



UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y
OCEANOGRÁFICAS



Patrones ecológicos en la comunidad de bacterias bentónicas del Sulfureto
de Humboldt

Selim Seman Musleh Vega

Seminario de Título presentado al
DEPARTAMENTO DE OCEANOGRAFIA
DE LA UNIVERSIDAD DE CONCEPCION

Para optar al Título de
BIOLOGO MARINO

Profesor guía:

Dr. Daniel Gómez Uchida

Concepción - Chile

2013

UNIVERSIDAD DE CONCEPCION
DEPARTAMENTO DE OCEANOGRAFIA

Este Seminario de Título ha sido realizado en el Departamento de Oceanografía de la Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas.

Profesor Guía

Nombre y Grado (s) Académico (s)

Ha sido aprobada por la
Siguiete Comisión Evaluadora

(Nombre y Grado (s) Académico (s))

(Nombre y Grado (s) Académico (s))

Jefe de Carrera

(Nombre y Grado (s) Académico (s))

DEDICATORIA

No soy un hombre de muchas palabras y quienes me conocen apreciarán esta escueta dedicatoria... Este trabajo está dedicado principalmente quienes me apoyaron, enseñaron y contribuyeron en mi formación como persona y como científico. Agradezco a mi familia por el esfuerzo, a mis compañeros y amigos por las conversaciones y buenos ratos, a mis profesores por su valiosa contribución en mi educación y a Valentina por su amor y paciencia.

Todos ellos, en distintas medidas y momentos, me ayudaron a crecer, a pensar y a sobrevivir durante mi paso por la universidad.

Este proceso que hoy termina, espero que sea sólo el primer paso de un largo viaje como Biólogo Marino...

A journey of a thousand miles begins with a single step... Lao-tzu.

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis no podría haberse llevado a cabo sin el apoyo y confianza del Dr. Víctor Ariel Gallardo, quién confió en mí y me facilitó valiosos datos y conocimientos. Agradezco también a los proyectos FONDECYT 1070552 y 1110786, al proyecto DIUC 210.112.103-1.0 y al Centro de Investigación Oceanográfica en el Pacífico Sur-Oriental (COPAS) de la Universidad de Concepción (FONDAP N° 150100007).

Agradezco también al profesor Fabián Tapia por su apoyo y guía en lo que a análisis usando datos oceanográficos respecta.

Agradezco especialmente al profesor Daniel Gómez Uchida, quien fue un pilar fundamental para el desarrollo tanto de mi tesis, destacando su constante apoyo y motivación.

Finalmente agradezco a los miembros y colaboradores del Laboratorio de Bentos, entre ellos a la Biol. Mar. Carola Espinoza, al Biol. Mar. Alexis Fonseca y a la Dra. Nathaly Ruiz-Tagle del Centro de Biotecnología; también al Laboratorio de Genómica en Ecología, Evolución y Conservación de la Universidad de Concepción.

ÍNDICE

RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	3
INTRODUCCIÓN.....	1
MATERIALES Y MÉTODOS.....	8
Muestreo.....	8
Extracción de ARN y Secuenciación.....	9
Biodiversidad y riqueza de OTUs.....	10
Patrones espacio-temporales.....	11
Caracterización oceanográfica.....	11
Cambios comunitarios y variables oceanográficas.....	12
RESULTADOS.....	13
Biodiversidad y riqueza de OTUs.....	13
Patrones espacio-temporales.....	14
Caracterización oceanográfica del sistema.....	15
Cambios comunitarios y variables oceanográficas.....	16
DISCUSIÓN.....	16
CONCLUSIONES.....	19

BIBLIOGRAFÍA.....

¡E

RROR! MARCADOR NO DEFINIDO.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura N° 1: Estaciones de muestreo.....	19
Figura N° 2: Diversidad y riqueza de OTUs.....	22
Figura N° 3: Curva de riqueza acumulada de OTUs.....	23
Figura N° 4: NMDS basado en abundancia y presencia-ausencia de OTs.....	23
Figura N° 5: Estructura taxonómica de las comunidades bacterianas del Sulfureto de Humboldt.....	26
Figura N° 6: Evolución temporal de la estructura vertical del oxígeno, temperatura y salinidad.....	27
Figura N° 7: Diagramas T-S-O para la fecha más cercana a la del muestreo.....	28
Figura N° 8: Diagramas T-S-O un mes antes de la fecha más cercana al muestreo.....	29
Figura N° 9: Serie de tiempo diaria y mensual de surgencia basada en datos del NOAA (36.25°S y 73.25°O).....	30
Figura N° 10: ARbd comunidades bacterianas y 3 variables oceanográficas.....	33
Figura N° 11: ARbd comunidades bacterianas y 4 variables oceanográficas.....	34
Figura N° 12: Diagrama resumen.....	35

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla N° 1: Información asociada a los muestreos.....	20
Tabla N° 2: Variables oceanográficas.....	21
Tabla N° 3: Tabla 3: riqueza esperada de OTUs.....	24
Tabla N 4: Selección de variables oceanográficas usando AIC y R².....	31

