3	0,0	0,0	0,1	-0,1	-0,1	*0,3
NH ₄ ⁺	*0,2	0,2	*0,2	0,3	1	-0,1	0,0	0,1	-0,1	*-0,2	*0,3
NO ₃ ⁻	0,1	0,0	0,1	0,0	-0,1	1	*0,6	*-0,2	*-0,3	0,1	-0,1
PO ₄ ⁻	0,2	*0,2	0,2	0,0	0,0	*0,6	1	*-0,2	*-0,2	*0,2	0,0
O ₂	*-0,3	-0,1	*-0,3	0,1	0,1	*-0,2	*-0,2	1	*0,5	*-0,7	*0,3
T	*-0,3	*-0,3	*-0,4	-0,1	-0,1	*-0,3	*-0,2	*0,5	1	*-0,3	0,2
S	0,1	0,1	0,2	-0,1	*-0,2	0,1	*0,2	*-0,7	*-0,3	1	-0,1
Fluorescencia	*0,3	0,2	*0,2	0,3	*-0,3	-0,1	0,0	*0,3	0,2	-0,1	1

*: R_s > p < 0,05

Aas: aminoácidos libres totales

AGVs: ácidos grasos volátiles totales

Tabla 2

Kruskal-Wallis ANOVA by Ranks; AGVs Totales (ANOVA SCFAs)				Kruskal-Wallis ANOVA by Ranks; AGVs Totales (ANOVA SCFAs)			
Independent grouping variable: Redox condition				Independent grouping variable: Season			
Kruskal-Wallis test: H (1; N=58)= 13.4517 p = 0.0002				Kruskal-Wallis test: H (1; N=58)= 15.8369 p = 0.0001			
	Code	Valid N	Sum of Ranks		Code	Valid N	Sum of Ranks
Grupo 1	1	34	771	Grupo 1	1	34	1310
grupo 2	2	24	940	grupo 2	2	24	401

Kruskal-Wallis ANOVA by Ranks; Acetate (ANOVA SCFAs)				Kruskal-Wallis ANOVA by Ranks; Acetate (ANOVA SCFAs)			
Independent grouping variable: Redox condition				Independent grouping variable: Season			
Kruskal-Wallis test: H (1; N=58)= 11.8492 p = 0.0006				Kruskal-Wallis test: H (1; N=58)= 16.2136 p = 0.0001			
	Code	Valid N	Sum of Ranks		Code	Valid N	Sum of Ranks
Grupo 1	1	34	787	Grupo 1	1	34	1311
grupo 2	2	24	925	grupo 2	2	24	339

Kruskal-Wallis ANOVA by Ranks; Isobutirate (ANOVA SCFAs)				Kruskal-Wallis ANOVA by Ranks; Isobutirate (ANOVA SCFAs)			
Independent grouping variable: Redox condition				Independent grouping variable: Season			
Kruskal-Wallis test: H (1; N=58)= 7.0305 p = 0.0080				Kruskal-Wallis test: H (1; N=58)= 1.4131 p = 0.2362			
	Code	Valid N	Sum of Ranks		Code	Valid N	Sum of Ranks
Grupo 1	1	34	836	Grupo 1	1	34	1135
grupo 2	2	24	875	grupo 2	2	24	575

Tabla 3

Reacción	Ecuación	¹ Concentración dador e ⁻ (M)	² Concentración aceptor e ⁻ (M)	T (°K)	pH	ΔGr (kJ/mol sustrato)
Fermentación	1) C ₆ H ₁₂ O ₆ + H ₂ O = 2CH ₃ COO ⁻ + 2HCO ₃ ⁻ + 4H ⁺ + 4H ₂	1x10 ⁻⁷	S/A	283	7,8	-283
Desnitrificación	2) 10CH ₃ COO ⁻ + 14NO ₃ ⁻ + 14H ⁺ = 20HCO ₃ ⁻ + 7N ₂ + 22H ₂ O	2x10 ⁻⁶	2x10 ⁻³	283	7,8	-3310
Reducción de hierro	3) CH ₃ COO ⁻ + 8Fe(OH) ₃ + 15H ⁺ = 2HCO ₃ ⁻ + 8Fe(II) _{aq} + 20H ₂ O	2x10 ⁻⁶	2x10 ⁻⁷	283	7,8	-98
Reducción de sulfato	4) CH ₃ COO ⁻ + SO ₄ ²⁻ = 2HCO ₃ ⁻ + HS ⁻	2x10 ⁻⁶	2x10 ⁻²	283	7,8	-103

¹ Concentración de glucosa en agua de mar (Azzam & Hodson 1981; Vaccaro et al. 1968; Bada & Lee 1977; Concentración de acetato: valores obtenidos en el presente estudio
² Concentración de nitrato: valores obtenidos del presente estudio. Concentración de hidruro de hierro en fase precipitada de acuerdo a Adchenberg et al. 2001; Gleichbill & Buck 2012.
Concentración de sulfato de acuerdo a Pilson 1998. Concentración de bicarbonato de acuerdo a Pilson 1998.

Tabla 4

Fermentación	Ecuación	k (d) ⁻¹	Tasa de producción (mg-C/L/d)
Acetogénica	1) C ₆ H ₁₂ O ₆ + 4H ₂ O = CH ₃ COO ⁻ + 4CO ₂ + H ⁺ + 7H ₂	0,04 ± 0,008	0,9 ± 0,2
Etanoligénica	2) C ₆ H ₁₂ O ₆ = 2C ₂ H ₅ OH + 2CO ₂	0,01 ± 0,001	0,3 ± 0,05

Tabla 5

Reacción	Ecuación	Concentración dador e ⁻ (M)	Concentración aceptor e ⁻ (M)	T (°K)	pH	ΔGr (kJ/mol sustrato)
Fermentación acetogénica	1) C ₆ H ₁₂ O ₆ + 4H ₂ O = CH ₃ COO ⁻ + 4CO ₂ + H ⁺ + 7H ₂	1x10 ⁶	S/A	283	7,8	-408
Fermentación etanoligénica	2) C ₆ H ₁₂ O ₆ = 2C ₂ H ₅ OH + 2CO ₂	2x10 ⁶	2x10 ⁻⁵	283	7,8	-276
Metanogénesis hidrogenotrófica	3) 4H ₂ + CO ₂ = CH ₄ + 2H ₂ O	N.D	2x10 ⁻⁷	283	7,8	N.D
Acetogénesis autotrófica	4) 2H ₂ + CO ₂ = CH ₃ COO ⁻ + H ⁺	N.D	2x10 ⁻⁷	283	7,8	N.D
Acetogénesis etanoltrófica	5) 2C ₂ H ₅ OH + 2H ₂ O = 2CH ₃ COO ⁻ + 4H ₂ + 2H ⁺	2x10 ⁻²	S/A	283	7,8	-18
Mixotrofia	6) 2C ₂ H ₅ OH + 2CO ₂ + H ₂ O = 3CH ₃ COO ⁻ + H ₂ O + 3H ⁺	2x10 ⁶	2x10 ⁻⁷	283	7,8	-273
Metanogénesis acetoclástica	7) CH ₃ COO ⁻ + H ⁺ = CH ₄ + CO ₂	2x10 ⁻⁷	S/A	283	7,8	-89

N.D: no determinado
S/A: sin aceptor de

Títulos de la figuras

Fig. 1. Ubicación del sitio de estudio (Estación 18) en el ecosistema de surgencia de Chile central frente a Concepción (36°S)

Fig. 2. Variabilidad oceanográfica en la columna de agua frente a Concepción (36°S) durante el periodo 2009 y 2011. A) temperatura, B) salinidad, C) fluorescencia, D) concentración de O₂, E) concentración de NH₄⁺, F) concentración de PO₄⁻ G) concentración de aminoácidos libres.

Fig. 3: Abundancias relativas de acetato, isobutirato e isovalerato en la columna de agua fuera de Concepción (36°S) durante el periodo de estudio

Fig. 4: Abundancias y distribución vertical y temporal de la concentración de ácidos carboxílicos volátiles en la columna de agua del sitio de estudio. A) ácidos grasos carboxílicos detectados (acetato + isobutirato+ isovalerato), B) acetato, C) isobutirato

Fig. 5: A) Espectro de masa de acetato producido mediante la fermentación anaerobia de glucosa. B) Evolución de la concentración de acetato, pH y energía libre de formación durante el periodo de incubación fermentativa anaeróbica. La concentración de acetato es presentado como promedio ± desviación estándar.

Fig. 6: A) Espectro de masa de etanol producido mediante la fermentación anaerobia de glucosa. B) Evolución en la concentración de etanol, pH y energía libre de formación durante el periodo de incubación fermentativa anaeróbica. La concentración de etanol es presentado como promedio ± desviación estándar.

Fig. 7: A) Concentración de acetato formado durante el periodo de incubación bajo

condiciones desnitrificantes. Concentraciones expresadas como valores promedios \pm desviación estándar.

Fig. 7: B) Concentración total de CO₂ formado a partir de la fermentación y oxidación de glucosa durante el periodo de incubación bajo condiciones desnitrificantes (círculos negros) y concentración de CO₂ formada mediante la fermentación de glucosa a acetato calculada estequiométricamente (círculos blancos). Concentraciones expresadas como valores promedios \pm desviación estándar.

Fig. 8: A) Concentración de aminoácidos durante el periodo de incubación fermentativa de aminoácidos B) Concentración de aminoácidos formados durante el periodo de incubación. Concentraciones expresadas como valores promedios \pm desviación estándar.

Fig. 9: A) Cromatografía de gas obtenida de la fase gaseosa de la incubación fermentativa de aminoácidos. a) acetato, b) propionato, c) isobutirato, d) butirato, e) isovalerato, f) valerato. Espectros de masa de los metabolitos producidos desde la fermentación de aminoácidos de: B) acetato, C) propionato, D) isobutirato, E) butirato, F) isovalerato, G) valerato.

Fig. 10: A) Producción fermentativa de ácidos carboxílicos volátiles en función del tiempo de incubación. Los datos son expresados como promedio \pm desviación estándar. B) variación temporal de pH y presión parcial de CO₂ en la incubación fermentativa de aminoácidos. Datos expresados como promedio \pm desviación estándar.

Fig. 11: A) Variación temporal en las concentraciones de acetato, etanol y CH₄ durante la incubación anaerobia fermentativa con glucosa como sustrato inicial. Datos expresados como promedio \pm desviación estándar. B) Evolución temporal de la presión parcial de CO₂ en la fase gaseosa de la incubación anaerobia fermentativa. C) Variación temporal de la actividad de protones en la fase líquida de la incubación expresada como pH.

Fig.12: A) Variación temporal en las concentraciones de acetato durante la incubación anaerobia reductora de Fe(III)_s. Las concentraciones son expresadas como promedio \pm desviación estándar. B) Evolución de las presiones parciales de CO₂ en la fase gaseosa de

la incubación anaerobia reductora de Fe(III)_s . C) Variación temporal de la actividad de protones en la fase líquida de la incubación expresada como pH y concentraciones iniciales y finales de $\text{Fe(II)}_{\text{aq}}$.

Fig. 13: Tasas constantes aparentes de degradación para la reducción acetotrófica no asimilativa de hierro y sulfato durante el periodo de incubación.

Fig. 14: A) Variación temporal en las concentraciones de acetato durante la incubación anaerobia reductora de SO_4^- . Las concentraciones son expresadas como promedio \pm desviación estándar. B) Evolución de las presiones parciales de CO_2 en la fase gaseosa de la incubación anaerobia reductora de SO_4^- . C) Variación temporal de la actividad de protones en la fase líquida de la incubación expresada como pH. D) Espectro de masa del HS^- detectado en la fase gaseosa de la incubación anaerobia reductora de SO_4^- . E) Variación temporal en la abundancia relativa de HS^- en función del tiempo de incubación.

Tabla 1: Matriz de correlaciones no paramétricas de Spearman entre las variables oceanográficas físico-químicas ambientales analizadas en este trabajo. Valores destacados corresponden a correlaciones estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

Tabla 2: Análisis de las variancias (ANDEVA) de una vía, no paramétrica, calculadas mediante la prueba de Kruskal-Wallis. Las variables dependientes fueron concentración ambiental de ácidos grasos carboxílicos volátiles (μM), concentraciones de acetato (μM) y concentraciones de isobutirato (μM). Los factores categóricos independientes considerados fueron a) oxigenación: condición óxica (concentración de oxígeno $>> 22 \mu\text{M}$) y condición subóxica/anóxica (concentración de $\text{O}_2 < 22 \mu\text{M}$), b) Estacionalidad: estación de otoño-invierno (Mayo-Agosto), estación de primavera verano (Noviembre-2009, Septiembre-Diciembre-2010, Enero-2011).

Tabla 3: Energías libres de formación bajo condiciones ambientales reales (ΔGr) para: 1) fermentación de glucosa; 2) desnitrificación acetotrófica; 3) reducción no-asimilativa acetotrófica de Fe(III)_s y 3) reducción no-asimilativa acetotrófica de SO_4^- .

Tabla 4: Tasas de producción fermentativa anaerobia de acetato y etanol en incubaciones

inoculadas con microorganismos provenientes de la Zona de Mínimo Oxígeno frente a Concepción (36°S).

Tabla 5: Metabolismos sintróficos inferidos, estequiometría de las reacciones implicadas y valores de energía libre de formación bajo condiciones experimentales (ΔGr) en incubaciones anaerobias con microorganismos presentes en aguas de la Zona de Mínimo de Oxígeno frente a Concepción (36°S).



