



Universidad de Concepción
Dirección de Postgrado
Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas
Programa de Magíster en Ciencias con mención en Oceanografía

Distribución de esteroides en la zona influenciada por la descarga de agua dulce proveniente del Glaciar Jorge Montt, Campos de Hielo Sur, Patagonia Chilena

Tesis para optar al grado de Magíster en Ciencias con Mención en Oceanografía.

PABLO ANDRES RIQUELME GODOY
CONCEPCIÓN - CHILE
2016

Profesor Guía: Dr. Marcelo Gutiérrez
Departamento de Oceanografía
Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas
Universidad de Concepción

Universidad de Concepción
Dirección de Postgrado

La Tesis de Magister en Ciencias con mención en Oceanografía titulada “*DISTRIBUCION DE ESTEROLES EN LA ZONA INFLUENCIADA POR LA DESCARGA DE AGUA DULCE PROVENIENTE DEL GLACIAR JORGE MONTT, CAMPOS DE HIELO SUR, PATAGONIA CHILENA*”, del Sr. “*PABLO ANDRES RIQUELME GODOY*” y realizada bajo la Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas, Universidad de Concepción, ha sido aprobada por la siguiente Comisión de Evaluación:

Dr. Marcelo Gutiérrez
Profesor Guía
Universidad de Concepción

Dr. Silvio Pantoja
Profesor Co-guía
Miembro Comité de Tesis
Universidad de Concepción



Dr. Miguel Martínez
Miembro Comité de Tesis
Universidad de Concepción

Dra. Laura Farías
Directora
Programa magister en ciencias con mención en oceanografía
Universidad de Concepción

Agradecimientos

Quisiera agradecer a todos quienes me ayudaron y contribuyeron con la realización de esta tesis, familia, amigos, profesores y compañeros de programa, en especial a mis padres y mis hermanos, también debo dedicar unas palabras a una de las personas dos personas que contribuyeron a que esta tesis se realizará manteniendo mi motivación y entusiasmo apoyándome en los momentos difíciles es mi gran amiga Sandra Sanhueza y mi hermano Cristian Riquelme que sin su apoyo no habría sido posible todo esto. Al Dr. Marcelo Gutiérrez y el Dr. Silvio Pantoja por brindarme la posibilidad de hacer mi tesis de magister en el Laboratorio de Geoquímica orgánica. También agradecer a toda la gente que conforma el laboratorio de Geoquímica orgánica por su acogida, en especial al Dr. Benjamín Srain quien me brindo toda su colaboración en el análisis de mis muestras. A la Dirección de Postgrado de la Universidad de Concepción por su apoyo. Al programa Conicyt por brindarme la beca para la realización de mis estudios de postgrado. A los miembros del comité por su apoyo en esta tesis.

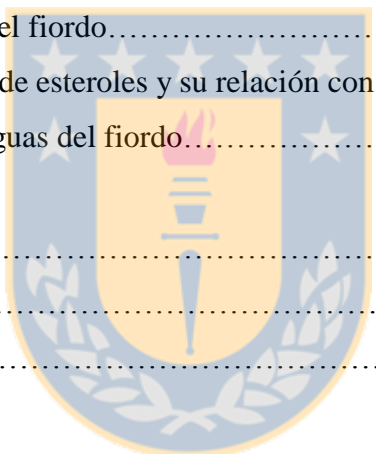
A quienes indudablemente siempre han estado presente y siempre lo estarán, gracias por su apoyo y cariño.



Índice de Contenidos

Resumen.....	ix
Abstract.....	xi
1.- INTRODUCCIÓN.....	1
1.1.- Impacto de la temperatura en los glaciares de la Patagonia.....	1
1.2.- Retroceso del Glaciar Jorge Montt.....	2
1.3.- Biomarcadores lipídicos.....	2
1.4.- Esteroles.....	3
1.5.- Formación y distribución de esteroles en el ambiente.....	4
1.6.- Glaciares: Vida en ambientes extremos.....	8
1.7.-Glaciar Jorge Montt: Modelo de estudio del aporte glaciar a ecosistemas marinos.....	8
2.- HIPÓTESIS Y OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	10
2.1.- HIPÓTESIS.....	10
2.2.- OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	10
3.- MATERIALES Y MÉTODOS.....	11
3.1.- Área de estudio.....	11
3.2.- Objetivo 1: <i>Determinar la abundancia y composición de esteroles en aguas superficiales y de fondo en el fiordo adyacente al glaciar Jorge Montt a lo largo del gradiente salino, producido por la descarga de agua dulce proveniente del Glaciar Jorge Montt (48.1- 48.3°S)</i>	12
3.3.- Objetivo 2: <i>Determinar la variabilidad estacional en la abundancia y composición de esteroles en la columna de agua del fiordo adyacente al Glaciar Jorge Montt y su relación con las variables fisicoquímicas y biológicas</i>	13
4.- RESULTADOS.....	14
4.1. -Capítulo 1. Impact of ice melting in the distribution of sterols in glacial fjords of Chilean Patagonia.....	14
4.1.1. – RESUMEN.....	15
Abstract.....	16
1. Introduction.....	18
2. Material and methods.....	20
2.1. Study area and sampling.....	20
2.2 .Sterols analysis.....	21
2.3. Data analysis.....	22

3. Results.....	23
3.1. Physicochemical and biological variability.....	23
3.2. Distribution and composition of sterols in the water column.....	25
3.3. Similarity analysis of sterol composition.....	28
4. Discussion.....	29
4.1. Environmental variability, setting melting scenario in glacial fjord.....	30
4.2. Sterol distribution in waters of Patagonian glacial fjords.....	33
4.3. Sterol signatures in glacial fjord waters.....	38
Acknowledgements.....	40
References.....	40
5.- DISCUSIÓN.....	68
5.1.- Variabilidad fisicoquímica y biológica en el fiordo.....	68
5.2.- Esteroles en la columna de agua.....	69
5.3.-Composición de esteroles en el fiordo.....	70
5.4.- Similitud en la composición de esteroles y su relación con las variables oceanográficas.....	71
5.5.- Señales de esteroles en las aguas del fiordo.....	72
6.- CONCLUSIONES.....	74
7.- REFERENCIAS.....	76
ANEXO.....	87



Índice de Figuras.

Figura 1. Clasificación general de los lípidos	3
Figura 2. Numeración de átomos de carbono en una molécula básica de esterol	4
Figura 3. Isomerización de isopentenil pirofosfato a dimetilalil pirofosfato (Stryer, 1997).	4
Figura 4. Síntesis del escualeno (Stryer, 1997).....	5
Figura 5. Vías de formación de hopanoides en procariontes y esteroides en Eucariontes (Jones <i>et al.</i> , 1994).	6
Figura 6. Esquema simplificado de los principales esteroides descritos en sistemas polares (Según: Venkatesan <i>et al.</i> , 1986; Green <i>et al.</i> , 1992; Muhlebach & Weber, 1998; Martins <i>et al.</i> , 2002; Villinski <i>et al.</i> , 2008).	7
Figura 7. Mapa área de muestreo, los puntos rojos señalan las estaciones de muestreo realizadas en el fiordo aledaño al glaciar Jorge Montt, mientras que los puntos azules la campaña realizada en el canal Martínez.	12
Figura 8. Sección Vertical de temperatura y salinidad en la zona de estudio durante abril 2012 (A, B) y noviembre 2013 (C, D).	68
Figura 9. Distribución de la concentración total de esteroides (ng L^{-1}) en aguas superficiales y de fondo a lo largo del fiordo durante todos los periodos (48.05-48.3°S).	68
Figura 10. Análisis de Cromatografía gaseosa, ejemplo de identificación del compuesto Phycomysterol B.	68

Índice de Tablas.

Tabla 1. Esteroides identificados en el fiordo cercano al glaciar Jorge Montt.	68
Tabla 2. Análisis de correlación spearman para ver las relaciones lineales significativas ($p < 0.05$) entre la composición de esteroides y las distintas variables obtenidas en este estudio	68

4.1.- Capítulo 1: Impact of ice melting in the distribution of sterols in glacial fjords of Chilean Patagonia

Índice de figuras.

Figure 1. Study area (A) and vertical sections and isolines of salinity in April (B) and August 2012 (C) and March (D) and November (E) 2013 in proglacial fjord, and laong Martinez channel in March 2013 (F). NPI: Northern Patagonian Icefield, SPI: Southern Patagonian Icefield.....	60
Figure 2. Concentration of sterols in surface (A) and bottom (B) waters along proglacial fjord and Martinez channel (C).	61
Figure 3. Average composition of sterols in surface (A) and bottom (B) waters along proglacial fjord and Martinez channel during study periods. MC, Martinez Channel.	62
Figure 4. Distribution of sterols among of plants (PL-S), microalgae (MIC-S), cholesterol (CHOL), and others in surface (A) and bottom (B) waters of proglacial fjord and Martinez channel (CM) during the study period. Plant sterol: β -sitosterol, stigmasterol, campesterol; Microalgae sterol: Methylene-cholesterol, brassicasterol, fucosterol.	63
Figure 5. Similarity analysis of sterol composition and distribution of total sterol, MIC-S to PL-S ratio and chlorophyll-a among samples. Groups C1, C2, C3, C4 and C5 showed similarity over 70%. Blue line indicates 70% of similitude, in sample ID GF=glacial fjord, BC=Baker channel and MC=Martinez channel.	64
Figure 6. Relative abundance (%) of cholesterol, Microalgae sterols, Plant sterols, and other sterols as defined by similarity analysis.	65
Figure 7 . Supplementary information. Vertical sections and isolines of temperature in April (A) and August 2012 (B) and March (C) and November (D) 2013 in proglacial fjord, and laong Martinez channel in March 2013 (E).....	66

Índice de Tablas.

Table 1. Sample ID and chemical and biological characteristics of the waters sampled during April and August 2012 in the fjord adjacent to Jorge Montt glacier. Concentrations of nutrients are average of duplicate samples. n.d.: not detected, - : not data.	54
Table 2. Two-way ANOVA to test statistical differences on the rank-transformed data of dissolved inorganic nutrients, prokaryote abundance, chlorophyll-a concentration and sterol concentrations (-- : insufficient data for analysis).	56
Table 3. Sterols detected in waters of the fjord adjacent to the Jorge Montt glacier. In numerical nomenclature ($C_x \Delta^y$), “x” represents carbon number and “y” indicates position of double bond, y = 0 means absence of double bonds (stanols).	57
Table 4. Significant correlations between environmental variables and sterol abundance, stanols proportion, plant sterols (PL-S), microalgae sterols (MIC-S) and cholesterol (CHOL).	58
Table 5. Supplementary information. Concentration of individual and total sterols ($ng L^{-1}$) in surface and bottom waters of the fjord adjacent to Jorge Montt glacier (glacial fjord) and in Baker and Martinez channels.	67



RESUMEN

El glaciar Jorge Montt, ubicado al norte del Campo de Hielo Sur, ha experimentado uno de los más drásticos retrocesos en el último siglo. Para determinar el impacto del flujo de agua de deshielo sobre la distribución de moléculas orgánicas, se analizó la composición y distribución de esteroides en el fiordo adyacente al glaciar Montt. Se realizaron cuatro campañas oceanográficas entre 2012 y 2013 que incluyen periodos contrastantes de flujo de agua de deshielo. La abundancia y composición de esteroides fue determinada por Cromatografía de Gas acoplada a Espectrometría de Masa. La distribución de salinidad y temperatura en la columna de agua evidenciaron la presencia de una capa de agua de deshielo fría ($< 9\text{ }^{\circ}\text{C}$) y dulce ($< 10\text{ psu}$) que se extendió entre los 4 y 10 m de profundidad durante los diferentes periodos estudiados. Bajo la capa superficial un aumento en la salinidad y temperatura reflejó la menor influencia de agua dulce y por lo tanto una transición hacia aguas más marinas (26 a 34 psu). Variaciones estacionales fueron observadas en la extensión vertical y horizontal de la capa superficial de agua de deshielo proveniente del glaciar Jorge Montt. Así, en abril del 2012, esta capa fría ($0.7\text{--}3\text{ }^{\circ}\text{C}$) y de baja salinidad (2 - 5 psu) alcanzó 4 m de espesor y se extendió hasta aproximadamente 26 km desde la boca del glaciar hasta el canal Baker, lo que fue interpretado como un escenario de mayor derretimiento glaciar. Contrario a esto el periodo de noviembre presentó una mayor temperatura superficial (hasta $11\text{ }^{\circ}\text{C}$) y una mayor salinidad superficial (hasta 7 psu) y se interpretó como el escenario de menor deshielo.

Se identificaron en total 17 moléculas diferentes de esteroides durante el período estudiado. La concentración de esteroides en la columna de agua en todas las campañas varió entre 35,3 y 1726,2 ng L^{-1} , estos valores se encuentran dentro del rango reportado para sistemas de altas latitudes como lagos de la antártica y el océano austral. La mayor concentración de esteroides se observó en el mes de Marzo 2013 y coincidió con las máximas concentraciones de clorofila-a, mientras que la menor concentración se observó en ese mismo periodo en área del canal Baker, en el sitio más alejado del frente del glaciar. Se observó una correlación positiva significativa entre clorofila-a y la concentración de esteroides, por el contrario la salinidad mostró una correlación negativa con la abundancia de esteroides.

La composición de esteroides se caracterizó por una predominancia de colesterol (colest-5-en- 3β -ol, $\text{C}_{27}\Delta^5$), Brasicasterol (24-metil-colest-5,22-dien- 3β -ol, $\text{C}_{28}\Delta^{5,22}$), Metileno-colesterol (24-metileno-colest-5-en- 3β -ol, $\text{C}_{28}\Delta^{5,24(28)}$), β -sitosterol, β -sitostanol (24-etil-colesterol, $\text{C}_{29}\Delta^5 + \text{C}_{29}\Delta^0$) y Fucosterol (Stigmasta-5,24(28)-dien- 3β -ol, $\text{C}_{29}\Delta^{5,24(28)}$), los cuales representaron más del 70 y hasta 90 % en los periodos estudiados. La composición de esteroides varió estacionalmente, así en otoño (considerado el periodo de mayor deshielo) dominó β -sitosterol (alrededor del 50%) el cual ha sido identificado como

indicador de aporte terrígeno por tener su origen en plantas vasculares. En el periodo de menor deshielo fucosterol, un esteroles identificado solo en organismos marinos, constituyó un 40% del total de esteroides, lo que sugiere la prevalencia de componentes autóctonos en épocas del año con menor influencia glacial. En marzo de 2013, el periodo de mayor concentración de esteroides y clorofila-a, metileno-colesterol fue el esteroles predominante. Esta molécula ha sido identificada en microalgas marinas del grupo de las diatomeas. En agosto 2013, brasicasterol, también considerado un marcador de microalgas marinas y diatomeas, representó una mayor fracción en la zona cercana al glaciar, mientras que en la zona del canal Baker el β -sitosterol fue predominante.

Nuestros resultados sugieren que la biomasa de fitoplancton (clorofila-a) contribuiría mayormente a la abundancia de esteroides en el fiordo adyacente al glaciar Jorge Montt durante el periodo de verano. Durante épocas de mayor deshielo se observó un aumento de la concentración de β -sitosterol (50%) en la zona del fiordo adyacente al glaciar, lo que indica una predominancia de esteroides que provienen de plantas vasculares. Esto sugiere que una fracción importante del material orgánico proveniente de eucariontes descargado por el agua de deshielo tendría una señal terrígena, y por el contrario en los periodos de menor deshielo la señal de esteroides de origen marino (metileno-colesterol y fucosterol) se hace más importante, lo que sugiere una predominancia de materia orgánica de origen autóctono (microalgas).

Considerando que el material terrígeno (en particular plantas) es considerado menos biodisponible que aquel producido *in situ* por microalgas, sugerimos que un eventual escenario de mayor deshielo puede modificar la biodisponibilidad de sustratos orgánicos y por lo tanto impactar la actividad heterotrófica y la composición de la comunidad microbiana de los fiordos patagónicos

Esta investigación fue financiada por el PROYECTO FONDECYT N°11110515, el Programa COPAS Sur-Austral (PFB-31) y Programa beca CONICYT para magister en Chile.

ABSTRACT

Jorge Montt glacier, located north of the Southern Ice Field, has experienced one of the most dramatic retreats in the last century. To determine the impact of the meltwater flux on the distribution of organic molecules, the composition and distribution of sterols in the fjord adjacent to Jorge Montt glacier was analyzed. Four oceanographic cruises were carried out between 2012 and 2013 during contrasting periods of meltwater flux. The abundance and composition of sterol was determined by gas chromatography coupled to mass spectrometry. The distribution of temperature and salinity in the water column showed the presence of a cold ($<9^{\circ}\text{C}$) and freshwater (<10 psu) layer between 4 and 10 m depth in all seasons. Below surface layer, salinity (26 to 34 psu) and temperature increased, evidencing the presence of marine waters in deeper strata of the fjord basin. Seasonal variations were observed in vertical and horizontal extension of the surface meltwater layer. Thus, in April 2012, this cold ($0.7\text{--}3^{\circ}\text{C}$) and low salinity (2-5 psu) surface layer reached 4 m depth and extended to approximately 26 km from the head of the fjord to the Baker channel, it was interpreted as a scenario of increased glacial melting. Contrary to that, in November higher surface temperature (up to 11°C) and salinity (up to 7 psu) was interpreted as lower melting scenario.

A total of 17 sterols were identified during the period studied. Sterol concentration in the water column ranged between 35.3 and 1726.2 ng L^{-1} during the study period, these values were in the range of those reported for high latitude systems such as Antarctic lakes and Southern Ocean. The highest concentration of sterols was observed in March 2013 and coincided with high concentrations of chlorophyll-a, while the lowest concentration was observed in the same period in Baker channel. A significant positive correlation between chlorophyll-a concentration and sterols was observed, in contrast salinity showed a negative correlation with the abundance of sterols.

Sterol composition was characterized by a predominance of cholesterol (cholesta-5-en-3 β -ol, $\text{C}_{27}\Delta^5$), brassicasterol (24-methyl-cholest-5,22-dien-3 β -ol, $\text{C}_{28}\Delta^5$), methylene- cholesterol (24-Methylene-cholest-5-en-3 β -ol, $\text{C}_{28}\Delta^{5,24(28)}$), β -sitosterol, β -sitostanol (24-ethyl-cholesterol, $\text{C}_{29}\Delta^5 + \text{C}_{29}\Delta^0$) and fucosterol (Stigmasta-5,24 (28) -diene-3 β -ol, $\text{C}_{29}\Delta^{5,24(28)}$), which accounted for more than 70 and 90% during certain periods. Sterol composition varied seasonally, with a predominance of β -sitosterol (about 50%) in autumn (considered the greatest period of melting), since their source in vascular plants β -sitosterol is considered an indicator of terrigenous contribution. In the period of low meltwater flux, fucosterol, a sterol found only in marine

organisms, represented 40% of total sterols, suggesting the prevalence of autochthonous components. In March 2013, the period of highest concentration of sterols and chlorophyll-a, the methylene-cholesterol predominated, which is considered representative of diatoms. In August 2013, brassicasterol, also considered a marker of marine microalgae and diatoms, represented a significant fraction of sterols in the area near to the glacier, while in the area of the canal Baker β -sitosterol predominated.

Our results suggest that phytoplankton biomass (chlorophyll-a) contribute mostly to the abundance of sterols in the fjord adjacent to Jorge Montt glacier during the summer. Under high melting scenario an increase of β -sitosterol concentration (50%) in the area adjacent to glacial fjord was observed, indicating a predominance of sterols derived from vascular plants. These results suggest that a significant fraction of organic material from eukaryote discharged by meltwater would have a terrigenous source, whereas in periods of low melting sterols had mostly a marine origin (methylene-cholesterol and fucosterol), suggesting a predominance of autochthonous organic matter (algae).

Since terrigenous material (especially plants) is considered less bioavailable than that produced in situ by microalgae, we suggest that in a potential scenario of high ice melting low bioavailability of organic substrates can impact heterotrophic activity and composition microbial community of the fjords.

This research was funded by FONDECYT PROJECT N°11110515, the South-Austral CUPS Program (PFB-31) and CONICYT scholarship for master's program in Chile.

1. INTRODUCCION

1.1.- Impacto de la temperatura en los glaciares de la Patagonia.

En la actualidad se estima que los glaciares cubren el 10% de la superficie terrestre y albergan aproximadamente el 70% del agua dulce de la tierra (U.S. Geological Survey, USG), por tanto son importantes en términos de balance hídrico global. La mayor parte de los glaciares se ubican en zonas de altas latitudes como la Antártida (Hemisferio Sur) y Groenlandia (Hemisferio Norte), los que en la última década han experimentado un rápido derretimiento (Krabill *et al.*, 2004; Rignot & Kanagaratnam, 2006; Velicogna & Wahr, 2006a; Velicogna & Wahr, 2006b; Chen *et al.*, 2006a; Chen *et al.*, 2006b; Rignot *et al.*, 2008a, Rignot *et al.*, 2008b; Howat *et al.*, 2008; Velicogna, 2009; Khan *et al.* 2010; Rignot *et al.* 2011). El aumento de la temperatura promedio global atribuido principalmente al aumento del CO₂ atmosférico (Solomon *et al.*, 2009), que se ha estimado en 0,74 °C entre los años 1906 y 2005 (Intergovernmental Panel on Climate Change, 2007), es considerado uno de los principales responsables de la pérdida de cobertura de hielo. En nuestro país la Patagonia representa una de las regiones de fiordos con influencia glaciar más extensas en el mundo, se encuentra ubicada en el extremo sureste del Océano Pacífico (41,5°S - 55,9°S) y cuenta con dos grandes campos de hielo: Campos de Hielo Norte y Campos de Hielo Sur. Este último destaca por ser la tercera reserva mundial de agua dulce después de la Antártida y Groenlandia, y se estima que aportaría *ca.* 3000 m³ de agua por segundo al océano (Pantoja *et al.*, 2011). Los campos de hielo Patagónicos han experimentado un rápido adelgazamiento en las últimas décadas, como es el caso del glaciar Jorge Montt (Rivera *et al.*, 2011). Durante los últimos años, el aumento de la temperatura y la disminución en las precipitaciones, han sido factores determinantes en la pérdida de hielo del Campo de Hielo Patagónico Sur (Aniya, 1998; Warren & Aniya, 1999; Rignot *et al.*, 2003; Rivera *et al.*, 2007). La contribución de la fusión de los Campos de Hielo Patagónicos al aumento del nivel del mar, se ha estimado en 9% de la contribución total de los glaciares de montaña en los últimos 50 años (Rignot *et al.*, 2003; Glasser *et al.*, 2011). Estas estimaciones representan un alto valor si se compara el área de los campos de hielo de la Patagonia con la contribución de otros campos de hielo, *e.g.* glaciares en Alaska (Rignot *et al.*, 2003). Otros antecedentes indicarían que los glaciares que conforman los campos de hielo de la Patagonia se estarían derritiendo 50% más rápido que una década atrás y habrían perdido en promedio 1,8 metros de hielo y nieve cada año desde el 2000, lo que se traduce en un aumento del nivel del mar de 0,067 mm anuales (Willis *et al.*, 2012). Así, sólo desde 1998 los Campos de Hielo Patagónicos ha contribuido al 2% del total del aumento del nivel del mar (Willis *et al.*, 2012). En particular, especial atención han tenido los glaciares que han perdido masas de hielo a elevadas tasas en las últimas décadas (Rivera *et al.*, 2005; Rivera *et al.*, 2007), como es el caso del Glaciar Jorge Montt que desde 1898 al 2011 ha retrocedido 19,5 km (Rivera *et al.*, 2011).

1.2.- Retroceso del Glaciar Jorge Montt

El Glaciar Jorge Montt es un glaciar de marea y uno de los tres glaciares más grandes del Campo de Hielo Sur (Rivera *et al.*, 2007), posee un área de acumulación de 348 km² (Aniya *et al.*, 1997) y una superficie de 464 km². En la actualidad el flujo de partición en las masas de hielo de este glaciar ha sido cuantificado en 2.4 km³ por año, estimándose una tasa de retroceso de 1 km por año entre el año 2010 y 2011, siendo hasta esa fecha el glaciar que más rápido retrocede en el territorio chileno (Rivera *et al.*, 2012). El retroceso del glaciar Jorge Montt conlleva la descarga de grandes cantidades de agua dulce al sistema de canales y fiordos aledaños, sin embargo aún se desconoce el tipo de material que estaría aportando a esta zona. Anesio *et al.* (2010) sugiere que los glaciares podrían ser una fuente de carbono orgánico para la actividad biogeoquímica de los sistemas acuáticos adyacentes. Para el fiordo aledaño al Glaciar Jorge Montt no existe evidencia de aporte de materia orgánica glaciar, sin embargo un estudio reciente realizado por Gutiérrez *et al.* (2015), demostró que la entrada de agua dulce a ese sistema impactaría la composición de la comunidad microbiana, además estudios previos con isótopos estables y composición de biomarcadores realizados en la zona norte de la Patagonia demostraron que las entradas de agua dulce influiría tanto las características físicas como biológicas en la zona de fiordos patagónicos (Sepúlveda *et al.*, 2011; Silva *et al.*, 2011; Vargas *et al.*, 2011).

1.3.- Biomarcadores lipídicos

Se consideran biomarcadores aquellas moléculas orgánicas que pueden estar relacionadas estructuralmente con una fuente biológica, proceso biogeoquímico o una fuente geográfica específica (Bianchi & Canuel 2011). Los biomarcadores orgánicos son compuestos específicos y característicos de ciertos organismos, cuya identificación en entornos naturales pueden entregar información sobre el origen y los procesos de transformación a los que está sometida la materia orgánica. Un biomarcador es considerado un buen trazador de la materia orgánica cuando representa una alta especificidad de su biosíntesis en diferentes organismos (Mudge *et al.*, 1997) y una relativa estabilidad en ambientes naturales (Bianchi & Canuel 2011). Aunque los biomarcadores, como cualquier compuesto orgánico pueden sufrir diagénesis y degradación con diferentes grados de intensidad en el ambiente (Bianchi & Canuel 2011), éstos pueden conservar la integridad de su estructura de manera que sus fuentes pueden ser reconocidas (Peng *et al.*, 2005). En el grupo de biomarcadores orgánicos destacan los lípidos por ser importantes componentes de los organismos vivos (Wakeham *et al.*, 1997). Su extracción se realiza con solventes orgánicos y por lo general se identifican por medio de cromatografía (Murphy *et al.*, 2001). Los biomarcadores lipídicos han sido utilizados en estudios ambientales; tales como la identificación de fuentes de materia orgánica (Jeng *et al.*, 2003; Vargas *et al.*, 2011), el análisis de la respuesta a las perturbaciones del medio ambiente (Kaur *et al.*, 2005) y en ecología microbiana (Vestal & White 1989; Klamer & Bååth, 1998). Por ejemplo, se ha observado que las moléculas lipídicas

pueden modificar su abundancia, estructura y configuración al someterse a stress ambiental, cambiando por ejemplo el número de dobles enlaces por estrés oxidativo (Singh *et al.*, 2002; Valavanidis *et al.*, 2006). Los lípidos se clasifican en tres grupos (Figura 1), siendo la fracción neutra la utilizada mayormente como biomarcadores, en este grupo se encuentran los ácidos grasos y esteroides. Estudios han demostrado que dentro de las diferentes clases de lípidos, los esteroides pueden ser biomarcadores adecuados para identificar la entrada de materia orgánica a un cuerpo de agua, ya que estas moléculas se acumularían en sedimentos y tendrían algún grado de resistencia a la degradación biológica (Machenzie *et al.*, 1982; Brassell & Eglinton, 1981; Volkman, 1986).

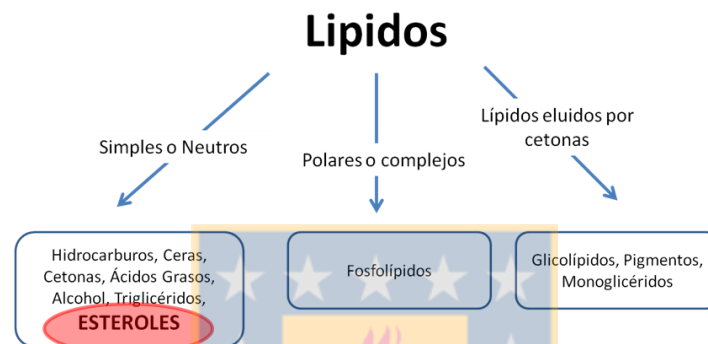


Figura 1. Clasificación general de los lípidos

1.4.- Esteroides

Los esteroides son moléculas orgánicas compuesta por una serie de anillos (esterano) y una cadena lateral alifática de ocho o más átomos de carbono en la posición 17 (Figura 2), formando parte de la fracción lipídica no-saponificable. Los esteroides son componentes vitales de las membranas de todos los organismos eucariotas y aunque la evidencia no es conclusiva se han identificado en algunos procariontes fotosintéticos (Volkman *et al.*, 2003). En consecuencia, los esteroides tienen importantes roles dentro de las células en función de los organismos que los sintetizan. Una de sus funciones clave es la regulación en la fluidez de la membrana y su permeabilidad mediante la condensación de la bicapa lipídica. El grupo hidroxilo en un extremo del esteroide se une a un átomo de oxígeno del carbonilo de la cabeza de los fosfolípidos a través de enlaces de hidrógeno, mientras que la cola flexible (hidrocarburo) en el otro extremo de la esteroide se inserta en el núcleo hidrofóbico de la bicapa (Volkman *et al.*, 2003; Bianchi & Canuel, 2011). De esta manera, la molécula de esteroide impide la cristalización de la cadena de ácido graso dentro de la bicapa, impidiendo la fase de transición dejándola en un estado fluido. Por el contrario, una molécula de esteroide voluminosa puede obstaculizar estéricamente el movimiento de las cadenas de ácido graso que conducen a la disminución de la fluidez de la membrana, por lo tanto la rigidez de la bicapa (Stryer, 1997). El rol estructural que tienen estas moléculas orgánicas les proporcionaría cierta resistencia a ser degradadas, siendo posible encontrarlas bien preservadas en sedimentos bajo ciertas condiciones ambientales de (Mudge *et al.*,

1997; Martins *et al.*, 2002). Sin embargo, en la columna de agua los esteroles están sometidos a mecanismos abióticos como: la luz, radicales libres ($\cdot\text{OH}$) y temperatura, y procesos bióticos como hidrólisis enzimática bacteriana (Chróst, 1991) que contribuyen a su degradación en el ambiente marino (Rontani, 2008; Rontani *et al.*, 2011; Rontani, 2012).