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo N° 1: Gráfico del estrés de ajuste en NMDS.....	45
Anexo N° 2: Diagrama de densidad versus profundidad Agosto 2008.....	45

RESUMEN

Los microorganismos son componentes claves de los ecosistemas oceánicos, por lo que conocer su diversidad y distribución es crucial para comprender y anticipar sus respuestas a cambios ambientales. El Sistema de Corrientes de Humboldt (SCH) determina las características oceanográficas de gran parte del mar costero de Chile. Frente a la zona central de Chile, el SCH presenta una marcada variabilidad estacional, identificándose dos regímenes climático-oceanográficos contrastantes — primavera-verano y otoño-invierno — donde la principal variable que afecta al bentos sublitoral es la presencia o ausencia, respectivamente, de la denominada “Zona de Mínimo Oxígeno” disuelto (ZMO). Los sedimentos bajo la ZMO son ricos en compuestos sulfurados y constituyen el “Sulfureto de Humboldt”, hábitat de extensas y masivas comunidades de bacterias filamentosas multicelulares gigantes y de poco estudiadas poblaciones de bacterias clásicas, de eucariontes unicelulares y de pequeños metazoos. En el presente trabajo se presentan los patrones de riqueza específica y diversidad de las comunidades de bacterias bentónicas en la Bahía de Concepción y la plataforma continental adyacente y sus cambios en el tiempo y espacio. Para esto se utilizó muestras de ADN de muestras bentónicas obtenidas en cuatro estaciones de muestreo visitadas en diciembre 2007, abril 2008, septiembre 2008 y enero de 2009 y datos ambientales pertinentes. Usando métodos moleculares cultivo-independientes (pirosecuenciación paralela masiva de la región V6 del gen 16S del ARN ribosomal) y la información molecular obtenida de cada bacteria, se crearon unidades taxonómicas operacionales (OTUs) basadas en criterios de similitud entre las secuencias V6. Esta técnica permite estudiar las comunidades de microorganismos presentes en muestras ambientales sin recurrir a la taxonómica clásica. En seguida, utilizando la información relativa a las OTUs y la correspondiente a las variables ambientales (temperatura, salinidad, oxígeno disuelto y surgencia producida por el viento), se investigaron los patrones espacio-temporales y las variables oceanográficas que mejor explican tales patrones.

Comparadas con estudios similares en otras localidades, utilizando el mismo método, las bacterias del Sulfureto de Humboldt presentaron valores más altos de riqueza de especies y diversidad. Las estimaciones de riqueza de OTUs sugiere la existencia de 46.658 OTUs diferentes de los que sólo logramos recuperar el 33%. Usando el método del escalamiento multidimensional se generaron grupos de OTUs asociados al periodo (estación del año) y a los sitios (estaciones) de muestreo. Al evaluar la significancia de los grupos observados se encontró diferencias significativas asociadas a los periodos (estaciones del año) de muestreo pero no así con las localidades (estaciones) de muestreo. El análisis para dilucidar la relación entre los patrones observados en las comunidad y las variables oceanográficas, indicó que la salinidad, la profundidad de la oxiclina <1 mL/L de oxígeno disuelto y la profundidad de las muestras bentónicas explican un 42,4% de la varianza observada. Los resultados de este trabajo dejan en evidencia una zona que presenta una comunidad bacteriana rica en especies y de alta diversidad cuya composición y estructura obedecen a un acoplamiento con la estacionalidad de los procesos oceanográficos regionales.

ABSTRACT

Because microorganisms are key components of ocean ecosystems, to know their diversity and distribution is essential to understand and anticipate responses of marine ecosystems to environmental changes. The Humboldt Current System (HCS) determines the oceanographic characteristics of most of the coastal sea of Chile. Off central Chile the HCS presents a marked seasonal variability with two contrasting climatic-oceanographic regimes — spring-summer and fall-winter — where the variable that affects the sublittoral benthos is the presence or absence, respectively, of the so-called “Oxygen Minimum Zone”. The sediments under the OMZ are rich in sulfur compounds and constitute the “Humboldt Sulfuretum”, the habitat of extensive and massive communities of giant filamentous multicellular bacteria and of yet insufficiently studied populations of classical bacteria, unicellular eukaryotes and small metazoans. In this work I present the patterns of species richness and diversity of the community of benthic bacteria of the Bay of Concepción and adjacent shelf and their temporal and spatial changes. For this I used data from four benthic sampling stations visited during December 2007, April 2008, September 2008 and January 2009. Using culture-independent molecular methods (massive parallel pyrosequencing of the V6 region in the 16S rRNA gene) and the molecular information obtained for each bacterium, I created Operational Taxonomic Units (OTUs) based on the similarity of the V6 sequences. This technique allows community studies without reference to taxonomic identifications. I then used the OTUs-related information as well as that of the environmental variables (temperature, salinity, dissolved oxygen and wind-driven upwelling) to find the spatial and temporal patterns and identify the oceanographic variables that best explained those patterns.