CAPÍTULO 4. DISCUSIÓN GENERAL

4.1. Rol de la Zona de Mínimo Oxígeno estacional frente a Concepción sobre la distribución y abundancia de lípidos isoprenoides arqueanos: Implicancias sobre el índice de paleo-temperatura TEX_{86} e inferencias sobre la ecología de las arqueas pelágicas marinas oxidadoras de NH_4^+

Las Zonas de Mínimo Oxígeno son capas de agua subsuperficiales subóxicas, las cuales en el océano oxigenado actual son consideradas como relictos de un antiguo océano anaerobio, las cuales son localizadas en el Pacífico Nororiental Tropical, el Mar de Arabia y el Pacífico Suroriental (Paulmier et al. 2006). Estas regiones son caracterizadas por una alta productividad primaria, la cual es degradada en la columna de agua consumiendo una alta cantidad de O_2 cuyo agotamiento es agudizado por una débil ventilación para generar las Zonas de Mínimo Oxígeno de aguas intermedias/sub superficiales (Wyrky 1962, Helly & Levin 2004, Fuenzalida et al. 2009). Zonas agotadas en O_2 estacionalmente son también conocidas, como es el caso las aguas que yacen sobre la plataforma continental fuera de Chile Central, las que se vuelven agotadas en O_2 durante la estación primavera-verano austral cuando esta es alimentada por la pobremente oxigenada contracorriente Perú-Chile. En otoño e invierno estas se vuelven oxigenadas otra vez por el aporte de las corrientes Sub Antárticas (Levin 2002, Sobarzo 2007, Fuenzalida et al. 2009).

Las Zonas de Mínimo Oxígeno son reconocidas por jugar un rol clave en el ciclo del N, en donde ocurre una significativa pérdida de N desde los océanos del mundo (Codispoti et al. 2001, Gruber 2004, 2008, Lam & Kuypers 2011), mediante la producción de gases N_2O y el N_2 vía denitrificación y oxidación anaerobia de NH_4^+ (Mulder et al. 1995). Sin embargo, la oxidación aerobia de NH_4^+ a NO_2 , proceso de nitrificación mediado por microorganismos, puede compensar la pérdida de N en estas zonas. La oxidación aerobica de NH_4^+ puede ser llevado a cabo por bacterias (Ritchie & Nicholas 1972, Hooper & Terry 1979, Poth & Focht 1985, Stüven et al. 1992, Bock et al. 1995, Schmidt & Bock 1997) y micro-aerofílicamente por arqueas mesofílicas pelágicas marinas (Ward et al. 1989, Karner et al. 2001, Venter et al. 2004, Francis et al. 2005, Könneke et al. 2005, Molina et al. 2007).

A pesar del crítico rol biogeoquímico pelágico y bentónico que cumplen las bacterias oxidadoras de NH_4^+ , estas a menudo dan cuenta de sólo el 0,1% de los ensamblajes bacterianos (Ward 2000). En cambio, las arqueas marinas Thaumarchaeota, responsables

de la oxidación de NH_4^+ son abundantes y ubicuas en el océano (DeLong et al. 1994, Stein & Simon 1996).

Nosotros estudiamos la ocurrencia y composición de los lípidos de membranas de arquea gliceroles dialquil gliceroles tetra éteres (GDGTs) así como el efecto de agotamiento estacional de O_2 en la columna de agua en la distribución tanto vertical como estacional de arqueas pelágicas. Asimismo, evaluamos si la composición molecular de los GDGTs depende de la temperatura como previamente se ha descrito, o puede haber otras variables ambientales que pueden modular la composición molecular de sus membranas y cuales podrían ser sus potenciales implicancias sobre el uso del TEX_{86} , un indicador orgánico de paleo-temperatura superficial del mar. Este índice se basa en la relación observada entre las variaciones de temperatura y el número de anillos ciclo-pentanos y ciclo-hexanos. El tercer objetivo fue estudiar la distribución de la comunidad pelágica arqueana asociada a variaciones estacionales en el contenido de nutrientes, productividad primaria y oxigenación de la columna de agua mediante el uso de estos biomarcadores orgánicos complementado con datos moleculares.

La abundancia relativa de crenarqueol se incrementó durante el periodo de surgencia, principalmente, dentro de la capa subóxica, periodo durante el cual se registraron las temperaturas más bajas y la disminución más notoria de las concentraciones de O_2 (Capítulo 1, FIG. 4 A y B). Bajo la premisa de que la formación de un anillo ciclohexano es una respuesta adaptativa de *Thaumarchaeota* a ambientes con temperaturas relativamente más bajas en las cuales este grupo evolucionó (Sinninghe Damsté et al. 2002), este incremento relativo de crenarqueol no es sorprendente. Las arqueas son capaces de ajustar la composición molecular lipídica de sus membranas para poder prosperar bajo cambios en las condiciones de crecimiento a las que se ven enfrentadas, tales como temperatura, pH y régimen de nutrientes (Pearson et al. 2004, Schouten et al. 2007, Pearson et al. 2008, Boyd et al. 2011). Por el contrario, la adición de estructuras pentacíclicas (sobre cuatro o cinco anillos) en la porción transmembrana de los lípidos aparece como una respuesta adaptativa al incremento de la temperatura ambiental, resultando en un aumentado empaquetamiento y reducida fluidez de las membranas arqueanas (Benvegnu et al. 2008). Esto ha sido observado en cultivos enriquecidos de *thaumarchaeotas* marinas (Wuchter et al. 2004, Schouten et al. 2007) y de arqueas termofílicas (Gliozzi et al. 1983, Ward et al. 1985, DeRosa & Gambacorta 1988, Uda et al. 2001). Así, la relación entre el grado de ciclización y la temperatura de crecimiento *in situ* ha sido propuesta para calcular la temperatura de la capa de mezcla del océano, basado en la distribución de GDGTs en

sedimentos superficiales y profundos (Wuchter et al. 2004, Schouten et al. 2002, Schouten et al. 2003). Sin embargo, variaciones en la distribución de GDGTs en ambientes marinos podrían ser una respuesta a cambio en los regímenes de nutrientes y estrés energético, así como a cambios relativos en la composición comunitaria de Thaumarchaeota y Euryarchaeota (Pearson & Ingalls 2013). En este estudio observamos un grado más alto de ciclización durante el periodo de surgencia, cuando las temperaturas fueron generalmente más bajas que durante el periodo de no-surgencia. Esto sugiere que otros factores, diferentes a la temperatura, podrían controlar la distribución de los GDGTs y consecuentemente las temperaturas derivadas del TEX₈₆ al menos en este ambiente.

Esta noción es apoyada por estudios previos que mostraron que las comunidades pelágicas de thaumarchaeotas varían estacionalmente en respuesta a la variabilidad oceanográfica, las cuales incluyen concentración de nutrientes y O₂ (Massana et al. 1997, Murray et al. 1998, Wuchter et al. 2004, Herfort et al. 2007, Pitcher et al. 2011b, Bale et al. 2013). Por otra parte, recientemente se ha sugerido que no todos los miembros de Thaumarchaeota planctónica son autótrofos estrictos (Ouverney & Fuhrmann 2000, Ingalls et al. 2006, Pearson & Ingalls 2013). Esto podría implicar que la diversidad metabólica podría también controlar el grado de ciclización de la membrana para mantener el balance energético celular (Pearson & Ingalls 2013).

Otra observación interesante detectada en este trabajo fue un incremento en la razón GDGT-2/GDGT-3 durante el periodo de surgencia, cuando la deficiencia de O₂ fue mayor y las concentraciones de NH₄⁺ fueron las más bajas. Esta contribución incrementada de GDGT-2 a sido reportada en aguas subsuperficiales subóxicas del Mar de Arabia (Schouten et al. 2012), el Pacífico Tropical Nororiental (Xie et al. 2012) y el Pacífico Suroriental Tropical (Sepúlveda et al. 2013). Así mismo, se ha observado que esta razón aumenta con la profundidad, particularmente en columnas de agua afectadas por deficiencias de O₂ (Taylor et al. 2013) lo que sugiere que las temperaturas derivadas de los GDGTs deben considerar dinámicas de exportación y la profundidad del agua del área de estudio, mientras que una creciente evidencia sugiere que las concentraciones de O₂ deberían ser tomadas en cuenta también.

El mecanismo exacto del aumento de la proporción de GDGT-2 en aguas subsuperficiales con baja concentración de O₂ permanece pobremente entendida. Sin embargo, nuestros resultados nos permiten proporcionar explicaciones para estas observaciones, las cuales incluyen: i) la presencia de poblaciones de Thaumarchaeota en aguas subóxicas que son filogenéticamente diferentes de aquellas presentes en la

superficie, ii) cambios en la contribución relativa de Euryarchaeota con profundidad, iii) una relación entre la composición de GDGTs y factores ambientales distintos a la temperatura, tales como variaciones en la química del agua.

Los perfiles de electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización obtenidos desde el sitio de estudio respaldan el primer mecanismo ya que los ribo-tipos arqueanos dominantes del agua superficial fueron diferentes a aquellos encontrados en el agua subsuperficial, especialmente cuando las condiciones subóxicas fueron más intensas. Esta observación concuerda con lo reportado por Levipan et al. (2012) quienes describieron dos comunidades arqueanas diferentes habitando las aguas superficiales y sub-superficiales costeras frente a Concepción. Además Molina et al. (2010) encontraron una diversidad más alta de las arqueas responsables de la oxidación de NH_4^+ en las aguas subóxicas del área de estudio.

Los datos obtenidos desde las hibridaciones del 16 rRNA arqueano obtenido desde la columna de agua, revelaron cambios estacionales y verticales de las comunidades de arqueas metanogénicas y Euryarchaeotas, con la más alta contribución durante la estación de verano austral apoyando nuestra explicación para el incremento en la proporción de GDGT-2 en las aguas subsuperficiales, lo cual es consistente con previas observaciones en el Mar del Norte (van der Maarel et al. 1999).

La variación en la distribución y abundancia de GDGTs en la capa subsuperficial de la columna de agua del sitio de estudio produjo grandes discrepancias entre las temperaturas derivadas de los GDGTs comparadas a las temperaturas *in situ*. El mismo patrón fue observado para las temperaturas obtenidas utilizando la distribución de los GDGTs en sedimentos. Las temperaturas calculadas mediante el TEX_{86}^L produjeron temperaturas más cálidas que aquellas obtenidas mediante el cálculo del TEX_{86} y las temperaturas medidas *in situ*. Esta desviación es producto de la contribución incrementada de GDGT-2 en aguas subsuperficiales subóxicas de la zona costera frente a Concepción, entendiendo que el TEX_{86}^L representa la relativa contribución de GDGT-2 sobre GDGTs 1-3. Así, TEX_{86}^L parece ser parcializado por factores ambientales diferentes a la temperatura *in situ* en áreas influenciadas por agotamiento de O_2 estacional, por lo que se sugiere que este indicador debería ser utilizado con precaución. Este patrón ha sido observado que ocurre también en sistemas de Zonas de Mínimo Oxígeno permanentes como el Mar de Arabia, Océano Pacífico Nororiental Tropical y el Océano Pacífico Sur (Schouten et al. 2012, Sepúlveda et al. 2013, Xie et al. 2013).

En un contexto ecológico, la distribución de GDGTs en aguas neríticas frente a

Concepción se asemejó a la señal molecular característica encontrada en las thaumarqueotas pelágicas marinas (Sinninghe Damsté et al. 2002, De la Torre et al. 2008, Schouten et al. 2008). Nuestros datos moleculares orgánicos mostraron un claro patrón estacional, con una abundancia mayor durante el periodo de no-surgencia (otoño-invierno austral), particularmente en aguas subsuperficiales. Esto concuerda con lo reportado por Levipan et al. (2007b) y Quiñones et al. (2009), quienes encontraron que las arqueas pelágicas marinas dan cuenta de ca. 50% de la comunidad procariota planctónica en aguas subóxicas subsuperficiales del sitio de estudio, donde Thaumarchaeota fue el grupo dominante. Este patrón estacional de la abundancia de Thaumarchaeota es consistente con lo encontrado en otros ecosistemas costeros (Wuchter 2006, Herfort et al. 2007, Pitcher et al. 2011b). En estos ecosistemas, Thaumarchaeota son predominantes durante el invierno, posterior a los afloramientos fitoplanctónicos, correlacionándose negativamente con las concentraciones de clorofila (Murray et al. 1998). Por ejemplo en el Mar del Norte, Thaumarchaeota fue menos abundante cuando fitoplancton de mayor tamaño ($> 3 \mu\text{m}$) dominó la comunidad fitoplanctónica, aún en la presencia de favorables cantidades de nutrientes (Herfort et al. 2007). De acuerdo a estos antecedentes se ha hipotetizado que las concentraciones de nutrientes en conjunto con la biomasa fitoplanctónica y su estructura comunitaria pueden controlar la población de Thaumarchaeota marina (Herfort et al. 2007). En el área de estudio, el ensamble fitoplanctónico es dominado por grandes diatomeas ($> 3 \mu\text{m}$) y altas concentraciones de clorofila durante el periodo de surgencia. Por el contrario, durante el periodo de no-surgencia, las concentraciones de clorofila son de un orden de magnitud menor que las observadas durante los periodos de surgencia.

El rol ecológico de Thaumarchaeota en el ciclo marino del nitrógeno marino ha sido demostrado por la co-ocurrencia de crenarqueol y máximos de NO_2^- (Massana et al. 1997, Murray et al. 1998, Sinninghe Damsté et al. 2002), así como con genes arqueanos responsables de la oxidación de NH_4^+ (*amoA*) (Francis et al. 2005, Hallam et al. 2006, Wuchter et al. 2006). Nuestros resultados apoyan previas observaciones usando análisis moleculares en el mismo sitio que dan cuenta del rol de las arqueas pelágicas oxidadoras de NH_4^+ en el ciclo del nitrógeno de la Zona de Mínimo Oxígeno frente a Concepción (Levipan et al. 2007b, Molina et al. 2010).