En los organismos el principal esteroles que se encuentra en los tejidos de los vertebrados es el colesterol, por otro lado el estigmasterol es considerado el principal esteroles en plantas superiores, ambos precursores en la formación de hormonas (Bianchi & Canuel, 2011). Aunque ciertos esteroides son sintetizados solo por organismos específicos, todos estos lípidos se derivan a través de la ciclación del escualeno (triterpeno).

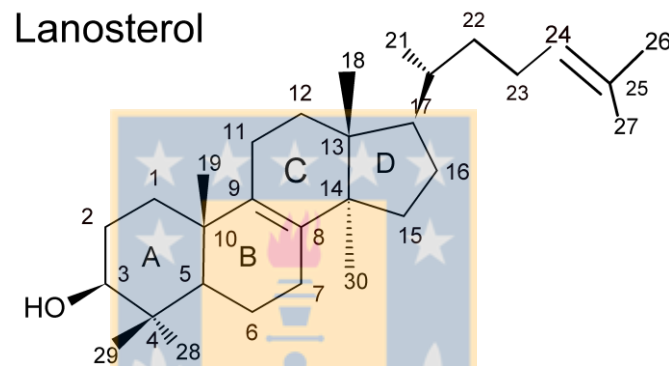


Figura 2. Numeración de átomos de carbono en una molécula básica de esteroles

1.5.- Formación y distribución de esteroides en el ambiente.

La formación de los esteroides se deriva de la síntesis y posterior ciclación del escualeno, un hidrocarburo C_{30} que se compone de seis unidades de isopreno (C_5). El primer paso en la síntesis del escualeno es la isomerización del isopentenil pirofosfato a dimetilalil pirofosfato (Figura 3).

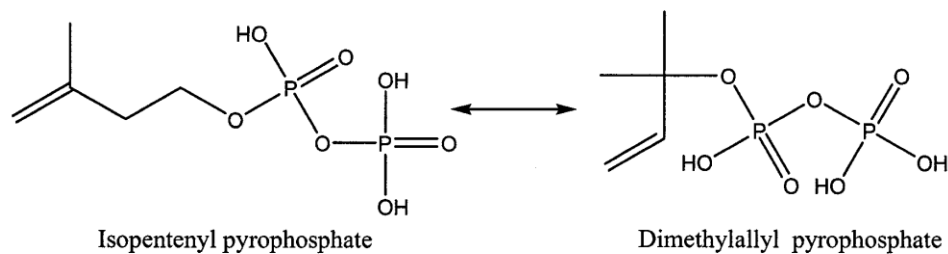


Figura 3. Isomerización de isopentenil pirofosfato a dimetilalil pirofosfato (Stryer, 1997).

El siguiente paso es la condensación de estas dos moléculas isómeras, para formar una nueva

estructura de C₁₀ llamada geranyl pirofosfato que nuevamente sufre una transformación al condensarse con otro isopentenil pirofosfato para generar una molécula de farnesil pirofosfato (C₁₅) la cual posee una cabeza (pirofosfato) y cola (hidrocarbonatada). El último paso es la unión de dos moléculas de farnesil pirofosfato a través de sus colas formando finalmente al escualeno (C₃₀).

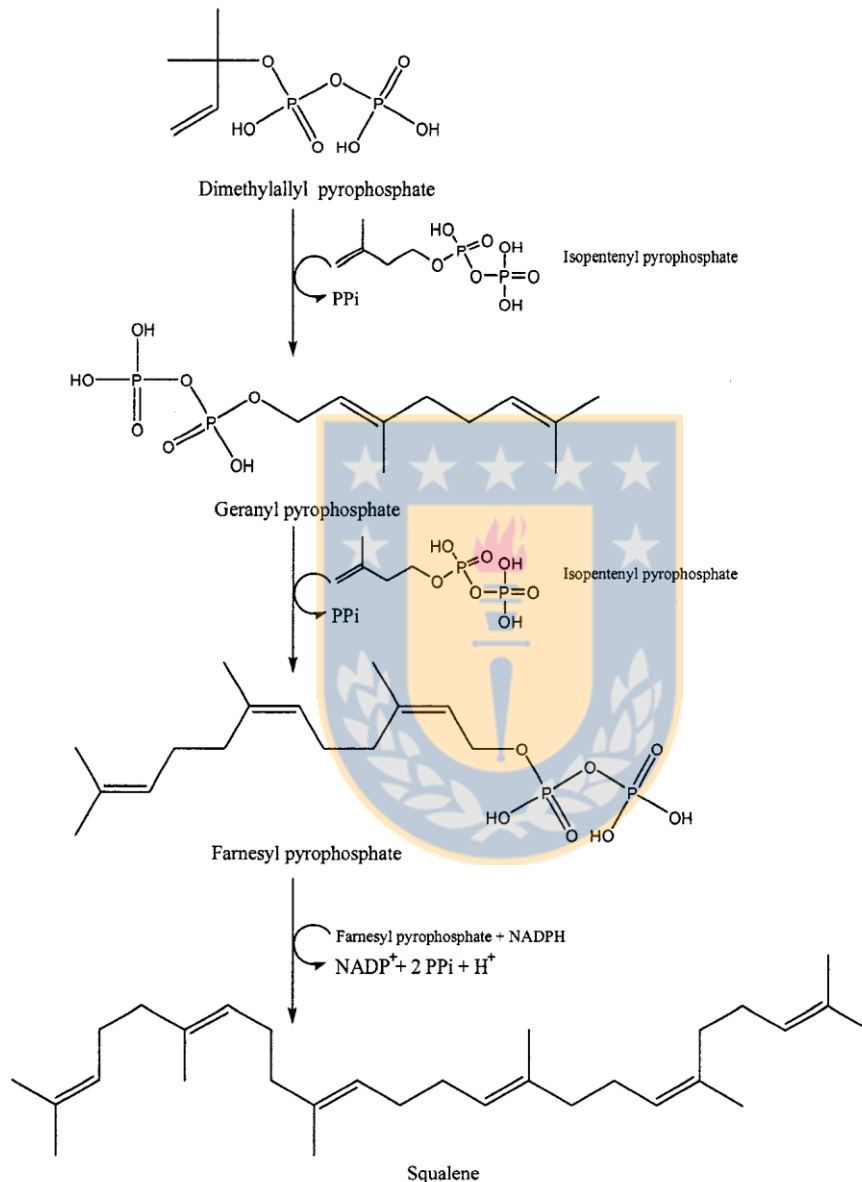


Figura 4. Síntesis del escualeno (Stryer, 1997)

Por último, el escualeno se somete a la ciclación para dar triterpenoides que se encuentran en bacterias y eucariotas. Sin embargo, las vías de biosíntesis son bastante diferentes entre sí ya que las bacterias producen hopanoides (triterpenoides biosintetizados anaeróbicamente, en que la sustitución de la cadena lateral se produce a través de grupos hidroxilo y amino), mientras que los organismos eucariotas sintetizan esterol (sustitución de la cadena lateral por grupos metilo y etilo). Un resumen de

los pasos para la biosíntesis de hopanoides bacterianos y esteroides en eucariotas se muestra en la Figura 5.

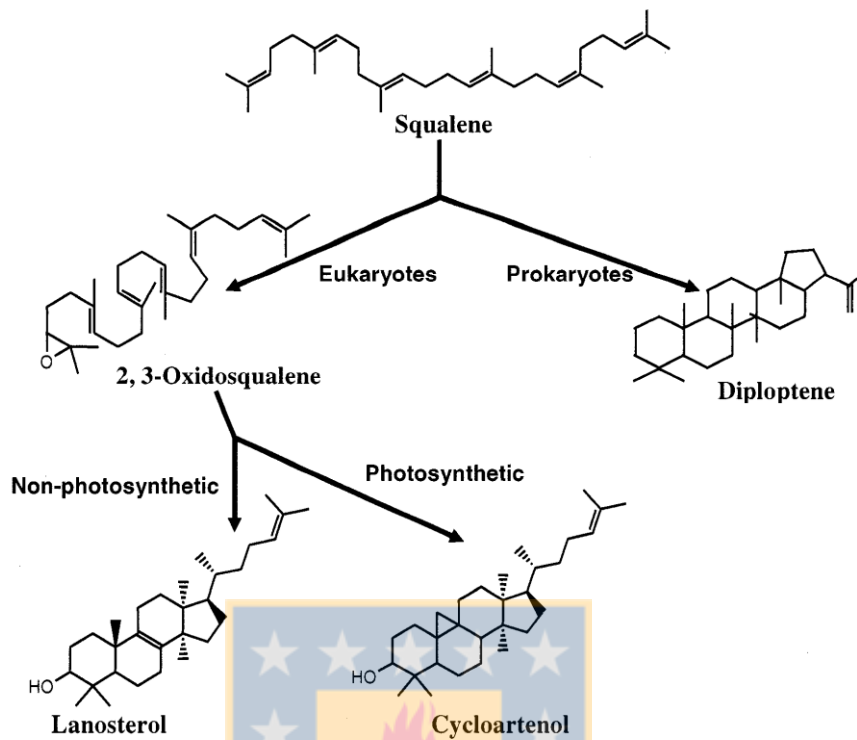


Figura 5. Vías de formación de hopanoides en procariontes y esteroides en Eucariotes (Jones *et al.*, 1994).

Además de su papel fundamental en el control de la fluidez en la membrana, los esteroides también tienen efectos importantes en la regulación de diversos sistemas, por ejemplo el colesterol está implicado en el desarrollo embrionario de los vertebrados y la interacción del colesterol con caveolina induce la formación de microdominios. Los esteroides provienen de variadas fuentes biológicas, pero hay otros que sólo parecen limitarse a organismos específicos (Brassell, 1994; Volkman, 2005). Esto ocurre porque a pesar de compartir rutas biosintéticas comunes, la diversidad de organismos que los producen permiten variaciones en el número de enlaces insaturados y sus posiciones dentro de la cadena lateral y los patrones de alquilación de cadena lateral que resultan en una variedad de estructuras discretas de esteroides en el ambiente marino (De Leeuw & Baas, 1986; Brassell, 1994; Volkman, 2005).

Junto con las funciones biológicas en que intervienen los esteroides, estas moléculas también tienen importantes aplicaciones en estudios ambientales. Por ejemplo su distribución en el ambiente ha sido vinculado como parte del reservorio en el material orgánico particulado de la columna de agua (Wakeham & Beier, 1991; Wakeham, 1995; Colombo *et al.*, 1996; Hudson *et al.*, 2001), así como en estudios de las vías degradativas asociadas con la herbivoría y depredación (Grice *et al.*, 1998; Hamm *et*

al., 2001; Nelson *et al.*, 2001) y sus alteraciones diagenéticas (Nishimura, 1978; Sun & Wakeham, 1999). En sistemas polares, tales como el mar de Ross, mar de Weddell y lagos en la Antártida, zonas que posee parte importante de los glaciares mundiales (Venkatesan *et al.*, 1986; Green *et al.*, 1992; Muhlebach & Weber, 1998; Martins *et al.*, 2002; Villinski *et al.*, 2008), los esteroides junto a otros biomarcadores y han sido utilizados para entender cuáles son las fuentes biológicas dominantes. En estos estudios se evidencia la presencia de una variedad de esteroides que serían indicadores de contribución de diferentes grupos de organismos eucariontes (Figura 6), así como variaciones estacionales influenciada por las comunidades de organismos eucariontes dominantes, encontrándose en época invernal una proliferación de organismos de pequeño tamaño como es el bacterioplancton y dinoflagelados a diferencia del periodo estival que dominarían diatomeas por la mayor exposición solar y ácido silícico de aporte continental (Villinski *et al.*, 2008). El sistema de fiordos y canales de la Patagonia chilena es influenciado por la entrada de material alóctono (Vargas *et al.* 2011; Montero *et al.* 2011), el cual y su trama trófica es considerada similar a la de los sistemas polares, aumentando la proliferación de diatomeas en verano (González *et al.* 2011; Torres *et al.* 2011). Por lo tanto, se propone que estas variaciones deberían verse reflejadas en la composición de esteroides. Por otra parte, los glaciares albergan comunidades activas de microorganismos que subsistirían a pesar de las condiciones extremas en el hielo, haciendo a los glaciares microambientes aptos para la vida (Hodson *et al.*, 2008; Anesio *et al.*, 2009) y potenciales fuentes de materia orgánica para sistemas acuáticos adyacentes.

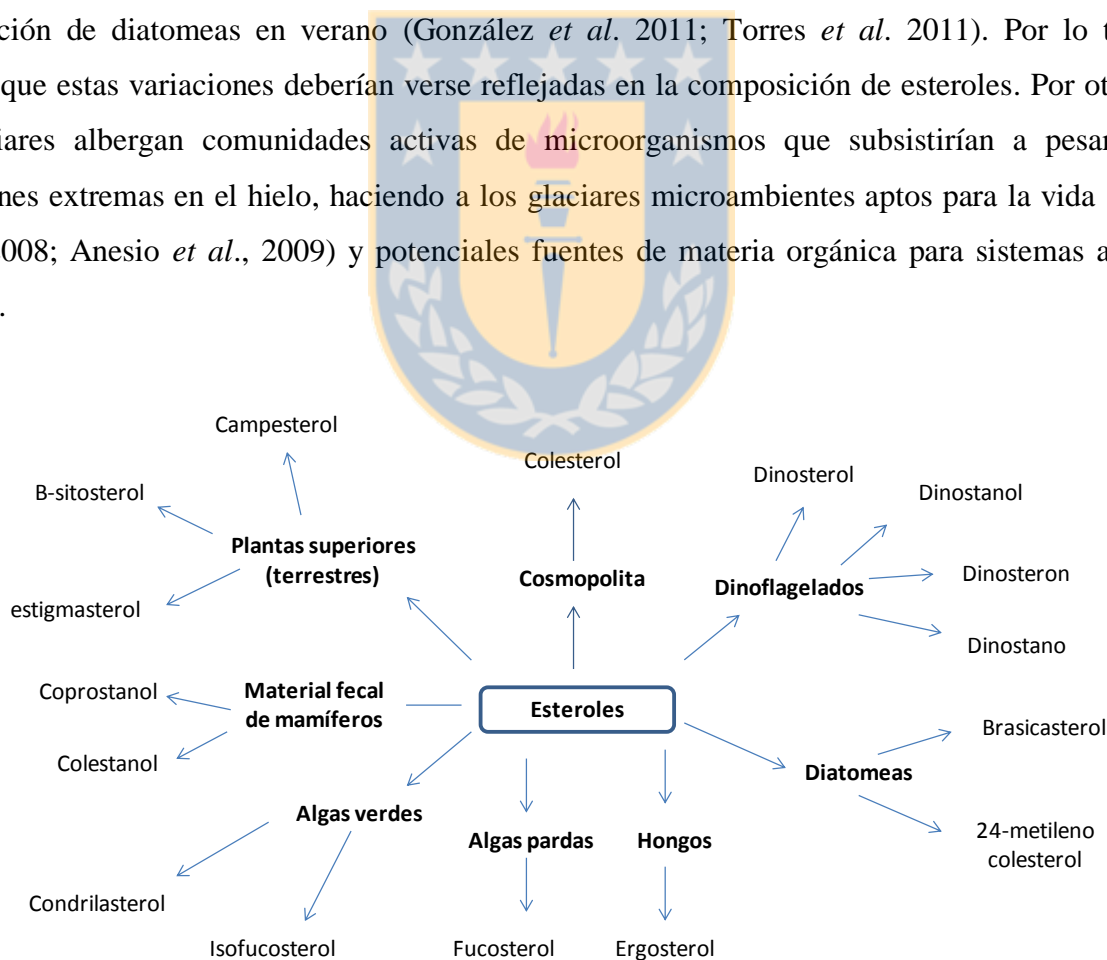


Figura 6. Esquema simplificado de los principales esteroides descritos en sistemas polares (Según: Venkatesan *et al.*, 1986; Green *et al.*, 1992; Muhlebach & Weber, 1998; Martins *et al.*, 2002; Villinski *et al.*, 2008).

1.6.- Glaciares: Vida en ambientes extremos.

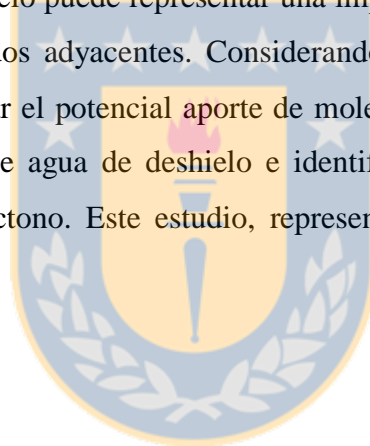
Los glaciares son masas de hielo dinámicas en constante movimiento, la mayoría de los glaciares comenzaron a retroceder desde el Último Máximo Glaciar hace aproximadamente 23000 años (Glasser *et al.*, 2011). Los glaciares han sido considerados reservorios de materia orgánica y microorganismos metabólicamente activos (Hodson *et al.*, 2008; Anesio *et al.*, 2009). Así, para glaciares del Golfo de Alaska se ha sugerido que los glaciares o el agua de deshielo podrían ser una fuente importante de materia orgánica lábil para la comunidad microbiana (Hood *et al.*, 2009). Otros antecedentes indicarían que en glaciares de los Alpes existirían comunidades de bacterias heterotróficas, que sustentan su metabolismo con el carbono orgánico “antiguo” que está atrapado en glaciares, el cual volvería a estar biodisponible para el ecosistema cuando los hielos glaciares se fusionan (Bardgett *et al.*, 2007). Por otra parte, se ha evidenciado la presencia de una diversa comunidad microbiana compuesta por bacterias, virus y microalgas, que habitarían la superficie de los glaciares en estructuras llamadas crioconitas, las cuales representan microambientes en donde se concentraría la materia orgánica (Mueller *et al.*, 2001; Christner *et al.*, 2003; Porazinska *et al.*, 2004; Kastovska *et al.*, 2005; Anesio *et al.*, 2007). En resumen la existencia de comunidades de microeucariontes y la depositación de material alóctono (Stubbins *et al.* 2012) en la superficie glaciar hacen pensar en que los esteroides resultarían adecuados para trazar las fuentes y alteraciones del material orgánico particulado (Saliot *et al.*, 1991; Conte *et al.*, 1995; Wakeham *et al.*, 1997) en los sistemas acuáticos adyacentes. Por lo tanto, considerando que los fiordos y canales Patagónicos están sujetos a la influencia de distintas fuentes de materia orgánica, se propone estudiar los cambios en la abundancia y composición de esteroides para determinar la influencia del deshielo glaciar sobre la composición de materia orgánica en los fiordos aledaños. En este contexto el fiordo aledaño al glaciar Jorge Montt se ha considerado como adecuado para estudiar el aporte de los glaciares al ecosistema de fiordos y canales australes.

1.7.-Glaciar Jorge Montt: Modelo de estudio del aporte glaciar a ecosistemas marinos.

En la Patagonia, los fiordos aledaños a glaciares pueden ser considerados la interfaz directa entre los glaciares y el océano costero, debido al aporte de agua dulce que resulta al desprenderse la masa de hielo. Este flujo de agua dulce produce cambios en la hidrografía del fiordo adyacente (Moffat, 2014) y por tanto cambios en las características químicas y biológicas en la columna de agua, como ha sido observado en la composición de la comunidad microbiana (Gutiérrez *et al.*, 2015). Asumiendo que las variaciones estacionales en la magnitud de la capa de agua de deshielo superficial representan escenarios contrastantes de derretimiento glaciar, se analizó la composición y distribución de esteroides a lo largo del fiordo para determinar una señal característica de la materia orgánica del agua de deshielo

que dé cuenta de su origen y permita estimar la importancia de la descarga de agua del glaciar como fuente orgánica para la columna de agua del sistema de fiordos y canales adyacentes.

En altas latitudes, se han logrado identificar esteroides característicos de diatomeas (Volkman & Hallegraeff, 1987), dinoflagelados (Martins *et al.*, 2002; Villinski *et al.*, 2008), y material terrestre asociado a plantas vasculares (Wakeham *et al.*, 1997) en agua y sedimentos, lo que indicaría la influencia de fuentes autóctonas (microalgas) y alóctonas (plantas vasculares) sobre la composición de la materia orgánica en ambientes sometidos a entradas de agua dulce. Considerando las características refractarias atribuidas a la materia orgánica derivada de plantas vasculares en sistemas acuáticos (Bianchi & Canuel, 2011), esta podría afectar en la biodisponibilidad de sustratos orgánicos para su posterior utilización por microorganismos. Los glaciares presentan una microbiota característica que incluye virus, bacterias y microalgas (Anesio *et al.*, 2007), además son reservorios de la materia orgánica alóctona que es transportada por el viento y depositada en su superficie (Wharton *et al.*, 1985). Así, el flujo de agua de deshielo puede representar una importante fuente de microorganismos y moléculas orgánicas hacia los fiordos adyacentes. Considerando la especificidad de esteroides como biomarcadores se propone identificar el potencial aporte de moléculas orgánicas desde el glaciar bajo diferentes escenarios de descarga de agua de deshielo e identificar la importancia relativa de éstas respecto a aquellas de origen autóctono. Este estudio, representa el primer reporte de esteroides en fiordos y canales patagónicos.



2.-HIPÓTESIS Y OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

2.1.- Hipótesis

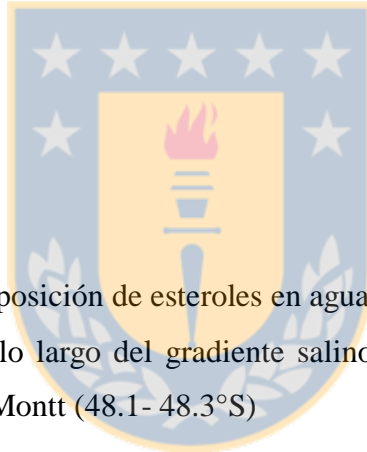
H₁: *La composición de esteroides en la capa superficial de la columna de agua posee características diferentes a las encontrados en la capa de fondo, lo que se ve reflejado en la mayor cantidad (>50%) de esteroides de organismos marinos en superficie, mientras que en el agua de fondo estaría dominado (>50%) por estanoles (esteroides saturados) y esteroides de plantas.*

H₂: *Bajo un régimen de mayor deshielo el estrato superficial de la columna de agua estaría dominado (>50%) por esteroides de origen terrestre, mientras que en un régimen de menor deshielo estaría dominado por esteroides de origen marino.*

2.2.- Objetivos Específicos.

1.- Determinar la abundancia y composición de esteroides en aguas superficiales y de fondo en el fiordo adyacente al glaciar Jorge Montt a lo largo del gradiente salino, producido por la descarga de agua dulce proveniente del Glaciar Jorge Montt (48.1- 48.3°S)

2.- Determinar la variabilidad estacional en la abundancia y composición de esteroides en la columna de agua del fiordo adyacente al Glaciar Jorge Montt y su relación con las variables fisicoquímicas y biológicas.



3.- MATERIALES Y METODOS

3.1.- Área de estudio

La Patagonia chilena se encuentra ubicada en el extremo sureste del Océano Pacífico (41,5°S - 55,9°S) y alcanza una superficie de aproximadamente 240.000 km² (Pantoja *et al.*, 2011, USGS, U.S. Geological Survey). La hidrología de los fiordos Patagónicos se caracterizan por una circulación tipo estuarina (Silva *et al.*, 1997; Strub *et al.*, 1998), debido a la entrada de agua dulce por el drenaje terrestre, ríos, lluvias, el derretimiento del hielo y la entrada de agua de origen marino desde la zona costera (Chuecas & Ahumada, 1980; Silva *et al.*, 1995; Sobarzo *et al.*, 2009). Además, el ecosistema Patagónico alberga la plataforma de hielos más extensa en el hemisferio sur, extendiéndose desde los 48°20'S hasta los 51°30'S y cubriendo un área de 16.800 Km² distribuida en 49 glaciares, destacándose por su tamaño en territorio chileno el Glaciar PIO XI y por su rápido adelgazamiento el Jorge Montt (Rivera *et al.*, 2011). Además, la Patagonia chilena se compone por un gran número de islas, penínsulas, fiordos y canales, que representa una costa de aproximadamente 84.000 km (Silva & Palma, 2008). Para cumplir los objetivos específicos planteados se integrarán resultados de 4 campañas de muestreo, las cuales fueron realizadas en 4 periodos contrastantes los que consistieron en transectas latitudinales en abril y agosto 2012, marzo y noviembre 2013. Las estaciones de muestreo se ubican aproximadamente entre 48.1 y 48.3°S de latitud y 73.4 y 74.5°W de longitud, en la zona aledaña al Glaciar Jorge Montt. (Fig. 7). Se eligieron 6 estaciones de muestreo latitudinales, que describen un gradiente de influencia asociada a la pluma de agua dulce del Glaciar Jorge Montt. Además, se colectaron muestras a lo largo del gradiente longitudinal descrito a lo largo del canal Martínez, el cual se encuentra conectado con el océano abierto a través del Golfo de Penas (Fig. 7). Se colectaron muestras de agua asegurándose de cubrir estratos superficiales (entre 0 y 3 m) con influencia del glaciar y el estrato profundo con menor influencia del glaciar (entre los 50 y 300 m), dichas profundidades fueron elegidas según la batimetría de cada estación de muestreo.

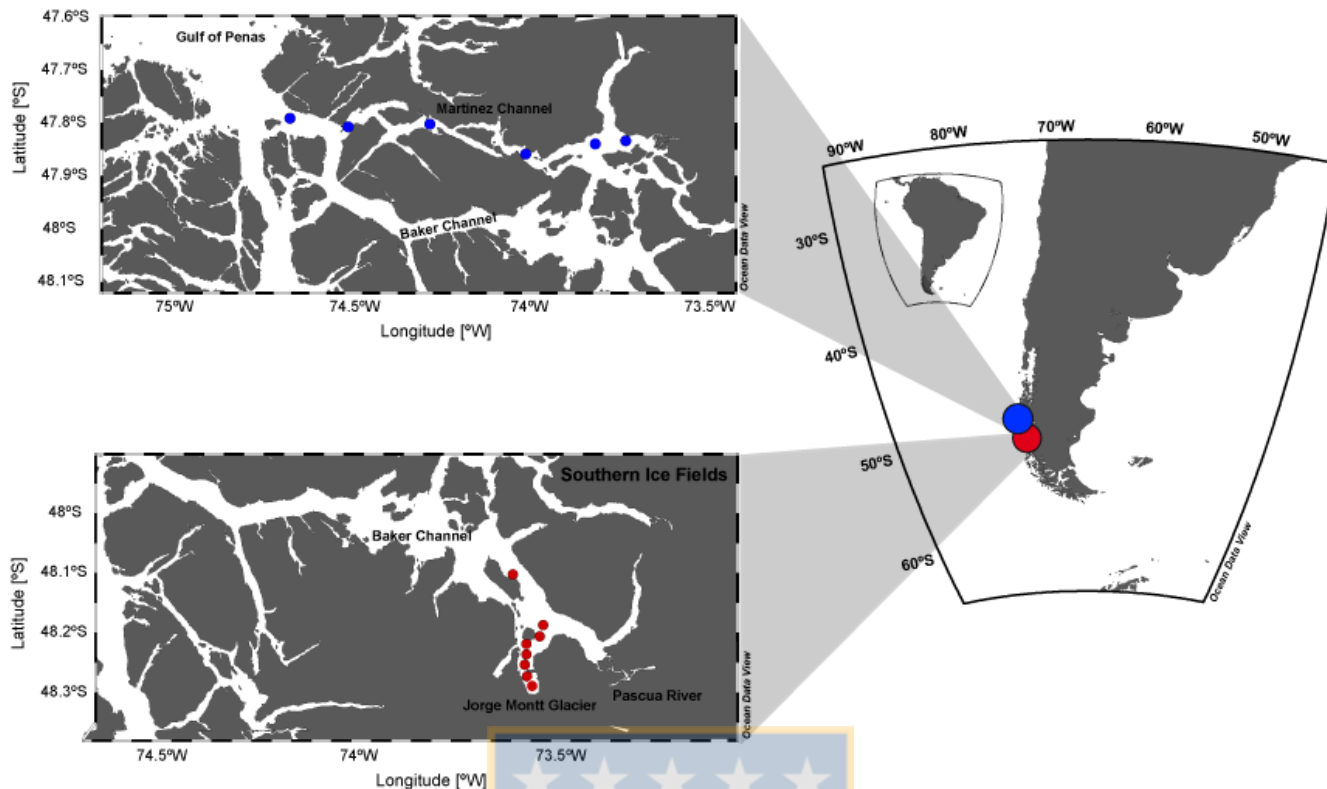


Figura 7. Mapa área de muestreo, los puntos rojos señalan las estaciones de muestreo realizadas en el fiordo adyacente al glaciar Jorge Montt, mientras que los puntos azules la campaña realizada en el canal Martínez.