Compared with similar studies elsewhere, using the same method, the benthic bacteria of the Humboldt Sulfuretum showed higher species richness and diversity. Estimates of OTUs richness suggest the existence of 46.658 OTUs, of which I only recovered 33%. Using the multidimensional scaling method, groups of OTUs associated with the period

(season) and sampling sites (stations) were generated. An evaluation of the significance of the observed groups significant differences associated with the period of sampling (seasons) but not with sampling locality (sampling station), were found. The analysis to elucidate the relationship between the observed community patterns and the oceanographic variables showed that salinity, depth of the oxycline <1 mL/L dissolved oxygen, and sampling depth, explained 42,4 % of the observed data variance. The results of this study contribute with evidence for a species-rich and high diversity bacteria community whose composition and structure results from the coupling with the seasonality of regional oceanographic processes.

INTRODUCCIÓN

Las bacterias son de importancia fundamental en los océanos tanto en términos de sus funciones ecosistémicas (Azam y Malfatti 2007, Karl 2007), como diversidad (Sogin et al. 2006), y biomasa (Karl 2007). Por consiguiente, entender sus patrones de distribución y estructura comunitaria en los distintos hábitats que ofrecen los océanos es crucial para anticipar la respuesta de los ecosistemas marinos a futuros cambios ambientales ya sean naturales o antropogénicos (Zinger et al. 2011).

De acuerdo con la frase “*Everything is everywhere, but the environment selects*” acuñada por Baas Becking & Beijerinck en 1934 (De Wit y Bouvier 2006, Ward y Bora 2006), las bacterias poseen la capacidad de distribuirse globalmente, siendo las condiciones ambientales las determinantes de la distribución diferencial entre las comunidades de bacterias en los océanos. En consecuencia, potencialmente podríamos encontrar cualquier cepa bacteriana en cualquier ambiente. Aquellas cepas que se encuentren en ambientes bajo condiciones desfavorables presentarán baja abundancia o se encontrarán en estado de latencia, donde con tan sólo una célula y nuevas condiciones ambientales favorables podrían aumentar su abundancia exponencialmente. Es por esto que diferentes regímenes espacio-temporales podrían producir cambios dramáticos en las comunidades bacterianas.

El sistema de corrientes de Humboldt (SCH) determina las características oceanográficas del mar costero de Chile centro-sur. Este se caracteriza por poseer una Zona de Mínimo Oxígeno disuelto (ZMO) permanente, aunque de variada intensidad intra- e inter-anual. Intra-anualmente presenta variaciones estacionales en su distribución batimétrica y latitudinal, asociadas a eventos de vientos favorables y desfavorables a eventos de surgencia (Shaffer et al. 1999, Sobarzo et al. 2007). La variabilidad estacional del SCH ha sido ampliamente estudiada por la Universidad de Concepción desde los inicios de su interés por el mar (Gallardo et al. en prensa). Entre las primeras observaciones se mencionan las realizadas por Ahumada y Chuecas (1979) quienes revelaron que el mar costero frente a la Región del Biobío, entre el cañón submarino del

río Itata y el del río Biobío (~36.5°S), presenta durante el período de primavera-verano austral una fuerte influencia de vientos del sur-oeste, favorables a la surgencia de Agua Ecuatorial Sub-superficial (AESS), también conocida por su sigla en inglés ESSW (Equatorial Sub-surface Water), rica en nutrientes y pobre en oxígeno disuelto. Estas condiciones oceanográficas aumentan la productividad primaria y la respiración de materia orgánica (Montero et al. 2007), intensificando el déficit de oxígeno en aguas sub-superficiales, pudiendo llegar hasta la anoxia (Ulloa et al. 2012). En contraste, durante el período del otoño-invierno austral, los vientos cambian y comienzan a predominar vientos provenientes del norte-este, favoreciendo la profundización de aguas someras y su mezcla en la columna de agua. La presencia de aguas de origen Antártico, ricas en oxígeno y de baja salinidad (Schneider et al. 2003), predominantemente influenciadas por Agua Intermedia Antártica (conocida por su sigla en inglés AAIW), y en menor medida por las descargas de ríos y precipitaciones, cambian las condiciones oceanográficas en toda la columna de agua, generando dos regímenes contrastantes (Sobarzo et al. 2007).

Los procesos oceanográficos y la variabilidad en las condiciones ambientales del SCH afectan tanto al dominio pelágico como al bentónico. En los sedimentos ubicados bajo de la ZMO encontramos un ecosistema bentónico rico en compuestos azufrados y materia orgánica, que presenta bajas concentraciones de oxígeno disuelto (Fossing et al. 1995, Zopfi et al. 2008), que concuerda con la descripción de “Sulfuretum”. El término, que fue acuñado originalmente por Baas-Becking (1925) para lagunas, posteriormente fue también aplicado a vertientes, llanuras mareales y ciénagas (Morgan y Lackey 1965), y recientemente ha sido aplicado en aguas marinas al que genéricamente se ha denominado “Sulfureto de Humboldt” (Gallardo et al. 2013).