4.2. Variación en paleo-oxigenación en la Zona de Mínimo Oxígeno del ecosistema de surgencia frente a Chile Central

Nuestro análisis de los cambios en la intensidad de la Zona de Mínimo Oxígeno en la costa de Concepción durante los últimos 110 años, mediante la utilización de indicadores orgánicos e inorgánicos, tuvo como objetivo determinar si las condiciones de suboxia/anoxia han sido magnificadas en el sitio de estudio. Del mismo modo, hemos estudiado como las variaciones en las condiciones de oxigenación de la columna de agua a través del tiempo pueden haber modulado en algún grado la estructura comunitaria microbiana del sitio de estudio.

Es importante señalar que la resolución temporal de nuestro muestreo nos impidió observar las variaciones de los niveles de oxigenación a una escala intra-anual. Para los primeros 5 cm de nuestro testigo, obtuvimos una resolución temporal con intervalos de tiempo de ca. 2 años. A partir de los 6 cm el testigo fue sub-muestreado cada 1 cm, que de acuerdo a la tasa de sedimentación para el sitio de estudio (0,27 cm/año; Muñoz et al. 2007) resultó en resolución de 4 años.

La distribución vertical de los metales sensibles a óxido-reducción en los sedimentos mostraron una más baja precipitación autigénica a principios del siglo XX hasta comienzos de los años 20, siendo similar a la distribución de los compuestos orgánicos (geohopanoles, esteroides, GDGTs y mono alquil glicerol éteres). Los enriquecimientos de uranio (U) y molibdeno (Mo) mostraron una significativa correlación. Estos metales trazas son elementos conservativos en la columna de agua pero precipitan bajo condiciones reducidas (Eriksson & Helz 2000, Siebert et al. 2003). El U y el Mo son afectados también por la precipitación efectiva de partículas orgánicas e inorgánicas y la escala de tiempo de la variación de las condiciones de oxido-reducción en la interface agua-sedimento (Zheng et al. 2002, Algeo & Tribovillard et al. 2006). El cadmio (Cd), por otra parte, es un elemento no conservativo, cuyo enriquecimiento en los sedimentos esta relacionado a la magnitud del flujo de materia orgánica y la presencia de sulfuros en el agua intersticial (Tribovillard et al. 2006). Así, las variaciones de Mo y Cd pueden ser utilizadas como indicadores de intensificación de flujo de materia orgánica y condiciones sulfhídricas en los sedimentos (Chaillou et al. 2002, Calvert & Pedersen 1993).

Los geo-hopanoles pueden ser utilizados para analizar los cambios en la estructura de la comunidad bacteriana en relación a variaciones temporales de los niveles de oxigenación, asumiendo que ellos tienen precursores biológicos conocidos (Rhommer et al. 1980; 1984, Innes et al. 1997, 1998). Hopanol C₃₁ mostró un incremento general con la profundidad, lo cual se correlacionó positivamente con el Mo e implícitamente con condiciones más reducidas. De igual modo, C₃₁ hopanol se correlacionó positivamente con las

concentraciones de Cd, lo cual sugirió una relación con un incremento de material orgánico exportado a los sedimentos, probablemente debido a una aumentada producción primaria (Tribovillard et al. 2006). El C₃₁ hopanol es derivado desde los BHPs penta-funcionalizados (Rohmer et al. 1984, Zundel & Rhomer 1985, Venkatesan et al. 1990, Innes et al. 1997,1998), los cuales han sido detectados en bacterias anaerobias (Sinninghe Damsté et al. 2004, Fisher et al. 2005, Blumenberg et al. 2006) y principalmente en metanotrofos microaerófilos Tipo II (Neulist & Rohmer 1985; Cvejic et al. 2000; Talbot et al. 2001; Blumenberg et al. 2007). Adicionalmente, la concentración de C₃₂ hopanol, un producto diagenético del bacteriohopanotetrol (BHT) (Rohmer et al. 1984, Farrimond et al. 2000, Watson 2002), exhibió una leve disminución con la profundidad, además de correlacionarse negativamente con Cd y U.

La distribución vertical de C₂₇ trisnorhopano se correlacionó positivamente con U y Cd, lo cual indicó una relación con el agotamiento de O₂ en este sistema. Aunque, el C₂₇ trisnorhopano es un biomarcador bacteriano asociado con ambientes de deposición anóxicos, su fuente biológica aún no ha sido identificada (Peters et al. 2005). Por su parte, la concentración de mono alquil glicerol éteres se correlacionaron positivamente con el Mo y el Cd, así como con trisnorhopanos. Los lípidos glicerolés conteniendo enlaces éteres son ampliamente distribuidos en la naturaleza, dado que ellos son constituyentes comunes de las membranas celulares (Kates 1993, Koga & Morri 2005). Específicamente, mono alquil glicerol éteres no isoprenoides han sido reportados en sedimentos marinos (Rütters et al. 2002), cultivos de bacterias reductoras de sulfato mesofílicas, así como en un amplio rango de organismos anaerobios fermentativos y reductores de SO₄⁻ (Rütters et al. 2001). Consecuentemente, la presencia de mono alquil glicerol éteres en sedimentos ha sido vinculada principalmente a el ciclo del S en ambientes marinos oceánicos (Hernandez-Sanchez et al. 2014). Es así como mono alquil glicerol éteres presentes en sedimentos de los sistemas de surgencia de Perú, Namibia y Chile han sido atribuidos a bacterias reductoras de SO₄⁻ (Arning et al. 2008).

La correlación positiva entre los mono alquil glicerol éteres, el Mo y el Cd respalda la inferencia de que condiciones más reducidas ocurrieron por un prolongado periodo de tiempo en la zona de estudio. Esto indica que bacterias implicadas en la degradación anaeróbica terminal de la materia orgánica fueron más prominentes durante este extenso periodo de agotamiento de O₂. De acuerdo a nuestros resultados obtenidos en el capítulo 3 de esta tesis, nosotros demostramos que tanto la fermentación, así como la reducción bacteriana no asimilativa de SO₄⁻ puede ocurrir en la columna de agua frente a

Concepción, por lo que el agotamiento severo de O₂ revelado por el registro sedimentario pudo haber alcanzado la columna de agua.

. Las concentraciones de esteroides, cuyas fuentes biológicas corresponden a microalgas, principalmente diatomeas, fueron consideradas como indicadores de paleo-producción. Estos biomarcadores se correlacionaron significativamente con Cd, indicando una relación entre la productividad primaria y concentraciones ambientales agotadas de O₂.

Concurrentemente se observó un incremento de los GDGTs, los cuales exhibieron además una positiva correlación con U interpretado aquí como células arqueanas siendo eficientemente removidas, agregadas y exportadas hacia los sedimentos debido a un aumento de la productividad primaria, como fue previamente sugerido por Wuchter et al. (2006) para explicar el aumento en el flujo de GDGTs durante la estación productiva en el Mar Arábico. Esta condición pudo haber derivado hacia más altos flujos de hundimiento de materia orgánica particulada y un concomitante aumento de consumo de O₂ mediante degradación microbiana, lo cual, potencialmente pudo haber agotado el O₂ en la columna de agua. Esto pudo haber quedado grabado en el registro sedimentario, a través del enriquecimiento del Mo, U y Cd en el agua de fondo y los sedimentos durante este periodo. Adicionalmente, el aumento en las concentraciones de GDGTs durante finales de los cuarenta hasta principios de los ochenta (Capítulo 2; Fig. 5B) podría estar reflejando una más alta eficiencia en la preservación de estos compuestos favorecida por un severo agotamiento de O₂ durante este periodo. Scouten et al. (2004) y Zonneveld et al. (2010) reportaron que la exposición de los GDGTs al O₂ podría causar una importante disminución en la preservación de los GDGTs comparado con la exposición a la anoxia y/o suboxia.

La combinación de resultados de metales sensitivos a óxido-reducción y biomarcadores orgánicos sugieren la ocurrencia de condiciones de agotamiento de O₂ incrementado, tanto en la columna de agua, como en la interfase agua-sedimento desde ca. 1935 hasta principios de los 70. Una posible explicación es la predominancia de factores oceanográficos físicos que pueden conducir a un incrementado aporte y frecuencia de la pobremente ventilada Agua Ecuatorial Subsuperficial sobre la plataforma continental. Esto implica una mayor predominancia de los vientos del sureste, responsables del afloramiento de Agua Ecuatorial Subsuperficial en esta área, además de la elevada producción primaria y respiración microbiana (Wyrky 1962, Ahumada et al. 1983, Strub et al. 1998, Helly & Levin, 2004, Sobarzo et al. 2007, Fuenzalida et al. 2009).

Es probable que la tendencia observada en los niveles de oxigenación fueran

controlados por un proceso inter-decadal de macro-escala comprometiendo la Cuenca del Pacífico, lo cual pudo haber magnificado los procesos físicos de meso-escala promoviendo el agotamiento de O₂ sobre la plataforma continental frente a Concepción. Este hipotético mecanismo es apoyado por las significativas correlaciones encontradas entre las concentraciones de los biomarcadores y los valores del índice de la Oscilación Decadal del Pacífico. La Oscilación Decadal del Pacífico es un recurrente patrón de variabilidad océano-atmósfera, en la cual el giro central del Pacífico se enfría, mientras que los márgenes orientales de la cuenca se calientan o viceversa, con fases que duran entre dos a tres décadas (Braddock et al. 2000). La Oscilación Decadal del Pacífico juega un importante rol en la variabilidad oceanográfica del Océano Pacífico a escala decadal (Mantua et al. 1997, White & Cayan 1998, Johnson & McPhaden 1999). Durante las fases “cálida” o “positiva”, el Pacífico occidental se vuelve más frío, mientras el borde oriental se torna más cálido. El patrón inverso ocurre durante las fases “frías” o “negativas” (Mantua et al. 1997).

Los biomarcadores microbianos C₃₁ hopanol, trisnor hopanos, gliceroles di-alquil gliceroles éteres arqueanos y mono alquil gliceroles ester bacterianos, derivan de microorganismos asociados a marcadas quimioclinas y gradientes de óxido-reducción (Rohmer 1984, Innes et al. 1998, Sinninghe Damsté et al. 2002, Sinninghe Damsté et al. 2004, Fisher et al. 2005, Blumenberg et al. 2006, Schouten et al. 2008). El contenido sedimentario de estos biomarcadores mostró una correlación inversa con las fases de la Oscilación Decadal del Pacífico. Así, las fases cálidas de la Oscilación Decadal del Pacífico estuvieron asociadas con una disminución de los vientos responsables de los eventos de surgencia, mejorando la oxigenación, disminuyendo la productividad primaria y una concomitante disminución de los microorganismos asociados a fuertes gradientes de óxido-reducción.

4.3 Fermentación en la Zona de Mínimo Oxígeno de la plataforma continental de Chile Central y su implicancia biogeoquímica

Uno de los metabolismos heterotróficos importantes en ambientes agotados de O₂ es la fermentación de la materia orgánica con la concomitante producción de metabolitos semi-reducidos de bajo peso molecular, los cuales son utilizados por los microbios implicados en la degradación terminal de la materia orgánica como desnitrificación, reducción de metales, reducción de SO₄⁻, y metanogénesis acetoclástica (Lovley & Phillips 1988,

Conrad 1999, Megonigal et al. 2004).

En el sistema de surgencia costera de Chile central (36°S) el pionero trabajo de González y Quiñones (2009) ha sido la única investigación focalizada en el potencial fermentativo de la comunidad procarionte del sitio de estudio. Estos investigadores reportaron a través del estudio de la actividad potencial enzimática que la comunidad micro-planctónica que habita la Zona de Mínimo Oxígeno está metabólicamente activa, y encontraron evidencia de la presencia y actividad de enzimas específicamente implicadas en el metabolismo fermentativo anaerobio, tales como, piruvato-oxidoreductasa, lactato dehidrogenasa y etanol dehidrogenasa.

En el presente estudio la actividad fermentativa fue evidenciada por la ocurrencia de ácidos carboxílicos volátiles en la columna de agua del sitio de estudio en donde sólo acetato e isobutirato, así como ocurrencias episódicas de isovalerato fueron detectados en la columna de agua en relativamente bajas concentraciones y similares a aquellas reportadas anteriormente en el Mar Negro, la Cuenca del Cariaco y la columna de agua de Long Island Sound (Albert et al. 1995; Wu et al. 1997; Ho et al. 2002). Las bajas concentraciones de estos compuestos observadas en este trabajo sugieren la existencia de un balance entre la producción de metabolitos fermentativos y su posterior consumo posiblemente por parte de microorganismos implicados en la degradación terminal de material orgánico en la columna de agua.

La abundancia y distribución de estos metabolitos fermentativos mostraron un claro patrón vertical y estacional, siendo predominantes en la capa suboxica/anoxica de la columna de agua, principalmente durante las estaciones de primavera-verano austral, correlacionándose significativamente con las concentraciones de O₂ disuelto, productividad primaria y la temperatura.

La distribución vertical y temporal de estos metabolitos semireducidos pueden ser consideradas al mismo tiempo modo como evidencia de la capacidad facultativa fermentativa de la comunidad microbiana heterótrofa pelágica del sitio de estudio.

Previamente, se ha sugerido que comunidades bacterianas heterotróficas de sistemas costeros y oceánicos pueden obtener energía mediante el metabolismo fermentativo de manera facultativa, es decir, cuando las condiciones ambientales dominantes lo requieren (Hochachka & Somero 1984, Simidu & Tsukamoto 1985, Shie et al. 2000, Riemann & Azam 2002).

Una columna de agua con alta concentración de materia orgánica en sedimentación es un ambiente propicio para la formación de micro-nichos anóxicos (Thorton 2002)

facilitando y/o propiciando la ocurrencia de una trama trófica anaerobia heterotrófica donde la fermentación jugaría un rol clave.