3.2.-Objetivo 1: Determinar la abundancia y composición de esteroides en aguas superficiales y de fondo en el fiordo adyacente al glaciar Jorge Montt a lo largo del gradiente salino, producido por la descarga de agua dulce proveniente del Glaciar Jorge Montt (48.1- 48.3°S)

Aproximadamente 40 L de agua fueron colectadas con Botellas Niskin de 10 L para el análisis de esteroides. El agua se filtró a través de filtros de 0.7 μm (GF/F fibra de vidrio) de 47 mm de diámetro, previamente calcinado a 400°C por 4 horas para la eliminación de las trazas de carbono orgánico. Luego de la recolección del material particulado, los filtros son almacenados en papel aluminio a -20°C para su posterior análisis en laboratorio.

La determinación de esteroides por cromatografía de gases fue adaptada del método de Bligh & yer (1959). El primer paso es la extracción del contenido total de lípidos recuperado de los filtros de fibra de vidrio (47 mm diámetro, 0.7 μm poro) utilizando una mezcla de solventes orgánicos (Metanol-Diclorometano-Hexano, MeOH:DC:HEX), utilizando un Accelerated Solvent Extraction (ASE) en periodos de 3 ciclos, procedimiento que permite a la muestra desprender su contenido de lípidos hacia los solventes, el extracto es sometido a un sistema de secado (Turvovap). El extracto seco se hidrata con 500 μL de diclorometano y se incorpora a una columna cromatográfica preparada con sílica gel activada. Esta columna separa los compuestos de acuerdo a su polaridad. La fracción N° 3 de la

columna es la que contiene los esteroides, es recuperada y derivatizada (convertir compuestos sólidos en gases volátiles para su posterior análisis por cromatografía gaseosa) con una mezcla de Diclorometano (DCM):etil acetato (EtOAc) 1:1 y bis-(trimethylsilyl)-trifluoroacetamida (BSTFA)/piridina a la forma de trimethylsilyl (TMS). Un μL de muestra derivatizada es inyectado al cromatógrafo de gases equipado con un detector de masa HP5-MS columna cromatográfica (30 x 0.2mm, 0.25 μm film thickness; Agilent Technologies). La identificación de las moléculas se realizó a través de la biblioteca de lípidos en línea (<http://www.chemspider.com>). Los esteroides son cuantificados a través de la comparación del área bajo la curva del peak del estándar interno 5 μg of 1- Nonadecanol) y la muestra en evaluación (ejemplo disponible en Fig. 4 anexos). Para el cálculo, se utilizó un factor de respuesta relativo de 1.0 para todos los esteroides. El coeficiente de variación para el método de análisis fue de 12% medido rutinariamente en diez análisis.

3.3.- Objetivo 2: Determinar la variabilidad estacional en la abundancia y composición de esteroides en la columna de agua del fiordo adyacente al Glaciar Jorge Montt y su relación con las variables fisicoquímicas y biológicas.

La toma de muestras fue realizada utilizando botellas Niskin de 10 L, además en cada lance se registró la temperatura, salinidad y oxígeno disuelto de la columna de agua a través del despliegue de un CTD (RBR XR-200 Ruskin). En paralelo se tomaron muestras de agua para el análisis de nutrientes (NO_2^- , NO_3^- , PO_4^{3-} , SiO_4^{4-}) y clorofila-*a*. Aproximadamente 1 L de agua fue filtrada a través de filtros de fibra de vidrio de 0.7 μm previamente muflados. Los filtros y el agua filtrada fueron almacenados a -20°C para la posterior determinación de la concentración de clorofila-*a* y nutrientes inorgánicos disueltos.

La determinación de nutrientes (NO_2^- , NO_3^- , PO_4^{3-} , SiO_4^{4-}) se realizó a través del con el método de Strickland y Parson, (1960) y la medición de las muestras se hace a través de un espectrofotómetro de absorción molecular. La concentración de clorofila-*a* se determinó a través del procedimiento basado en la extracción del pigmento con una solución acuosa de acetona al 90% y la determinación de la densidad óptica de la muestra con un fluorómetro (Parson *et al.*, 1984).

El análisis estadístico se llevó a cabo a través de agrupación jerárquica euclidiana basada en la matriz de disimilitud de Bray Curtis, para ello se utilizó la abundancia relativa de los esteroides (%) utilizando el software Statistica version 7.0. Adicionalmente se realizó la prueba no-paramétrica de Wilcoxon con XLSTAT (Addinsoft) para ver si habían diferencias estadísticas ($p < 0.05$) en la

distribución de los esteroides presentes en las muestras (%) superficiales y profundas en cada estación y el análisis de Spearman para establecer relaciones lineales significativas ($p < 0.05$) entre la composición de esteroides y las distintas variables obtenidas en este estudio.

4. RESULTADOS

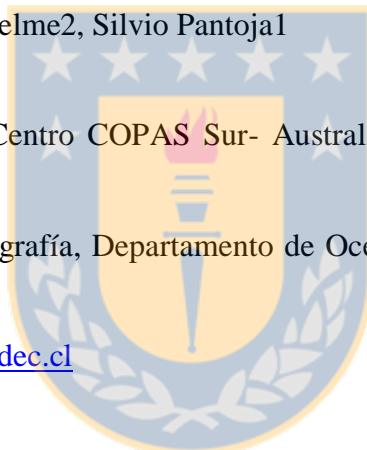
4.1.- Capítulo 1: Impact of ice melting in the distribution of sterols in glacial fjords of Chilean Patagonia

Marcelo H. Gutiérrez^{1,*}, Pablo Riquelme², Silvio Pantoja¹

¹Departamento de Oceanografía y Centro COPAS Sur- Austral, . Universidad de Concepción. Concepción, Chile.

² Programa de Postgrado en Oceanografía, Departamento de Oceanografía de la Universidad de Concepción, Concepción, Chile.

*Corresponding author: magutier@udec.cl



To be submitted to Organic Geochemistry

December 2015

4.1.1. - RESUMEN

Se analizó la variabilidad estacional de la abundancia y composición de esteroides en las aguas del fiordo adyacentes al Jorge Montt, uno de los glaciares que más rápido ha retrocedido en los campos de hielo de la Patagonia. El estudio se realizó entre agosto de 2012 y noviembre 2013 e incluyó cuatro campañas en el fiordo proglacial bajo diferentes escenarios de agua de deshielo. La composición y concentración de esteroides en la superficie y las aguas profundas se determinó por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. Se identificaron dos estanoles, un tri-insaturados, ocho di-insaturado y seis esteroides monoinsaturados. La concentración total de esteroles osciló entre 35 a 1726 ng L⁻¹ en la superficie y 18-789 ng L⁻¹ en aguas de fondo y mostró diferencias significativas entre profundidades y una correlación positiva con la concentración de clorofila-a. Bajo condiciones de alto derretimiento en el verano austral, encontramos altas concentraciones de esteroides y clorofila-a y una composición dominada por moléculas representante de diatomeas céntricas en las aguas superficiales cerca del término de glaciar. Se sugiere la presencia de una población de fitoplancton singular capaz de prosperar en agua de deshielo superficial durante verano austral en el fiordo glacial. En el mismo período en la zona cercana al mar abierto, y en el otoño austral, invierno y primavera en el fiordo proglacial, las concentraciones de esteroides más bajas en las aguas superficiales fueron acompañadas por otros esteroides de algas y un aumento en la abundancia relativa de los esteroides vegetales, evidenciando cambios en fuente dominante de la materia orgánica entre las estaciones ya lo largo del gradiente-deshielo marino. En otoño, cuando se evidenció el más alto de flujo de agua de deshielo, la presencia de una proporción significativa de estanoles y un esteroles tri-insaturados poco común sugiere influencia de aguas de deshielo en la composición de esteroides en el fiordo aguas abajo. Llegamos a la conclusión de que la fusión del hielo puede modificar la composición de esteroides mediante el establecimiento de condiciones para el desarrollo de las poblaciones de fitoplancton adaptados-agua de deshielo y llevando materia orgánica glaciar adentro de los fiordos glaciares patagónicos. En el escenario de fusión de hielo proyectado, estos cambios en la cantidad y calidad de la materia orgánica pueden afectar potencialmente la disponibilidad de sustratos orgánicos para la actividad heterotrófica y el estado trófico de los fiordos glaciales.

1 **Abstract**

2 We analyzed seasonal variability in abundance and composition of sterols in waters of the
3 fjord adjacent to Jorge Montt, one of the fastest retreated glaciers in Patagonian Icefields.
4 The study was carried out between August 2012 and November 2013 and included four
5 campaigns in proglacial fjord under different meltwater scenarios. The composition and
6 concentration of sterols in surface and bottom waters was determined by Gas
7 Chromatography coupled to Mass Spectrometry. We identified two stanols, one tri-
8 unsaturated, eight di-unsaturated, and six monounsaturated sterols. Total sterol
9 concentration ranged from 35 to 1726 ng L⁻¹ in surface and from 18 to 789 ng L⁻¹ in bottom
10 waters and showed significant differences between depths and a positive correlation with
11 chlorophyll-a concentration. Under high melting conditions in austral summer, we found
12 high concentrations of sterols and chlorophyll-a and a composition dominated by
13 molecules representative of centric diatoms in surface waters near to glacier terminus.
14 We suggest the presence of a singular phytoplankton population able to thrive in surface
15 meltwater during austral summer in glacial fjord. In the same period in the area near open
16 ocean, and in austral autumn, winter and spring in proglacial fjord, lower sterol
17 concentrations in surface waters were accompanied by others algae sterols and an
18 increase in relative abundance of plant sterols, evidencing changes in the dominant source
19 of organic matter among seasons and along meltwater-marine gradient. In autumn, when
20 the highest meltwater flux was evidenced, the presence of a significant proportion of
21 stanols and an uncommon tri-unsaturated sterol suggests influence of meltwaters in
22 composition of sterols in the downstream fjord. We conclude that ice melting can modify

23 sterol composition by setting conditions for development of meltwater-adapted
24 phytoplankton populations and by carrying glacier organic matter into Patagonian glacial
25 fjords. In projected ice melting scenario, these changes in organic matter quantity and
26 quality can potentially affect the availability of organic substrates for heterotrophic
27 activity and trophic status of glacial fjords.

28

29 Keywords: Sterols, Ice melting, glacial Fjords, Patagonian Icefields

30



31 **1.Introduction**

32

33 Southern Patagonian Ice Field (41.5°S - 55.9°S) covers ca. 240,000 km² and is considered
34 the world's third largest reservoir of freshwater, after Greenland and Antarctica (Rignot et
35 al. 2003). In last decades, most glaciers in Patagonian Icefields have shown significant
36 retreats contributing to ca. 0.067 mm to sea level rise (Willis et al., 2012). Glacier Jorge
37 Montt has retreated ca. 19 km in the last century (Rivera et al., 2011) and has shown rates
38 of ice loss up to 1 km y⁻¹ (Rivera et al. 2012). It has been shown that melt water from
39 Jorge Montt glacier affects hydrography (Moffat 2014), chemical characteristics and
40 microbial community composition in waters of downstream fjord (Gutiérrez et al. 2015).

41

42 Glaciers are considered reservoirs of a diverse pool of organic matter (Singer et al. 2012,
43 Stubbins et al. 2012, Spencer et al. 2014). Global storage of organic carbon in glaciers and
44 ice sheets is estimated in ca. 6 Pg and their rate of release to downstream freshwater and
45 marine ecosystems in ca. 3 Tg C y⁻¹ (Hood et al. 2015), contributing glacial organic carbon
46 (Hood et al. 2009, Stibal et al. 2012) onto adjacent aquatic systems, with direct
47 consequences for local carbon fluxes (Hood et al. 2015). For example, glacial meltwater
48 can contribute with labile organic matter and fuel heterotrophic activity of
49 microorganisms in the Gulf of Alaska (Hood et al., 2009), and in Alpine glaciers (Bardgett
50 et al., 2007). Amino acids, sugars, amino sugars and lactic and formic acids have been
51 identified in glacial environments (Pautler et al. 2011, 2012) as well as a wide variety of
52 phospholipids fatty acids representative of bacteria and Fungi, and sterols of higher plants

53 such as campesterol, β -sitosterol and stigmasterol (Pautler et al. 2013). An important
54 fraction of organic molecules on glaciers corresponds to allochthonous compounds
55 transported by winds as aerosols (Stubbins et al. 2012).

56

57 Sterols are constituents of eukaryotic membrane and regulate membrane fluidity and
58 permeability (Stryer, 1997). Due to their specificity in some groups of eukaryotes
59 (Volkman 2003), sterols are considered useful biomarkers to trace source and alterations
60 of organic matter in aquatic environments (Nishimura, 1978; Volkman, 1986; Wakeham &
61 Beier, 1991; Wakeham, 1995; Colombo et al., 1996; Sun & Wakeham, 1999; Hudson et al.,
62 2001; Volkman, 2003; Bianchi & Canuel, 2011). Whereas some sterols are considered
63 more universally distributed among different groups of eukaryotes (e.g. cholesterol),
64 others are restricted to specific groups of organisms (De Leeuw & Baas, 1986; Brassell,
65 1994; Volkman, 2005). For example, sitosterol, stigmasterol and campesterol are mostly
66 found in vascular plants, whereas brassicasterol and methylene-cholesterol are
67 representative of some of microalgae (Gillan et al., 1980; Volkman & Hallegraeff, 1988;
68 Volkman 2003). In addition, saturated sterols are considered indicative of biotic and
69 abiotic degradation in aquatic environments (Rontani, 2008; Rontani et al., 2011; Rontani,
70 2012).

71

72 The presence of sterols representative of phytoplankton, plants and animals in surface
73 sediments (Venkatesan et al., 1986; Martins et al., 2002), marine waters (Muhlebach &
74 Weber, 1998) and lakes (Matsumoto et al., 1984; Matsumoto, 1989) of the Antarctic

75 region has been documented. In waters of these cold and polar environments, seasonal
76 differences in composition of sterols appears to be associated with changes in
77 predominance of phytoplankton groups (Venkatesan et al., 1986; Green et al., 1992;
78 Muhlebach & Weber, 1998; Martins et al., 2002; Villinski et al., 2008). In addition, in
79 waters of Canadian Arctic region influenced by rivers, plant sterols appear to represent a
80 high fraction of organic carbon and susceptible to microbial degradation in the shelf area
81 (Rontani et al. 2014).

82

83 Ice melting of glaciers in Patagonian Icefields represents a significant source of freshwater
84 (Willis et al. 2012) and is a potential source of organic matter for downstream fjords and
85 channels. Since seasonal regime in meltwater flux, proglacial fjord adjacent to Jorge
86 Montt glacier is a suitable scenario to evaluate effect of ice melting on composition and
87 concentration of organic matter in fjord waters. We analyzed composition and abundance
88 of sterols under different regimes of freshwater fluxes in the fjord adjacent to Jorge Montt
89 glacier. We hypothesized that meltwater dilute marine signal of sterols during high ice
90 melting scenario by replacing autochthonous sterols by others from glacial and terrestrial
91 environments, evidencing the impact of glacier melting on composition of organic matter
92 in Patagonian fjords.

93

94 **2. Material and methods**

95

96 *2.1. Study area and sampling*

97

98 The study area is located in the fjord adjacent to Jorge Montt glacier (48°20'S; 73°30'W),
99 in the northern region of Southern Patagonian Ice Field (Fig. 1A). Sampling was carried out
100 during austral autumn (April 2012) and summer (March 2013) and austral winter (August
101 2012) and austral spring (November 2013) in sites distributed along the Montt fjord and
102 Baker Channel (Fig. 1A). In March 2013, we collected samples from a freshwater-ocean
103 transect in Martinez Channel, located north of Baker Channel (Fig. 1A). Water samples (37
104 to 47 L) were collected from surface (0 and 3m) and bottom waters (50 and ca. 300 m)
105 with Niskin bottles, and filtered through combusted 0.7 µm glass fiber filters (4 h, 450 °C)
106 for analysis of sterols. Additional water was collected to determine chlorophyll-a and
107 inorganic nutrients. All samples were stored at -20 °C until their analysis in the laboratory.
108 Chlorophyll-a was determined by fluorometry (Turner Design AU-10) according to Parsons
109 et al. (1984), and nitrate, phosphate and silicic acid by spectrophotometry (Strickland and
110 Parson, 1960). Temperature, salinity and oxygen concentration were recorded with a CTD
111 (RBR XR-200 Ruskin).

112

113 *2.2. Sterols analysis*

114

115 Extraction of lipid biomarkers from filters was carried out according to Bligh and Dyer
116 (1959), using an accelerated solvent extractor (ASE 35) with a 3:1 mix of dichloromethane
117 and methanol at 100 °C, 5 min heat, 5 min static time, 50% rinse volume and 7 s purges.
118 Lipid extract was concentrated with a rotary evaporator and dried with anhydrous Na₂SO₄

119 and separated into four fractions by column chromatography (10 cm length, 0.5 cm ID)
120 filled with ca. 0.9 g deactivated silica gel. Aliphatic hydrocarbons (F1) were eluted with
121 40mL hexane, ketones (F2) were eluted with 50 mL toluene/hexane (1:3 v/v), alcohols (F3)
122 with 50 mL ethyl-acetate/hexane (1:9 v/v), and polar compounds (F4) were eluted with 35
123 mL ethyl acetate/methanol/hexane (4:4:1 v/v). The alcohol fraction (F3) was derivatized
124 with 80 μ L BSTFA (N,O- bis(trimethylsilyl) trifluoroacetamide) and 40 μ L TMCS
125 (trimethylchlorosilane) at 70 °C for 1 h before analysis.

126
127 Derivatized solutions were injected (1 μ L) on a gas chromatograph coupled to a mass
128 spectrometer (GC-MS) equipped with a HP5-MS chromatographic column (30 x 0.2mm,
129 0.25 μ m film thickness; Agilent Technologies). Identification of sterols was achieved by
130 analyzing mass spectra and comparing with available mass spectrometry data of sterols
131 (Online lipid library; <http://www.chemspider.com>). Sterol concentration was determined
132 using internal standard 1-nonadecanol (5 μ g). Coefficient of variation for analysis was
133 12% (n=10).

134

135 *2.3. Data analysis*

136

137 Two-way ANOVA was applied to test statistical differences among periods and depths on
138 rank-transformed data of environmental variables and sterol abundance in order to use
139 data that do not meet assumptions of normality (Conover and Iman, 1981; Neter *et al.*,
140 1996). Similarity for sterol composition was estimated based on the Bray-Curtis distance

141 matrix index and hierarchical cluster analysis (UPGMA clustering). Statistical and
142 ordination analyses were carried out in software packages PAST (Hammer et al. 2001) and
143 Statistica version 6.0.

144

145 **3. Results**

146

147 *3.1. Physicochemical and biological variability*

148

149 A stratified water column was evidenced during all seasons, with a surface fresh water
150 layer (<10 psu) occupying the top 4 to 8 m of the water column in proglacial fjord and
151 Baker channel (Fig 1B-E). The lowest salinities (below 3 psu) were observed in surface
152 waters in April 2012 near glacier terminus, whereas the highest values were observed in
153 waters of the Baker Channel during austral autumn and spring (Fig. 1B, E). Salinity
154 increased gradually with depth from ca. 26 psu to over 32 psu in bottom waters (Fig. 1B-
155 E). In austral autumn and summer, subsurface waters showed salinities lower than 30 psu
156 at 50 m depth in the proglacial fjord and deeper 30 psu halocline near glacier terminus
157 (Fig. 1B,D). In contrast, in austral winter and spring salinity values above 30 psu were
158 observed below 10-meter depth (Fig. 1C,E) and bottom waters of proglacial fjord showed
159 salinities higher than in summer and autumn (Fig. 1B-E). We observed a stronger
160 stratification of the water column along Martinez channel in austral summer, with low
161 salinity waters (<28 psu) occupying the top 10 m and salinities over 32 psu below 20 m
162 depth (Fig. 1F). A rising of haloclines was observed in the area close to Gulf of Penas (Fig.

163 1F). Major differences in surface temperature in proglacial fjord were observed in March
164 2013, with values $>9^{\circ}\text{C}$, and in April 2012 with values $<1^{\circ}\text{C}$ (Fig. 1 supplementary
165 information). Along Martinez channel, surface temperatures increased from ca. 12°C in
166 the inner area to over 13°C towards ocean side (Fig. 1 supplementary information).

167

168 Chlorophyll-a ranged between less than 0.1 and 1.1 mg m^{-3} in waters of proglacial fjord,
169 with maxima concentrations in surface waters during austral summer (March 2013; Table
170 1). Along surface waters in Martinez channel, chlorophyll-a concentration ranged from
171 0.2 to 1.3 mg m^{-3} and maximum values were observed towards ocean side (Table 1).

172 Nitrate concentration in surface waters ranged between 0.2 and $18.5\text{ }\mu\text{M}$ and in bottom
173 waters from 6.7 to $27.5\text{ }\mu\text{M}$ during the study period (Table 1). In surface waters, the
174 highest and lowest (below the detection limit of the method) nitrate concentrations were
175 recorded in austral autumn (April 2012) in waters of proglacial fjord and Baker channel
176 (Table 1). In bottom waters, nitrate showed concentrations over $7\text{ }\mu\text{M}$ in all seasons, with
177 the highest values ($>20\text{ }\mu\text{M}$) recorded in winter and summer (Table 1). Phosphate
178 concentration ranged from 0 to $2.0\text{ }\mu\text{M}$ in surface waters and between 0.3 and $1.9\text{ }\mu\text{M}$ in
179 bottom waters (Table 1), with no clear seasonal pattern. Concentration of silicic acid
180 ranged between 5.9 and $79.5\text{ }\mu\text{M}$ in surface waters and from 3.3 to $25.3\text{ }\mu\text{M}$ in bottom
181 waters (Table 1), with the highest concentration in surface waters in March 2013 (>36
182 μM), and the lowest in April 2012 (3.2 - $16.1\text{ }\mu\text{M}$) in surface and bottom waters (Table 1).
183 There were significant differences in nitrate, phosphate and silicic acid concentration
184 among seasons and depths (Table 2).

185

186 *3.2. Distribution and composition of sterols in the water column*

187

188 We identified 17 sterols in surface and bottom waters of proglacial fjord, and channels
189 Baker and Martinez (Fig. 2; Table 2). We detected two saturated, six monounsaturated,
190 eight di-unsaturated and one tri-unsaturated sterols (Table 3). Total sterol concentration
191 ranged from 35.3 to 1726.2 ng L⁻¹ in surface and from 17.8 to 788.6 ng L⁻¹ in bottom
192 waters (Fig. 2, Table S1, Supplementary information). In surface waters, the highest sterol
193 concentrations (>1000 ng L⁻¹) were found in austral summer (March 2013) in waters of the
194 proglacial fjord, close to glacier terminus (Fig. 2A; Table S1, Supplementary information).
195 In contrast, the lowest concentrations (<200 ng L⁻¹) were found in surface waters of the
196 fjord during winter (August 2012; Fig. 2A) and in waters of the Baker and Martinez
197 channels in summer (March 2013; Fig. 2A). In bottom waters, the highest concentrations
198 (200-800 ng L⁻¹) were observed in austral autumn and spring (April 2012 and November
199 2013; Fig. 2B), whereas minimal concentrations (< 50 ng L⁻¹) were found in austral winter
200 and summer (Fig. 2B, Table S1, Supplementary information). Sterol concentration showed
201 latitudinal differences along proglacial fjord, and longitudinal variations across gradient in
202 Martinez channel (Fig. 2C). Thus, in austral summer (March 2013), the highest
203 concentrations were observed in surface waters close to glacier terminus, decreasing
204 toward the mouth of the fjord and in Baker channel (Fig. 2A), contrary to trend in autumn
205 (April 2012) and spring (November 2013) (Fig. 2A). In bottom waters, in summer and
206 spring we observed a relatively homogeneous distribution of sterols in waters of the

207 proglacial fjord, whereas in autumn high concentrations ($>700 \text{ ng L}^{-1}$) were observed in
208 Baker channel, close to the mouth of proglacial fjord (Fig. 2B). Along Martinez Channel,
209 higher concentrations (ca. 600 ng L^{-1}) were found in surface waters near Gulf of Penas,
210 than in inner channel ($<150 \text{ ng L}^{-1}$, Fig. 2c). Significant differences were observed in sterol
211 concentration between depths (Table 2). For the whole data set, sterol concentration was
212 positively correlated with chlorophyll-a concentration and prokaryote abundance, and
213 negatively correlated with salinity and nitrate concentration (Table 4).

214

215 Variability in sterol composition was observed between surface and bottom waters and
216 among seasons in the proglacial fjord and Baker and Martínez channels (Fig. 3). In surface
217 waters sterols composition was dominated by cholesterol (ca. 15 – 40% of the total
218 sterols), methylene-cholesterol (ca. 5 – 40%), β -sitosterol (ca. 5 – 20%), fucosterol (ca. 5 –
219 35%) and brassicasterol (up to 20%) (Fig. 3A). In contrast, in bottom waters cholesterol
220 (ca. 20 – 70%) and β -sitosterol (ca. 15 – 30%; Fig. 3B) dominated. Major differences in
221 surface water sterol composition in the proglacial fjord were observed in austral summer,
222 when methylene-cholesterol reached ca. 40% of sterols, and in spring, when fucosterol
223 averaged about 40% (Fig. 3A). In addition, in surface waters from autumn β -sitosterol
224 represented ca. 20% and β -sitostanol (a saturated sterol) accounted for ca. 15% of sterols
225 (Fig. 3A). In bottom waters, major differences were observed in autumn, when
226 brassicasterol predominated ($>40\%$), followed by β -sitostanol and cholesterol (ca. 20%;
227 Fig. 3B). An uncommon tri-unsaturated sterol (19-norergosta-5,7,9-trien-3- β -ol) was
228 detected in surface and bottom waters in autumn and in surface waters during winter.

229

230 Since the main focus of our analysis was to study changes in source of organic matter
231 under different melting scenarios, sterols were grouped (Fig. 4) according to their source:
232 Plant sterols (PL-S), microalgae sterols (MIC-S) and cholesterol (CHOL; animals and less
233 specific source). Surface waters of proglacial fjord were characterized by high average
234 relative abundance of MIC-S (ca. 25 to over 50%) and CHOL (ca. 20–40%), whereas
235 bottom waters, with exception of austral autumn (April 2012), were characterized by
236 CHOL relative abundance of 45% of sterols, followed by PL-S (ca. 20–40%; Fig. 4). In
237 particular, in surface waters of proglacial fjord during spring and summer, MIC-S
238 accounted for ca. 50% and MIC-S plus CHOL represented ca. 80% of sterols, respectively
239 (Fig. 4A).

240

241 PL-S proportion was positively correlated with nitrate and phosphate and negatively
242 correlated with chlorophyll-a concentration in the whole data set, whereas MIC-S was
243 positively correlated with chlorophyll-a and prokaryotes, and negatively correlated with
244 salinity, nitrate and phosphate (Table 4). In addition, in surface waters, proportion of PL-S
245 was directly correlated with phosphate and nitrate, and MIC-S with chlorophyll-a and
246 prokaryote abundance, whereas in bottom waters, we did not observe significant
247 correlations between sterol categories and environmental variables (Table 4). Among
248 periods, positive correlations were found between PL-S and nitrate and phosphate in
249 autumn and spring, PL-S and salinity in spring, between MIC-S and chlorophyll-a in
250 summer and spring, and between MIC-S and prokaryotes in winter (Table 4). Negative

251 correlations were observed between PL-S and chlorophyll-a in spring, MIC-S and salinity in
252 summer and spring, and MIC-S and nitrate and phosphate in spring. CHOL shown a
253 positive correlation with salinity and nitrate, and was negatively correlated with
254 chlorophyll-a for the whole dataset (Table 4). During spring, a positive correlation was
255 found between CHOL proportion and salinity, nitrate and phosphate and was negatively
256 correlated with chlorophyll-a, and in winter CHOL was negatively correlated with
257 prokaryote abundance (Table 4). Along waters of Martinez channel in summer, positive
258 correlations were found between chlorophyll-a and MIC-S, and CHOL and nitrate and
259 phosphate, whereas negative correlations were observed between CHOL and chlorophyll-
260 a and temperature (Table 4).