En el Sulfureto de Humboldt habitan extensas comunidades de bacterias gigantes, de características primitivas (Gallardo y Espinoza 2007), las que mantienen una compleja y diversa comunidad de procariontes y eucariontes microbianos cuyo conocimiento aún se encuentra en desarrollo.

Para el estudio de las comunidades bacterianas, la taxonomía clásica utiliza el cultivo y aislamiento de cepas desde sus ambientes, los que pueden ser bastante complejos de reproducir en laboratorio (Mincer et al. 2005), para posteriormente hacer estimaciones de diversidad y riqueza (Sul et al. 2013, Zinger et al. 2011). Una gran parte de las bacterias son difíciles o poco asequibles de cultivar, por lo que la taxonomía clásica posee limitaciones para estimar diversidad, especialmente si las bacterias provienen de ambientes extremos como fondos oceánicos o chimeneas hidrotermales. La aproximación genómica se presenta como una poderosa herramienta alternativa cultivo-independiente para estudiar comunidades bacterianas. Ésta utiliza como análogo de una bacteria una región de su secuencia de ADN o ARN, pudiendo ser aplicable sobre muestras ambientales (Bik et al. 2012, Deutschbauer et al. 2006, Goodfellow y Fiedler 2010, Jensen et al. 2005, Ward y Bora 2006). Las técnicas moleculares logran recuperar entre 10 y 100 veces más de la riqueza bacteriana presente en muestras ambientales que usando métodos cultivo-dependientes (Bérdy 2005). La secuenciación de última generación (NGS; Next-generation sequencing), como la pirosecuenciación Roche 454, posee ventajas para el estudio de la diversidad bacteriana, ofreciendo aumentar el número de secuencias obtenidas a costos más bajos que la secuenciación tipo Sanger, permitiendo además analizar múltiples comunidades bacterianas y compararlas (Forde y O'Toole 2013, Tamaki et al. 2011). Los métodos moleculares son una opción potente para estudios microbianos, pero no están exentos de limitaciones. Uno de los mayores problemas subyace en la capacidad de asignar taxonomía sobre las secuencias obtenidas de muestras ambientales, ésta depende de las bases de datos (Stewart et al. 2011). Para superar éste problema, los estudios ecológicos utilizan Unidades Taxonómicas Operacionales (conocidos como OTUs, por su sigla en inglés), utilizando el concepto filogenético de especie (Pedrós-Alió 2012). Éste método es ampliamente utilizado en ecología bacteriana, ya que logra reflejar efectivamente la estructura de una comunidad sin necesidad conocer su taxonomía (Hagström et al. 2000, Pedrós-Alió 2012).

Actualmente han aumentado los esfuerzos por conocer la diversidad en ambientes marinos, mediante el uso de la genómica, buscando conocer la gran diversidad bacteriana que estos albergan, con fines tanto ecológicos, como biotecnológicos. En la

síntesis realizada por Zinger et al. (2011) se evalúa la riqueza de bacterias en ambientes marinos, tanto pelágicos como bentónicos a partir de datos de pirosecuenciación de la región V6 del gen 16S Ribosomal generados en el sub-proyecto International Census of Marine Microbes (ICoMM), dentro del proyecto internacional “Census of Marine Life”, evidenciando mayor diversidad en ambientes bentónicos por sobre los pelágicos.

El presente trabajo busca evaluar si las comunidades de bacterias bentónicas que habitan el Sulfureto de Humboldt frente a Concepción, caracterizadas mediante pirosecuenciación, evidencian patrones de cambios temporales explicados por la variabilidad estacional del SCH y/o espaciales asociados a la profundidad y ubicación geográfica, tal como fue anteriormente observado en comunidades macrobentónicas por Gallardo et al. (1995). La hipótesis planteada es que las comunidades bacterianas cambian dinámicamente en el tiempo y el espacio; específicamente, la variabilidad estacional presente se debe a cambios de regímenes oceanográficos. Además, mediante el uso de datos oceanográficos, se evaluó qué variables (e. g., oxígeno disuelto, salinidad) explican mejor los patrones observados en las comunidades bacterianas del Sulfureto de Humboldt.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestreo

El estudio se realizó en el Sulfureto de Humboldt de la Bahía de Concepción y plataforma continental adyacente (Fig. 1), Región del Biobío en Chile central (36°32'S y 72°57'W; Fig. 1). Los datos provienen de 16 muestras de sedimento (Tabla 1). Las muestras fueron recolectadas en tres estaciones ubicadas dentro de la Bahía de Concepción: Estación 1 (12 m de profundidad), Estación 4 (25 m profundidad) y Estación 7 (35 m profundidad), y una estación ubicada sobre la plataforma continental fuera de la Bahía de Concepción, Estación 18 (88 m profundidad), las que fueron muestreadas en diciembre 2007, abril 2008, septiembre 2008 y enero 2009. Las muestras de sedimento fueron obtenidas utilizando un mini-multisacatestigos OKTOPUS (tubos

de 95 mm de diámetro) y un sacatestigos provisto de un tubo de acrílico de 50 mm de diámetro. Todas las muestras de sedimento fueron inmediatamente sub-muestreadas, obteniéndose 16 alícuotas de 0,5 gramos de la superficie del sedimento aun estando a bordo de la embarcación, se depositó en recipientes aislados térmicamente y en cada sub-muestra se realizó extracción de ARN para su posterior secuenciación.