Si los microbios involucrados en la degradación terminal del carbono orgánico utilizan imperativamente metabolitos semi-reducidos previamente fermentados para su consumo (Magonigal et al. 2004), entonces podemos esperar la ocurrencia de un activo metabolismo fermentativo en la porción más reducida de la columna de agua, lo cual podría ser la fuente biológica de estos metabolitos en la Zona de Mínimo Oxígeno frente a Concepción en Chile central.

La energía libre de formación para la fermentación de glucosa bajo las condiciones físico-químicas de la columna de agua fue de -283 kJ/mol sustrato (Tabla 3), lo cual es, suficiente para la conservación de energía para los microorganismos que llevan a cabo este metabolismo. Las concentraciones de glucosa reportadas para columnas de agua marinas (Azam & Hodson 1981), así como la concentración del HCO_3^- en el océano (Pilson 1998) y la concentración de los ácidos carboxílicos volátiles encontrados en este trabajo apoyan termodinámicamente la ocurrencia de la fermentación de carbohidratos en el sitio de estudio.

Experimentalmente se demostró que la comunidad microbiana que habita la columna de agua de Chile central es capaz de fermentar glucosa bajo condiciones anaerobias (Cap. 3; Figs. 6B y 7B), lo cual corrobora el potencial metabólico de la comunidad microbiana para fermentar compuestos orgánicos.

Cabe señalar además que la Zona de Mínimo Oxígeno del Sistema de Corrientes de Humboldt sostiene una alta tasa catabólica de material proteico el cual es hidrolizado a aminoácidos más pequeños los cuales son activamente utilizados y probablemente también fermentados por la comunidad microbiana (Pantoja et al. 2004, Pantoja et al. 2009).

La evolución de las concentraciones de ácidos carboxílicos volátiles producidos, la variación en los valores de pH y la producción CO_2 en las incubaciones inoculadas con agua proveniente de la Zona de Mínimo Oxígeno y con aminoácidos como única fuente de carbono y energía confirman esta hipótesis indicando consistentemente que la comunidad microbiana del sitio de estudio es metabólicamente capaz de fermentar aminoácidos disueltos acoplado el ciclamiento de carbono y nitrógeno mediante la fermentación.

Es así como uno de los objetivos de este trabajo fue evaluar el rol de la fermentación en el ciclamiento terminal del carbono y su acople con otros elementos de importancia biogeoquímica global en la columna de agua del área de estudio. Las evidencias químicas-experimentales obtenidas durante nuestra investigación revelaron que

el acetato puede ser utilizado por los microorganismos provenientes del Zona de Mínimo Oxígeno frente a Concepción, tanto en la reducción no asimilativa de Fe(III)_s , así como en la reducción no asimilativa de SO_4^- . Experimentalmente el acetato fue catabolizado a CO_2 en la presencia de Fe(III)_s durante la duración de la incubación inoculada con el agua de la Zona de Mínimo Oxígeno (Fig. 12 A,B). Por el contrario, durante la incubación control (no inoculada) no se evidenció la oxidación de acetato, ni tampoco una concomitante producción de CO_2 , lo cual indica que la oxidación de acetato fue producto de actividad biológica llevada a cabo por los microorganismos contenidos en el inóculo. Adicionalmente, no se evidenció la precipitación de alguna fase sólida de Fe, aunque sí se observó, a ojo desnudo, la disolución del Fe(III)_s , pasando desde la fase sólida a la fase acuosa. Esto fue corroborado mediante la cuantificación de Fe(II)_{aq} al final del experimento, donde se observó un importante incremento del 30% en la concentración de hierro disuelto producto de la reducción biológica del Fe(III)_s . Esta especiación del hierro no se observó en los experimentos no inoculados.

El descubrimiento de la capacidad de utilizar biológicamente el hierro precipitado es sumamente importante en el sitio de estudio dado que la costa de Chile central es caracterizada por una alta descarga fluvial (Dávila et al. 2002, Sobarzo et al. 2007), la cual puede estar suministrando grandes cantidades de Fe en su forma oxidada y en su fase precipitada, tanto en la columna de agua el cual puede ser potencialmente aprovechado por los microorganismos oxidando carbono y liberando Fe(II)_{aq} biodisponible tanto para el fitoplancton, así como para bacterias y arqueas sosteniendo un activo ciclamiento de Fe y C mediado por bacterias en la columna de agua acoplado a la productividad primaria y secundaria en el sitio de estudio.

La capacidad metabólica de reducir SO_4^- con acetato como dador de electrones y la consecuente producción de HS^- por parte la comunidad microbiana pelágica del sitio de estudio fue demostrada en este trabajo. Estos resultados apoyan la existencia de un activo pero complejo ciclo del S en la Zona de Mínimo Oxígeno de Chile Central (Canfield et al. 2010, Finster & Kjeldsen 2010). Por otra parte, la alcalinidad alcanzada durante el transcurso de la incubación y la aparente precipitación de CaCO_3 abren un interesante flanco de investigación añadiendo más información sobre la biogeoquímica del S acoplada al C es este sistema. Heterotróficamente, la precipitación de carbonatos puede ser conducida por la reducción no asimilativa de SO_4^- , la cual es realizada por bacterias reductoras de SO_4^- (Hammes & Verstraete 2002), las cuales aumentan la alcalinidad de la interfase entre la célula y el ambiente reduciendo los iones de SO_4^- y consumiendo

compuestos orgánicos (Braissant et al. 2007). Este proceso ha sido previamente observado en agua de mar (Morita 1980), formaciones geológicas (Peckman et al. 1999) y durante el tratamiento biológico de residuos mineros ácidos (Kaufman et al. 1996).

La precipitación de CaCO_3 por parte de la comunidad microbiana que habita la Zona de Mínimo Oxígeno implicada en la reducción no asimilativa de SO_4^- nos puede llevar a un entendimiento del ciclo del C en las Zonas de Mínimo Oxígeno, y su rol en el secuestro de C. La información geoquímica encriptada en estos precipitados bacterianos podría ser utilizada como potenciales indicadores paleo-oceanográficos en el estudio del ciclo del C y del S en columnas de agua con baja concentración de O_2 .



CAPÍTULO 5. CONCLUSIONES

1. En el capítulo 1 de este trabajo fue puesta a prueba la hipótesis de trabajo que postulaba que las variaciones verticales y temporales de los niveles de oxigenación en la columna de agua modulan y/o tienen un efecto sobre la composición de la estructura comunitaria arqueana en el sitio de estudio.

Nuestro trabajo basado en el estudio de la distribución y abundancia de biomarcadores específicos para organismos arqueanos mostraron que la mayor abundancia y diversidad de iGDGTs ocurrió en aguas subsuperficiales bajo condiciones de no-surgencia concurrente con las mayores concentraciones de O₂ disuelto en la columna de agua. Durante condiciones de surgencia, una mayor contribución relativa de GDGT-2 fue detectada en el agua subsuperficial sub-óxica, conduciendo a discrepancias entre temperaturas derivadas del TEX₈₆ y las temperaturas *in situ*. Del mismo modo, las temperaturas derivadas desde el TEX₈₆ en los sedimentos superficiales arrojaron valores de temperatura que superaron los promedios estacionales y anuales de las aguas superficiales y del subsuelo. Aunque los mecanismos exactos detrás de estas discrepancias se mantienen desconocidos, los datos moleculares y geoquímicos sugieren: (i) la presencia de poblaciones de Thaumarchaeota en aguas deficientes en O₂ que son filogenéticamente diferentes de las de las aguas de superficie; (ii) los cambios en la contribución relativa de Euryarchaeota con la profundidad; (iii) una relación entre iGDGTs y factores ambientales diferentes a la temperatura, como por ejemplo, O₂, régimen de nutrientes y pH. Además, la distribución de iGDGTs en sedimentos superficiales sobre la plataforma continental frente a Concepción podría estar sesgado por el aporte estacional de iGDGTs provenientes desde arqueas metanogénicas durante la temporada de surgencia, así como por arqueas terrestres durante la temporada de baja productividad en el otoño-invierno austral.

Aunque nuestros datos no nos permitieron estimar estadísticamente si el O₂ es la variable ambiental maestra que controla la distribución y abundancia de las arqueas en el sitio de estudio, si podemos sugerir que las variaciones verticales y temporales de O₂ disuelto en la columna de agua juegan un papel importante en la composición y diversidad de la comunidad arqueana en la columna de agua frente a Concepción, Chile Central.

2. En el capítulo 2 de la presente tesis y bajo un contexto paleo-oceanográfico nosotros hipotetizamos que el registro sedimentario de los últimos 110 años evidencia una intensificación secular de las condiciones de hipoxia en la zona de estudio hacia el

presente. Nuestros datos no nos mostraron una evidente tendencia en la disminución de O₂ disuelto hacia el presente sino que más bien un patrón interdecadal de variaciones en la intensidad de la Zona de Mínimo Oxígeno durante los últimos 110 años. Nuestros datos sugieren que la anomalía climática conocida como la “Oscilación Decadal del Pacífico” podría ser el mecanismo físico que ha controlado las variaciones inter-decadales de las condiciones de oxido-reducción observadas en el registro sedimentario en el sistema de surgencia costera frente Concepción. Esta anomalía climática que afecta a la cuenca del Pacífico en su totalidad podría haber modulado la composición de la comunidad microbiana en el sitio de estudio, que se evidencia en el registro sedimentario de los biomarcadores orgánicos provenientes de organismos procariontes y su correlación con los indicadores ambientales paleo-oceanográficos físico-químicos estudiados en este trabajo.

3. En capítulo 3 del presente trabajo se estudió la ocurrencia vertical y estacional de metabolitos semi-reducidos fermentativos en la columna de agua que subyacen la plataforma continental de Chile Central, además del potencial fermentativo de la comunidad microbiana que habita la Zona de Mínimo Oxígeno y su implicancia en la degradación terminal de la materia orgánica en el sitios de estudio. Es así como se hipotetizó que la fermentación juega un papel importante en el ciclamiento del C produciendo metabolitos reducidos de bajo peso molecular que son luego utilizados por la comunidad microplanctónica implicada en el ciclamiento terminal del C.

La distribución vertical y temporal de ácidos carboxílicos volátiles en la columna de agua frente a Concepción sugiere la ocurrencia de una activa comunidad microbiana capaz de fermentar materia orgánica generando metabolitos semi-reducidos que pueden ser utilizados por otros componentes microbianos implicados en la degradación terminal de la materia orgánica en la columna de agua frente a Concepción (36°S). Correlaciones significativas entre la distribución vertical y temporal de ácidos carboxílicos en la columna de agua y estacionalidad y la concentración de O₂ sugieren una dependencia de factores ambientales para la ocurrencia de actividad fermentativa, posiblemente llevada a cabo por microorganismos fermentadores facultativos. El estudio experimental demostró que la comunidad microbiana pelágica es metabólicamente capaz de realizar metabolismo fermentativo sobre carbohidratos y material proteico, produciendo ácidos carboxílicos volátiles y etanol como sus principales productos metabólicos. Del mismo modo se demostró que el acetato, el metabolito más abundante, tanto en las incubaciones fermentativas, así como en la columna de agua del sitio de estudio fue activamente

catabolizado por microorganismos que habitan la columna de agua de la Zona de Mínimo de Oxígeno implicados en la degradación terminal de la materia orgánica acoplado biogeoquímicamente el ciclamiento del C, N, Fe y S.



Referencias

Ahumada, R.A., & V. Martínez. 1983. Circulation and fertility of waters in Concepción bay. *Estuarine Coastal and Shelf Science* 16: 95-105.

Albert, D.B., C.Taylor, & C.S.Martens. 1995. Sulfate reduction rates and low molecular weight fatty acids concentrations in the water column and surficial sediments of The Black Sea. *Deep Sea Research Part I* 42: 1239-1260.

Algeo, T.J., & N. Tribovillard. 2009. Environmental analysis of paleoceanographic systems based on molybdenum-uranium covariation. *Chemical Geology* 268: 211-225.

Amann, R.I., B.J. Binder, R.J. Olson, S.W.Chisholm, R. Devereux, & D.A. Stahl. 1990. Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. *Applied Environmental Microbiology* 56: 1919-1925.

Andreesen, J.R., H. Bahl, & G. Gottschalk. 1989. Introduction to the physiology and biochemistry of the genus *Clostridium*. En: Minton NP & Clarke DC (eds) *Clostridia* 3: 27-62. Plenum Press, New York.

Arning, E.T., D. Birgel, H.N. Schulz-Vogt, L. Holmkvist, B.B. Jørgensen, A. Larsson, & J. Peckmann. 2008. Lipid biomarker patterns of phosphogenic sediments from upwelling regions. *Geomicrobiology Journal* 25: 69-82.

Arnosti C., Durkin S., & W.H., Jeffrey. 2005a. Patterns of extracellular enzyme activities among pelagic marine microbial communities: implications for cycling of dissolved organic carbon. *Aquatic Microbial Ecology* 38: 135-145.

Arnosti C., Finke N., Larsen O., & S., Ghobria. 2005b. Anoxic carbon degradation in Arctic sediments: microbial transformations of complex substrates. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 69: 2309-2320.

Arrigo, K.R. 2005. Marine microorganisms and global nutrient cycles. *Nature* 437 (7057): 349-55.

Azam, F., & R.E. Hodson. 1981. Multiphasic kinetics for D-glucose uptake by assemblages of natural marine bacteria. *Marine Ecology Progress Series* 6: 213-222.

Bale, N.J., L. Villanueva, E.C. Hopmans, S. Schouten, & J.S. Sinninghe Damsté. 2013. Different seasonality of pelagic and benthic *Thaumarchaeota* in the North Sea. *Biogeosciences* 10: 12593-12624.