261

262 *3.3. Similarity analysis of sterol composition*

263

264 Similarity analysis of relative abundance of individual sterols (based in Bray-Curtis distance
265 matrix) resulted in five clusters (C1-C5) with more than 70% similarity (Fig. 5). C1 includes
266 mostly surface water samples from austral summer; C2 grouped bottom water samples
267 from most of seasons; C3 grouped surface water samples from proglacial fjord in autumn
268 and winter and from Martinez channel in summer; C4 includes mostly surface water
269 samples from spring and autumn, and C5 grouped bottom water samples from autumn
270 and surface water samples from the area close to glacier terminus in winter (Fig. 5).

271

272 The composition of C1 was characterized by a predominance of methylene-cholesterol

273 (37–49%) followed by cholesterol (16–38%; Fig. 5). In this group MIC-S averaged over 50%,
274 whereas PL-S represented ca. 10% (Fig. 6). C2 was mainly composed of cholesterol (39–
275 73%) and β -sitosterol (4 to ca. 30%), and among categories PL-S represented about 30%,
276 whereas MIC-S averaged less than 10% (Figs. 5 and 6). Cluster C3 was characterized by
277 relative abundance of β -sitosterol ranging between 9 and 32%, brassicasterol between 11
278 and 24%; methylene-cholesterol from 3 to 14%, (no detected in GF_Apr1_3m) and
279 Fucosterol from 2–20% (Fig. 5). C3 was characterized by MIC-S accounted for ca. 30% and
280 PL-S around 20% (Fig. 6). Representative sterols in C4 were cholesterol (15-20%) and β -
281 sitosterol (15-32%) in spring and fucosterol (37-44%) and β -sitostanol (19-41%) in autumn
282 (Fig. 5). Categories MIC-S and PL-S represented ca. 30 % each of all sterols in C4,
283 respectively (Fig. 6). Cluster C5 was mainly composed of brassicasterol (34-70%) and
284 cholesterol (17-41%), with MIC-S accounting for ca. 50% sterols (Figs. 5 and 6).

285

286 **4. Discussion**

287

288 We analyzed abundance and composition of sterols along freshwater-marine gradients
289 and their variability under different scenarios of meltwater flux in a Patagonian glacial
290 fjord. Under high melting conditions during austral summer, surface waters of proglacial
291 fjord showed maxima abundance of sterols and a composition dominated by molecules
292 representative of centric diatoms (Fig. 6). During the same period in the area near open
293 ocean, lower abundance of sterols was accompanied by a different compositional pattern,
294 evidencing changes in the dominant source of organic matter. Variations in sterol

295 abundance were mostly associated with those of phytoplankton biomass (Table 4), and
296 changes in their composition were attributable to fluctuations in predominance of
297 phytoplankton populations among seasons and along freshwater-marine gradient (Fig. 6).
298 Our results suggest presence of a singular phytoplankton population (Fig. 5) adapted to
299 thrive under surface meltwater conditions in glacial fjords, potentially responsible for local
300 increase of phytoplankton biomass during austral summer. In contrast, during austral
301 autumn, winter and spring, low sterol concentrations were accompanied by other algae
302 sterols in surface waters, and an increase in relative abundance of plant sterols,
303 suggesting allochthonous contributions of organic matter into glacial fjords (Figs5 and 6).
304 In particular, in autumn, when high meltwater flux is evidenced (Fig. 1), presence of a
305 significant proportion of stanols and occurrence of an uncommon tri-unsaturated sterol
306 suggests influence of meltwaters in composition of sterols in the downstream fjord. In
307 bottom waters, low sterol concentration and a predominance of cholesterol and sterols
308 representative of plants during winter, spring and summer, suggest low organic matter
309 content and prevalence of refractory molecules in deep waters of Patagonian glacial
310 fjords. We suggest that ice melting modifies sterol composition by setting conditions for
311 development of singular populations of phytoplankton and by carrying glacier organic
312 matter into Patagonian fjords during periods of high meltwater flux. In the hypothetical
313 scenario of increasing ice melting, these changes in organic matter pool can potentially
314 affect the trophic status of glacial fjords.

315

316 *4.1. Environmental variability, setting melting scenario in glacial fjord*

317

318 Low salinity surface waters (<26 psu), observed in the top 4 to ca. 10 m of the water
319 column along the fjord adjacent to Jorge Montt glacier and Baker channel, evidenced a
320 permanent influence of meltwaters on hydrographic structure of Patagonian glacial fjords
321 (Fig. 1B-E.). Below surface layer, salinity increased slowly to maxima values ca. 34 psu in
322 bottom waters, which were interpreted as representative conditions of marine waters. A
323 similar hydrographic structure was observed along Martinez channel, however a sharper
324 vertical gradient of salinity between 10 and 20 m evidenced stronger stratification of the
325 water column (Fig. 1F). In this channel, rising in haloclines at the mouth of the channel
326 reflected influence of oceanic waters entering through Gulf of Penas (Fig. 1F). Our
327 observations on water column hydrography are consistent with the model of two-or-
328 more-layer circulation described for Patagonian fjords and channels, which is attributed to
329 surface input of freshwater from rivers, ice melting and precipitations and from deep
330 inflow of marine water from the oceanic area (Silva et al., 1997; Silva et al., 2011).

331

332 Seasonality in the influence of meltwaters on water column structure was evidenced by
333 changes in dilution of marine conditions in subsurface and bottom waters. In austral
334 summer and autumn, dilution of marine waters resulted in the presence of waters with
335 salinities lower than 30 psu at 50 m depth along proglacial fjord (Fig.1B,D). In autumn near
336 glacier terminus (Fig. 1A), waters with salinities lower than 30 psu reached the bottom of
337 the fjord (Fig. 1B), whereas in winter and spring, 30 and 31 psu isolines were at about 20
338 m and ~50 m depth along channel, respectively (Fig. 1C,E). We interpreted these

339 differences in salinity distribution as contrasting scenarios of ice melting of Jorge Montt
340 glacier, with higher fluxes of meltwater during austral autumn and summer. Although
341 direct measurements of meltwater flux are not available for the study area, it is expected
342 that an increase in atmospheric temperatures during austral summer result in a higher
343 runoff of meltwaters into the fjord, thus diluting marine conditions of the water column
344 that can persist until autumn. Consistently, during summer we observed high
345 temperatures in surface waters along proglacial fjord (Fig. 1, supplementary information).

346

347 In agreement with a strong influence of freshwater fluxes in the study area, surface waters
348 were characterized by high concentrations of silicic acid, especially along Martinez
349 channel, where concentrations higher than $60 \mu\text{M}$ were detected in inner sites (Table 1).

350 The distribution of silicic acid together with lower concentrations of nitrate and phosphate
351 in surface waters of fjords are also indicative of influence of freshwater fluxes in waters of
352 channels and fjords of central Patagonia (González et al., 2013; Torres et al., 2014),

353 whereas, and consistent with a marine source, high concentrations of nitrate and

354 phosphate were found in bottom waters of the study area (Table 1). Chlorophyll-a

355 concentrations were lower than 1.3 mg m^{-3} during all seasons, evidencing oligotrophic

356 conditions in waters of this fjord area. This is consistent with low primary productivity and

357 phytoplankton biomass reported for fjords and channels of central Patagonia, which are

358 attributed to unfavorable light conditions since high load of suspended material and low

359 concentrations of macronutrients in surface waters (Aracena et al. 2011; González et al.

360 2013).

361

362 *4.2. Sterol distribution in waters of Patagonian glacial fjords*

363

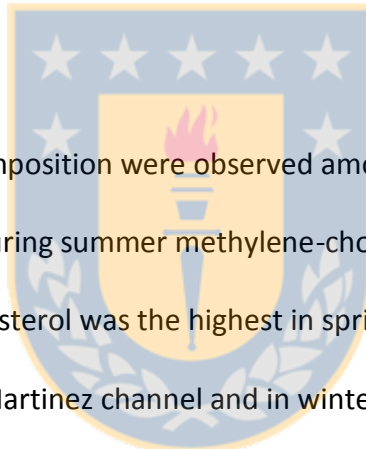
364 Sterol concentrations in surface and bottom waters of proglacial fjord and channels during
365 the study period were in the range (35 – 1726 ng L⁻¹; Fig. 2) of that reported for cold
366 environments such as Antarctic lakes (Matsumoto, 1989), Arctic waters (Rontani et al.
367 2014) and Sea Ice (Belt et al. 2013), and Atlantic Southern Ocean (Cavagna et al. 2013).

368 The highest sterol concentrations were observed in surface waters of austral summer in
369 proglacial fjord, near glacier terminus (>1000 ng L⁻¹), whereas the lowest concentrations
370 (<100 ng L⁻¹) were found in bottom waters (Fig. 2). Sterol concentration was positively
371 correlated with that of chlorophyll-a, particularly in summer when it was also inversely
372 correlated with nitrate concentration. We suggest the increase in phytoplankton biomass
373 as main factor controlling changes in sterol abundance in surface waters of proglacial
374 fjord. In the same period (austral summer), sterol concentration was lower than 600 ng L⁻¹
375 along Martinez channel and showed no correlation with chlorophyll-a. Relatively high
376 concentrations of sterols and chlorophyll-a were observed in sites near mouth of the
377 channel (Fig. 2, Table1), where hydrography (Fig. 1F) shows higher influence of oceanic
378 waters. In contrast, lower concentrations of sterols and chlorophyll-a, comparable to
379 those found in waters of proglacial fjord during winter, were measured in inner area of
380 Martinez channel, where freshwater could promote unfavorable conditions for
381 phytoplankton production (Aracena et al. 2011, González et al. 2013).

382

383 Overall composition of sterols in waters of proglacial fjord and channels was characterized
384 by a predominance of cholesterol, brassicasterol, methylene-cholesterol, β -sitosterol and
385 fucosterol, which together contributed by over 70% of sterols (3a). In bottom waters
386 cholesterol and β -sitosterol were the most representative molecules (Fig. 3b). Methylene-
387 cholesterol and brassicasterol are considered representative of diatoms (Volkman &
388 Hallegraeff, 1988; Barrett et al., 1995; Volkman, 2003; Rampen et al., 2010) and fucosterol
389 has been described as characteristic of some *Chlorophyta* microalgae and some
390 macroalgae (Volkman, 1986; Volkman and Hallegraeff 1988; Chikaraishi et al. 2006). β -
391 sitosterol is well represented in plants whereas cholesterol in animals (including
392 zooplankton) but they have been found in low abundance in some microalgae (Volkman
393 1986; 2003). Based on sterol distribution, our results evidenced a significant proportion of
394 microalgae sterols in surface waters and a predominance of plant sterols and cholesterol
395 in bottom waters (Fig. 4). Segregation in proportion of phytoplankton-derived sterols
396 respect to other sources throughout water column, fall in the general pattern observed in
397 the open ocean (no freshwater source), where plankton-derived lipids prevailed in surface
398 waters and loss of labile molecules during sinking results in less reactive organic matter in
399 bottom waters (Wakeham et al. 1997). This distribution is also consistent with previous
400 observations for surface water sterol composition in the Crozet Plateau in Southern Ocean
401 (Hernández et al. 2008) and in Arctic and Antarctic Sea Ice (Nichols et al. 1989; Belt et al.
402 2013) and with water column distribution of particular microalgae sterols in the Atlantic
403 Southern Ocean (Cavagna et al. 2013). Thus, predominance of cholesterol and sitosterol
404 and low amounts of algae-derived sterols in bottom waters may result from selective

405 preservation of more refractory organic matter. Low renewal of oceanic-derived deepest
406 waters of Patagonian fjords (Silva and Vargas, 2014) can result in degradation of more
407 labile organic matter leaving a refractory signature in bottom waters. Additionally, the
408 presence of a copious woodland vegetation and continental drainage can result in
409 significant inputs of terrestrial organic debris to fjords and channels that can explain the
410 predominance of sitosterol in bottom waters. Sitosterol represents a dominant portion of
411 sterols in vascular plants (Lütjohann, 2004) and in aquatic environments strongly
412 influenced by terrigenous material plants is considered its main source (Yunker et al.
413 1995).



414
415 Major differences in sterol composition were observed among seasons in surface waters
416 of proglacial fjord (Fig. 3A). During summer methylene-cholesterol was the most
417 abundant sterol, whereas fucosterol was the highest in spring (Fig. 3A). Additionally,
418 surface waters in summer in Martinez channel and in winter in proglacial fjord, showed a
419 significant relative abundance of brassicasterol (Fig. 3A). Methylene-cholesterol is
420 considered representative of centric diatoms (Barret et al. 1995; Rampen et al. 2010),
421 particularly for *Thalassiosirales* (Volkman and Hallegraeff, 1988; Rampen et al. 2010),
422 whereas brassicasterol can represent pennate diatoms (Volkman 1986; Rampen et al.
423 2010). Accordingly, our results suggest dominance of centric diatoms during melting
424 condition of summer in proglacial fjord waters, whereas for the same period along
425 Martinez channel and in winter in proglacial fjord, pennate diatoms appear to
426 predominate. These results are consistent with reports of prevalence of genera of centric

427 and pennate diatoms in the study area (González et al. 2013) and with predominance of
428 pennate *Pseudo-nitzschia* in waters of Martinez and Baker Channel in spring 2013 (Lange
429 and Rebolledo, unpublished data). During spring in surface waters of proglacial fjord, high
430 relative abundance of fucoesterol suggests prevalence of other microalgae in meltwaters.
431 Fucoesterol appears to be abundant in *Chlorophyta* (Volkman 1986; Volkman and
432 Hallegraeff 1988; Volkman et al. 1994), therefore its occurrence is a plausible possibility
433 since in estuarine systems chlorophytes dominate in low salinity waters during certain
434 periods (Thompson et al. 1998; Gang et al. 2014). Another source of fucoesterol are
435 macroalgae (Chikaraishi et al. 2006; Volkman and Hallegraeff 1988; Lopes et al. 2001).
436 Those possibilities need to be evaluated.

437
438 A different scenario was observed in autumn, when similar proportions of representative
439 sterols of microalgae and plants, saturated sterols (stanols) and cholesterol were found in
440 surface meltwaters (Figs. 3A and 4A). The presence of stanols is indicative of sterol
441 degradation (Rontani et al. 2009; 2014) and of reworked organic matter and low
442 proportion of fresh material (Volkman et al. 2007). Thus, occurrence of stanols in surface
443 waters of proglacial fjord in autumn suggests organic matter with a sizable fraction of
444 refractory material, probably carried by meltwaters from glacial surface. In support for
445 that, stanols relative abundance showed significant negative correlations with chlorophyll-
446 a and temperature, and significant positive correlations with nitrate and phosphate (Table
447 4). In addition, during autumn we also detected an unusual tri-unsaturated sterol
448 identified as 19-norergosta-5,7,9-trien-3 β -ol (phycomysterol B, Table 2, Table 1,

449 supplementary information), which has been reported in some species of filamentous
450 Fungi (Barrero et al. 1998; 2002). Consistently, meltwaters appear to be an important
451 source of fungal sequences during high ice melting condition in the study area (Gutiérrez
452 et al. 2015). We suggest that in austral autumn, a period with apparently high meltwater
453 flux but unfavorable conditions for phytoplankton growth due to low PAR, composition of
454 sterols in proglacial fjord was significantly influenced by discharge of molecules from the
455 glacier. Glacier organic matter contains autochthonous and allochthonous molecules
456 (Pautler et al. 2012; 2013) partially reworked on supraglacial environments, such as
457 organic debris of vascular plants transported by winds (Wharton 1985). These organic
458 molecules can be transported with meltwaters to downstream ecosystems (Hood et al.
459 2015) and modify the composition of organic matter in proglacial fjords. A high correlation
460 of β -sitosterol and sitostanol abundances ($Pearson = 0.86$, $p\text{-value} = 0.000$) suggests same
461 source for these sterols, with the latter probably coming from degradation of
462 phytosterols.

463

464 In bottom waters, major changes in sterol composition were observed in autumn and in
465 summer, when significant proportions of microalgae sterols (brassicasterol in autumn, and
466 methylene-cholesterol and fucosterol in summer) and of saturated sterols were found
467 (Figs. 3B and 4B). Although the abundance of sterols was significantly lower in bottom
468 than in surface waters, the presence of characteristic molecules of microalgae suggest
469 that sterols can be transferred more efficiently from surface to deeper waters during
470 periods of high meltwaters flux. Consistently, like in surface meltwaters, we observed a

471 significant proportion of stanols and the presence of 19-norergosta-5,7,9-trien-3 β -ol in
472 bottom waters in autumn. We suggest that deepening of cold and low salinity waters
473 during these periods (Fig. 1B) promote vertical mixing and transport of matter to bottom
474 waters of proglacial fjord.

475

476 *4.3. Sterol signatures in glacial fjord waters*

477

478 Major variability in sterol composition in waters of Patagonian glacial fjords and adjacent
479 channels was explained mostly by changes in few sterols representative of microalgae and
480 plants, and cholesterol. According to relative abundance of these molecules,
481 concentration of sterols and chlorophyll-a, and relative proportion of microalgae to plant
482 sterols, we defined different organic signatures among periods, depths and locations in
483 the study area (Figs. 5 and 6). While ubiquitous among the water column, cholesterol was
484 the prevalent sterol in bottom waters together with β -sitosterol. Since this pattern of
485 composition was accompanied by low concentrations of sterols and low values of MIC-S to
486 PL-S ratio (Fig. 5), we interpreted this signal as indicative of less reactive organic matter in
487 most of deep waters of proglacial fjords and channels in central Patagonia. This apparent
488 conservative signature of sterol distribution may be partially modified during scenarios of
489 high meltwater flux, as observed in austral summer and autumn, when a relatively higher
490 contribution of microalgae-derived sterols and stanols are found in bottom waters of the
491 proglacial fjord.

492

493 In surface waters, variability in sterol composition among seasons was mostly associated
494 with changes in predominance of sterols representative of microalgae. Thus, under high
495 ice melting condition of summer and relatively high chlorophyll-a and sterol
496 concentration, predominance of methylene-cholesterol suggests a prevalence of centric
497 diatoms in surface waters of proglacial fjord (Fig. 5). Under apparent low melting scenario
498 of winter and spring, moderate concentrations of sterols were accompanied by a
499 predominance of fucoesterol and brassicasterol, suggesting a predominance of green
500 microalgae and pennate diatoms. A prevalence of brassicasterol in waters along Martinez
501 channel, suggest that the presence of pennate diatoms can be interpreted as indicative of
502 waters under no direct influence of ice melting. These results are consistent with a higher
503 sterol content per cell (Belt et al. 2013) observed in centric diatoms (i e. high sterol to
504 chlorophyll-a ratio in surface meltwaters in summer in proglacial fjord) and low sterol
505 content per pennate diatom cell (Belt et al. 2013) (i e. low sterol to chlorophyll-a ratio in
506 surface waters in summer in Martinez channel). Finally, the occurrence of stanols in
507 surface waters of proglacial fjord, as well as the presence of tri-unsaturated sterols,
508 appears to be a distinctive signal of direct influence of ice melting in sterol composition of
509 waters of glacial fjord.

510

511 Fjords of central Patagonia are under direct influence of ice melting from glaciers of
512 Northern and Southern Patagonian Icefields. Meltwater flux can modify physicochemical
513 features and microbial community composition in downstream fjords (Moffat 2014;
514 Gutiérrez et al. 2015). Here we show evidence for meltwaters modifying organic matter

515 composition by setting favorable conditions for development of specific microalgae
516 populations and by carrying organic molecules from glacial environments. Considering
517 that meltwaters can impact autotrophic and heterotrophic microbial community of fjords
518 and can be a potential source of organics molecules, we propose that progressive ice
519 melting of Patagonian Icefields (Willis et al., 2012) will have a significant effect on trophic
520 status of Patagonian fjord and channel ecosystems by changing the bioavailability of
521 organic substrates for heterotrophic activity.

522

523 **Acknowledgements**

524 This work was funded by FONDECYT 11110515, with partial support from PAI (Conicyt
525 grant #791220026) and COPAS Sur-Austral (PFB-31).

526

527

528 **References**

529

530 Aracena, C., Lange, C. B., Luis Iriarte, J., Rebolledo, L., Pantoja, S. (2011). Latitudinal
531 patterns of export production recorded in surface sediments of the Chilean Patagonian
532 fjords (41–55 S) as a response to water column productivity. *Continental shelf research* 31,
533 340-355

534

535 Bardgett, R. D., Richter, A., Bol, R., Garnett, M. H., Bäumlér, R., Xu, X., Lopez-Capel, E.,
536 Manning, D., Hobbs, P., Hartley, I., Wanek, W. (2007). Heterotrophic microbial

537 communities use ancient carbon following glacial retreat. *Biology letters* 3, 487-490

538

539 Barrero, A. F., Oltra, J. E., Poyatos, J. A., Jiménez, D., Oliver, E. (1998). Phycomysterols and
540 other sterols from the fungus *Phycomyces blakesleeanus*. *Journal of natural products* 61,
541 1491-1496

542

543 Barrero, A.F., Oltra, J.E., Robinson, J., Burke, P.V., Jiménez, D., Oliver, E. (2002) Esterol in
544 erg mutants of *Phycomyces*: metabolic pathway and physiological effects. *Steroids* 67,
545 403-409

546

547 Barret, S.M., Volkman, J.K., Dunstan, G.A. (1995) Sterols of 14 species of marine diatoms
548 (*Bacillariophyta*). *Journal of Phycology* 31, 360-369

549

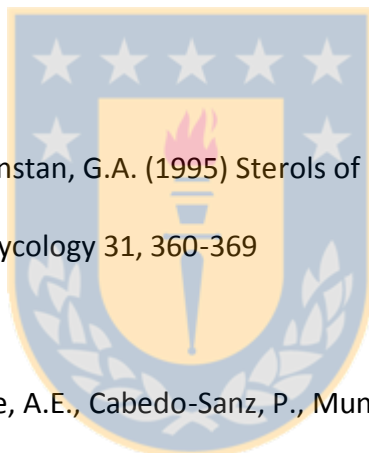
550 Belt, S.T., Brown, T.A., Ringrose, A.E., Cabedo-Sanz, P., Mundy, C.J., Gosselin, M., Poulin,
551 M. (2013) Quantitative measurement of the sea diatom biomarker IP25 and sterols in
552 Arctic sea ice and underlying sediments: Further considerations for palaeo sea ice
553 reconstruction. *Organic geochemistry* 62, 33-45

554

555 Bianchi, T. S., Canuel, E. A. (2011) *Chemical Biomarkers in Aquatic Ecosystems*. Princeton
556 University Press, 396 pp.

557

558 Bligh, E., & Dyer, W. J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification.



559 Canadian journal of biochemistry and physiology 37, 911-917

560

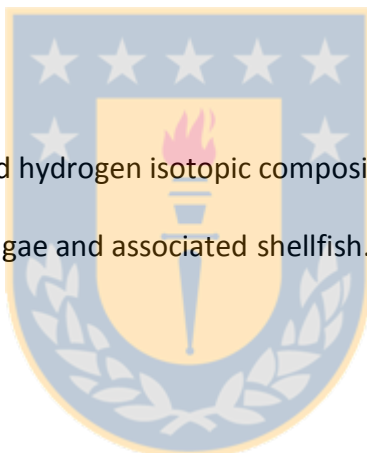
561 Brassell, S. C., Eglinton, G. (1981). Steroids and triterpenoids in deep sea sediments as
562 environmental and diagenetic indicators. *Advances in organic geochemistry*, 684-697

563

564 Cavagna, A.J., Dehairs, F., Bouillon, S., Woule-Ebongue, V., Planchon, F., Delille, B.,
565 Bouloubassi, I. (2013) Water column distribution and carbon isotopic signal of cholesterol,
566 brassicasterol and particulate organic carbon in the Atlantic sector of the Southern Ocean.
567 *Biogeosciences* 10, 2787-2801

568

569 Chikaraisi, Y. (2006) Carbon and hydrogen isotopic composition of sterols in natural
570 marine brown and red macroalgae and associated shellfish. *Organic geochemistry* 37, 428-
571 436



572

573 Colombo, J. C., Silverberg, N., Gearing, J. N. (1996). Lipid biogeochemistry in the
574 Laurentian Trough: I-fatty acids, sterols and aliphatic hydrocarbons in rapidly settling
575 particles. *Organic geochemistry* 25, 211-225

576

577 Conover, W.J., Iman, R.L. (1981) Rank transformation as a bridge between parametric and
578 non parametric statistics. *American Statistics* 35: 124-129

579

580 De Leeuw, J. W., Baas, M. (1986). Early-stage diagenesis of steroids. *Methods in*

581 geochemistry and geophysics 24, 101-123

582

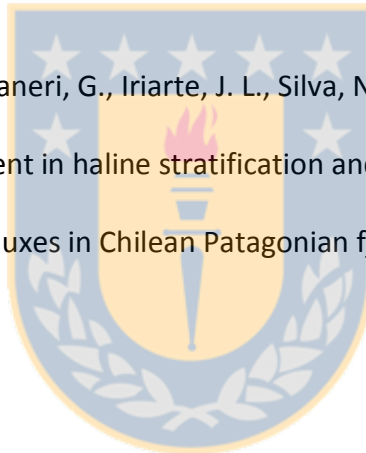
583 Gang, L., Qiang, L., Junda, L., Xingyu, S., Yehui, T., Liangmin, H. (2014) Environmental
584 gradients regulate the spatial variations of phytoplankton biomass and community
585 structure in surface water of the Pearl River estuary. *Acta ecologica sinica* 34, 129-133

586

587 Gillan, F.T., Johns, R.B. (1980) Input and early diagenesis of chlorophylls in a temperate
588 intertidal sediment. *Marine chemistry* 9, 243–253

589

590 González, H. E., Castro, L. R., Daneri, G., Iriarte, J. L., Silva, N., Tapia, F., Teca, C. A., Vargas,
591 C. A. (2013). Land-ocean gradient in haline stratification and its effects on plankton
592 dynamics and trophic carbon fluxes in Chilean Patagonian fjords (47°-50° S). *Progress in*
593 *Oceanography* 119: 32–47



594

595 Green, G., Skerratt, J. H., Leeming, R., Nichols, P. D. (1992). Hydrocarbon and coprostanol
596 levels in seawater, sea-ice algae and sediments near Davis Station in Eastern Antarctica: a
597 regional survey and preliminary results for a field fuel spill experiment. *Marine pollution*
598 *bulletin* 25, 293-302

599

600 Gutiérrez, M.H., Galand, P.E., Moffat, C., Pantoja, S. (2015) Melting glacier impacts
601 community structure of Bacteria, Archaea and Fungi in a Chilean Patagonia fjord.

602 *Environmental microbiology* XXX, xxx-XXX

603

604 Hammer, Ø., Harper, D.A.T., and P. D. Ryan, 2001. PAST: Paleontological Statistics
605 Software Package for Education and Data Analysis. *Palaeontologia Electronica* 4, 9pp.

606

607 Hernandez, M.T., Mills, R.A., Pancost, R.D. (2008) Algal biomarkers in surface waters
608 around the Crozet plateau. *Organic geochemistry* 39, 1051-1057

609

610 Hood, E., Fellman, J., Spencer, R. G., Hernes, P. J., Edwards, R., D'Amore, D., Scott, D.
611 (2009). Glaciers as a source of ancient and labile organic matter to the marine
612 environment. *Nature* 462, 1044-1047

613

614 Hood, E., BAttin, T.J., Fellman, J., O'Neel, S., Spencer, R.G.M. (2015) Storage of organic
615 carbon from glaciers and ice sheets. *Nature geoscience* 8, 91-96

616

617 Hudson, E. D., Parrish, C. C., Helleur, R. J. (2001). Biogeochemistry of sterols in plankton,
618 settling particles and recent sediments in a cold ocean ecosystem (Trinity Bay,
619 Newfoundland). *Marine chemistry* 76, 253-270

620

621

622 Lopes, G., Sousa, C., Bernardo, J., Andrade, P.B., Valentao, P. (2011) Sterol profiles in 18
623 macroalgae of the portuguese coast. *Journal of phycology* 47, 1210-1218

624

625 Lütjohann, D., 2004. Sterol autoxidation: from phytosterols to oxyphytosterols.
626 British journal of nutrition 91, 3–4
627
628 Martins, C. C., Venkatesan, M. I., & Montone, R. C. (2002). Sterols and linear alkylbenzenes
629 in marine sediments from Admiralty Bay, King George Island, South Shetland Islands.
630 Antarctic Science 14, 244-252
631
632 Matsumoto, G.I., Torii, T., Hanya, T. (1984) Vertical distribution of organic constituents in
633 an Antarctic lake: Lake Vanda. Hydrobiologia 111, 119-126
634
635 Matsumoto, G.I. 1989. Biogeochemical studies of organic substances in Antarctic lakes.
636 Hydrobiologia 172, 265-289
637
638 Moffat, C. (2014) Wind-driven modulation of warm water supply to a proglacial fjord,
639 Jorge Montt Glacier, Patagonia. Geophysical Research Letter 41, 3943–3950
640
641 Muhlebach, A., Weber, K. (1998). Origins and fate of dissolved sterols in the Weddell Sea,
642 Antarctica. Organic geochemistry 29, 1595-1607
643
644 Nelson, M. M., Mooney, B. D., Nichols, P. D., & Phleger, C. F. (2001). Lipids of Antarctic
645 Ocean amphipods: food chain interactions and the occurrence of novel biomarkers.
646 Marine chemistry 73, 53-64



647

648 Neter, J., Kutner, M., Wasserman, W., Nachtsheim, C. (1996) Applied linear statistical
649 models, 4th edition, Chicago, McGraw–Hill/Irwin.