Extracción de ARN y Secuenciación

La extracción de ARN se realizó en el Laboratorio de Biopelículas y Microbiología Ambiental del Centro de Biotecnología de la Universidad de Concepción. A partir de los primeros 5 cm de la capa superior del sedimento se tomaron 0,5 g (por triplicado), se lavaron 3 veces con PBS (en g/L: 8g NaCl, 0.2g KCl, 1.44g Na₂HPO₄, 0.24g KH₂PO₄, pH 7.4, 0.1% tween) y luego fueron centrifugados a 5.000 rpm, esperando 5 min entre cada lavado. Las muestras preparadas fueron almacenadas a -20°C para la extracción del ARN. La extracción del ARN genómico se realizó usando el kit FastDNA SPIN y FastPrep para sólidos, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La calidad y concentración de los extractos de ARN fueron evaluados midiendo absorbancia a A₂₆₀ y A₂₈₀ de longitud de onda en InfiniteF200Pro (Tecan). Las muestras fueron liofilizadas durante 30 minutos en *speedy vac* para posteriormente ser enviadas a los laboratorios de Marine Biological Laboratory en Woods Hole, Massachusetts, USA para su posterior amplificación y secuenciación. Se amplificó la región hipervariable V6 del gen 16S del ARN ribosomal de 60 pares de bases aproximadamente (posición 967–1046 en *Escherichia coli*), utilizada para estudios ecológicos en bacterias (Bik et al. 2012, Goodfellow y Fiedler 2010, Sul et al. 2013, Zinger et al. 2011), usando secuenciación masiva en paralelo, pirosecuenciación 454 Roche (Fakruddin y Chowdhury 2012), usando la plataforma plataforma GS-FLX y el kit LR70. Las secuencias fueron limpiadas, eliminando lecturas de baja calidad usando el método descrito por Huse et al. (2007) y se asignaron OTUs usando el método de *single linkage preclustering and pairwise alignment with average linkage clustering* (Huse et al. 2008). Esta aproximación minimiza la inflación de OTUs (Huse et al. 2010) y se considera comparable a los métodos de secuenciación de reducción de ruido de error tales como

PyroNoise (Quince et al. 2011). Todas las secuencias ARN ribosomal V6 provenientes de genes bacterianos se agruparon en 269.752 OTUs con un nivel de similitud de 97%. La identificación taxonómica se realizó utilizando el método de Alineamiento Global de Secuencias para Taxonomía (sigla en inglés GAST) comparando las lecturas obtenidas de la región V6 del gen 16S ribosomal (Huse et al. 2008) y puestos a disposición en la plataforma de VAMPS (disponibles en <http://vamaps.mbl.edu> Proyecto “Humboldt Marine Ecosystem”, ID: ICM_VAG_Bv6).

Biodiversidad y riqueza

A partir de los OTUs obtenidos, se estimó la riqueza (S) de especies y el índice inverso Simpson (D), siendo $D = 1/1 - \sum(N_i(N_i - 1)/(N(N - 1))$, N_i y N representan a la abundancia del i th OTU y es el número total de OTUs para cada muestra, respectivamente. Se utilizó el inverso de Simpson por ser sensible a la dominancia al nivel de OTUs (Hansel et al. 2008) y representar mejor los cambios de ésta (Zhou et al. 2002). Los cálculos y figuras se realizaron utilizando el paquete de ecología de comunidades “vegan” (Oksanen et al. 2012) en la plataforma R (R Core Team 2012).

Se analizó la amplitud del muestreo realizando una curva de acumulación de especies, agregando los sitios de muestreo en orden aleatorio y usando 1000 permutaciones. La curva de acumulación de especies no alcanzó un plateau, indicando que no se muestreó por completo la riqueza bacteriana en la zona de estudio. Para estimar la riqueza total de la comunidad de bacterias bentónicas—riqueza observada más riqueza no observada—basada en OTUs se utilizó el software CatchAll (Bunge 2011). Catchall realiza estimaciones mediante modelos de mezcla-finitos y computa el máximo de verosimilitud, mediante métodos no-paramétricos basados en análisis de regresión lineal y en cobertura, además de diagnosticar valores atípicos. Las estimaciones se basan en conteos de frecuencias de OTUs en las muestras. Catchall computa 12 diferentes estimadores de riqueza y aplica un algoritmo de selección de modelos usando bondad de ajuste para seleccionar el más adecuado. Además, permite realizar descuentos de la estimación de riqueza para ajustar por posibles incertezas producidas por los OTUs que

poseen baja frecuencia, conocidos en la literatura como *singletons* y que generan inflación en las estimaciones de riqueza y diversidad (Dickie 2010, Gihring et al. 2012).