Barker, H.A. 1981. Amino acid degradation by anaerobic bacteria. *Annual Review Biochemistry* 50: 23-40.

- Bange, H.W., S. Rapsomanikis, & M.O. Andreae. 1996. Nitrous oxide in coastal waters. *Global Biogeochemical Cycles* 10: 197-207.
- Bakun, A. 1990. Global climate change and intensification of coastal ocean upwelling. *Science* 247: 198-201.
- Bakun, A., & C. Nelson. 1991. The seasonal cycle of wind stress curl in subtropical eastern boundary current regions. *Journal of Physical Oceanography* 21: 1815-1834.
- Baumann, P., & L. Baumann. 1984. Genus II. *Photobacterium* Beijerinck 1889, 401^{AL}. En: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* 1: 539-545. Edited by N. R. Krieg & J. G. Holt. Baltimore: Williams & Wilkins.
- Baumann, P., & R.H.W. Schubert. 1984. Family II *Vibrionaceae* Veron 1965, 5245^{AL}. En: *Bergey's Manual Systematic Bacteriology* 1: 516-517. Edited by N. R. Krieg & J. G. Holt. Baltimore: Williams & Wilkins.
- Baumann, P., A.L. Furniss, & J.V. Lee. 1984. Genus I. *Vibrio Pacini* 1854, 411^{AL}. En: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*: 1: 518-538. Edited by N. R. Krieg & J. G. Holt. Baltimore: Williams & Wilkins.
- Benvegnu, T., L. Lemiegre, & S. Cammas-Marion. 2008. Archaeal lipids: innovative materials for biotechnological applications. *European Journal of Organic Chemistry* 4725-4744.
- Blanco, J.L., A.C. Thomas, M.E. Carr, & P.T. Strub. 2001. Seasonal climatology of hydrographic conditions in the upwelling region off northern Chile. *Journal of Geophysical Research*, 106(C6): 11451-11467.
- Blanco, J.L., M.E. Carr, A.C. Thomas, & P.T. Strub. 2002. Hydrographic conditions off northern Chile during the 1996-1998 La Niña and El Niño events. *Journal of Geophysical Research* 107(C3), art. no. 3017.
- Bligh, E.G., & W.J. Dyer. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology* 37: 911-917.
- Blumenberg, M.M. Krüger, K. Nauhaus, H.M. Talbot, B.I. Oppermann, R. Seifert T. Pape, & W. Michaelis. 2006. Biosynthesis of hopanoids by sulfate-reducing bacteria (genus *Desulfovibrio*). *Environmental Microbiology* 8: 1220-1227.
- Blumenberg, M., R. Seifert, & W. Michaelis. 2007. Aerobic methanotrophy in the oxic-anoxic transition zone of the Black Sea water column. *Organic Geochemistry* 38: 84-91.
- Bock, E., I. Schmidt, R. Stüven, & D. Zart. 1995. Nitrogen loss caused by denitrifying *Nitrosomonas* cells using ammonium or hydrogen as electron donors and nitrite as electron acceptor. *Archives of Microbiology* 163: 16-20.
- Boesch, D.F., ed. 2008. *Global Warming in the Free State: Comprehensive Assessment of Climate Change Impacts in Maryland*. University of Maryland Center for Environmental Science, Cambridge, MD, USA.

- Boschker, H.T.S., W. de Graaf, M. Koster, L.A. Meyer-Reil, & T.E. Cappenberg. 2001. Bacterial populations and processes involved in acetate and propionate consumption in anoxic brackish sediment. *FEMS Microbiology Ecology* 35: 97-103.
- Boyd, E., A. Pearson, Y. Pi, W.J. Li, Y.G. Zhang, & L. He, et al. 2011. Temperature and pH controls on glycerol dibiphytanyl glycerol tetraether lipid composition in the hyperthermophilic crenarchaeon *Acidilobus sulfurireducens*. *Extremophiles* 15: 59-65
10.1007/s00792-010-0339-y.
- Braddock, K.L., M.W. Gerard, & P.S. Daniel. 2000. Decadal Sea Surface Temperature Variability in the Sub-Tropical South Pacific from 1726 to 1997 A.D. *Science* 290: 1145-1148.
- Braissant, O., A.W. Decho, C. Dupraz, C. Glunk, K.M. Przekop, & P.T. Visscher. 2007. Exopolymeric substances of sulfate-reducing bacteria: interactions with calcium at alkaline pH and implication for formation of carbonate minerals. *Geobiology* 5: 401-411.
- Brune, A. & M. Friedrich (2000) Microecology of the termite gut: structure and function on a microscale. *Current Opinion in Microbiology*, 13, 263-269.
- Brune A., E. Frenzel, & H. Cypionka. 2000. Life at the oxic-anoxic interface: Microbial activities and adaptations. *FEMS Microbiology Reviews* 24(5): 691-710.
- Burggraf, S., T. Mayer, R. Amann, S. Schadhauser C.R. Woese, & K.O. Stetter. 1994. Identifying Archaea with rRNA-targeted oligonucleotide probes. *Applied Environmental Microbiology* 60: 3112-3119.
- Buchholz, B., E. Laczko, N. Pfennig, M. Rohmer, & S. Neunlist. 1993. Hopanoids of a recent sediment from Lake Constance as eutrophication markers. *FEMS Microbiology Ecology* 102: 217-223.
- Calvert, S.E., & T.F. Pedersen. 1993. Geochemistry of recent oxic and anoxic sediments: implications for the geological record. *Marine Geology* 113: 67-88.
- Canfield, D.E., E. Kristensen & B. Thamdrup. 2005. The Sulfur Cycle. *Advances in Marine Biology* 48: 313-381.
- Canfield, D.E., F.J. Stewart, B. Thamdrup, L. De Brabandere, T. Dalsgaard, E.F. DeLong, N.P. Revsbech, & O. Ulloa. 2010. A cryptic sulfur cycle in oxygen-minimum-zone waters off the Chilean coast. *Science* 330 (6009): 1375-1378.
- Carr, M.E., P.T. Strub, A. Thomas, & J.L. Blanco. 2002. Evolution of 1996-1999 La Niña and El Niño conditions off the western coast of South America: a remote sensing perspective. *Journal of Geophysical Research* 107 (C12): art. no. 3236.
- Chaillou, G., P. Anschutz, G. Lavaux, J. Schäfer & G. Blanc. 2002. The distribution of Mo, U, and Cd in relation to major redox species in muddy sediments of the Bay of Biscay. *Marine Chemistry* 80: 41-59.
- Chidthaisong, A., & R. Conrad. 2000. Turnover of glucose and acetate coupled to reduction

of nitrate, ferric iron and sulfate and to methanogenesis in anoxic rice field soil. *FEMS Microbiology Ecology* 31: 73-86.

Christensen, D. 1984. Determination of substrates oxidized by sulfate reduction in intact cores of marine sediments. *Limnology and Oceanography* 29: 189-192.

Cicerone, R.J., & R.S. Oremland. 1988. Biogeochemical aspects of atmospheric methane. *Global Biogeochemical Cycles* 2: 299-327, doi:10.1029/GB002i004p00299.

Cloern, J.E. 2001. Our evolving conceptual model of the coastal eutrophication problem. *Marine Ecology Progress Series* 210: 223-253.

Codispoti, L.A., J.A. Brandes, J.P. Christensen, A.H. Devol, S.W.A., Naqvi, H.W. Paerl, & T. Yoshinari. 2001. The oceanic fixed nitrogen and nitrous oxide budgets: Moving targets as we enter the anthropocene? *Scientia Marina* 65: 85-105, doi:10.3989/scimar.2001.65s285.

Colman, S.M., & J.F. Bratton. 2003. Anthropogenically induced changes in sediment and biogenic silica fluxes in Chesapeake Bay. *Geology* 31: 71-74.

Conrad, R. 1999. Contribution of hydrogen to methane production and control of hydrogen concentrations in methanogenic soils and sediments. *FEMS Microbiology Ecology* 28: 193-202.

Cvejjic, J.H., L. Bodrossy, K.L. Kovács, & M. Rohmer. 2000. Bacterial triterpenoids of the hopane series from the methanotrophic bacteria *Methylocaldum* spp.: phylogenetic implications and first evidence for an unsaturated aminobacteriohopanepolyol. *FEMS Microbiology Letters* 182: 361-365.

Dávila, P.M., D. Figueroa, & E. Müller. 2002. Freshwater input into the coastal ocean and its relation with the salinity distribution off austral Chile (35–55°S). *Continental Shelf Research* 22: 521-534.

De la Torre, J.R., C.B. Walker, A.E. Ingalls, M. Konneke, & D.A. Stahl. 2008. Cultivation of a thermophilic ammonia oxidizing archaeon synthesizing crenarchaeol. *Environmental Microbiology* 10: 810-818.

DeLong, E.F., K.Y. Wu, B.B. Prézelin, & R.V.M. Jovine. 1994. High abundance of Archaea in Antarctic marine picoplankton. *Nature* 371: 695-697.

DeLong, E.F., L.L. King, R. Massana, H. Cittone, A. Murray, C. Schleper, & S.G. Wakeham. 1998. Dibiphytanyl ether lipids in nonthermophilic crenarchaeotes. *Applied and Environmental Microbiology* 64: 1133-1138.

Deming, J.W., L.K. Somers, W.L. Straube, D.G. Swartz, & M.T. MacDonell. 1988. Isolation of an obligately barophilic bacterium and description of a new genus, *Colwellia* gen. Nov. *Systematic and Applied Microbiology* 10: 152-160.

De Rosa, M., & A. Gambacorta. 1988. The lipids of archaeobacteria. *Progress in Lipid*

Research 27: 153-175.

Dettinger, M.D., D.S. Battisti, R.D. Garreaud, G.J. Jr. McCabe, & C.M. Bitz. 2000. Interhemispheric effects of interannual and decadal ENSO-like climate variations on the Americas: 1-16. En *Present and Past Interhemispheric Climate Linkages in the Americas and their Societal Effects*, ed. by V. Markgraf, Cambridge University Press. Cambridge, U.K.

Devereux, R., M.R. Winfrey, J. Wndfrey, & D. Stahl. 1996. Depth profile of sulfate-reducing bacterial ribosomal RNA and mercury methylation in an estuarine sediment. *FEMS Microbiology Ecology* 20: 23-31.

Diaz R.J., & R. Rosenberg. 1995. Marine Benthic hypoxia: a review of its ecological effects and the behavioural responses of benthic macrofauna. *Oceanography and Marine Biology* 33: 245-303.

Diaz, R.J. 2001. Overview of hypoxia around the world. *Journal of Environmental Quality* 30: 275-281.

Doney, S.C., M. Ruckelshaus, J. Emmett Duffy, J.P. Barry, F. Chan, C.A. English, H.M. Galindo, J.M. Grebmeier, A.B. Hollowed, N. Knowlton, J. Polovina, N. Rabalais, W.J. Sydeman, & L.D. Talley. 2010. Climate Change Impacts on Marine Ecosystems. *Annual Reviews of Marine Sciences* 4: 11-37.

Dugdale, R.C. 1972. Chemical oceanography and primary productivity in upwelling regions. *Geoforum* 2: 47-61.

Dugdale, R.C., J.J. Goering, R.T. Barber, R.L. Smith, & T.T. Packard. 1977. Denitrification and hydrogen sulfide in the Peru upwelling region during 1976. *Deep-Sea Research* 24: 601-608.

Ehrlich, H.L., & D.K. Newman. 2008. *Geomicrobiology*, ISBN-13 9780849379062, 5, 628 pp.

Emerson, S., Y.W. Watanabe, T. Ono, & S. Mecking. 2004. Temporal trends in apparent oxygen utilization in the upper pycnocline of the North Pacific: 1980-2000. *Journal of Oceanography* 60: 139-147.

Eriksson, B.E., & G.R. Helz. 2000. Molybdenum (IV) speciation in sulphidic waters: stability and lability of thiomolybdates. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 64: 1149-1158.

Escribano, R., G. Daneri, L. Fariás, V.A. Gallardo, H.E. González, D. Gutiérrez, C.B. Lange, et al. 2004. Biological and chemical consequences of the 1997-1998 El Niño in the Chilean coastal upwelling system: a synthesis. *Deep Sea Research II* 51: 2389-2411.

Falkowski, P.G. 1997. Evolution of the nitrogen cycle and its influence on the biological sequestration of CO₂ in the ocean. *Nature*: 387 272 -275.

Farrimond, P., I.M. Head, & H.E. Innes. 2000. Environmental influence on the

biohopanoid composition of recent sediments. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 64: 2985-2992.

Fenchel, T. & B.J. Finlay. 1995. *Ecology and evolution in anoxic worlds*. Oxford series in ecology and evolution, Oxford, UK: Oxford University Press.

Finster, K.W., & K.U. Kjeldsen (2010), *Desulfovibrio oceani* subsp. *oceani* sp. nov., subsp. nov. and *Desulfovibrio oceani* subsp. *galataeae* subsp. nov., novel sulfate-reducing bacteria isolated from the oxygen minimum zone off the coast of Peru. *Antonie van Leeuwenhoek* 97: 221-229.

Fischer, W.W., R.E. Summons, & A.P. Pearson. 2005. Targeted genomic detection of biosynthetic pathways: anaerobic production of hopanoid biomarkers by a common sedimentary microbe. *Geobiology* 3: 33-40.

Francis, C.A., K.J. Roberts, J.M. Beman, A.E. Santoro, & B.B. Oakley. 2005. Ubiquity and diversity of ammonia oxidizing archaea in water columns and sediments of the ocean. *Proceedings of National Academic of Sciences USA* 102: 14683-14688.