650

651 Nichols, P.D., Palmisano, A.C., Rayner, M.S., Smith, G.A., White, D.C. (1989) Changes in the
652 lipid composition of Antarctic Sea-ice diatoms community during a spring bloom: an
653 indication of community physiological status. *Antarctic science* 1, 133-140

654

655 Nishimura, M. (1978). Geochemical characteristics of the high reduction zone of stenols in
656 Suwa sediments and the environmental factors controlling the conversion of stenols to
657 stanols. *Geochimica et cosmochimica acta* 42, 349–357

658

659 Parsons, T., Maita, Y., Lalli, C., 1984. A Manual of Chemical and Biological Methods for
660 Seawater Analysis. Pergamon Press, Oxford

661

662 Pautler, B.G., Simpson, A.J., Simpson, M.J., Tseng, L-H, Spraul, M., Dubnick, A., Sharp, M.J.,
663 Fitzsimons, S.J. (2011) Detection and Structural Identification of Dissolved Organic Matter
664 in Antarctic Glacial Ice at Natural Abundance by SPR-W5-WATERGATE ¹H NMR
665 Spectroscopy. *Environmental science & technology* 45, 4710–4717

666

667 Pautler, B.G., Woods, G.C., Dubnick, A., Simpson, A.J., Sharp, M.J., Fitzsimons, S.J.

668 Simpson, M.J. (2012) Molecular Characterization of Dissolved Organic Matter in Glacial

669 Ice: Coupling Natural Abundance ¹H NMR and Fluorescence Spectroscopy. *Environ science*
670 & technology 46, 3753–3761

671

672 Pautler, B.G., Dubnick, A., Sharp, M.J., Simpson, A.J., Simpson, M.J. (2013) Comparison of
673 cryoconite organic matter composition from Arctic and Antarctic glaciers at the molecular-
674 level. *Geochimica et cosmochinica acta* 104, 1-18

675

676 Rampen, S. W., Abbas, B. A., Schouten, S., Sinninghe Damste, J. S. (2010). A
677 comprehensive study of sterols in marine diatoms (Bacillariophyta): Implications for their
678 use as tracers for diatom productivity. *Limnology and oceanography* 55, 91-105

679

680 Rignot, E., Rivera A., Casassa, G. (2003). Contribution of the Patagonia Ice fields of South
681 America to Global Sea Level Rise. *Science* 302, 434-437

682

683 Rignot, E., Velicogna, I., Van den Broeke, M. R., Monaghan, A., Lenaerts, J. T. M. (2011).
684 Acceleration of the contribution of the Greenland and Antarctic ice sheets to sea level rise.
685 *Geophysical Research Letters*, vol. 38, L05503, doi: 10.1029/2011GL046583 (5)

686

687 Rivera, A., Koppes, M., Bravo, C., Aravena, J. C. (2011). Little ice age advance and retreat of
688 Glaciar Jorge Montt, Chilean Patagonia, recorded in maps, air photographs and
689 dendrochronology. *Climate of the past discussions* 7, 3131-3164

690

691 Rivera, A., Corripio, J., Bravo, C., & Cisternas, S. (2012). Glaciar Jorge Montt (Chilean
692 Patagonia) dynamics derived from photos obtained by fixed cameras and satellite image
693 feature tracking. *Annals of glaciology* 53, 147–155
694
695 Rontani, J.F. (2008). Photooxidative and autoxidative degradation of lipid components
696 during the senescence of phototrophic organisms. *Phytochemistry research progress*.
697 Nova Science Publishers, pp. 115-144.
698
699 Rontani, J.F., Zabeti, N., Wakeham, S.G. (2009) The fate of marine lipids: Biotic vs. abiotic
700 degradation of particulate sterols and alkenones in the Northwestern Mediterranean Sea.
701 *Marine chemistry* 113, 9-18
702
703 Rontani, J. F., Zabeti, N., & Wakeham, S. G. (2011). Degradation of particulate organic
704 matter in the equatorial Pacific Ocean: Biotic or abiotic?. *Limnology and oceanography* 56,
705 333-349
706
707 Rontani, J-F. (2012). Photo- and free radical-mediated oxidation of lipid components
708 during the senescence of phototrophic organisms. *Senescence*, Dr. Tetsuji Nagata (Ed.),
709 ISBN 978-953-51-0144-4
710
711 Rontani, J-F., Charriere, B., Sampéré, R., Doxaran, D., Vultier, F., Vonk, J.E., Volkman, J.K.
712 (2014) Degradation of sterols and terrigenous organic matter in waters of the Mackenzie

713 Shelf, Canadian Arctic. Organic geochemistry 75, 61-73
714
715 Silva, N., Calvete, C., Sievers, H. A. (1997). Características oceanográficas físicas y químicas
716 de canales australes chilenos entre Puerto Montt y Laguna San Rafael (Crucero Cimar-
717 Fiordo 1). Ciencia y Tecnología del Mar 20, 23–106
718
719 Silva, N., Vargas, C. A. Prego, R. (2011). Land–ocean distribution of allochthonous organic
720 matter in surface sediments of the Chiloé and Aysén interior seas (Chilean Northern
721 Patagonia). Continental Shelf Research 31, 330–339
722
723 Silva, N., Vargas, C.A. (2014) Hypoxia in Chilean Patagonian Fjords. Progress in
724 Oceanography, doi: <http://dx.doi.org/10.1016/>.
725
726 Singer, G.A., et al. 2012. Biogeochemically diverse organic matter in Alpine glaciers and its
727 downstream fate. Nature geoscience, doi: 10.1038/NGEO1581
728
729 Spencer, R.G.M., et al. 2014. Seasonal variability of organic matter composition in an
730 Alaskan glacier outflow: insights into glacier carbon sources. Environ res lett, 9,
731 doi:10.1088/1748-9326/9/5/055005
732
733 Stibal, M., et al. 2012. Biological processes on glacier and ice sheet surfaces. Nature
734 geosciences, doi: 10.1038/NGEO1611



735

736 Strickland, J. D., Parsons, T. R. (1960). A manual of sea water analysis. Fisheries Research
737 Board of Canada, 167

738

739 Stubbins, A., et al. 2012. Anthropogenic aerosols as a source of ancient dissolved organic
740 matter in glaciers. Nature geoscience, doi: 10.1038/NGEO1403

741

742 Sun, M.Y., Wakeham, S.G. (1999). Diagenesis of planktonic fatty acids and sterols in Long
743 Island Sound sediments: influences of a phytoplankton bloom and bottom water oxygen
744 content. Journal of marine research 57, 357–385

745

746 Thompson, P.A. (1998) Spatial and temporal patterns of factors influencing phytoplankton
747 in a salt wedge estuary, the Swan River, western Australia. Estuaries 21, 801-817

748

749 Torres, R., Frangopulos, M., Hamamé, M., Montecino, V., Maureira, C., Pizarro, G., Reid,
750 B., Valle-Levinson, A., Blanco, J. L. (2011). Nitrate to silicate ratio variability and the
751 composition of micro-phytoplankton blooms in the inner-fjord of Seno Ballena (Strait of
752 Magellan, 54° S). Continental shelf research 31, 244-253

753 .

754 Venkatesan, M. I., Ruth, E., Kaplan, I. R. (1986). Coprostanols in Antarctic marine
755 sediments: a biomarker for marine mammals and not human pollution. Marine pollution
756 bulletin 17, 554-557

757

758 Villinski, J. C., Hayes, J. M., Brassell, S. C., Riggert, V. L., Dunbar, R. B. (2008). Sedimentary
759 sterols as biogeochemical indicators in the Southern Ocean. *Organic geochemistry* 39,
760 567-588

761

762 Volkman, J.K. (1986). A review of sterol markers for marine and terrigenous organic
763 matter. *Organic geochemistry* 9, 83-99

764

765 Volkman, J.K., G. M. Hallegraeff (1988). Lipids in marine diatoms of the genus
766 *Thalassiosira*: Predominance of 24 methylene cholesterol. *Phytochemistry* 27, 1389–1394

767

768 Volkman, J.K., Barret, S.M., Dunstan, G.A., Jeffrey, S.W. 1994. Sterol biomarkers for
769 microalgae from the green algal class *Prasinophyceae*. *Organic geochemistry* 21, 1211-
770 1218

771

772 Volkman, J.K. (2003). Sterols in microorganisms. *Applied microbiology and biotechnology*
773 60, 495-506

774

775 Volkman, J. K. (2005). Sterol and other triterpenoids: Source specificity and evolution of
776 biosynthetic pathways. *Organic geochemistry* 36, 139-159

777

778 Volkman, J.K., Revill, A.T., Bonham, P.I., Clementson, L.A. (2007) Sources of organic matter

779 in sediments from the Ord River in tropical northern Australia. *Organic geochemistry* 38,
780 1039-1060

781

782 Wakeham, S. G., Beier, J. A. (1991). Fatty-acid and sterol biomarkers as indicators of
783 particulate matter source and alteration processes in the Black Sea. *Deep Sea Research*
784 Part A 38, S943–S968

785

786 Wakeham, S. G. (1995). Lipid biomarkers for heterotrophic alteration of suspended
787 particulate organic matter in oxygenated and anoxic water columns of the ocean. *Deep*
788 *sea research I* 42, 1749–1771

789

790 Wakeham, S. G., Hedges, J. I., Lee, C., Peterson, M. L., Hernes, P. J. (1997). Compositions
791 and transport of lipid biomarkers through the water column and surficial sediments of the
792 equatorial Pacific Ocean. *Deep Sea Research Part II* 44, 2131-2162.

793

794 Wharton J.R.A., McKay C.P., Simmons G.M., Parker B.C. (1985) Cryoconite holes on
795 glaciers. *BioScience* 8, 499–503

796

797 Willis, M. J., Melkonian, A. K., Pritchard, M. E., Rivera, A. (2012). Ice loss from the Southern
798 Patagonian Ice Field, South America, between 2000 and 2012. *Geophysical research*
799 *letters* 39, L17501, doi: 10.1029/2012GL053136

800

801 Yunker, M.B., Macdonald, R.W., Veltkamp, D.J., Cretney, W.J. (1995) Terrestrial and
802 marine biomarkers in a seasonally ice-covered Arctic estuary – integration of
803 multivariate and biomarker approaches. *Marine chemistry* 49, 1–50
804
805
806



Table 1. Sample ID and chemical and biological characteristics of the waters sampled during April and August 2012 in the fjord adjacent to Jorge Montt glacier. Concentrations of nutrients are average of duplicate samples. n.d.: not detected, - : not data.

Date	Collection site	Sample ID	Latitude (°S)	Longitude (°W)	Sample depth (m)	Nitrate (μM)	Phosphate (μM)	Silicic acid (μM)	Chlorophyll-a (mg m^{-3})	Prokaryotes ($\times 10^8$ cells L^{-1})
Apr-12	Glacial fjord	GF_Apr1_3m	48.264	73.445	3	n.d.	0.01 ± 0.01	16.1 ± 0.4	0.15	3.22
Apr-12	Glacial fjord	GF_Apr2_3m	48.247	73.445	3	5.3 ± 0.9	n.d.	18.2 ± 0.7	0.29	1.57
Apr-12	Glacial fjord	GF_Apr6_3m	48.266	73.449	3	7.5 ± 0.5	0.69 ± 0.02	5.9 ± 0.3	0.06	1.62
Apr-12	Glacial fjord (sill)	GF_Apr10_3m	48.218	73.502	3	1.6 ± 0.1	0.33 ± 0.01	11.8 ± 0.9	0.18	3.83
Apr-12	Baker channel	BC_Apr15_3m	48.183	73.476	3	18.5 ± 1.6	1.96 ± 0.08	14.9 ± 0.4	0.11	2.15
Aug-12	Glacial fjord	GF_Aug1_0m	48.297	73.456	0	0.8 ± 0.0	0.08 ± 0.00	20.6 ± 0.0	0.02	2.86
Aug-12	Glacial fjord	GF_Aug2_0m	48.237	73.470	0	1.0 ± 0.0	0.09 ± 0.00	25.8 ± 0.0	0.56	2.56
Aug-12	Baker channel	BC_Aug3_3m	48.194	73.503	3	5.6 ± 0.0	0.55 ± 0.00	14.3 ± 0.0	0.27	2.11
Mar-13	Martinez channel	MC_Mar1_3m	47.785	73.640	3	4.5 ± 0.1	0.11 ± 0.01	60.4 ± 0.4	0.07	6.17
Mar-13	Martinez channel	MC_Mar2_3m	47.789	73.723	3	3.2 ± 0.0	0.13 ± 0.01	67.0 ± 0.6	0.21	2.19
Mar-13	Martinez channel	MC_Mar3_3m	47.814	73.947	3	1.5 ± 0.0	0.09 ± 0.02	79.5 ± 0.1	0.65	4.30
Mar-13	Martinez channel	MC_Mar4_3m	47.771	74.240	3	3.5 ± 0.0	0.17 ± 0.01	45.5 ± 0.1	0.73	4.02
Mar-13	Martinez channel	MC_Mar5_3m	47.792	74.462	3	2.0 ± 0.0	0.09 ± 0.02	46.9 ± 0.2	1.26	5.16
Mar-13	Martinez channel	MC_Mar6_3m	47.777	74.639	3	2.0 ± 0.0	0.05 ± 0.02	31.9 ± 0.0	0.84	5.34
Mar-13	Glacial fjord	GF_Mar1_3m	48.299	73.459	3	0.6 ± 0.0	0.01 ± 0.02	10.7 ± 0.0	0.89	6.19
Mar-13	Glacial fjord	GF_Mar2_3m	48.295	73.458	3	0.5 ± 0.0	n.d.	15.9 ± 0.0	0.48	3.83
Mar-13	Glacial fjord	GF_Mar3_3m	48.295	73.488	3	2.2 ± 0.0	0.36 ± 0.09	43.2 ± 0.1	1.13	7.18
Mar-13	Glacial fjord	GF_Mar4_3m	48.235	73.467	3	1.3 ± 0.0	0.14 ± 0.01	31.4 ± 0.1	0.23	6.37
Mar-13	Baker channel	BC_Mar5_3m	48.192	73.488	3	2.4 ± 0.0	0.16 ± 0.00	52.5 ± 0.0	0.51	10.49
Mar-13	Baker channel	BC_Mar6_3m	48.159	73.459	3	0.3 ± 0.0	0.23 ± 0.01	36.4 ± 0.0	0.34	4.70
Nov-13	Glacial fjord	GF_Nov1_3m	48.282	73.442	3	n.d.	0.10 ± 0.06	28.4 ± 6.3	0.33	-
Nov-13	Baker channel	BC_Nov2_3m	48.191	73.506	3	0.3 ± 0.1	0.12 ± 0.06	$25.2 \pm$	0.67	-
Nov-13	Baker channel	BC_Nov3_3m	48.072	73.537	3	0.2 ± 0.1	0.19 ± 0.01	26.6 ± 0.4	0.74	-
Nov-13	Glacial fjord	GF_Nov4_3m	48.231	73.471	3	0.2 ± 0.1	$0.002 \pm$	4.2 ± 0.4	0.62	-

Nov-13	Baker channel	BC_Nov5_3m	48.190	73.487	3	1.5 ± 0.0	0.15 ± 0.13	25.7 ± 0.0	0.59	-
Apr-12	Glacial fjord	GF_Apr2_160m	48.247	73.445	160	6.7 ± 0.1	0.87 ± 0.00	4.3 ± 0.1	n.d.	3.28
Apr-12	Glacial fjord	GF_Apr6_210m	48.266	73.449	210	7.6 ± 0.4	0.76 ± 0.01	3.3 ± 0.1	n.d.	1.14
Apr-12	Glacial fjord (sill)	GF_Apr10_105m	48.218	73.502	105	10.5 ± 0.6	1.07 ± 0.02	4.1 ± 0.7	n.d.	1.52
Aug-12	Baker channel	BC_Aug5_70m	48.146	73.435	70	24.7 ± 0.0	1.40 ± 0.00	12.5 ± 0.0	n.d.	0.96
Mar-13	Martinez channel	MC_Mar3_50m	47.814	73.947	50	27.5 ± 0.0	1.15 ± 0.02	34.8 ± 0.0	n.d.	0.74
Mar-13	Martinez channel	MC_Mar5_100m	47.792	74.462	100	26.1 ± 0.0	1.52 ± 0.01	31.2 ± 0.03	n.d.	0.90
Mar-13	Glacial fjord	GF_Mar1_90m	48.299	73.459	90	12.2 ± 0.0	0.58 ± 0.030	10.7 ± 0.04	0.00	2.13
Mar-13	Glacial fjord	GF_Mar2_200m	48.295	73.458	200	10.6 ± 0.0	0.49 ± 0.03	13.6 ± 0.2	0.00	3.52
Mar-13	Glacial fjord	GF_Mar3_25m	48.295	73.488	25	9.0 ± 0.1	0.43 ± 0.01	11.1 ± 0.1	0.16	2.57
Mar-13	Glacial fjord	GF_Mar4_50m	48.235	73.467	50	7.8 ± 0.2	0.33 ± 0.01	7.0 ± 0.1	0.03	3.04
Mar-13	Baker channel	BC_Mar5_50m	48.192	73.488	50	9.5 ± 0.0	0.62 ± 0.02	9.6 ± 0.0	0.05	3.44
Mar-13	Baker channel	BC_Mar6_200m	48.159	73.459	200	20.6 ± 0.0	1.92 ± 0.03	22.2 ± 0.0	0.01	1.87
Nov-13	Glacial fjord	GF_Nov1_190m	48.282	73.442	190	7.8 ± 0.3	1.00 ± 0.05	4.9 ± 0.1	n.d.	-
Nov-13	Baker channel	BC_Nov2_30m	48.191	73.506	30	7.9 ± 0.1	0.82 ± 0.15	5.8 ±	0.04	-
Nov-13	Baker channel	BC_Nov3_150m	48.072	73.537	150	14.3 ± 0.6	0.62 ± 0.00	6.2 ± 1.7	0.06	-
Nov-13	Glacial fjord	GF_Nov4_70m	48.231	73.471	70	7.1 ± 1.6	0.96 ± 0.13	5.8 ± 0.9	0.01	-
Nov-13	Baker channel	BC_Nov5_130m	48.190	73.487	130	10.3 ± 2.4	1.09 ± 0.32	12.5 ± 0.4	n.d.	-

Table 2. Two-way ANOVA to test statistical differences on the rank-transformed data of dissolved inorganic nutrients, prokaryote abundance, chlorophyll-a concentration and sterol concentrations (-- : insufficient data for analysis).

Variable	Factor	df	F	p-value
Nitrate	Period	4	4.21	0.009
	Depth	1	91.98	0.000
	Period*Depth	4	4.69	0.005
Phosphate	Period	1	2.89	0.040
	Depth	1	53.96	0.000
	Period*Depth	1	4.01	0.010
Silicic acid	Period	1	10.67	0.000
	Depth	1	21.93	0.000
	Period*Depth	1	0.29	0.881
Prokaryote	Period	1	9.14	0.000
	Depth	1	27.81	0.000
	Period*Depth	1	3.30	0.038
Chlorophyll-a	Period	1	1.22	0.323
	Depth	1	-	-
	Period*Depth	1	-	-
Sterols	Period	1	1.18	0.340
	Depth	1	16.85	0.000
	Period*Depth	1	0.69	0.606

Table 3. Sterols detected in waters of the fjord adjacent to the Jorge Montt glacier. In numerical nomenclature ($C_x \Delta^y$), "x" represents carbon number and "y" indicates position of double bond, y = 0 means absence of double bonds (stanols).

Nomenclature	Common Name	$C_x \Delta^y$
26,27-Dinorergosta-5,22-dien-3-ol		$C_{26}\Delta^{5,22}$
Cholesta-5,22-dien-3 β -ol	22-Dehydrocholesterol	$C_{27}\Delta^{5,22}$
Cholesta-5-en-3 β -ol	Cholesterol	$C_{27}\Delta^5$
Cholestan-3 β -ol	Cholestanol	$C_{27}\Delta^0$
24-methyl cholest-5,22-dien-3 β -ol	Brassicasterol	$C_{28}\Delta^{5,22}$
3 β -Cholest-7-en-3-ol	Lathosterol	$C_{27}\Delta^7$
24-methylene-cholest-5-en-3 β -ol	Methylene-cholesterol	$C_{28}\Delta^{5,24(28)}$
24-methylcholest 5-en-3 β -ol	Campesterol	$C_{28}\Delta^5$
24-ethylcholest-5,22E-dien-3 β -ol	Stigmasterol	$C_{29}\Delta^{5,22}$
19-Norergosta-5,7,9-trien-3 β -ol	Phycomysterol B	$C_{27}\Delta^{5,7,9}$
Stigmasta-5,7-dien-3 β -ol	7-Dehydrositosterol	$C_{29}\Delta^{5,7}$
24-ethylcholest-5-en-3 β -ol/24-ethyl-cholesterol	β -Sitosterol	$C_{29}\Delta^5$
5 α -Stigmastan-3 β -ol	β -sitostanol	$C_{29}\Delta^0$
Stigmasta-5,24(28)-dien-3 β -ol	Fucoesterol	$C_{29}\Delta^{5,24(28)}$
4 α ,23,24-Trimethyl-5 α -cholest-22-en-3 β -ol	Dinosterol	$C_{30}\Delta^{22}$
4-Methylergost-7-en-3-ol	24-Methyl lophenol	$C_{29}\Delta^7$
29-Methylisofucoesterol	29-Methylisofucoesterol	$C_{30}\Delta^{5,24(28)}$

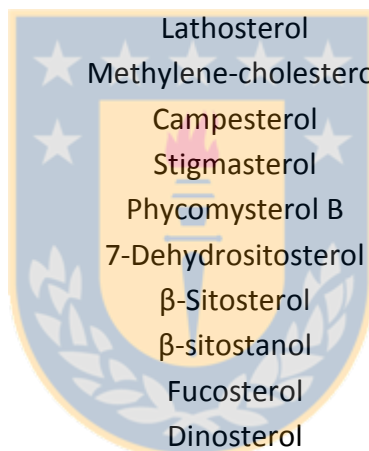


Table 4. Significant correlations between environmental variables and sterol abundance, stanols proportion, plant sterols (PL-S), microalgae sterols (MIC-S) and cholesterol (CHOL).

Total data set					
	Total sterols	Stanols	PL-S	MIC-S	CHOL
Salinity	-0.366 n=42 p=0.017			-0.447 n=42 p=0.003	0.431 n=41 p=0.020
Nitrate	-0.4021 n=40 p=0.010	0.507 n=17 p=0.038	0.378 n=40 p=0.016	-0.5636 n=40 p=0.000	0.4789 n=40 p=0.002
Phosphate		0.4929 n=17 p=0.044	0.352 n=40 p=0.026	-0.4030 n=40 p=0.010	
Chlorophyll-a	0.5350 n=34 p=0.001	-0.7145 n=14 p=0.004	-0.4112 n=34 p=0.016	0.6601 n=34 p=0.000	-0.4726 n=34 p=0.005
Prokaryote	0.4102 n=32 p=0.020			0.4058 n=32 p=0.021	
Surface waters					
Temperature		-0.8549 n=12 p=0.000			
Nitrate		0.7736 n=11 p=0.005	0.6325 n=23 p=0.001	-0.4200 n=23 p=0.046	
Phosphate		0.6957 n=11 p=0.017	0.5628 n=23 p=0.005		
Silicic acid		-0.5843 n=12 p=0.046			
Chlorophyll-a	0.3999 n=25 p=0.048	-0.8323 n=25 p=0.001		0.5553 n=25 p=0.004	
April 2012					
Temperature					
Salinity		0.9015 n=7 p=0.006			
Nitrate			0.7936 n=7 p=0.033		
Phosphate			0.8019 n=7 p=0.030		
Silicic acid		-0.8593 n=7 p=0.013			
Prokaryote				0.9687 n=4 p=0.031	-0.9547 n=4 p=0.045

August 2012

Salinity	-0.6828 n=12 p=0.021		-0.6072 n=12 p=0.036
Nitrate	-0.5896 n=12 p=0.044		
Chlorophyll-a	0.7522 n=12 p=0.005		0.6450 n=12 p=0.024

March 2013

Salinity	0.9428 n=6 p=0.005	0.7948 n=10 p=0.006	-0.9495 n=10 p=0.000	0.9368 n=10 p=0.000
Nitrate	0.9658 n=6 p=0.002	0.7446 n=9 p=0.021	-0.9002 n=9 p=0.001	0.9517 n=9 p=0.000
Phosphate	0.9365 n=6 p=0.006	0.7766 n=10 p=0.008	-0.9403 n=10 p=0.000	0.8491 n=10 p=0.000
Chlorophyll-a		-0.8692 n=8 p=0.005	0.8822 n=8 p=0.004	-0.8791 n=8 p=0.004

November 2013

Temperature				-0.7377 n=8 p=0.037
Nitrate			-0.7271 n=8 p=0.041	0.8548 n=8 p=0.007
Phosphate				0.8242 n=8 p=0.012
Chlorophyll-a			0.8769 n=6 p=0.022	-0.8229 n=6 p=0.044

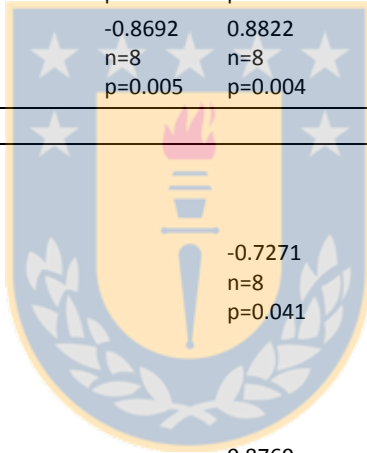


Figure captions

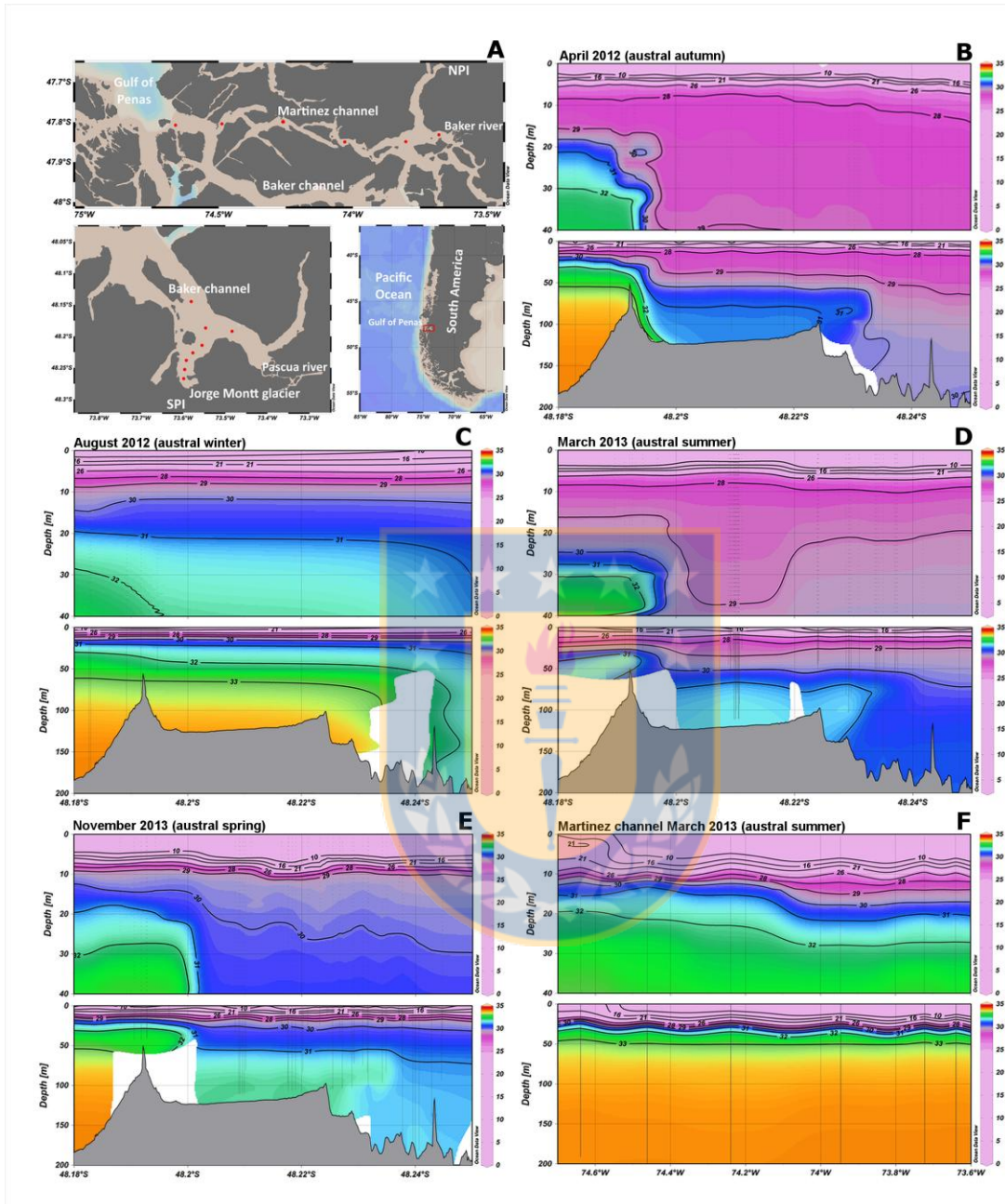


Figure 1. Study area (A) and vertical sections and isolines of salinity in April (B) and August 2012 (C) and March (D) and November (E) 2013 in proglacial fjord, and laong Martinez channel in March 2013 (F). NPI: Northern Patagonian Icefield, SPI: Southern Patagonian Icefield.