Patrones espacio-temporales

Todos los análisis se llevaron a cabo usando el paquete estadístico “vegan” (Oksanen et al. 2012) utilizando el software R (R Core Team 2012). Para determinar si las variaciones espacio-temporales producen cambios en las comunidades bacterianas tanto en abundancia como en recambio de OTUs, se realizó un test de Mantel (Mantel y Valand 1970) comparando una matriz de distancia multivariada semi-métrica de Bray-Curtis a partir de datos de abundancia de OTUs, y una matriz de distancia multivariada métrica de Jaccard utilizando datos de presencia-ausencia de OTUs, usando la función “vegdist”. La hipótesis nula de no correlación se puso a prueba mediante un test no paramétrico de Spearman usando 99999 permutaciones. Los datos fueron explorados utilizando un ordenamiento en dos dimensiones por medio de un escalamiento multidimensional no métrico—sigla en inglés NMDS—(Kruskal 1964) usando la función “metaMDS”, basado en distancia de Bray-Curtis. Para determinar la existencia de los patrones espacio-temporales observados en el NMDS, se usó un Análisis de Varianza Multivariado basado en Permutaciones (PERMANOVA) con dos factores (profundidad de la muestra y fechas de muestreo), usando 99999 permutaciones y la función “adonis”.

Caracterización oceanográfica

Para la determinación de las características y origen de las masas de aguas presentes durante el periodo de muestreo, se realizaron diagramas de temperatura, salinidad y oxígeno (T-S-O), basados en las descripciones de las masas de aguas presentes en el SCH (Blanco et al. (2001) Silva et al. (2009)). Se graficó además la evolución temporal y la estructura vertical del oxígeno, la temperatura y la salinidad en la columna de agua entre enero del 2007 y noviembre del 2009 utilizando el paquete “oce” (Kelley 2013). Los datos oceanográficos fueron obtenidos de la serie de tiempo registrada en la Estación 18 (ST18) (<http://copas.udec.cl/eng/research/serie/>) de frecuencia mensual y

resolución vertical entre 1 y 88 m de profundidad, generada por el Centro de Investigación Oceanográfica en el Pacífico Sur-Oriental (COPAS) de la Universidad de Concepción (Proyecto FONDAP N° 150100007). Los diagramas T-S-O para agosto del 2008 fueron inconsistentes con un cambio monotónico de la densidad de las masas de agua con la profundidad (Fig. S1), sugiriendo anomalías de su registro. Por lo anterior, los datos correspondientes a agosto 2008 fueron reemplazados por un “agosto promedio” calculado entre 2002 y 2006. Por otra parte, se caracterizó la surgencia producto del estrés del viento utilizando una serie de tiempo espacial de datos satelitales registrados por el satélite de la NASA QuikSCAT (Hoffman y Leidner 2005), descargados desde la plataforma de libre acceso de la National Oceanic and Atmospheric Administration (NOAA). Los datos descargados corresponden a índices de surgencia diarios entre el 1 de julio del 2007 y el 31 de marzo del 2009 en una grilla de 15' de longitud por 15' de latitud ubicada cerca de la ST18 (Lat: 37°30' – 35°30'S; Long: 75°00' – 72°30'W). La elección se basó en la grilla con mayor porcentaje de datos de la serie (640 días; 84% del total de días). A partir de éstos se hizo una estimación mensual (surgencia neta mensual = $\sum_i^1 M_i$, donde M_i corresponde al valor del i -ésimo día del mes M) durante el periodo comprendido en la serie de tiempo, donde valores positivos indican transporte neto hacia la superficie (surgencia) y valores negativos indican transporte neto hacia el fondo (subsistencia). Los datos fueron analizados y graficados en el software R. Los datos ausentes fueron interpolados linealmente usando la función “na.approx” para análisis de series de tiempo (Zeileis y Grothendieck 2005) del paquete “zoo”.