Frólicher, L., Joos, F., Plattner, G.K., Steinacher, M., & C., Doney. 2009. Natural variability and antropogenic trends in oceanic oxygen in a coupled carbón cycle-climate model enesemble. *Global Biogeochemical Cycles*, 23, GB1003, doi:10.1029/2008GB003316.

Fuenzalida, R., W. Schneider, J. Garces-Vargas, L. Bravo, & C.B. Lange. 2009. Vertical and horizontal extension of the oxygen minimum zone in the eastern South Pacific Ocean. *Deep-Sea Research II* 56: 992-1003.

Garreaud, R.D., & D.S. Battisti. 1999. Interannual ENSO and Interdecadal ENSO-like variability in the southern hemisphere tropospheric circulation. *Journal of Climate* 12: 2113-2123.

Gliozzi, A., G. Paoli, M. De Rosa, & A. Gambacorta. 1983. Effect of isoprenoid cyclization on the transition temperature of lipids in thermophilic archaeobacteria. *Biochimica et Biophysica Acta* 735: 234-242.

González, H.E., G. Daneri, J.L. Iriarte, B. Yannicelli, E. Menschel, C. Barría, S. Pantoja, & L. Lizárraga (2009), Carbon fluxes within the epipelagic zone of the Humboldt Current system off Chile: the significance of euphausiids and diatoms as key functional groups for the biological pump. *Progress in Oceanography* 83: 217-227.

González, R.R., & R.A. Quiñones. 2009. Common catabolic enzyme patterns in a microplankton community of the Humboldt Current System off northern and central-south Chile: Malate dehydrogenase activity as an index of water-column metabolism in an oxygen minimum zone. *Deep Sea Research II* 56: 1095-1104.

Gruber, N., & J.L. Sarmiento. 1997. Global patterns of marine nitrogen fixation and denitrification. *Global Biogeochemical Cycles* 11(2): 235-266.

Gruber, N. 2004. The dynamics of the marine nitrogen cycle and atmospheric CO₂. En:

Carbon Climate interactions (Oguz, T., and Follows, M., eds.), Kluwer, Dordrecht, 97-148.

Gruber N. 2008. The marine nitrogen cycle: overview and challenges. En: Nitrogen in the Marine Environment, ed. D.G. Capone, D.A. Bronk, M.R. Mulholland, E.J. Carpenter, 1-50. Amsterdam: Elsevier.

Gutiérrez, D., V.A. Gallardo, S. Mayor, C. Neira, C. Vásquez, J. Sellanes, D.K. Rivas, A. Soto, F. Carrasco, & M. Baltasar. 2000. Effects of dissolved oxygen and fresh organic matter on the bioturbation potential of macrofauna in sublittoral sediments off central Chile, during the 1997-98 El Niño. *Marine Ecology Progress Series* 202: 81-99.

Hallam, S.J., T.J. Mincer, C. Schleper, C.M. Preston, K. Roberts, P.M. Richardson, & E.F. DeLong. 2006. Pathways of carbon assimilation and ammonia oxidation suggested by environmental genomic analyses of marine Crenarchaeota. *PLoS Biology* 4: E95.

Hamersley, M., G. Lavik, & D. Woebken. 2007. Anaerobic ammonium oxidation in the Peruvian oxygen minimum zone. *Limnology and Oceanography* 71: 1066-1071.

Hammes, F., & W. Verstraete. 2002. Key roles of pH and calcium metabolism in microbial carbonate precipitation. *Reviews in Environmental Sciences. Bio/Technology* 1: 3-7.

Hansen, L.S., M. Holmer, & T.H. Blackburn. 1993. Mineralization of organic nitrogen and carbon (fish food) added to anoxic sediment microcosms: Role of sulfate reduction. *Marine Ecology Progress Series* 102, 199-204.

Hansen, L.S., & T.H. Blackburn. 1995. Amino acid degradation by sulfate-reduction bacteria: evaluation of four methods. *Limnology and Oceanography* 40: 502-510.

Helly, J.J., & L.A. Levin. 2004. Global distribution of naturally occurring marine hypoxia on continental margins. *Deep-Sea Research I* 51: 1159-1168.

Herfort, L., S. Schouten, B. Abbas, M.J.W. Veldhuis, M.J.L. Coolen, & C. Wuchter et al. 2007. Variations in spatial and temporal distribution of Archaea in the North Sea in relation to environmental variables. *FEMS Microbiology Ecology* 62: 242-257.

Hernandez-Sanchez, T.M., W.B. Homoky, & R.D. Pancost. 2014. Occurrence of 1-O-monoalkyl glycerol ether lipids in ocean waters and sediments. *Organic Geochemistry* 66: 1-13.

Ho, T.Y., M.I. Scranton, & G.T. Taylor. 2002. Acetate cycling in the water column in the Cariaco Basin: Seasonal and vertical variability and implication for carbon cycling. *Limnology and Oceanography* 47: 1119-1128.

Hochachka, P.W., & G.N. Somero. 1984. *Biochemical Adaptation*. Princeton University Press, Princeton.

Holmer, M., & E. Kristensen. 1992. Impact of marine fish cage farming on metabolism and sulfate reduction of underlying sediments. *Marine Ecology Progress Series* 80: 191-201.

Holmer, M., & E. Kristensen. 1996. Seasonality of sulfate reduction and pore water solutes in a marine fish farm sediment- the importance of temperature and sedimentary organic matter. *Biogeochemistry* 32: 15-39

Holmer, M., & E. Kristensen. 1994. Organic matter mineralization in an organic-rich sediment: experimental stimulation of sulfate reduction by food pellets. *FEMS Microbiology Ecology* 14: 33-44.

Hooper, A.B., & K.R. Terry. 1979. Hydroxylamine oxidoreductase of *Nitrosomonas*: production of nitric oxide from hydroxylamine. *Biochimica et Biophysica Acta* 571: 12-20.

Hoppe, H.G. 1991. Microbial extracellular enzyme activity: a new key parameter in aquatic ecology. In: Chrost, R. J. (ed.) *microbial enzymes in aquatic environments*. Springer-Verlag, New York, p. 60-79.

Hoppe, H.G., Ducklow, H., & B., Karrasch. 1993. Evidence for dependency of bacterial growth on enzymatic hydrolysis of particulate organic matter in the mesopelagic ocean. *Marine Ecology Progress* 93: 277-283.

Huguet, C., E.C. Hopmans, W. Febo-Ayala, D.H. Thompson, J.S. Sinninghe Damsté, & Schouten, S. 2006. An improved method to determine the absolute abundance of glycerol dibiphytanyl glycerol tetraether lipids. *Organic Geochemistry* 37: 1036-1041.

Innes, H.E., A.N. Bishop, I.M. Head, & P. Farrimond. 1997. Preservation and diagenesis of hopanoids in recent lacustrine sediments of Priest Pot, England. *Organic Geochemistry* 26: 565-576.

Innes, H.E., A.N. Bishop, P.A. Fox, I.M. Head, & P. Farrimond. 1998. Early diagenesis of bacterio-hopanoids in recent sediments of Lake Pollen, Norway. *Organic Geochemistry* 29: 1285-1295.

Ingalls, A. E., S.R. Shah, R.L. Hansman, L.I. Aluwihare, G.M. Santos, E.R.M. Druffel, & A. Pearson. 2006. Quantifying archaeal community autotrophy in the mesopelagic ocean using natural radiocarbon. *Proceedings of the National Academic of Sciences USA* 103: 6442-6447.

IPCC (2007) *Climate change 2007: the physical science basis*. In: Solomon S, Qin D, Manning M, Z. Chen, M. Marquis, K.B. Averyt, M. Tignor, H.L. Miller (eds) *Contribution of Working Group I to the fourth assessment report of the intergovernmental panel on climate change*, Cambridge University Press, Cambridge, 996 pp.

Johnson, G.C., & M.J. McPhaden 1999. Interior pycnocline flow from the subtropical to the equatorial Pacific Ocean. *Journal of Physical Oceanography* 29: 3073-3089.

- Jørgensen, B.B. 2006. Bacteria and marine biogeochemistry. En: *Marine Geochemistry*, 2nd Edn. eds H.D. Schulz and M. Zabel (Springer-Verlag), 169-206.
- Inglett, P.W., K.R. Reddy, & R. Corstanje. 2005. Anaerobic soils. En: Daniel, H. (Ed.). *Encyclopedia of Soils in the Environment*. Elsevier, Oxford, pp. 72e78.
- Karner, M.B., E.F. DeLong, & D.M. Karl. 2001. Archaeal dominance in the mesopelagic zone of the Pacific Ocean. *Nature* 409: 507-510.
- Kates, M., D.J. Kushner, & A.T. Matheson. 1993. The biochemistry of Archaea (Archaeobacteria), (eds. Kates, M., D.S. Kushner, & A.T. Matheson), 261-295 Elsevier Science Publishers, Amsterdam.
- Kaufman, E.N., M.H. Little, & P.J. Selvaraj. 1996. Recycling of FGD gypsum to calcium carbonate and elemental sulphur using mixed sulphate-reducing bacteria with sewage digest as carbon source. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 66 (4): 365-374.
- Keeling, R., & H. Garcia. 2002. The change in oceanic O₂ inventory associated with recent global warming. *Proceedings of the National Academic of Sciences USA* 99: 7848-7853.
- Koga Y, & H. Morii 2005. Recent advances in structural research on ether lipids from archaea including comparative and physiological aspects. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 69: 2019-2034.
- Könneke, M., A.E. Bernhard, J.R. de la Torre, C.B. Walker, J.B. Waterbury, & D.A. Stahl. 2005. Isolation of an autotrophic ammonia-oxidizing marine archaeon. *Nature* 437: 543-546.
- Kristensen, E. & K. Hansen. 1995. Decay of plant detritus in organic-poor marine sediment: production rates and stoichiometry of dissolved C and N compounds. *Journal of Marine Research* 53: 675-702.
- Kristensen, E. 2000. Organic matter diagenesis at the oxic/anoxic interface in coastal marine sediments, with emphasis on the role of burrowing animals. *Hydrobiologia* 426: 1-24.
- Kristensen, E., & M. Holmer. 2001. Decomposition of plant materials in marine sediment exposed to different electron acceptors (O₂, NO₃⁻, and SO₄²⁻), with emphasis on substrate origin, degradation kinetics, and the role on bioturbation. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 65: 419-433.
- Kuypers, M.M., G. Lavik, D. Woebken, M. Schmid, B.M. Fuchs, & R. Amann, et al. 2005. Massive nitrogen loss from the Benguela upwelling system through anaerobic ammonium oxidation. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 102: 6478-6483.
- Lam, P., Lavik, G., Jensen, J. van d. Vossenberg, M. Schmid, D. Woebken, D. Gutierrez, R. Amann, M.S.M. Jetten, & M.M.M. Kuypers. 2009. Revising the nitrogen cycle in the Peruvian oxygen minimum zone. *Proceedings of the National Academy of Sciences of*

USA 106: 4752-4757.

Lam, P. & M.M. Kuypers. 2011. Microbial nitrogen cycling processes in oxygen minimum zones. *Annual Review of Marine Science* 3: 317-347.

Levin, L.A. 2002. Deep-ocean life where oxygen is scarce. *American Scientist*, 90, 436-444.

Levipan, H.A., R.A. Quiñones, H.E. Johansson, & H. Urrutia. 2007a. Methylophilic Methanogens in the Water Column of an Upwelling Zone with a Strong Oxygen Gradient Off Central Chile. *Microbes and Environments*, 22: 268-278.

Levipan, H.A., R.A. Quiñones, & H. Urrutia. 2007b. A time series of prokaryote secondary production in the oxygen minimum zone of the Humboldt current system, off central Chile. *Progress in Oceanography* 75: 531-549.

Levipan, H.A., W.O. Alarcón, & G.S. Saldías. 2012. Fingerprinting analysis of the prokaryote community along a marine–freshwater transect in central-southern Chile. *Annals of Microbiology* 62 (3): 1121-1140.

Livingstone, D.R. 1991. Origins and evolution of pathways of anaerobic metabolism in the animal kingdom. *American Zoologist* 31: 522-534.

Lovley, D.R., & E.J.P. Phillips (1988) Novel mode of microbial energy metabolism: organic carbon oxidation coupled to dissimilatory reduction of iron or manganese. *Applied Environmental Microbiology* 54: 1472-1480.

Lovely, D.R. 1991. Dissimilatory Fe(III) and Mn(IV) reduction. *Microbiology Reviews* 55: 259-287.

Mantua, N.J., S.R. Hare, Y. Zhang, J.M. Wallace, & R.C. Francis. 1997. A Pacific decadal climate oscillation with impacts on salmon. *Bulletin of the American Meteorological Society* 78: 1069-1079.

MacDonell, M.T., & R.R. Colwell. 1985. The phylogeny of the Vibrionaceae, and recommendation for two new genera, *Listonella* and *Shewanella*. *Systematic and Applied Microbiology* 6: 171-182.

Massana, R., A. Murray, C. Preston, & E. DeLong. 1997. Vertical distribution and phylogenetic characterization of marine planktonic Archaea in the Santa Barbara channel. *Applied Environmental Microbiology* 63: 50-56.

McDonagh, E.L., & H.L. Bryden, et al. (2005), "Decadal Changes in the South Indian Ocean Thermocline," *Journal of Climate*, 18, 1575-1590.

McInerney, M.J. 1988. Anaerobic hydrolysis and fermentation of fats and proteins. En: *Biology of Anaerobic Microorganisms*, 373-415. Edited by A. J. B. Zehnder. New York: Wiley.

Megonigal, J.P., M.E. Hines, & P.T. Visscher. 2004. Anaerobic metabolism: Linkage to trace gases and aerobic processes, Pages 317-424 in Schlesinger, W.H. (Editor).

Biogeochemistry. Elsevier-Pergamon, Oxford, UK.