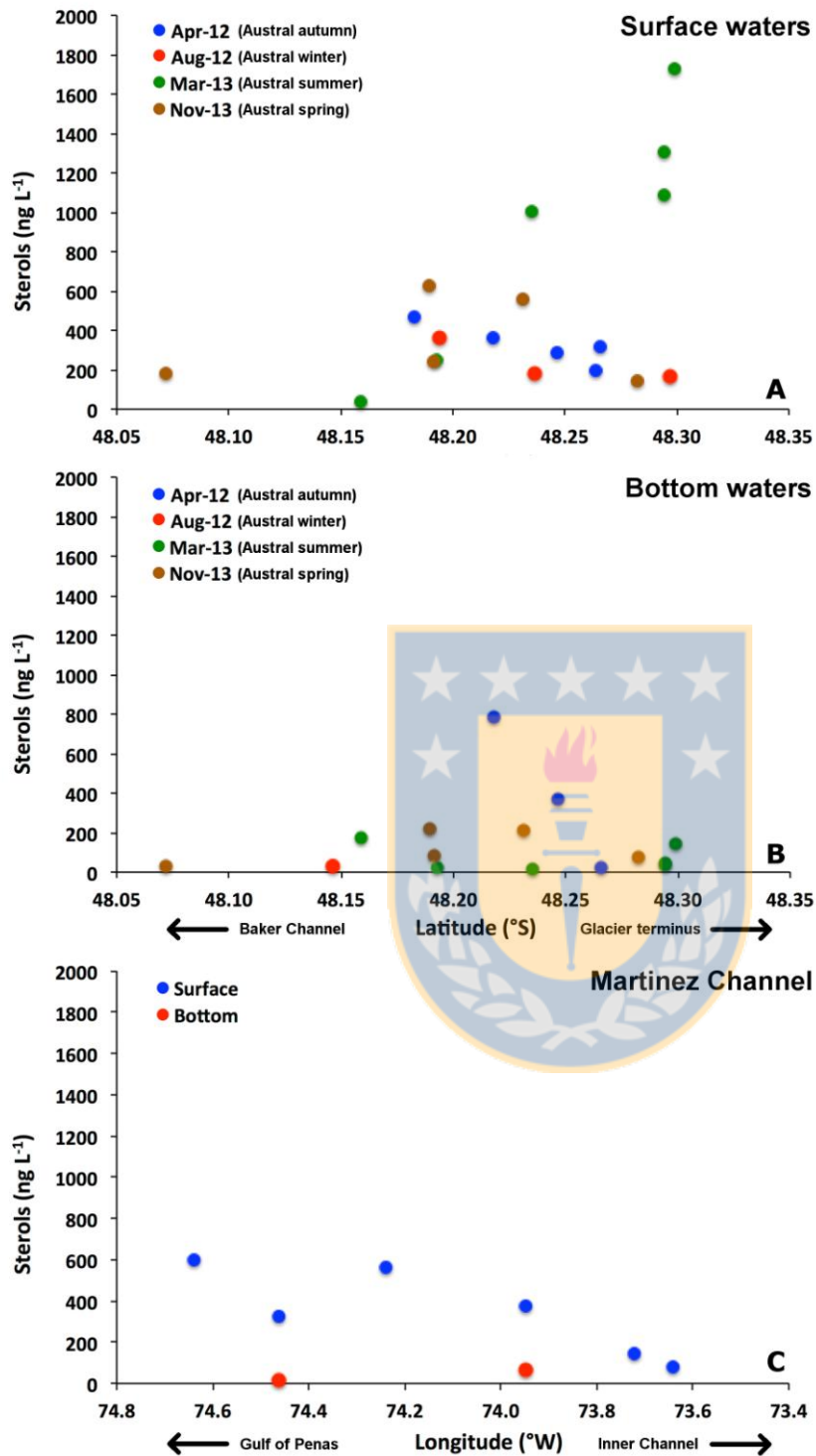


Figure 2. Concentration of sterols in surface (A) and bottom (B) waters along proglacial fjord and Martinez channel (C).

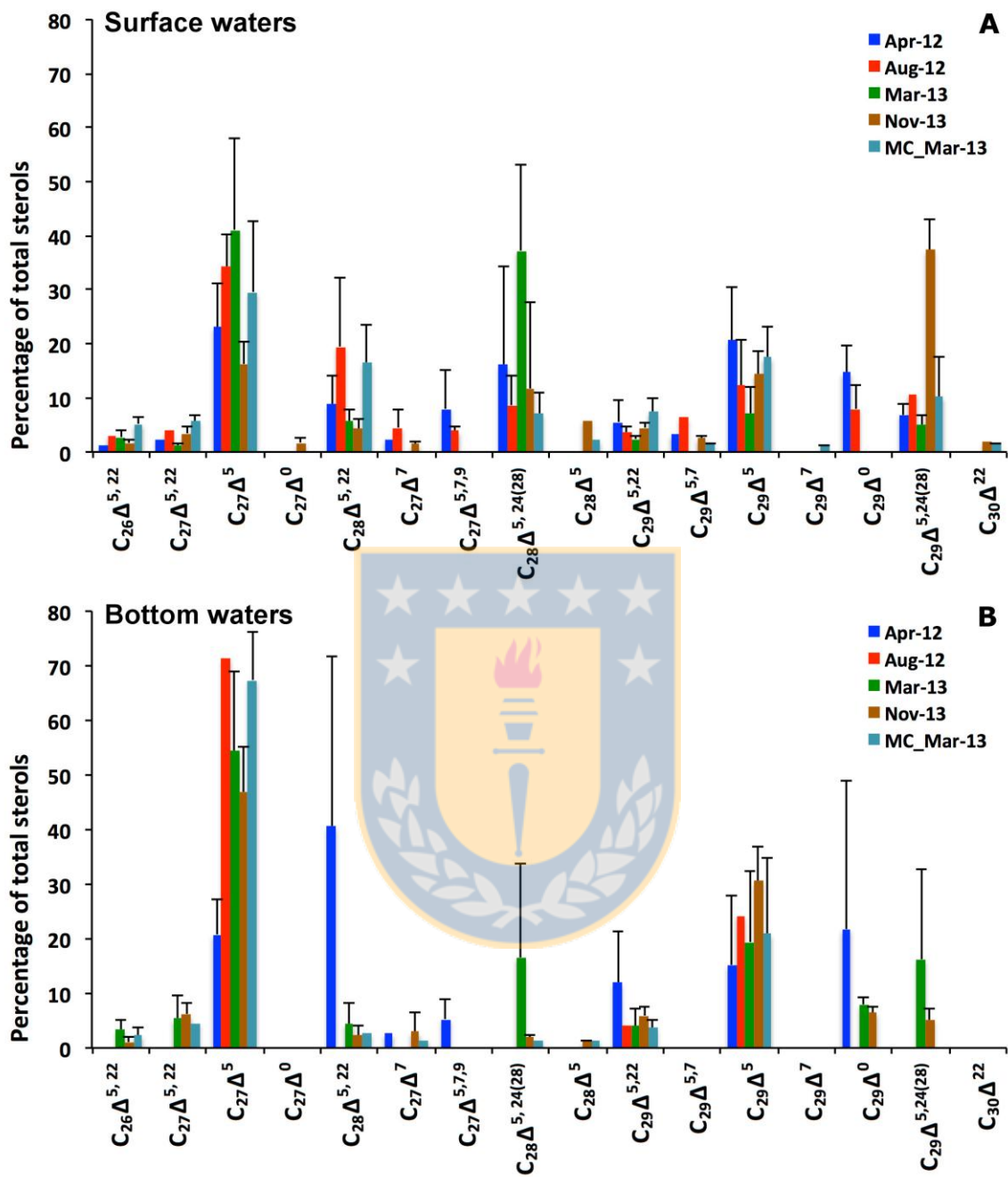


Figure 3. Average composition of sterols in surface (A) and bottom (B) waters along proglacial fjord and Martinez channel during study periods. MC, Martinez Channel.

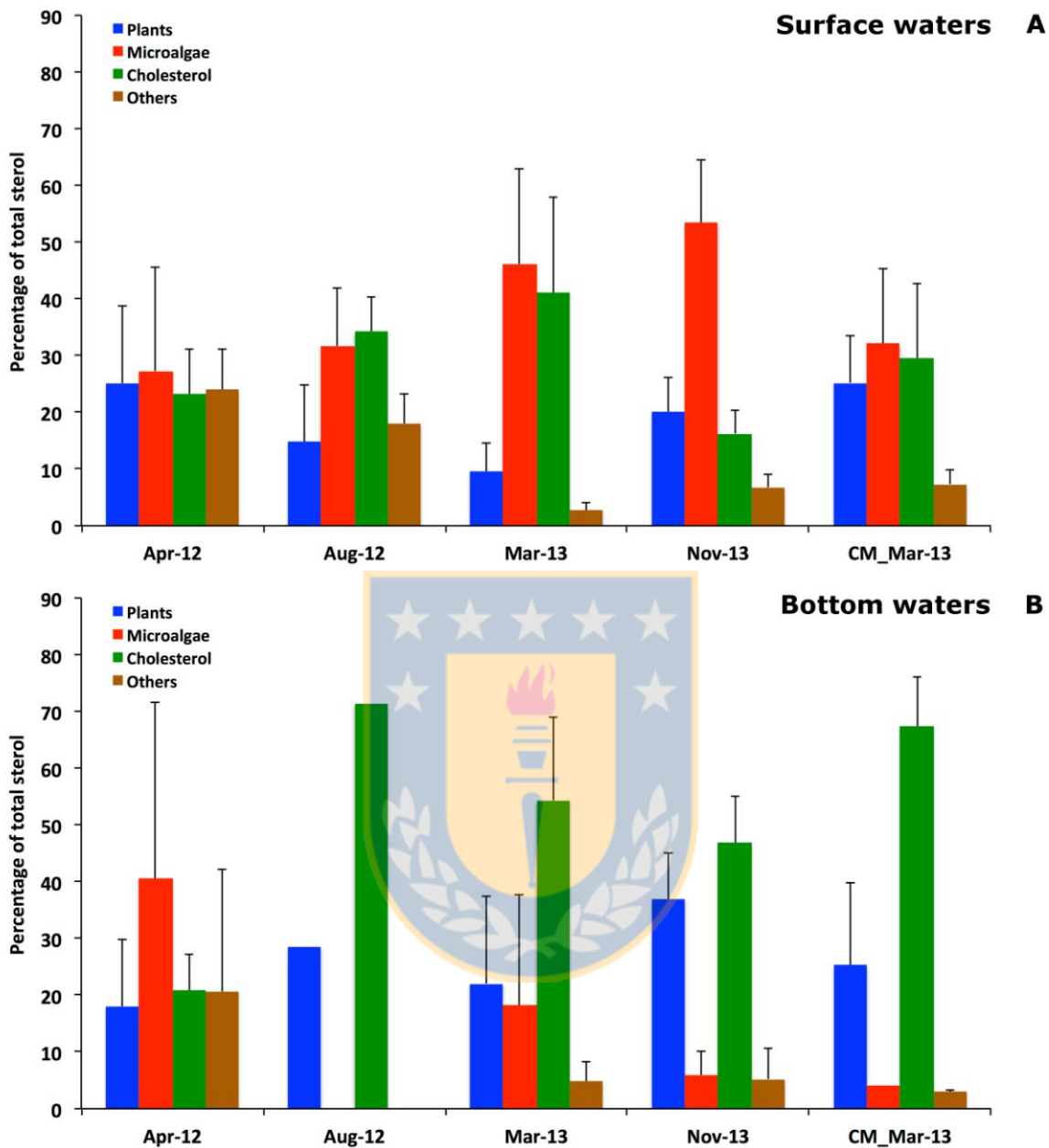


Figure 4. Distribution of sterols among of plants (PL-S), microalgae (MIC-S), cholesterol (CHOL), and others in surface (A) and bottom (B) waters of proglacial fjord and Martinez channel (CM) during the study period. Plant sterol: β -sitosterol, stigmasterol, campesterol; Microalgae sterol: Methylene-cholesterol, brassicasterol, fucosterol.

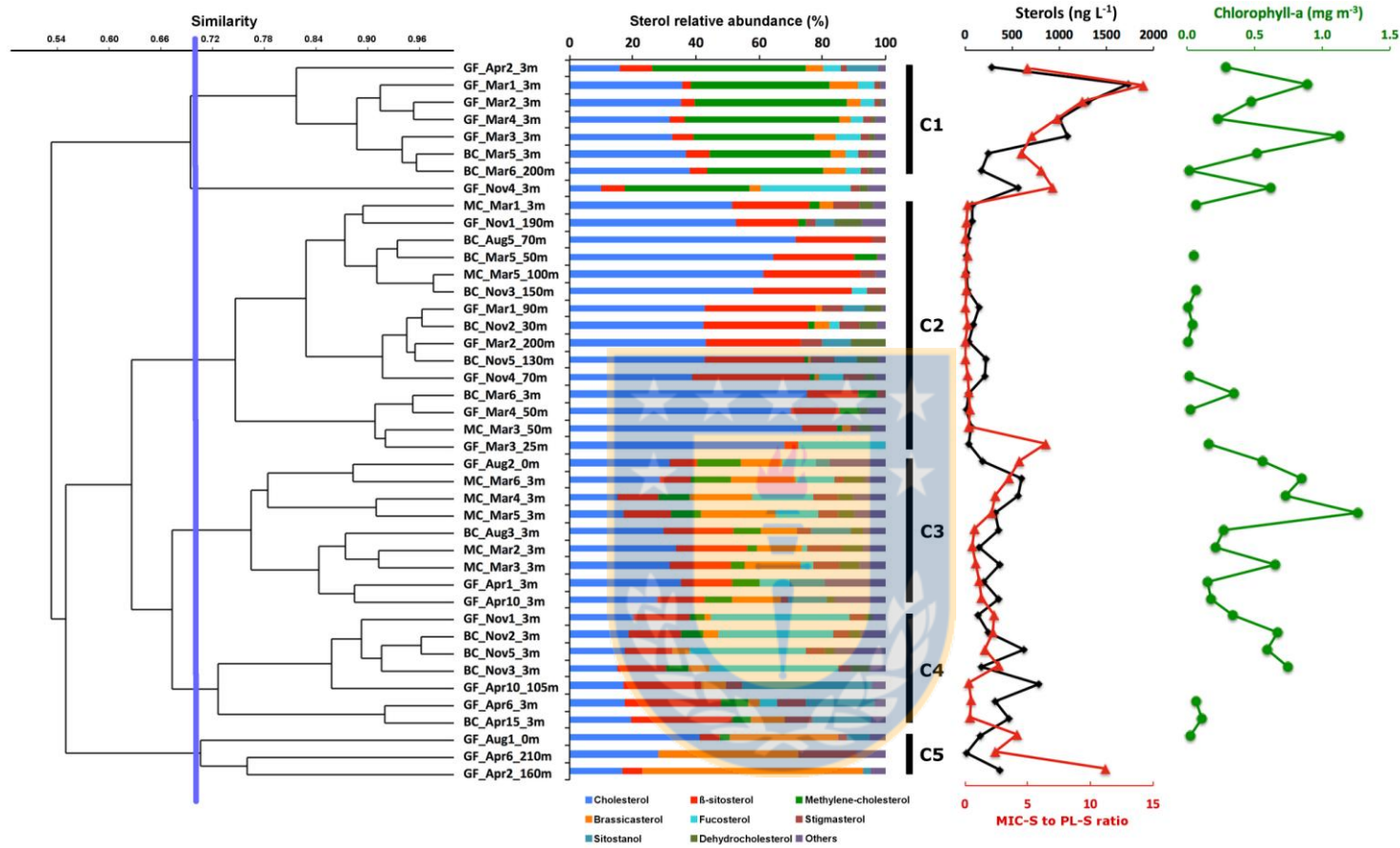


Figure 5. Similarity analysis of sterol composition and distribution of total sterol, MIC-S to PL-S ratio and chlorophyll-a among samples. Groups C1, C2, C3, C4 and C5 showed similarity over 70%. Blue line indicates 70% of similitude, in sample ID GF=glacial fjord, BC=Baker channel and MC=Martinez channel.

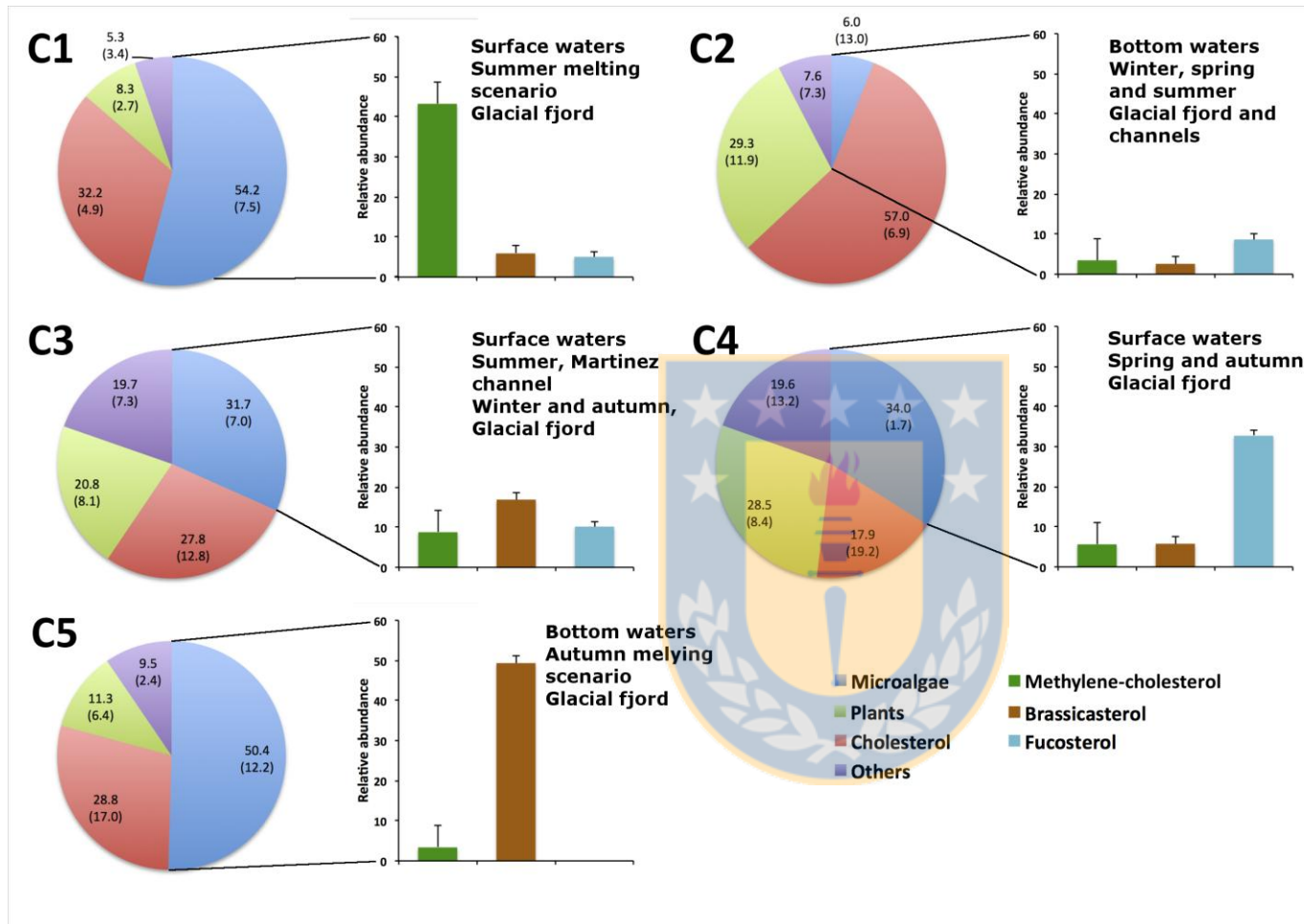


Figure 6. Relative abundance (%) of cholesterol, Microalgae sterols, Plant sterols, and other sterols as defined by similarity analysis.

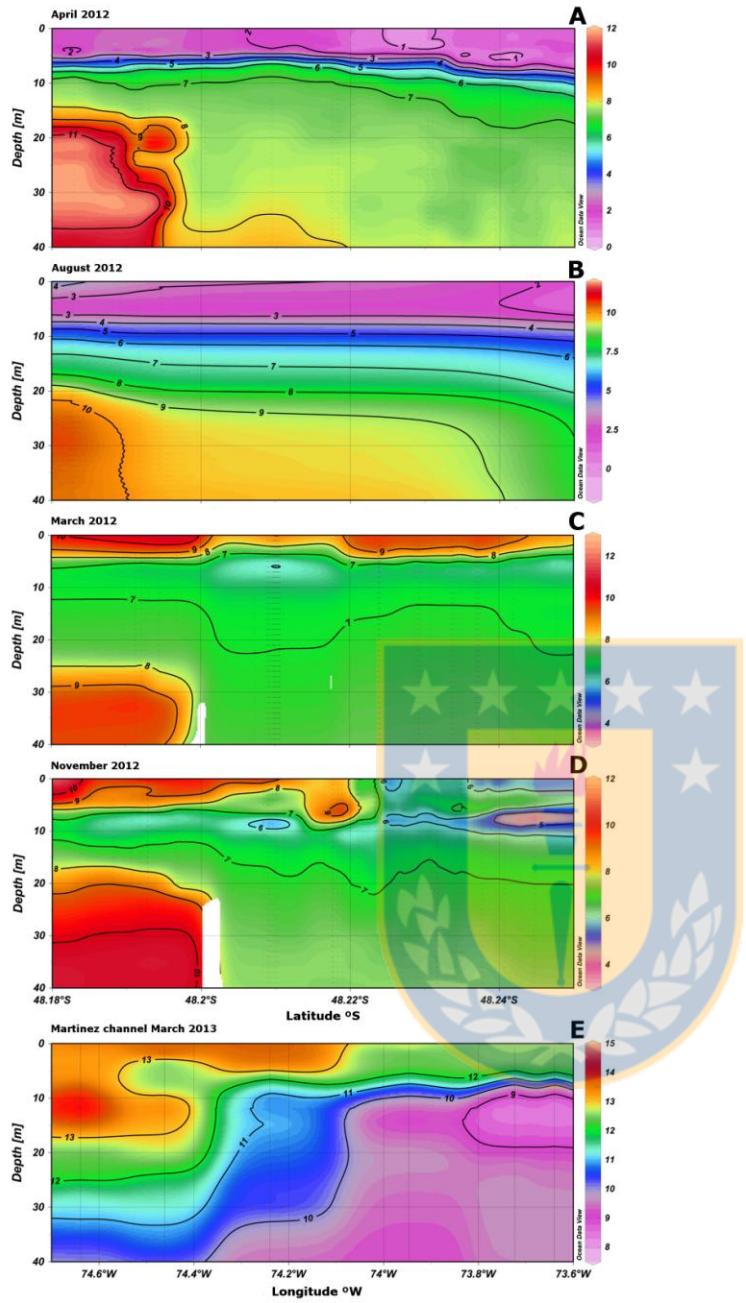


Figure 7 . **Supplementary information.** Vertical sections and isolines of temperature in April (A) and August 2012 (B) and March (C) and November (D) 2012 in proglacial fjord, and along Martinez channel in March 2013 (E).

Table 5. **Supplementary information.** Concentration of individual and total sterols (ng L⁻¹) in surface and bottom waters of the fjord adjacent to Jorge Montt glacier (glacial fjord) and in Baker and Martinez channels.

Date	Collection site	Latitude	Longitude	Depth	C ₂₆ Δ ^{5,22}	C ₂₇ Δ ^{5,22}	C ₂₇ Δ ⁵	C ₂₇ Δ ⁰	C ₂₈ Δ ^{5,22}	C ₂₇ Δ ⁷	C ₂₇ Δ ^{5,7,9}	C ₂₈ Δ ^{5,24(28)}	C ₂₈ Δ ⁵	C ₂₉ Δ ^{5,22}	C ₂₉ Δ ^{5,7}	C ₂₉ Δ ⁵	C ₂₉ Δ ⁷	C ₂₉ Δ ⁰	C ₂₉ Δ ^{5,24(28)}	C ₃₀ Δ ²²	Total
Apr-12	Glacial fjord	48.264	73.445	3			68.62				37.92	16.77				31.45		21.50	18.19		194.45
Apr-12	Glacial fjord	48.247	73.445	3			45.94		16.75		7.33	139.15		5.57		29.15		27.68	15.80		287.38
Apr-12	Glacial fjord	48.266	73.449	3			55.95		11.92		11.94	27.56		28.45		96.93		69.02	18.09		319.86
Apr-12	Glacial fjord (sill)	48.218	73.502	3		8.54	99.02		55.98	8.58	37.87	30.50		8.94	11.42	54.83		44.11			359.80
Apr-12	Baker channel	48.183	73.476	3	5.27		91.66		48.38		16.49	29.42		41.68		148.66		87.51			469.06
Aug-12	Glacial fjord	48.297	73.456	0			68.41		56.93	3.45	5.25	5.58		4.78		10.37		11.40			166.17
Aug-12	Glacial fjord	48.237	73.470	0			57.18		23.37	12.53	8.31	25.32			11.56	15.63		7.73	19.52		181.14
Aug-12	Baker channel	48.194	73.503	3	10.98	14.30	108.34		41.04		14.60	31.09		16.22		79.94		46.30			362.81
Mar-13	Martinez channel	47.785	73.640	3	3.07	3.61	40.24		3.28			2.53		6.40		19.32					78.45
Mar-13	Martinez channel	47.789	73.723	3	6.12	10.14	50.00		20.59			4.75		16.29		33.32	1.96		2.33	2.54	148.03
Mar-13	Martinez channel	47.814	73.947	3	14.13	23.53	117.86		65.83			16.45	8.43	30.84		72.75	4.00		15.66	4.28	373.76
Mar-13	Martinez channel	47.771	74.240	3	33.80	27.70	85.35		109.73			55.87		44.03	8.92	72.05	4.96		109.51	9.40	561.33
Mar-13	Martinez channel	47.792	74.462	3	21.17	16.22	55.51		76.74			29.93		20.47	4.35	48.73	2.98		43.23	4.00	323.31
Mar-13	Martinez channel	47.777	74.639	3	41.02	39.22	171.22		122.88			74.42		17.64		60.30			74.02		600.72
Mar-13	Glacial fjord	48.299	73.459	3	25.55	11.62	613.81		152.73			759.24		23.64		47.13			92.49		1726.21
Mar-13	Glacial fjord	48.295	73.458	3	16.56	9.15	458.35		55.31			630.74		22.89		56.84			56.64		1306.48
Mar-13	Glacial fjord	48.295	73.488	3	41.11	15.50	351.88		75.55			414.05		30.89		75.69			83.79		1088.48
Mar-13	Glacial fjord	48.235	73.467	3	31.33	13.04	318.20		34.74			491.37		28.48		48.75			38.33		1004.24
Mar-13	Baker channel	48.192	73.488	3	10.38	3.64	90.74		12.31			94.82		7.43		18.73			9.81		247.87
Mar-13	Baker channel	48.159	73.459	3			26.55					2.09		0.94		5.69					35.28
Nov-13	Glacial fjord	48.282	73.442	3	1.61	3.45	28.54		2.75	2.32		6.65		6.31	2.34	24.70			61.78		140.47
Nov-13	Baker channel	48.191	73.506	3	3.37	8.20	45.03	6.39	10.76	2.50		17.19		12.43	7.38	41.15			89.07		243.48
Nov-13	Baker channel	48.072	73.537	3	4.51	9.87	26.65	1.12	11.97			12.61		7.56	3.91	27.82			72.04		178.07
Nov-13	Glacial fjord	48.231	73.471	3	6.87	13.58	55.51	10.48	17.83			222.13		16.37	14.46	41.13			159.77		558.13
Nov-13	Baker channel	48.190	73.487	3	12.89	21.36	109.69	11.32	34.28	9.79			36.62	35.37	19.02	92.44			230.34	11.01	624.14
Apr-12	Glacial fjord	48.247	73.445	160			62.52		258.45		17.82					23.02		9.08			370.90
Apr-12	Glacial fjord	48.266	73.449	210			5.61		8.75		1.83			3.67							19.86
Apr-12	Glacial fjord (sill)	48.218	73.502	105			135.73		61.69	20.31	14.32			41.65		190.98		323.87			788.56
Aug-12	Baker channel	48.146	73.435	70			23.65							1.41		8.03					33.09
Mar-13	Martinez channel	47.814	73.947	50	0.86	3.08	50.99		1.81	1.04		1.04	1.02	1.78		7.66					69.28
Mar-13	Martinez channel	47.792	74.462	100	0.59		11.03							0.86		5.54					18.02
Mar-13	Glacial fjord	48.299	73.459	90	1.99	7.71	61.77		2.70					9.32		51.10		10.02			144.61
Mar-13	Glacial fjord	48.295	73.458	200		5.12	19.68							3.07		13.70		4.10			45.67
Mar-13	Glacial fjord	48.295	73.488	25			24.00									1.53			9.84		35.37
Mar-13	Glacial fjord	48.235	73.467	50	0.96	0.54	12.49					1.12				2.72					17.83
Mar-13	Baker channel	48.192	73.488	50	0.49		13.01					1.38		0.10		5.24					20.22
Mar-13	Baker channel	48.159	73.459	200	7.00	2.86	65.57		12.11			63.11		3.99		9.73			7.99		172.36
Nov-13	Glacial fjord	48.282	73.442	190	0.32	6.81	40.77			5.60		1.79		2.63		15.38		4.45			77.75
Nov-13	Baker channel	48.191	73.506	30	2.28	4.90	37.05		3.96			1.91		5.65		28.58			2.81		87.14
Nov-13	Baker channel	48.072	73.537	150			19.20							1.96		10.29			1.55		33.00
Nov-13	Glacial fjord	48.231	73.471	70	2.10	7.72	80.85		3.02	1.71		3.42	2.58	13.66		77.39			15.72		208.17
Nov-13	Baker channel	48.190	73.487	130	0.58	14.85	92.82		1.90	1.58		2.82	2.81	15.84		69.07		15.92			218.21

5. Discusión

5.1.- Variabilidad fisicoquímica y biológica en el fiordo.