Cambios comunitarios y variables oceanográficas

Se realizó un análisis de redundancia basado en distancia (ARbd) (Legendre y Anderson 1999) sobre una matriz de distancias de Bray-Curtis (basada en abundancia de OTUs), usando como variable explicativa los datos oceanográficos registrados en la ST18 por el COPAS descritos anteriormente, mediante el procedimiento “capscale” de R. Como resultado se identificaron una o más variables que explican los cambios en comunidades de bacterias bentónicas del Sulfureto de Humboldt, realizando la selección de aquellas que generan el mejor modelo para explicar la varianza observada. Se utilizaron dos

aproximaciones, la primera basada en la estimación del criterio información de Akaike, y la segunda basada en valores de ajuste de R^2 , ambas estimadas usando 10.000 permutaciones implementando las funciones “ordistep” y ordiR2step, respectivamente (Oksanen et al. 2012). Se evaluó la significancia del efecto de cada variable sobre las muestras con un análisis de varianza para modelos lineales generalizados, usando la función “ANOVA” con 10.000 permutaciones (R Core Team 2012). Se evaluó la importancia de las siguientes variables oceanográficas registradas a 79 m (máxima profundidad de datos disponibles) tanto en la fecha más cercana al muestreo como un mes antes del muestreo: (1) temperatura, (2) salinidad, y (3) oxígeno disuelto; también se evaluó la (4) profundidad de la oxiclina en la que el oxígeno disuelto alcanzó 1 mL/L en la columna de agua para ambas fechas. Por último, se evaluó el (5) efecto de la surgencia-subsidencia integrando valores semanales, ya que en las costas de Chile se observan variaciones sinópticas (3-7 días) durante todo el año. Los cambios a escala sinóptica resultan ser un factor importante en la estructuración de las comunidades microbianas que habitan la capa de mezcla en zonas costeras (Jacob et al. 2011). Se usará un el índice de surgencia neta calculado para la primera, segunda, tercera y cuarta semanas que antecedieron al muestreo bentónico. Las quince variables se encuentran descritas en la Tabla 2 y fueron estandarizadas con antelación a la realización del ARbd.

RESULTADOS

Biodiversidad y riqueza

Las comunidades de bacterias bentónicas del Sulfureto de Humboldt, presentan cambios tanto en riqueza de especies como en diversidad entre las muestras de OTUs (riqueza: Fig. 2a; diversidad: Fig. 2b). El máximo valor de riqueza fue observado en abril del 2008 en la ST1 ($S= 3624$), mientras que la menor se observó en diciembre del 2007, también en la ST1 ($S= 1938$) y enero del 2009 en la ST 4 ($S=1959$). La diversidad de OTUs—evaluada con el índice inverso de Simpson—presentó los mayores valores en los muestreos realizados en septiembre del 2008 ($D=265.79 \pm 67.80$) y enero del 2009 ($D=253.03 \pm 25.98$), para todos los sitios muestreados, mientras que los menores valores

fueron obtenidos en las muestras de abril ($D=129.89 \pm 31.26$). Tanto el valor máximo como el mínimo de diversidad pertenecieron a muestras provenientes de la ST7.

La curva de acumulación de especies muestra que, potencialmente, existen taxones en el Sulfureto de Humboldt que no fueron recolectados en este estudio (Fig. 3). Una regresión lineal sobre los valores de riqueza acumulada describe un aumento en la riqueza de OTUs de 806 por cada muestra ($F_{1,14}= 563.6$; valor $p < 0.01$; $R^2=0.973$). La estimación de riqueza esperada para el Sulfureto de Humboldt usando Catchall, se describe en la Tabla 3. Estas estimaciones indican que se logró coleccionar alrededor de un 33% de la riqueza total de OTUs presente en el sitio de estudio.

Patrones espacio-temporales

La ordenación observada en los NMDS basadas en distancias de Bray-Curtis y Jaccard sugieren patrones convergentes en las muestras, con una diferenciación en el eje X de las fechas de muestreos—principalmente una separación de la muestra de septiembre con respecto al resto—y en el eje Y de los sitio de muestreo, mostrando una incipiente separación basada en la profundidad de los sitios de muestreo (Fig. 4a y 4b). El test de Mantel, usado para evaluar la correlación entre matrices de distancia muestra una fuerte correlación ($\rho=0.8614$, valor $p < 0.01$). La fuerte correlación entre ambas matrices de distancia sugiere cambios conjuntos tanto en abundancia como en la aparición y desaparición de OTUs bacterianos entre las muestras. El análisis de PERMANOVA sobre la matriz de abundancia de OTUs encontró diferencias significativas ($F_{1,3}= 2.428$, y valor $p < 0.01$).

El patrón estacional observado entre las comunidades muestreadas fue también evaluado usando la estructura comunitaria, las que respaldan el patrón observado en el NMDS (Fig. 5). La estructura taxonómica al nivel de filo y agrupando las muestras por mes, evidencia cambios en la abundancia porcentual de los filios más representativos presentes en este estudio (abundancia $> 1\%$ del total de los OTUs). Particularmente, los filios Bacteroidetes y Actinobacteria presentan cambios entre las muestras, Bacteroidetes disminuye su abundancia porcentual desde alrededor de 31% en diciembre 2007, abril

2008 y enero 2009 a un 16%, mientras que Actinobacteria aumenta cuatro veces su abundancia en porcentaje con relación a los meses anteriormente mencionados.