Meehl, G.A., T.F. Stocker, W.D. Collins, P. Friedlingstein, A.T. Gaye, J.M. Gregory, A. Kitoh, R. Knutti, J.M. Murphy, A. Noda, S.C.B. Raper, I.G. Watterson, A.J. Weaver, & Z.C. Zhao. 2007. Global climate projections. En: Solomon S, Qin D, Manning M, Chen Z, Marquis M, Averyt K, Tignor M, Miller (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.

Mecking, S., C. Langdon, R.A. Feely, C.L. Sabine, C.A. Deutsch, & D.A. Min. 2008. Climate variability in the North Pacific thermocline diagnosed from oxygen measurements: An update based on the U.S. CLIVAR/CO₂ Repeat Hydrography cruises. *Global Biogeochemical Cycles* 2: GB3015, doi:10.1029/2007GB003101.

Molina, V., O. Ulloa, L. Farías, H. Urrutia, S. Ramírez, P. Junier, & K.P. Witzel. 2007. Ammonia-oxidizing b-proteobacteria from the oxygen minimum zone off Northern Chile. *Applied Environmental Microbiology* 73: 3547-3555.

Molina, V., L. Belmar, & O. Ulloa. 2010. High diversity of ammonia-oxidizing archaea in permanent and seasonal oxygen-deficient waters of the eastern South Pacific. *Environmental Microbiology* 12: 2450-2465, doi:10.1111/j.1462-2920.2010.02218.x.

Montero, P., G. Daneri, L.A. Cuevas, H.E. Gonzalez, B. Jacob, L. Lizarraga, & E. Menschel. 2007. Productivity cycles in the coastal upwelling area off Concepción: the importance of diatoms and bacterioplankton in the organic carbon flux. *Progress in Oceanography* 75: 518-530.

Mulder A., L.A. Van de Graff Robertson & J.G. Kuenen. 1995. Anaerobic ammonium oxidation discovered in a denitrifying fluidized bed reactor. *FEMS Microbial Ecology* 16: 177-184.

Müller, V. 2001. Bacterial Fermentation. *Encyclopedia of Life Sciences & Nature Publishing Group / www.els.net*. 1-7 p.

Muñoz, P., J. Sellanes, C.B. Lange, M. Palma, & M.A. Salamanca. 2007. Temporal variability of ²¹⁰Pb fluxes and bioturbation in shelf sediments beneath the high primary production area off Concepción, central southern Chile (36 S). *Progress in Oceanography* 75: 586-602.

Murray, A.E., C.M. Preston, R. Massana, L.T. Taylor, A. Blakis, & K. Wu, et al. 1998. Seasonal and spatial variability of bacterial and archaeal assemblages in the coastal waters near Anvers Island Antarctica. *Applied Environmental Microbiology* 64: 2585-2595.

Neira, C., J. Sellanes, A. Soto, D. Gutiérrez, & V.A. Gallardo. 2001. Meiofauna and sedimentary organic matter off central Chile: response to changes caused by the 1997-98 El Niño. *Oceanologica Acta* 24: 313 -328.

Neunlist, S., & M. Rohmer. 1985. Novel hopanoids from the methylotrophic bacteria *Methylococcus capsulatus* and *Methylomonas methanica*- (22S)-35-aminobacteriohopane-30,31,32,33,34-pentol and (22S)-35-amino-3-beta methylbacteriohopane-30,31,32,33,34-

pentol. *Biochemical Journal* 231: 635-639.

Nixon, S.W. 1995. Coastal marine eutrophication: a definition, social causes, and future concerns. *Ophelia* 41: 199-219.

Ouverney, C.C., & J.A. Fuhrman. 2000. Marine Planktonic Archaea Take Up Amino Acids. *Applied Environmental Microbiology* 66: 4829-4833.

Pantoja, S., J. Sepúlveda, & H. González. 2004. Decomposition of sinking proteinaceous material during fall in the oxygen minimum zone off northern Chile. *Deep-Sea Research I* 51: 55-70.

Pantoja, S., P. Rossel, R. Castro, L.A. Cuevas, G. Daneri, & C. Córdova. 2009. Microbial degradation rates of small peptides and amino acids in the OMZ of Chilean coastal waters. *Deep-Sea Research II* 56: 1055-1062

Paulmier, A. 2005. Oxygen Minimum Areas (OMZs) of the modern ocean. A study focused in the Pacific North West, Ph.D. Thesis, University Curie, Paris, France, 248pp.

Paulmier, A., D. Ruiz-Pino, V. Garcçon, & L. Fariás. 2006. Maintaining of the East South Pacific Oxygen Minimum Zone (OMZ) off Chile. *Geophysical Research Letters* 33: 6 L20601, doi:10.1029/2006GL026801.

Paulmier, A. & D. Ruiz-Pino. 2008. Oxygen Minimum Zones (OMZs) in the modern ocean. *Progress in Oceanography* 80 (3-4): 113-128, doi:10.1016/j.pocean.2008.05.001.

Pearson, A., Z. Huang, A.E. Ingalls, C.S. Romanek, J. Wiegel, & K.H. Freeman, et al. 2004. Non marine crenarchaeol in Nevada hot springs. *Applied Environmental Microbiology* 70, 5229-5237.

Pearson A., & A.E. Ingalls. 2013. Assessing the use of archaeal lipids as marine environmental proxies. *Annual Review of Earth and Planetary. Sciences* 41: 359-384.

Pearson, A., Y. Pi, W. Zhao, W.J. Li, Y. Li, & W. Inskeep, et al. 2008. Factors controlling the distribution of archaeal tetraethers in terrestrial hot springs. *Applied Environmental Microbiology* 74: 3523-3532.

Peckman, J., J. Paul, & V. Thiel. 1999. Bacterially mediated formation of diagenetic aragonite and native sulphur in Zechstein carbonates (Upper Permian, central Germany). *Sedimentary Geology* 126: 205-222.

Peters, K.E., C.C. Walters, & J.M. Moldowan. 2005. *The Biomarker Guide, Second Edition, Volume II, Biomarkers and Isotopes in Petroleum Systems and Earth History*, United Kingdom at the Cambridge University Press, 684 pp.

Pilson, M.E.Q. 1998. *An Introduction to the Chemistry of the Sea*, Prentice Hall, Inc. Upper Saddle River, NJ. 431 pp.

Pitcher, A., C. Wuchter, K. Siedenberg, S. Schouten, & J.S. Sinninghe Damsté. 2011.

Crenarchaeol tracks winter blooms of ammonia-oxidizing Thaumarchaeota in the coastal North Sea. *Limnology and Oceanography* 56: 2308-2318.

Poth, M., & D.D. Focht. 1985. ^{15}N kinetic analysis of N_2O production by *Nitrosomonas europaea*: an examination of nitrifier denitrification. *Applied Environmental Microbiology* 49: 1134-1141.

Quiñones, R.A., H.A. Levipan, & H. Urrutia. 2009. Spatial and temporal variability of planktonic archaeal abundance in the Humboldt Current System off Chile. *Deep Sea Research II* 56 (16): 1073-1082.

Raskin, L., J.M. Stromley, B.E. Rittmann, & D.A. Stahl. 1994. Group-specific 16S rRNA hybridization probes to describe natural communities of methanogens. *Applied Environmental Microbiology* 60: 1232-1240.

Riemann, L., & F. Azam. 2002. Widespread N-acetyl-*d*-glucosamine uptake among pelagic marine bacteria and its ecological implications. *Applied Environmental Microbiology* 68: 5554-5562.

Rohmer, M., M. Dastillung, & G. Ourisson. 1980. Hopanoids from C_{30} to C_{35} in recent muds. *Naturwissenschaften*, 67: 456-458.

Rohmer, M., P. Bouvier-Nave, & G. Ourisson. 1984. Distribution of hopanoid triterpenes in prokaryotes. *Journal of General Microbiology* 130: 1137-1150.

Romano, A.H., S.J. Eberhard, S.L. Dingle, & T.D. McDowell. 1970. Distribution of the phosphoenolpyruvate:glucose phosphotransferase system in bacteria. *Journal of Bacteriology* 104: 808-813.

Romano, A. H.J.D. Trifone, & M. Brustolon. 1979. Distribution of the phosphoenolpyruvate:glucose phosphotransferase system in fermentative bacteria. *Journal of Bacteriology* 139: 93-97.

Richards, F.A. 1965. Anoxic basins and fjords. En: Ripley, J.P., Skirrow, G. (Eds.). *Chemical Oceanography*, Academic Press, London and New York, pp. 611-645.

Ritchie G.A. F., & D.J.D. Nicholas. 1972. Identification of nitrous oxide produced by oxidative and reductive processes in *Nitrosomonas europaea*. *Biochemical Journal* 126: 1181-1191.

Rütters H., H. Sass, H. Cypionka, & J. Rullkötter. 2001. Monoalkyl ether phospholipids in the sulfate reducing bacteria *Desulfosarcina variabilis* and *Desulforhabdus amnigenus*. *Archives of Microbiology* 176: 435-442.

Rütter, H., H. Sass, H. Cypionka, & J. Rullkötter. 2002. Phospholipid analysis as a tool to study complex Microbial communities in marine sediments. *Journal of Microbiological Methods* 48: 149-160.

Sánchez, G.E., C.B. Lange, H.E. González, G. Vargas, P. Muñoz, C. Cisternas, & S.

Pantoja. 2012. Siliceous microorganisms in the upwelling center off Concepción, Chile (36S): Preservation in surface sediments and downcore fluctuations during the past 150 years. *Progress in Oceanography* 92 (95): 50-65.

Schaechter, M., J.L. Ingraham, & F.C. Neidhardt (2006), *Microbe*, Washington DC: ASM Press.

Schink, B., & A.J.M. Stams. 2002. Syntrophism among prokaryotes. En: *The Prokaryotes, An Evolving Electronic Resource for the Microbiological Community*, release 3.8. Edited by M. Dworkin, K.H. Schleifer & E. Stackebrandt. New York: Springer.

Schink, B. 2006. Microbially Driven Redox Reactions in Anoxic Environments: Pathways, Energetics, and Biochemical Consequences. *Engineering in Life Sciences* 6: 228-233.

Schmidt, I. & E. Bock. 1997. Anaerobic ammonia oxidation with nitrogen dioxide by *Nitrosomonas eutropha*. *Archives of Microbiology* 167: 106-111.

Schouten, S., E.C. Hopmans, R.D. Pancost, & J.S. Sinninghe Damsté. 2000. Widespread occurrence of structurally diverse tetraether membrane lipids: evidence for the ubiquitous presence of low-temperature relatives of hyperthermophiles. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 97: 14421-14426.

Schouten, S., E.C. Hopmans, M.M.M. Kuypers, Y. van Breugel, A. Forster, & J.S. Sinninghe Damsté. 2003. Extremely high sea water temperatures at low latitudes during the middle Cretaceous as revealed by archaeal membrane lipids. *Geology* 31: 1069-1072.

Schouten, S., M.T.J. van der Meer, E.C. Hopmans, W.I.C. Rijpstra, A.L. Reysenbach, & D.M. Ward et al. 2007. Archaeal and bacterial glycerol dialkyl glycerol tetraether lipids in hot springs of Yellowstone National Park. *Applied Environmental Microbiology* 73: 6181-6191 10.1128/AEM.00630-07.

Schouten, S., E.C. Hopmans, M. Baas, H. Boumann, S. Standfest, M. Könneke, D.A. Stahl, & J.S. Sinninghe Damsté. 2008. Intact membrane lipids of *Candidatus Nitrosopumilus maritimus*, a cultivated representative of the cosmopolitan Mesophilic Group I Crenarchaeota. *Applied and Environmental Microbiology* 74: 2433-2440.

Schouten, S., W. Irene, C. Rijpstra, E. Durisch-Kaiser, C.J. Schubert, & J.S. Sinninghe Damsté. 2012. Distribution of glycerol dialkyl glycerol tetraether lipids in the water column of Lake Tanganyika. *Organic Geochemistry* 53: 34-37.

Schulz, H.D., & M. Zabel. 2006. *Marine Geochemistry* ISBN: 3540321438, 9783540321439, 574 pp.

Sellanes, J., & C. Neira. 2006. ENSO as a natural experiment to understand environmental control of meiofaunal community structure. *Marine Ecology-An Evolutionary Perspective* 27: 31-43.

Sepúlveda, J., F. Schubotz, E. Matys, S. Pantoja, C.B. Lange, & R.E. Summons. 2013. Vertical and spatial distribution of intact and core archaeal lipids in response to oxygenation gradients. 26th International Meeting on Organic Geochemistry, book of

abstracts 1: 151-152.

Shieh, W.Y., A.L. Chen, & H.H. Chiu. 2000. *Vibrio aerogenes* sp. nov., a facultatively anaerobic, marine bacterium that ferments glucose with gas production. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 50: 321-329.

Siebert, C., T.F. Nägler, F. von Blanckenburg, & J.D. Kramers. 2003. Molybdenum isotope records as a potential new proxy for paleoceanography. *Earth and Planetary Science Letters* 159-171.

Silver, M.W., A.L. Shanks, & J.D. Trent. 1978. Marine snow: microplankton habitat and source of small-scale patchiness in pelagic populations. *Science* 201: 371-373.

Simon, M., H.P. Grossart, B. Schweitzer, & H. Ploug. 2002. Microbial ecology of organic aggregates in aquatic ecosystems. *Aquatic Microbial Ecology* 28. 175-211.

Simidu, U. & K. Tsukamoto. 1985. Habitat segregation and biochemical activities of marine members of the family *Vibrionaceae*. *Applied Environmental Microbiology* 50: 781-790.

Sinninghe Damsté, J.S., W.I.C. Rijpstra, E.C. Hopmans, F.G. Prahl, S.G. Wakeham, & S. Schouten (2002), Distribution of membrane lipids of planktonic Crenarchaeota in the Arabian Sea, *Applied Environmental Microbiology*, 68, 2997-3002.