Los resultados del análisis de salinidad y temperatura en la columna de agua (Figura 8 anexo) evidenciaron la presencia de una capa de agua fría ($< 9\text{ }^{\circ}\text{C}$) y dulce ($< 10\text{ psu}$) que se extendió entre los 4 y 10 m de profundidad en todos los periodos de estudio. Bajo la capa superficial un aumento en la salinidad y temperatura reflejó la menor influencia de agua dulce y por lo tanto una transición hacia aguas más marinas (26 a 34 psu). La estructura estratificada de la columna de agua observada es consistente con el patrón general de circulación y las características hidrológicas del sistema de fiordos y canales de la Patagonia definidas previamente (Silva *et al.*, 1997; Silva *et al.*, 2011). Variaciones estacionales fueron observadas en la extensión vertical y horizontal de la capa superficial de agua deshielo asociado a la descarga de agua dulce proveniente del glaciar Jorge Montt. Así, en abril del 2012, esta capa alcanzó 4 m de espesor y se extendió hasta aproximadamente 26 km desde la boca del glaciar hasta el cana Baker. Además, durante este periodo se observó la menor temperatura (0.7°C) y salinidad (2.15 psu), reflejando una mayor estratificación (Fig.1, anexo). Estas condiciones fueron consideradas como el periodo de máxima descarga de agua dulce e interpretadas como un escenario de alto deshielo. En este contexto el periodo de menor estratificación fue Noviembre 2013, lo que se interpreto como el escenario de menor deshielo, extendiéndose la capa de agua dulce hasta cerca de los 10 m (Figura 8), con una temperatura de hasta 11°C y salinidad hasta 7 psu. Adicionalmente, en Marzo 2013 se observaron las mayores temperaturas superficiales llegando 12.6°C . Bajo la capa superficial la salinidad aumentó gradualmente hasta llegar a valores de 30 a 33 psu en las aguas de fondo. Durante todos los periodos analizados, bajas concentraciones de nitrato y fosfato fueron observadas en la capa superficial, diferente a lo observado en el agua de fondo. Contrario a esto, el ácido silícico mostró las mayores concentraciones en la capa superficial y menores concentraciones en el estrato de fondo. La mayores concentraciones superficiales de nitrato (5.3 - 18.5 μM) y fosfato (0.7 - 2.0 μM) fueron percibidas en la campaña de abril. Sin embargo, estos niveles fueron acompañados por una baja concentración de clorofila-a (0-06-0.3 ng L^{-1}), lo que sugiere que la entrada de agua dulce afecta a la productividad, resultando en una mayor acumulación de nutrientes que deberían estar en menores concentraciones en superficie (González *et al.*, 2011). Contrario a esto, las más altas concentraciones de Chl-a fueron observadas en marzo y noviembre 2013 con 1.13 ng L^{-1} y noviembre 0.74 ng L^{-1} respectivamente. Valores de esa magnitud han sido reportados para zonas hyperoligotróficas limitadas en macronutrientes como nitrato y fosfato (Morel *at al.*, 2010). Para canales y fiordos de la Patagonia central, se ha sugerido una baja productividad producida por la alta carga de material suspendido y bajo

contenido de macronutrientes en aguas superficiales (Aracena et al. 2011; González et al. 2013).

5.2.- Esteroles en la columna de agua

La concentración de esteroles en la columna de agua en todas las campañas varió entre 35,3 y 1726,2 ng L⁻¹ (Figura 9), estos valores se encuentran dentro del rango reportado para sistemas de altas latitudes como lagos de la antártica (Matsumoto *et al.*, 1984; Matsumoto, 1989) y el océano austral (Green *et al.*, 1992; Villinski *et al.*, 2008), además en otros sistemas asociados a influencias continentales como por ejemplo para la cuenca del río Orinoco (Jaffé *et al.* 1995) y el río Amazonas (Richey *et al.* 1986). La mayor concentración de esteroles fue encontrada durante marzo 2013, donde las aguas superficiales mostraron una alta abundancia de metileno-colesterol (>40%), el cual se encontró significativa y altamente correlacionado ($R^2 = 0.99$) con la concentración total de esteroles, lo que confirma que este compuesto es el principal responsable de la mayor abundancia de esteroles durante este periodo. El metileno-colesterol ha sido reportado como representativo de diatomeas en ambientes marinos (Volkman & Hallegraeff, 1988; Barrett *et al.*, 1995; Volkman, 2003; Kamenarska *et al.*, 2003; Rampen et al., 2010). Durante esta campaña en la zona cercana al glaciar también se registraron las mayores concentraciones de Chl-a, la que se correlaciona positiva y significativamente con la concentración de esteroles (Tabla 1 anexo). En aguas superficiales, las concentraciones más altas de esteroles fueron observadas durante Marzo 2013 en las estaciones cercanas al glaciar, mientras que las concentraciones más bajas se encontraron en la zona del canal Baker en marzo y noviembre 2013, un patrón diferente al observado el año 2012 (abril y agosto) ya que las concentraciones mayores se observaron en las estaciones ubicadas en la zona del canal Baker, lo que significaría que en periodos de mayor deshielo debido al verano austral se vería favorecida la producción primaria. Este gradiente latitudinal en la productividad primaria ha sido evidenciado en la Patagonia chilena, en la zona norte de los fiordos (González *et al.*, 2011). Este patrón también se observó en el análisis de Aracena *et al.* (2011) para el área total de la Patagonia chilena, además se observó un fuerte gradiente de influencia terrestre en la materia orgánica marina desde las cabezas de los fiordos a las áreas abiertas en el norte de la Patagonia chilena (Sepúlveda *et al.*, 2011, Silva *et al.*, 2011).

Para las aguas de fondo la concentración de esteroles durante todas las campañas fluctuó entre 18-788 ng L⁻¹ encontrándose las mayores concentraciones en las estaciones realizadas en el canal Baker, aunque para el periodo de noviembre 2013 las máximas concentraciones estuvieron entre el glaciar y el canal Baker lo que se reflejó en la mayor cantidad de esteroles encontrados en el sedimento superficial para ese periodo y coincide con la zona donde se encuentra una morrena

(Figura 9). En los glaciares el proceso de floculación de partículas es importante desde el punto de vista de la sedimentología del material orgánico presente (Szcucinski & Zajaczkowski, 2012), por lo tanto la acumulación de material dependería de la capacidad de agruparse que tendrían las partículas y que favorecería su sedimentación, por lo que se presume que la resuspensión y la floculación son los responsables de la acumulación en la zona de la morrena.

5.3.-Composición de esteroides en el fiordo.

La composición de esteroides (Tabla 2) se caracterizó por una predominancia de colesterol (colest-5-en-3 β -ol, C₂₇ Δ^5), Brasicasterol (24-metil-colest-5,22-dien-3 β -ol, C₂₈ $\Delta^5, 22$), Metileno-colesterol (24-metileno-colest-5-en-3 β -ol, C₂₈ $\Delta^5, 24(28)$), β -sitosterol, β -sitostanol (24-etil-colesterol, C₂₉ $\Delta^5 + C_{29}\Delta^0$) y Fucosterol (Stigmasta-5,24(28)-dien-3 β -ol, C₂₉ $\Delta^5, 24(28)$), los cuales representaron más del 70 y hasta 90 % en los periodos estudiados. Cabe señalar que la molécula de colesterol fue la única que estuvo presente en todas las muestras, esto se debe a su ubicuidad, ya que no solo se encuentra en las membranas celulares sino que también forma parte de procesos biológicos en las células eucariontes de organismos heterotróficos (Bianchi & Canuel, 2011). Durante Abril de 2012, cuando la capa superficial de agua de deshielo presentó una mayor estratificación (indicando un mayor deshielo) el esteroide más abundante fue β -sitosterol al interior del fiordo y en el canal Baker. El β -sitosterol (C₂₉ Δ^5) se encuentra dentro del grupo de los fitoesteroides, denominados así porque son característicos de plantas vasculares (Scheuer, 1973; Wannigama *et al.*, 1981; Gagosian *et al.*, 1983; Shaw & Johns, 1985) en distintos ambientes, incluyendo zonas de latitudes altas (Li *et al.*, 1995; Wakeham *et al.*, 1997). La presencia de β -sitosterol sugiere una predominancia de material proveniente de plantas vasculares en la zona del fiordo en el periodo de mayor deshielo. Por el contrario, en agosto de 2012 el Brasicasterol alcanzó las mayores concentraciones en aguas superficiales, hasta 34% en las muestras en la zona cercana al glaciar, sugiriendo un origen más marino en la señal de esteroides. El brasicasterol es considerado un marcador de diatomeas (Rubinstein & Goad, 1974), no siendo un marcador específico sólo para ese grupo de organismos ya que se ha encontrado en otras microalgas (Volkman *et al.* 1998; Volkman, 2003). Además cabe destacar que solo en las campañas del 2012 se observó en las muestras el 19-Norergosta-5,7,9-trien-3 β -ol (Phycomysterol B), un esteroide tri-insaturado muy poco común en aguas marinas y el cual se ha reportado para especies de hongos (Barrero *et al.*, 1998), por lo que se presume que podría pertenecer a alguna especie de hongos asociados a aguas estuarinas y que se verían favorecidos por la entrada de material terrestre de tipo vascular o bien la presencia de material terrígeno conteniendo hongos, esporas, etc. Consistentemente, Gutiérrez *et al.* (2015) reportaron la presencia de secuencias de hongos en aguas superficiales durante el periodo de mayor deshielo en el área de estudio. En marzo 2013, la

máxima concentración de esteroides y Chla-a fue observada en la zona más cercana al glaciar Jorge Montt y el estero dominante en las aguas superficiales fue el Metileno-colesterol, el cual llegó hasta 44% en las muestras. Esta molécula es considerada representativa de especies de diatomeas unicelulares y formadoras de cadenas (Volkman & Hallegraeff, 1988; Patterson, 1991; Barret *et al.*, 1995; Volkman *et al.* 1998; Volkman 2003). La presencia de abundantes microalgas durante este periodo podría ser explicada por el aumento de la incidencia de luz que favorecería el crecimiento de éstas (Aracena *et al.*, 2011). En noviembre, se observó un patrón diferente con una predominancia de Fucosterol tanto en la zona cercana al glaciar como en el canal Baker con hasta un 44% en las muestras, el cual también ha sido asociado a microalgas marinas (Ikewaka *et al.*, 1968; Kamenarsk *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2004). Estos resultados, indicarían un origen diferente de la materia orgánica bajo diferentes periodos contrastantes de deshielo, siendo en algunos casos de origen autóctono y en otros alóctono. En aguas superficiales, la variabilidad en la composición de esteroides al parecer estaría siendo mayormente controlada por los cambios en las poblaciones dominantes de fitoplancton como se desprende del análisis de correlación positiva entre la clorofila-a y el total de esteroides (Tabla 2), mientras que la composición en el agua de fondo estaría siendo controlada por el transporte vertical de la materia orgánica, debido a que se observa un aumento en la señal marina en el periodo de máximo flujo de deshielo (otoño), mientras que en los otros periodos se mantiene dominante la señal de colesterol y fitoesteroides en las aguas de fondo.

5.4.- Similitud en la composición de esteroides y su relación con las variables oceanográficas.

El análisis de composición de esteroides se utilizó además para realizar el análisis de similitud (Figure 5 y 6, sección resultados). Este análisis arrojó la presencia de 5 grupos diferentes con sobre 60% de similitud entre muestras (C1, C2, C3, C4 y C5), que corresponden a patrones espacio-temporales que permitieron observar cómo se comportaron las moléculas de esteroides en las diferentes campañas. El grupo C1 corresponde casi en su totalidad a muestras superficiales de marzo 2013 (escenario de deshielo estival) y que se caracteriza por la abundancia de metileno-colesterol, un estero que es considerado un indicador de diatomeas céntricas, en particular del orden *Thalassiosirales* (Volkman & Hallegraeff, 1988; Rampen *et al.*, 2010) y que se verían favorecidas por las condiciones de mayor radiación solar en periodo estival (González *et al.*, 2013). El grupo C2 en cambio abarcó a las muestras de las aguas de fondo de 3 periodos (invierno, primavera y verano) las que contenían una mayor señal de colesterol y fitoesteroides, este patrón es consistente con la visión general de los lípidos en ambientes marinos, donde en aguas superficiales estaría más asociados al plancton, y debido a la pérdida de moléculas más reactivas en el proceso de sedimentación, en las aguas de fondo darían lugar a una prevalencia de

moléculas orgánicas más refractarios (Wakeham *et al.*, 1997), encontrándose en estas aguas moléculas de estanoles, las que se producen por reducción de las moléculas de colesterol y β -sitosterol (Rontani *et al.*, 2009; 2014). El grupo C3 consistió en muestras superficiales del fiordo en el periodo otoño y primavera junto con a la transecta realizada en el canal Martínez (verano 2013). Este grupo se caracterizó por la presencia de esteroides de microalgas, específicamente el brasicasterol un esteroide que ha sido reportado para especies de diatomeas del tipo penadas Volkman, 1986; Rampen *et al.*, 2010), la prevalencia de esta molécula a lo largo del Canal Martínez sugiere que las diatomeas penadas se ven favorecidas en aguas sometidas a menor flujo de deshielo, lo que es consistente con la presencia de este tipo de diatomeas en la zona de estudio (González *et al.*, 2013). El grupo C4 contiene muestras de aguas superficiales de primavera y otoño, las que se caracterizan por la presencia del fucosterol lo que sugiere la prevalencia de otro grupo microalgas en aguas superficiales. El fucosterol ha sido reportado para la división de las clorofitas (e. g. Prasinophyceae Volkman, 1986; Volkman & Hallegraeff, 1988; Volkman *et al.*, 1994), este grupo de microalgas ha sido observado en sistemas estuarinos en condiciones de baja salinidad durante ciertos periodos (Thompson *et al.*, 1998; Gang *et al.*, 2014), aunque para la zona de estudio no hay información sobre abundancia de este grupo de organismos para ser comparado. Además, el fucosterol ha sido reportado para especies de macroalgas pardas (Chikaraishi, 2006; Volkman & Hallegraeff 1988), sin embargo no se dispone información sobre distribución de macroalgas para esta zona. El grupo C5 se caracterizó por contener muestras de agua de fondo del fiordo en periodo de otoño, las que se caracterizaron por la presencia de esteroides indicadores de microalgas, esto se debería a que en ese periodo es el mayor flujo de deshielo lo que favorecería el transporte vertical de estas moléculas llegando así a aguas más profundas, lo que no fue observado en otros periodos. Por otro lado en este periodo las muestras contenían Phycomysterol B un esteroide tri-insaturado reportado para especies de hongos (Barrero *et al.*, 1998), y estanoles, lo que sugiere una predominancia de materia orgánica degradada (Rontani *et al.* 2014).

5.5.- Señales de esteroides en las aguas del fiordo.

La variabilidad en la composición de esteroides a lo largo de los fiordos patagónicos y canales prevalencia junto al β -sitosterol en aguas profundas, además este patrón observado fue coincidente con bajos valores en la concentración de esteroides lo que se interpretó como una señal que indicaría una predominancia de materia orgánica más refractaria en las aguas más profundas de los fiordos patagónicos. El patrón observado en aguas profundas puede estar sujeto a cambios durante escenarios de alto flujo de agua de deshielo, como fue posible observar en las muestras de verano y otoño austral que contenían una mayor proporción de esteroides y estanoles provenientes

de microalgas marinas en aguas profundas en la zona más cercana al frente glaciar estudiado fue principalmente influenciada y explicada por los cambios que se producían por algunos esteroides dominantes pertenecientes a microalgas y plantas, además del colesterol. De acuerdo al análisis de abundancia relativa de esteroides, la concentración de esteroides y clorofila-a, junto con la proporción relativa de esteroides de microalgas y fitoesteroides se pudieron distinguir señales espacio-temporales en el área de estudio (Fig. 5 y 6, resultados). Es así, como la molécula de colesterol mantuvo su presencia en toda la columna de agua, siendo destacable su prevalencia en aguas profundas junto con el β -sitosterol. Dado que este patrón de composición fue acompañado por bajas concentraciones de esteroides y bajos valores de esteroides en la proporción de esteroides de microalgas y esteroides de asociados a plantas (Fig. 5), se interpretó esta señal como indicativa de materia orgánica menos reactiva en la mayoría de aguas profundas de los fiordos proglaciales y canales de la Patagonia central. Esta aparente señal conservativa de distribución de esteroides puede ser modificada parcialmente durante escenarios de alto flujo de agua de deshielo, como se observa en el verano y el otoño austral, cuando una relativamente mayor contribución de esteroides derivados de microalgas y estanoles se encuentran en aguas del fondo del fiordo proglacial.

Por otra parte, en las aguas superficiales, la variabilidad entre periodos en la composición de esteroides fue asociada mayormente a los cambios que se producían debido al predominio de distintos esteroides representantes de grupos de microalgas. Así, en condiciones de alta fusión de hielo en el periodo de verano, máxima concentración de clorofila-a y de esteroides, la molécula de esteroides que predominó fue el metileno-colesterol, lo que sugiere que bajo esas condiciones hay una prevalencia de diatomeas céntricas en las aguas superficiales cercanas al frente glaciar (Fig. 5 Resultados). En contraste, bajo un aparente escenario de menor fusión de hielo representado por las condiciones de invierno y primavera se observa un predominio de moléculas de fucosterol y brasicasterol, lo que sugiere que bajo regímenes de menor entrada de agua dulce y mayor estratificación en la columna de agua microalgas verdes y diatomeas del tipo pennadas podrían ser favorecidas. En esta misma línea, la prevalencia de Brasicasterol en aguas a lo largo del canal Martínez, sugiere que la presencia de diatomeas pennadas se podría interpretar como un indicador de aguas que tendrían una baja o no directa influencia de aguas de deshielo. Finalmente, la aparición de estanoles en aguas superficiales del fiordo proglacial, así como la presencia de esteroides tri-insaturados, parece ser una señal distintiva de la influencia directa de la fusión del hielo en la composición de esteroides de las aguas del fiordo glacial.

5.- CONCLUSIONES

- Este estudio presenta por primera vez la distribución de esteroides en fiordos y canales Patagónicos, en la zona de descarga del Glaciar Jorge Montt, además de reportar por primera vez la presencia de un esteroide tri-insaturado descrito para especies de hongos llamado Phycomysterol (19-Norergosta-5, 7, 9-trien-3b-ol) en aguas de deshielo glaciar. Dicho esteroide fue prevalente en el periodo de mayor flujo de deshielo y en conjunto con la presencia de estanoles, parece ser una señal distintiva de la influencia directa de la fusión de hielo glaciar y que afectaría la composición de esteroides en el fiordo aledaño al glaciar Jorge Montt.
- La composición de esteroides en la capa superficial y profunda mostró diferencias, encontrándose una mayor abundancia de esteroides asociados a microalgas (30-70%) en la capa superficial en casi todos los periodos estudiados. Una excepción a este patrón fue observada en otoño, cuando las características de la columna de agua sugieren un mayor flujo de deshielo. Durante este periodo, se observó un aumento la señal de esteroides de plantas. En aguas de fondo, los esteroides más abundantes fueron los asociados a plantas (30-40%) y el colesterol que llegó hasta 70% en algunas muestras. Este patrón de composición podría ser explicado por la remoción del material orgánico más fresco durante la sedimentación y la prevalencia de moléculas de carácter más refractario. Considerando este patrón de distribución de esteroides la Hipótesis n° 1 (H₁) es rechazada.
- Los resultados de esta investigación sugieren que la biomasa de fitoplancton (clorofila-a) contribuiría mayormente a la abundancia de esteroides en el fiordo adyacente al glaciar Jorge Montt durante los periodos de mayor incidencia solar (primavera y verano). Durante épocas de mayor deshielo se observó un aumento de la concentración de β -sitosterol (50%) en la zona del fiordo adyacente al glaciar, lo que indicaría una predominancia de esteroides que provienen de plantas vasculares, por lo tanto, la Hipótesis n° 2 (H₂) es aceptada. Esto sugiere que una fracción importante del material orgánico proveniente de eucariontes descargado por el agua de deshielo tendría una señal terrígena, y por el contrario en los periodos de menor deshielo la señal de esteroides de origen marino (metileno-colesterol y fucosterol) se hace más importante, lo que sugiere una predominancia de materia orgánica de origen autóctono (microalgas).
- Considerando que el material terrígeno (en particular plantas) es considerado menos disponible que aquel producido *in situ* por microalgas, sugerimos que un eventual escenario de mayor deshielo puede modificar la biodisponibilidad de sustratos orgánicos y por lo tanto impactar la

actividad heterotrófica y la composición de la comunidad microbiana de los fiordos patagónicos.



7.- REFERENCIAS

Anesio, A. M., Mindl, B., Laybourn-Parry, J., Hodson, A. J., & Sattler, B. (2007). Viral dynamics in cryoconite holes on a high Arctic glacier (Svalbard). *Journal of Geophysical Research: Biogeosciences* (2005–2012), 112(G4).

Anesio, A. M., Hodson, A. J., Fritz, A., Psenner, R., & Sattler, B. (2009). High microbial activity on glaciers: importance to the global carbon cycle. *Global Change Biology*, 15(4), 955-960.

Anesio, A. M., Sattler, B., Foreman, C., Telling, J., Hodson, A., Tranter, M., & Psenner, R. (2010). Carbon fluxes through bacterial communities on glacier surfaces. *Annals of Glaciology*, 51(56), 32-40.

Aniya, M., Sato, H., Naruse, R., Skvarca, P., & Casassa, G. (1997). Recent glacier variations in the Southern Patagonia Icefield, South America. *Arctic and Alpine Research*, 29 (1), 1-12

Aniya, M., Naruse, R., Casassa, G., & Rivera, A. (1998). Variations of Patagonian glaciers, South America, utilizing RADARSAT images. En: *Proceedings of the International Symposium on RADARSAT Application Development and Research Opportunity (ADRO)*, Montreal, Canada (pp. 13-15).

APHA (1998). Standard methods for the examination of water and wastewater. 20th edition

Aracena, C., Lange, C. B., Luis Iriarte, J., Rebolledo, L., & Pantoja, S. (2011). Latitudinal patterns of export production recorded in surface sediments of the Chilean Patagonian fjords (41–55 S) as a response to water column productivity. *Continental Shelf Research*, 31(3), 340-355.

Bardgett, R. D., Richter, A., Bol, R., Garnett, M. H., Bäumler, R., Xu, X., Lopez-Capel, E., Manning, D., Hobbs, P., Hartley, I., & Wanek, W. (2007). Heterotrophic microbial communities use ancient carbon following glacial retreat. *Biology letters*, 3(5), 487-490.

Barrero, A. F., Oltra, J. E., Poyatos, J. A., Jiménez, D., & Oliver, E. (1998). Phycomysterols and other sterols from the fungus *Phycomyces blakesleeanus*. *Journal of natural products*, 61(12), 1491-1496.

- Bianchi, T.S., & Canuel, E. A. (2011).** “Chemical Biomarkers in Aquatic Ecosystems”. Princeton University Press, 396 pp.
- Bligh, E., & Dyer, W. J. (1959).** A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian journal of biochemistry and physiology*, 37(8), 911-917.
- Brassell, S. C., & Eglinton, G. (1981).** Steroids and triterpenoids in deep sea sediments as environmental and diagenetic indicators. *Advances in organic geochemistry*, 684-697.
- Brassell, S.C. (1994).** Isopentenoids and geochemistry. In: Nes, W.D. (Ed.), *Isopentenoids and other Natural Products: Evolution and Function*, American Chemical Society Symposium Series, vol. 562, pp. 2–30.
- Chuecas, L., & Ahumada, R. (1980).** Contribución al conocimiento de las condiciones hidrográficas de los fiordos de la región magallánica-Chile. *Boletim do Instituto Oceanografico*, 29(2), 95-100.
- Colombo, J. C., Silverberg, N., & Gearing, J. N. (1996).** Lipid biogeochemistry in the Laurentian Trough: I—fatty acids, sterols and aliphatic hydrocarbons in rapidly settling particles. *Organic Geochemistry*, 25(3), 211-225.
- Conte, M. H., Eglinton, G., Madureira, L. A., Rabouille, C., Labeyrie, L., & Mudge, S. (1995).** Origin and Fate of Organic Biomarker Compounds in the Water Column and Sediments of the Eastern North Atlantic [and Discussion]. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 348(1324), 169-178.
- Chen, J. L., Wilson, C. R., & Tapley, B. D. (2006a).** Satellite gravity measurements confirm accelerated melting of Greenland ice sheet. *Science*, 313(5795), 1958-1960.
- Chen, J. L., Wilson, C. R., Blankenship, D. D., & Tapley, B. D. (2006b).** Antarctic mass rates from GRACE. *Geophysical Research Letters*, vol.33, L11502, doi:10.1029/2006GL026369, 2006
- Chikaraishi, Y. (2006)** Carbon and hydrogen isotopic composition of sterols in natural marine brown and red macroalgae and associated shellfish. *Organic Geochemistry*, 37(4), 428-436
- Christner, B. C., Kvitko II, B. H., & Reeve, J. N. (2003).** Molecular identification of bacteria and eukarya inhabiting an Antarctic cryoconite hole. *Extremophiles*, 7(3), 177-183.

Chróst, R. J. (1991). Environmental control of the synthesis and activity of aquatic microbial ectoenzymes. En: *Microbial Enzymes in Aquatic Environments*, edited by Chróst, R. J., Springer, New York, 29-59.

De Leeuw, J. W., & Baas, M. (1986). Early-stage diagenesis of steroids. *Methods in geochemistry and geophysics*, 24, 101-123.

Evans, J. C., Ehrlich, R., Krantz, D., & Full, W. (1992). A comparison between polytopic vector analysis and empirical orthogonal function analysis for analyzing quasi-geostrophic potential vorticity. *Journal of Geophysical Research: Oceans (1978–2012)*, 97(C2), 2365-2378.

Glasser, N. F., Jansson, K. N., Goodfellow, B. W., De Angelis, H., Rodnight, H., & Rood, D. H. (2011). Cosmogenic nuclide exposure ages for moraines in the Lago San Martín Valley, Argentina. *Quaternary Research*, 75(3), 636-646.

González, H. E., Castro, L., Daneri, G., Iriarte, J. L., Silva, N., Vargas, C. A., Giesecke R., & Sánchez, N. (2011). Seasonal plankton variability in Chilean Patagonia fjords: Carbon flow through the pelagic food web of Aysen Fjord and plankton dynamics in the Moraleda Channel basin. *Continental Shelf Research*, 31(3), 225-243.

González, H. E., Castro, L. R., Daneri, G., Iriarte, J. L., Silva, N., Tapia, F., Teca, C. A., & Vargas, C. A. (2013). Land-ocean gradient in haline stratification and its effects on plankton dynamics and trophic carbon fluxes in Chilean Patagonian fjords (47°-50° S). *Progress in Oceanography*. En prensa

Green, G., Skerratt, J. H., Leeming, R., & Nichols, P. D. (1992). Hydrocarbon and coprostanol levels in seawater, sea-ice algae and sediments near Davis Station in Eastern Antarctica: a regional survey and preliminary results for a field fuel spill experiment. *Marine Pollution Bulletin*, 25(9), 293-302.