Sinninghe Damsté, J.S., W.I.C. Rijpstra, S. Schouten, J.A. Fierst, M.S.M. Jetten, & M. Strous. 2004. The occurrence of hopanoids in planctomycetes: Implications for the sedimentary biomarker record. *Organic Geochemistry* 35: 561-566.

Sobarzo, M., K. Shearman, & S. Lentz. 2007. Near-inertial motions over the continental shelf off Concepcion, central Chile. *Progress in Oceanography* 75: 348-362.

Sowers, K.R., S.F. Baron, & J.G. Ferry. 1984. *Methanosarcina acetivorans* sp. nov., an acetotrophic methane producing bacterium isolated from marine sediments. *Applied Environmental Microbiology* 47: 971-978.

Srain, B., Sepúlveda, J., Pantoja, S., Summons, R.E., Quiñones, R.A., Levipan, H.A. 2014. Archaeal and bacterial assemblages in the Oxygen Minimum Zone of the upwelling ecosystem off Central Chile as determined by organic biomarkers. *International Journal of Biodiversity, Oceanology and Conservation*. In press.

Stahl, D.A., & R. Amann. 1991. Development and application of nucleic acid probes. En: Stackebrandt E, Goodfellow M (eds), *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*. John Wiley & Sons Inc: New York. 205-248.

Stein, J.L., & M.I. Simon. 1996. Archaeal ubiquity. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 93: 6228-6230.

Stein, S.E. 2000. IR and Mass Spectra. En: NIST Chemistry WebBook; Mallard, W.G., Linstrom, P.J., Eds. NIST Standard Reference Database Number 69; National Institute of Standards and Technology: Gaithersburg, MD.

Stramma, L., G.C. Johnson, J. Sprintall, & V. Mohrholz. 2008. Expanding Oxygen-Minimum Zones in the Tropical Oceans. *Science* 320: 655-658.

Stramma, L., S. Schmidtko, L.A. Levin, & G.C. Johnson. 2010. Ocean Oxygen minima expansions and their biological impacts. *Deep Sea Research I* doi:10.1016/j.dsr.2010.01.005.

Stramma, L., E.D. Prince, S. Schmidtko, J. Luo, J.P. Hoolihan, M. Visbeck, D.W.R. Wallace, P. Brandt, & A. Körtzing. 2012. Expansion of oxygen minimum zones may reduce available habitat for tropical pelagic fishes. *Nature Climate Change* 2: 33-37.

Strub, P.T., J.M. Mesias, V. Montecino, J. Rutllant, & S. Salinas. 1998. Coastal ocean circulation off western South America. En: *The Sea*, vol. 11, Robinson, A. R., and K. H. Brink, eds. John Wiley and Sons, Inc., New York, 273-314.

Stryer, L. 1995. *Biochemistry*, fourth edition. W.H. Freeman, NY. 1009 pp.

Stüven, R., M. Vollmer, & E. Bock. 1992. The impact of organic matter on nitric oxide formation by *Nitrosomonas europaea*. *Archives of Microbiology* 158: 439-443.

Summons, R.E., L. Jahnke, J. Hope, & G. Logan. 1999. 2-Methylhopanoids as biomarkers for cyanobacterial oxygenic photosynthesis. *Nature* 23: 85-88.

Takii, S. 2003. Amino acids as main substrates for sulfate reducing bacteria in surface sediment of a eutrophic bay. *Journal of General and Applied Microbiology* 49: 329-336.

Talbot, H.M., D.F. Watson, J.C. Murrell, J.F. Carter, & P. Farrimond. 2001. Analysis of intact bacteriohopanepolyols from methanotrophic bacteria by reversed-phase high-performance liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionisation mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 921: 175-185.

Talbot, H.M., D.F. Watson, E.J. Pearson, & P. Farrimond. 2003. Diverse biohopanoid compositions of non-marine sediments. *Organic Geochemistry* 34: 1353-1371.

Taylor, K.W.R., M. Huber, C.J. Hollis, M.T. Hernandez-Sanchez, & R.D. Pancost. 2013. Re-evaluating modern and Paleogene GDGT distributions: Implications for SST reconstructions. *Global and Planetary Change* doi: 10.1016/j.gloplacha.2013.06.011.

Thamdrup, B., & T. Dalsgaard. 2002. Production of N₂ through anaerobic ammonium oxidation coupled to nitrate reduction in marine sediments. *Applied Environmental Microbiology* 68: 1312-1318.

Thornton, D.C.O. 2002. Diatom aggregation in the sea: Mechanisms and ecological implications. *European Journal of Phycology* 37: 149-161.

Tribouillard, N., T.J. Algeo, T. Lyons, & A. Riboulleau. 2006. Trace metals as paleoredox and paleoproductivity proxies: an update. *Chemical Geology* 232: 12-32.

Turner, R.E., & N.N. Rabalais. 1994. Coastal eutrophication near the Mississippi river

delta. *Nature* 368: 619-621.

Tyson, R.V., & H. Perason. 1991. Modern and ancient continental shelf anoxia: an overview. *Geological Society, London, Special Publications* 01/1991; 58 (1): 1-24. DOI:10.1144/GSL.SP.1991.058.01.01.

Ulloa, O., & S. Pantoja. 2009. The oxygen minimum zone of the eastern South Pacific. *Deep-Sea Research II* 56: 987-991.

Uda, I., A. Sugai, Y.H. Itoh, & T. Itoh. 2001. Variation in molecular species of polar lipids from *Thermoplasma acidophilum* depends on growth temperature. *Lipids* 36: 103-105.

Valdemarsen T., & E. Kristensen. 2010. Degradation of dissolved organic monomers and short-chain fatty acids in sandy marine sediment by fermentation and sulfate reduction. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 74: 1593-1605.

van der Maarel, M.J.E.C., W. Sprenger, R. Haanstra, & L.J. Forney. 1999. Detection of methanogenic archaea in seawater particles and the digestive tract of a marine fish species. *FEMS Microbiology Letters* 173: 189-194.

Van Mooy, B.A.S., R.G. Keil, & A.H., Devol. 2002. Impact of suboxia on sinking particulate organic carbon: Enhanced carbon flux and preferential degradation of amino acids via denitrification. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 66: 457-465.

Vargas, G., S. Pantoja, J. Rutillant, C.B. Lange, & L. Ortlieb. 2007. Enhancement of coastal upwelling and interdecadal ENSO-like variability in the Peru-Chile Current since late 19th century. *Geophysical Research Letters* 34: L13607, doi: 10.1029/2006GL028812.

Venter, J.C., K. Remington, J.F. Heidelberg, A.L. Halpern, D. Rusch, & J.A. Eisen et al. 2004. Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso Sea. *Science* 304: 66-74.

Venkatesan, M.I., E. Ruth, & I.R. Kaplan. 1990. Triterpenols from sediments of Santa Monica Basin, Southern California Bight, USA. *Organic Geochemistry* 16: 1015-1024.

Wang S.Y., E.B. Sudduth, M.D. Wallenstein, J.P. Wright, & E.S. Bernhardt. 2011. Watershed urbanization alters the composition and function of stream bacterial communities. *PLoS One* 6: e22972.

Ward B.B., K.A. Kilpatrick, E.H. Renger, & R.W. Eppley. 1989. Biological nitrogen cycling in the nitracline. *Limnology and Oceanography* 34: 493-513.

Ward, B.B. 2000. Nitrification and the marine nitrogen cycle. En: Kirchman D (ed). *Microbial Ecology*, Wiley-Liss: New York, 427-454.

Ward, D.M., S.C. Brassell, & G. Eglinton. 1985. Archaeobacterial lipids in hot-spring microbial mats. *Nature* 318: 656- 659.

Watson, D.F. 2002. Environmental distribution and sedimentary fate of hopanoid biological marker compounds. Ph.D. thesis, University of Newcastle, UK.

White, W.B., & D.R. Cayan. 1998. Quasi-periodicity and global symmetries in interdecadal upper ocean temperature variability. *Journal of Geophysical Research* 103: 21335-21354.

Wu, H.M. Green., & M.I.S. Cranton. 1997. Acetate cycling in the water column and surface sediment of Long Island Sound following a bloom. *Limnology and Oceanography* 42: 705-713.

Wuchter, C., S. Schouten, M.J.L. Coolen, & J.S. Sinninghe Damste. 2004. Temperature-dependent variation in the distribution of tetraether membrane lipids of marine Crenarchaeota: Implications for TEX₈₆ paleothermometry. *Paleoceanography* 19: PA4028, doi:4010.1029/2004PA001041, 002004-.

Wuchter, C.W., S. Schouten, & S.G. Wakeham. 2006. Archaeal tetraether membrane lipid fluxes in the northeastern Pacific and the Arabian Sea: Implications for TEX₈₆ paleothermometry. *Paleoceanography* 21: PA4208, doi:10.1029/2006PA001279

Wyrтки, K. 1962. The oxygen minima in relation to ocean circulation. *Deep-Sea Research* 9: 11-23.

Xavier, K.B., R. Peist, M. Kossmann, W. Boos, & H. Santos. 1999. Maltose metabolism in the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus litoralis*: purification and characterization of key enzymes. *Journal of Bacteriology* 181: 3358-3367.

Xie, S. 2013. Organic Geochemical Studies of Microbial Lipids and Carbon Flow in Oxygen-Deficient Marine Environments. PhD thesis, University of Bremen, Germany.

Zhang, Y., J.M. Wallace, & D.S. Battisti. 1997. ENSO-like interdecadal variability: 1900-93. *Journal of Climate* 10: 1004-1020.

Zheng, Y., R.F. Anderson, A. van Geen, & M.Q. Fleisheir. 2002. Remobilization of authigenic uranium in marine sediments by bioturbation. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 66: 1759-1772.

Zundel, M., & M. Rohmer. 1985. Hopanoids of methylotrophic bacteria *Methylococcus capsulatus* and *Methylomonas* sp. As possible precursors of C29 and C30 hopanoid chemical fossils. *FEMS Microbiology Letters* 28: 61-64.

Figuras

Figura 1.

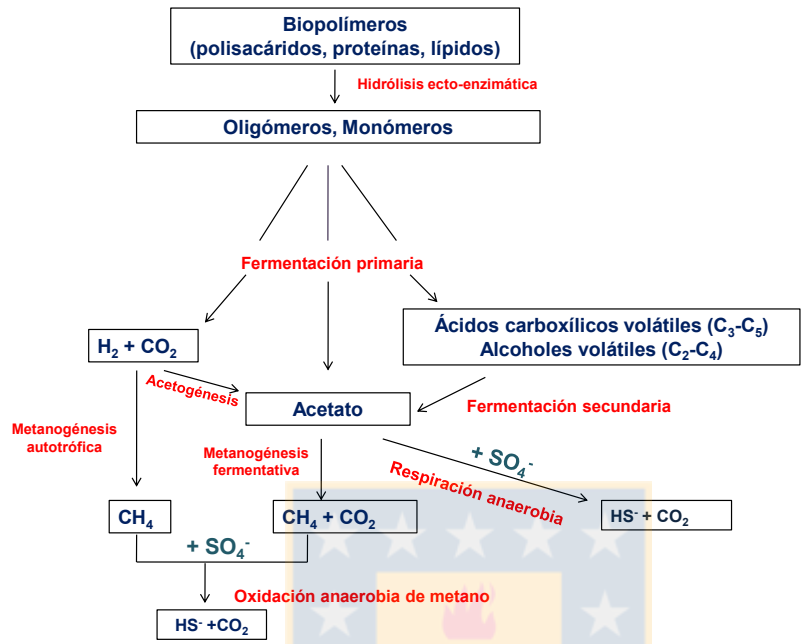
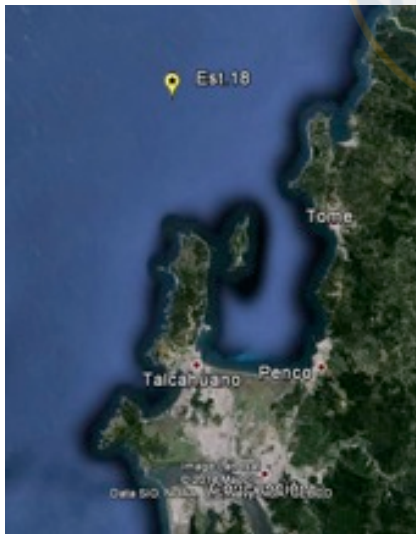


Figura 2.



Títulos de las figuras

Figura 1. Esquema metabólico para la degradación anaeróbica de materia orgánica. Los polímeros son hidrolizados mediante la acción de enzimas ecto-celulares a monómeros los cuales son luego fermentados a productos orgánicos, H_2 y CO_2 . El CH_4 es principalmente formado mediante la reducción de H_2 acoplado a la reducción de CO_2 o mediante la fermentación del acetato. El acetato puede ser formado directamente desde la fermentación primaria de los monómeros orgánicos formados durante la hidrólisis enzimática, mediante la acetogénesis desde H_2/CO_2 (acetogénesis quimiolitotrofica) ó desde la fermentación secundaria de los productos orgánicos de la fermentación primaria (acetogénesis heterotrofica). La reducción no-asimilativa de sulfato es llevada a cabo por bacterias reductoras de sulfato las cuales oxidan el acetato a CO_2 . Degradación anaeróbica de oligómeros y monómeros (i.e. glucosa y aminoácidos) con aceptores de electrones externos puede ser realizada directamente por bacterias anaerobias oxidando el carbono orgánico a CO_2 (Barker 1981; Lovley & Phillips 1986; Van Mooy 2002).

Figura 2. Ubicación geográfica de la zona de estudio en el sistema de surgencia de Chile central (36°S).