Grice, K., Klein Breteler, W., Schouten, S., Grossi, V., Leeuw, J. W., & Damsté, J. S. S. (1998). Effects of zooplankton herbivory on biomarker proxy records. *Paleoceanography*, 13(6), 686-693.

Hamm, C., Reigstad, M., Wexels-Riser, C., & Wassmann, P. (2001). On the trophic fate of *Phaeocystis pouchetii*: VII. Sterols and fatty acids reveal sedimentation of *Phaeocystis*-derived organic matter via krill fecal strings. *Marine Ecology Progress Series*, 209, 55-69.

Hodson, A., Anesio, A. M., Tranter, M., Fountain, A., Osborn, M., Prisco, J., Laybourn-Parry, J., & Sattler, B. (2008). Glacial ecosystems. *Ecological Monographs*, 78(1), 41-67.

Hood, E., Fellman, J., Spencer, R. G., Hernes, P. J., Edwards, R., D'Amore, D., & Scott, D. (2009). Glaciers as a source of ancient and labile organic matter to the marine environment. *Nature*, 462(7276), 1044-1047.

Howat, I. M., Smith, B. E., Joughin, I., & Scambos, T. A. (2008). Rates of southeast Greenland ice volume loss from combined ICESat and ASTER observations. *Geophysical Research Letters*, 35(17), L17505.

Hudson, E. D., Parrish, C. C., & Helleur, R. J. (2001). Biogeochemistry of sterols in plankton, settling particles and recent sediments in a cold ocean ecosystem (Trinity Bay, Newfoundland). *Marine Chemistry*, 76(4), 253-270.

IPCC. (2007). Cambio climático 2007: Informe de síntesis. Contribución de los Grupos de trabajo I, II y III al Cuarto Informe de evaluación del Grupo Intergubernamental de Expertos sobre el Cambio Climático [Equipo de redacción principal: Pachauri, R.K. y Reisinger, A. (directores de la publicación)]. IPCC, Ginebra, Suiza, 104 págs.

Jeng, W. L., Lin, S., & Kao, S. J. (2003). Distribution of terrigenous lipids in marine sediments off northeastern Taiwan. *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography*, 50(6), 1179-1201.

Johnson, G.W., R., Ehrlich & Full, W.(2002). Principal components analysis and receptor models in environmental forensics. In: Murphy, B.L., Morrison, R.D. (Eds.), *An Introduction to Environmental Forensics*. Academic Press, San Diego, pp. 461–515.

Kaštovská, K., Elster, J., Stibal, M., & Šantrůčková, H. (2005). Microbial assemblages in soil microbial succession after glacial retreat in Svalbard (High Arctic). *Microbial Ecology*, 50(3), 396-407.

Kaur, S., Nieuwenhuijsen, M. J., & Colvile, R. N. (2005). Pedestrian exposure to air pollution along a

major road in Central London, UK. *Atmospheric Environment*, 39(38), 7307-7320.

Kerr, R. A. (2009). Both of the world's ice sheets may be shrinking faster and faster. *Science*, 326(5950), 217-217.

Khan, S. A., Wahr, J., Bevis, M., Velicogna, I., & Kendrick, E. (2010). Spread of ice mass loss into northwest Greenland observed by GRACE and GPS. *Geophysical Research Letters*, vol. 37, L06501, doi: 10.1029/2010GL04246.

Klamer, M., & Bååth, E. (1998). Microbial community dynamics during composting of straw material studied using phospholipid fatty acid analysis. *FEMS Microbiology Ecology*, 27(1), 9-20.

Krabill, W., Hanna, E., Huybrechts, P., Abdalati, W., Cappelen, J., Csatho, B., Frederick, E., Manizade, S., Martin, C., Sonntag, J., Swift, R., Thomas, R., & Yungel, J. (2004). Greenland ice sheet: increased coastal thinning. *Geophysical Research Letters*, vol. 31, L24402, doi: 10.1029/2004GL021533.

Lee, S., & Fuhrman, J. A. (1987). Relationships between biovolume and biomass of naturally derived marine bacterioplankton. *Applied and Environmental Microbiology*, 53(6), 1298-1303.

Mackenzie, A. S., Lamb, N. A., & Maxwell, J. R. (1982). Steroid hydrocarbons and the thermal history of sediments. *Nature* 295, 223-226.

Martins, C. C., Venkatesan, M. I., & Montone, R. C. (2002). Sterols and linear alkylbenzenes in marine sediments from Admiralty Bay, King George Island, South Shetland Islands. *Antarctic Science*, 14(3), 244-252.

Montero, P., Daneri, G., González, H. E., Iriarte, J. L., Tapia, F. J., Lizárraga, L., Sánchez, N., & Pizarro, O. (2011). Seasonal variability of primary production in a fjord ecosystem of the Chilean Patagonia: Implications for the transfer of carbon within pelagic food webs. *Continental shelf research*, 31(3), 202-215.

Mudge, S.M. & Norris, C. E. (1997). Lipid biomarkers in the Conwy Estuary (North Wales, U.K.): a comparison between fatty alcohols and sterols. *Marine Chemistry*, 57: 61-84.

- Muhlebach, A., & Weber, K. (1998).** Origins and fate of dissolved sterols in the Weddell Sea, Antarctica. *Organic Geochemistry*, 29, 1595-1607.
- Mueller, D. R., Vincent, W. F., Pollard, W. H., & Fritsen, C. H. (2001).** Glacial cryoconite ecosystems: a bipolar comparison of algal communities and habitats. *Nova Hedwigia Beiheft*, 123, 173-198.
- Murphy, R. C., Fiedler, J., & Hevko, J. (2001).** Analysis of nonvolatile lipids by mass spectrometry. *Chemical Reviews*, 101(2), 479-526.
- Nelson, M. M., Mooney, B. D., Nichols, P. D., & Phleger, C. F. (2001).** Lipids of Antarctic Ocean amphipods: food chain interactions and the occurrence of novel biomarkers. *Marine Chemistry*, 73(1), 53-64.
- Nishimura, M. (1978).** Geochemical characteristics of the high reduction zone of sterols in Suwa sediments and the environmental factors controlling the conversion of sterols to stanols. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 42, 349-357.
- Pantoja, S., Iriarte, J. L., & Daneri, G. (2011).** Oceanography of the Chilean Patagonia. *Continental shelf research*, 31(3), 149-153.
- Peng, X., Zhang, G., Mai, B., Hu, J., Li, K., & Wang, Z. (2005).** Tracing anthropogenic contamination in the Pearl River estuarine and marine environment of South China Sea using sterols and other organic molecular markers. *Marine Pollution Bulletin*, 50, 856- 865.
- Porazinska, D. L., Fountain, A. G., Nylén, T. H., Tranter, M., Virginia, R. A., & Wall, D. H. (2004).** The biodiversity and biogeochemistry of cryoconite holes from McMurdo Dry Valley glaciers, Antarctica. *Arctic, Antarctic, and Alpine Research*, 36(1), 84-91.
- Porter, K.G., & Feig, Y.S. (1980).** The use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora. *Limnology and Oceanography*, 25, 943-948.
- Rampen, S. W., Abbas, B. A., Schouten, S., & Sinninghe Damste, J. S. (2010).** A comprehensive study of sterols in marine diatoms (Bacillariophyta): Implications for their use as tracers for diatom productivity. *Limnology and oceanography*, 55(1), 91-105.

Rignot, E., Rivera A., & Casassa, G. (2003). Contribution of the Patagonia Ice fields of South America to Global Sea Level Rise. *Science*, 302, 434-437.

Rignot, E., & Kanagaratnam, P. (2006). Changes in the velocity structure of the Greenland Ice Sheet. *Science*, 311(5763), 986-990.

Rignot, E., Bamber, J. L., Van Den Broeke, M. R., Davis, C., Li, Y., Van De Berg, W. J., & Van Meijgaard, E. (2008a). Recent Antarctic ice mass loss from radar interferometry and regional climate modelling. *Nature Geoscience*, 1(2), 106-110.

Rignot, E., Box, J. E., Burgess, E., & Hanna, E. (2008b). Mass balance of the Greenland ice sheet from 1958 to 2007. *Geophysical Research Letters*, 35(20).

Rignot, E., Velicogna, I., Van den Broeke, M. R., Monaghan, A., & Lenaerts, J. T. M. (2011). Acceleration of the contribution of the Greenland and Antarctic ice sheets to sea level rise. *Geophysical Research Letters*, vol. 38, L05503, doi: 10.1029/2011GL046583 (5).

Rivera, A., Casassa, G., Bamber J., & Kääb, A. (2005). Ice elevation changes of Glaciar Chico, southern Patagonia, using ASTER DEMs, aerial photographs and GPS data. *Journal of Glaciology*, 51 (172): 105-112.

Rivera, A., Benham, T., Casassa, G., Bamber J., & Dowdeswell, J. (2007). Ice elevation and areal changes of glaciers from the Northern Patagonia Icefield, Chile. *Global and Planetary Change*, 59, 126-137.

Rivera, A., Koppes, M., Bravo, C., & Aravena, J. C. (2011). Little ice age advance and retreat of Glaciar Jorge Montt, Chilean Patagonia, recorded in maps, air photographs and dendrochronology. *Climate of the Past Discussions*, 7, 3131-3164.

Rivera, A., Corripio, J., Bravo, C., & Cisternas, S. (2012). Glaciar Jorge Montt (Chilean Patagonia) dynamics derived from photos obtained by fixed cameras and satellite image feature tracking. *Annals of Glaciology*, 53, 147–155.

Rontani, J.F. (2008). Photooxidative and autoxidative degradation of lipid components during the senescence of phototrophic organisms. *Phytochemistry research progress*. Nova Science Publishers, pp. 115-144.

Rontani, J. F., Zabeti, N., & Wakeham, S. G. (2011). Degradation of particulate organic matter in the equatorial Pacific Ocean: Biotic or abiotic?. *Limnology and oceanography*, 56(1), 333-349.

Rontani, J.F. (2012). Photo- and Free Radical-Mediated Oxidation of Lipid Components During the Senescence of Phototrophic Organisms. *Senescence*, Dr. Tetsuji Nagata (Ed.), ISBN 978-953-51-0144-4.

Salot, A., Laureillard, J., Scribe, P., & Sicre, M. A. (1991). Evolutionary trends in the lipid biomarker approach for investigating the biogeochemistry of organic matter in the marine environment. *Marine Chemistry*, 36(1), 233-248.

Sepúlveda, J., Pantoja, S., & Huguen, K.A. (2011). Sources and distribution of organic matter in northern Patagonia fjords, Chile (~44–47°S): A multi-tracer approach for carbon cycling assessment. *Continental Shelf Research*, 31(3-4): 315-329.

Silva N, Sievers, H., & Prado, R. (1995). Descripción oceanográfica de los canales australes de Chile. Zona Puerto Montt-Laguna San Rafael (Crucero Cimar-Fiordo 1). *Revista de Biología Marina, Valparaíso*, 30 (2) (1995), 207–254.

Silva, N., Calvete, C., Sievers, H.A. (1997). Características oceanográficas físicas y químicas de canales australes chilenos entre Puerto Montt y Laguna San Rafael (Crucero Cimar-Fiordo 1). *Ciencia y Tecnología del Mar*. 20, 23–106.

Silva, N. & Palma, S. (2008). “The CIMAR Program in the austral Chilean channels and Fjords”, in: Silva, Palma (Eds.), *Progress in the oceanographic knowledge of Chilean interior waters, from Puerto Montt to Cape Horn*. Comité Oceanográfico Nacional - Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, 11-15 pp.

Silva, N., Vargas, C.A. & Prego, R. (2011). Land–ocean distribution of allochthonous organic matter in surface sediments of the Chiloé and Aysén interior seas (Chilean Northern Patagonia). *Continental Shelf Research* 31, 330–339.

Singh, S. C., Sinha, R. P., & Hader, D. P. (2002). Role of lipids and fatty acids in stress tolerance in cyanobacteria. *Actaprotozoologica*, 41(4), 297-308.

Sobarzo M. (2009). The Fjord region of Southern Chile: oceanographic aspects, Marine Benthic Fauna of Chilean Patagonia, *Nature in Focus* (2009) p. 1000.

Solomon, S., Qin, D., Manning, M., Chen, Z., Marquis, M., Averyt, K.B., Tignor, M., & Miller, H.L. (eds.). (2007). *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, UK, and New York, NY: Cambridge University Press.

Solomon, S., Plattner, G. K., Knutti, R., & Friedlingstein, P. (2009). Irreversible climate change due to carbon dioxide emissions. *Proceedings of the national academy of sciences*, 106(6), 1704-1709.

Strickland, J. D., & Parsons, T. R. (1960). *A manual of sea water analysis.* Fisheries Research Board of Canada, 167.

Strub, P. T., Mesias, J. M., Montecino, V., Rutllant, J., & Salinas, S. (1998). Coastal ocean circulation off western South America. In: Robinson, A.R., Brink, K.H. (Eds.), *The Sea*, vol. 11. Wiley, New York, USA, pp. 273–313

Sun, M.Y., Wakeham, S.G. (1999). Diagenesis of planktonic fatty acids and sterols in Long Island Sound sediments: influences of a phytoplankton bloom and bottom water oxygen content. *Journal of Marine Research*, 57, 357–385.

Torres, R., Frangopulos, M., Hamamé, M., Montecino, V., Maureira, C., Pizarro, G., Reid, B., Valle-Levinson, A., & Blanco, J. L. (2011). Nitrate to silicate ratio variability and the composition of micro-phytoplankton blooms in the inner-fjord of Seno Ballena (Strait of Magellan, 54° S). *Continental Shelf Research*, 31(3), 244-253.

Valavanidis, A., Vlahogianni, T., Dassenakis, M., & Scoullou, M. (2006). Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. *Ecotoxicology and environmental safety*, 64(2), 178-189.

Vargas, C.A., Martinez, R.A., San Martin, V., Aguayo, M., Silva, N., & Torres, R. (2011). Allochthonous subsidies of organic matter across a lake-river-fjord landscape in the Chilean Patagonia: Implications for marine zooplankton in inner fjord areas. *Continental Shelf Research*, 31(3-4): 187-201.

Velicogna, I., & Wahr, J. (2006a). Acceleration of Greenland ice mass loss in spring 2004. *Nature*, 443(7109), 329-331.

Velicogna, I., & Wahr, J. (2006b). Measurements of time-variable gravity show mass loss in Antarctica. *Science*, 311(5768), 1754-1756.

Velicogna, I. (2009). Increasing rates of ice mass loss from the Greenland and Antarctic ice sheets revealed by GRACE. *Geophysical Research Letters*, vol.36, L19503, doi: 10.1029/2009GL040222 .

Venkatesan, M. I., Ruth, E., & Kaplan, I. R. (1986). Coprostanols in Antarctic marine sediments: a biomarker for marine mammals and not human pollution. *Marine Pollution Bulletin*, 17(12), 554-557.

Vestal, J. R., & White, D. C. (1989). Lipid analysis in microbial ecology. *Bioscience*, 39(8), 535-541.

Villinski, J. C., Hayes, J. M., Brassell, S. C., Riggert, V. L., & Dunbar, R. B. (2008). Sedimentary sterols as biogeochemical indicators in the Southern Ocean. *Organic Geochemistry*, 39(5), 567-588.

Volkman, J.K. (1986). A review of sterol markers for marine and terrigenous organic matter. *Organic Geochemistry*, 9, 83-99.

Volkman, J. K., Barrett, S. M., Blackburn, S. I., Mansour, M. P., Sikes, E. L., & Gelin, F. (1998). Microalgal biomarkers: a review of recent research developments. *Organic Geochemistry*, 29(5), 1163-1179.

Volkman, J.K. (2003). Sterols in microorganisms. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 60: 495-506.

Volkman, J. K. (2005). Sterol and other triterpenoids: Source specificity and evolution of biosynthetic pathways. *Organic Geochemistry*, 36, 139-159.

Volkman, J. K. (2006). Lipid markers for marine organic matter. In *Marine Organic Matter: Biomarkers, Isotopes and DNA*. Springer Berlin Heidelberg. pp. 27-70

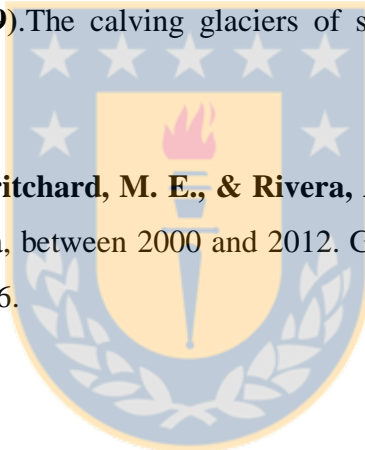
Wakeham, S.G., Beier, J.A. (1991). Fatty-acid and sterol biomarkers as indicators of particulate matter source and alteration processes in the Black Sea. *Deep Sea Research Part A: Oceanographic Research Papers*, 38, S943–S968.

Wakeham, S.G. (1995). Lipid biomarkers for heterotrophic alteration of suspended particulate organic matter in oxygenated and anoxic water columns of the ocean. *Deep Sea Research I*, 42, 1749–1771.

Wakeham, S. G., Hedges, J. I., Lee, C., Peterson, M. L., & Hernes, P. J. (1997). Compositions and transport of lipid biomarkers through the water column and surficial sediments of the equatorial Pacific Ocean. *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography*, 44(9-10), 2131-2162.

Warren, C.R. & Aniya, M. (1999). The calving glaciers of southern South America. *Global and Planetary Change*, 22(1-4), 59-77.

Willis, M. J., Melkonian, A. K., Pritchard, M. E., & Rivera, A. (2012). Ice loss from the Southern Patagonian Ice Field, South America, between 2000 and 2012. *Geophysical Research Letters*, vol. 39, L17501, doi: 10.1029/2012GL053136.



ANEXO



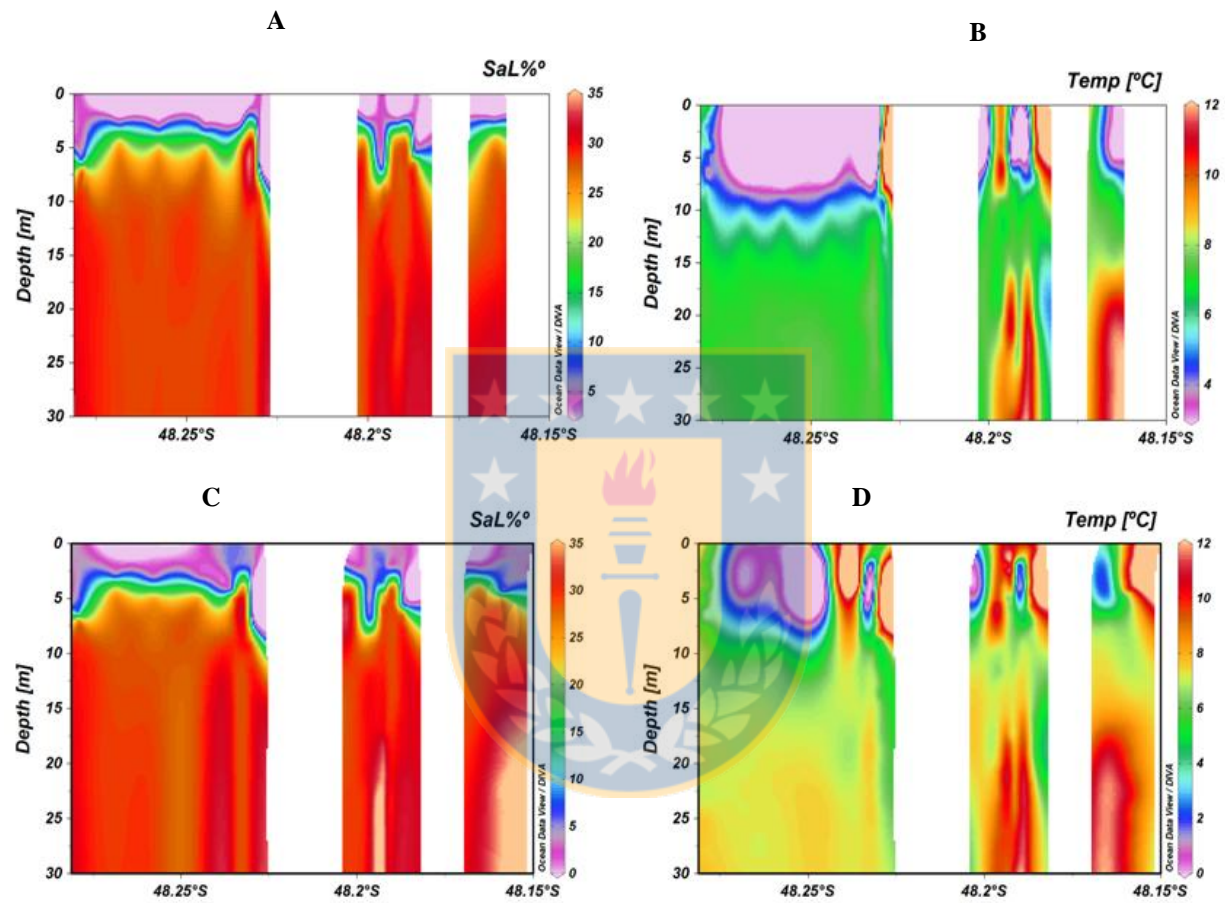


Figura 8. Sección Vertical de temperatura y salinidad en la zona de estudio durante abril 2012 (A, B) y noviembre 2013 (C, D).

Nomenclature	C _x Δ ^y
C26Δ^{5,22}	C ₂₆ Δ ^{5,22}
22-Dehidrocholesterol	C ₂₇ Δ ^{5,22}
Cholesta-5-en-3β-ol	C ₂₇ Δ ⁵
Cholestan-3β-ol	C ₂₇ Δ ⁰
24-methyl cholest-5,22-dien-3β-ol	C ₂₈ Δ ^{5,22}
3β-Cholest-7-en-3-ol	C ₂₇ Δ ⁷
24-methylene-cholest-5-en-3β-ol	C ₂₈ Δ ^{5,24(28)}
24-methylcholest 5-en-3β-ol	C ₂₈ Δ ⁵
24-ethylcholest-5,22E-dien-3β-ol	C ₂₉ Δ ^{5,22}
19-Norergosta-5,7,9-trien-3b-ol	C ₂₇ Δ ^{5,7,9}
Stigmasta-5,7-dien-3β-ol	C ₂₉ Δ ^{5,7}
24-ethylcholest-5-en-3β-ol/24-ethyl-cholesterol	C ₂₉ Δ ⁵
5α-Stigmastan-3β-ol	C ₂₉ Δ ⁰
Stigmasta-5,24(28)-dien-3β-ol	C ₂₉ Δ ^{5,24(28)}
4α,23,24-Trimethyl-5α-cholest-22-en-3β-ol	C ₃₀ Δ ²²
4-Methylergost-7-en-3-ol	C ₂₉ Δ ⁷
29-Methylisofucoesterol	C ₃₀ Δ ^{5,24(28)}

Tabla 1. Esteroles identificados en el fiordo cercano al glaciar Jorge Montt. *”x” es el numero de átomos de carbono e “y” indica la posición del doble enlace, el numero “0” indica ausencia de doble enlaces (estanoles).

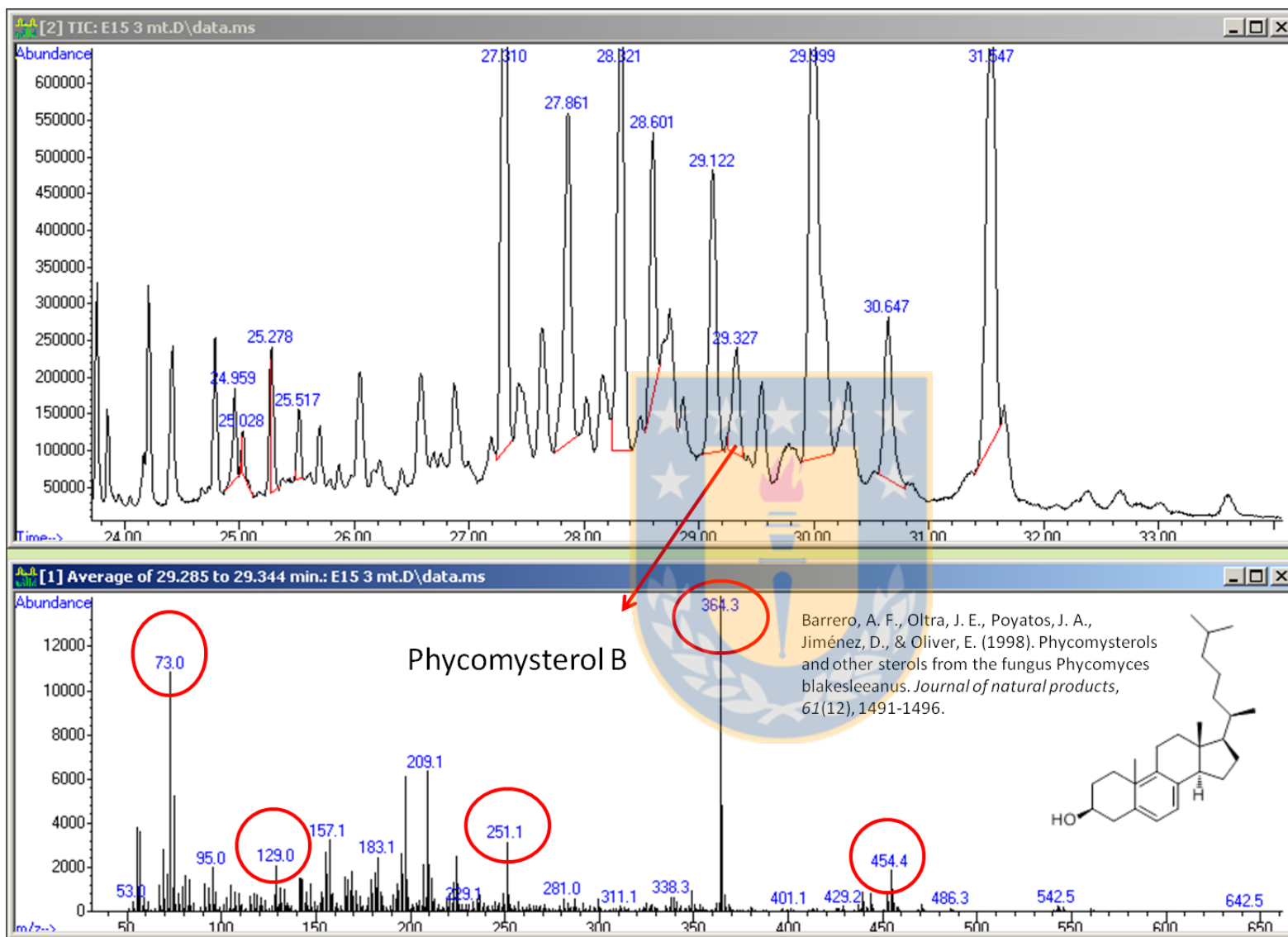


Figura 10. Análisis de Cromatografía gaseosa, ejemplo de identificación del compuesto Phycomysterol B.

Variables	Esterol total	Colesterol	Brasicasterol	Metileno-co	β -sitosterol	Fucosterol	Salinidad	Temperatura	Nitrato	Acido Silicico	Fosfato	Cl-a
Esterol total	1	0,902	0,841	0,676	0,799	0,577	-0,377	0,035	-0,282	0,158	-0,178	0,404
Colesterol	0,902	1	0,745	0,607	0,772	0,373	-0,290	0,005	-0,243	0,185	-0,102	0,265
Brasicasterol	0,841	0,745	1	0,576	0,596	0,413	-0,332	0,153	-0,208	0,164	-0,165	0,294
Metileno-colesterol	0,676	0,607	0,576	1	0,418	0,589	-0,473	-0,125	-0,411	0,406	-0,315	0,581
β -sitosterol	0,799	0,772	0,596	0,418	1	0,307	-0,311	-0,134	-0,099	-0,022	0,076	0,152
Fucosterol		0,373	0,413	0,589	0,307	1	-0,373	0,111	-0,489	0,359	-0,460	0,670
Salinidad	-0,377	-0,290	-0,332	-0,473	-0,311	-0,373	1	0,008	0,378	-0,511	0,468	-0,570
Temperatura	0,035	0,005	0,153	-0,125	-0,134	0,111	0,008	1	0,011	0,201	0,024	0,097
Nitrato	-0,282	-0,243	-0,208	-0,411	-0,099	-0,489	0,378	0,011	1	-0,392	0,596	-0,664
Acido Silicico	0,158	0,185	0,164	0,406	-0,022	0,359	-0,511	0,201	-0,392	1	-0,480	0,609
Fosfato	-0,178	-0,102	-0,165	-0,315	0,076	-0,460	0,468	0,024	0,596	-0,480	1	-0,692
Cl-a	0,404	0,265	0,294	0,581	0,152	0,670	-0,570	0,097	-0,664	0,609	-0,692	1

Los valores en negrita son diferentes de 0 con un nivel de significación $\alpha=0,05$

Tabla 2. Análisis de correlación spearman para ver las relaciones lineales significativas ($p < 0.05$) entre la composición de esteroides y las distintas variables obtenidas en este estudio