Caracterización oceanográfica del sistema

La evolución temporal de la estructura vertical de la columna de agua en cuanto temperatura, salinidad y oxígeno disuelto muestra cambios consistentes con distintas estaciones del año (Fig. 6). La columna de agua se presenta más oxigenada en julio, agosto y septiembre, con concentraciones $> 1 \text{ mL L}^{-1}$ de oxígeno desde la superficie hasta alrededor de los 60 m de profundidad, mientras que entre octubre y mayo hay una columna de agua dominada por bajas concentraciones de oxígeno disuelto ($0,5 - 1 \text{ mL L}^{-1}$) entre los 20 y 30 m de profundidad. En la columna se observan aguas con temperaturas de alrededor de 11°C extendiéndose por debajo de la termoclina (20 m de profundidad) hasta alrededor de los 80 m de profundidad durante gran parte del año. Entre octubre y febrero se observa la aparición de aguas más frías ($10,5 - 9,5^\circ\text{C}$) a partir de los 20 m de profundidad (enero 2008) y los 60 m de profundidad (noviembre y diciembre 2008). Entre enero de 2007 y octubre de 2008 predominan aguas de 34 psu de salinidad, mientras que entre septiembre 2008 y mayo 2009 predominan aguas de mayor salinidad (34.5 – 34.6 psu).

La caracterización de las masas de aguas presentes en la zona de estudio se basó en sus propiedades conservativas (Open University 1995) usando temperatura, salinidad y oxígeno. Los diagramas T-S-O (Fig. 7 y 8) muestran la presencia de aguas mezcladas con características principalmente de masas de Aguas Ecuatoriales Subsuperficiales (ESSW) y Aguas Subantárticas (SAAW). Durante agosto y septiembre 2008 se observa la presencia de aguas de menor salinidad en superficie, influenciadas por las descargas de los ríos, mientras que en febrero y diciembre 2008 se observan aguas más cálidas, influenciadas por Aguas Subtropicales (STW).

La serie de tiempo correspondiente a surgencia-subsidencia presenta un índice de surgencia positivo (surgencia) en 67.9% de los días registrados, mientras que el 32.1% restante presentó valores negativos (subsidencia: Fig. 9). El promedio de la serie de

tiempo diaria fue $9.669041e-06$ m/s dentro de un rango entre -0.000242 y 0.000133 m s⁻¹. Un análisis mensual de la serie de tiempo (Fig. 9b), sumando todos los valores diarios, revela un predominio de surgencia ($\sum M_i > 0$), y sólo julio 2007, octubre 2007, julio 2008 y agosto 2008 presentaron subsidencia.

Cambios comunitarios y variables oceanográficas

Usando las variables descritas en la Tabla 2 y la matriz de distancia de Bray-Curtis el ARbd explica un 50.3% de la varianza entre las muestras de comunidades del sulfureto; también indica que algunas variables poseen información redundante, por lo que se obtuvo un subconjunto de las variables oceanográficas que explican un mayor porcentaje de la varianza utilizando ambos criterios, es decir, Akaike y el ajuste de R^2 (Tabla 4). El subconjunto de variables seleccionadas fueron (1) salinidad a 79 m de profundidad, correspondiente al mes de muestreo; (2) profundidad del oxígeno disuelto = 1 mL L^{-1} ; y (3) la profundidad de cada sitio de muestreo, que colectivamente explican el 42,4% de la varianza (Fig. 10). Akaike selecciona una cuarta variable, cualquiera de las restantes, y aumenta a 50.3%, no así el ajuste de R^2 (Fig. 11). En la figura 12 se describe un resumen de la interacción de las variables oceanográficas en las comunidades de bacterias.

DISCUSIÓN

Las comunidades bacterianas del Sulfureto de Humboldt presentan altos valores de diversidad y riqueza de especies al contrastarlos con la síntesis realizada por Zinger et al. (2011)—basada en los datos recopilados en el programa ICoMM—usando 72 muestras de comunidades bacterianas del bentos costero de distintas partes del mundo. Los datos correspondientes a sistemas bentónicos revisados en esta síntesis muestran una menor diversidad ($D=143.2 \pm 111.54$) que los obtenidos para el Sulfureto de Humboldt en este estudio ($D= 199.45 \pm 74.31$). Por otra parte, los valores de riqueza en las comunidades bentónicas analizadas en la síntesis de Zinger *et al.* (2011) alcanzan una riqueza de 59,000 OTUs, mientras que en el Sulfureto de Humboldt con sólo 16 muestras obtuvimos una riqueza de 15,398 OTUs. La riqueza observada de OTUs descrita en este

estudio podría aumentar si aumentamos el esfuerzo de muestreo y secuenciación, sobre todo al recolectar más muestras a lo largo del año, ya que existen diferencias temporales en la diversidad y riqueza de OTUs. Estudios globales de la riqueza bacteriana han encontrado gradientes latitudinales en la riqueza de especies bacterianas y diferencias en riqueza de especies al comparar ambos hemisferios (Sul et al. 2013). La idea de que existe cierto grado de endemismo en la distribución de los taxones bacterianos, como sucede en macro-organismos, tiene sus detractores. En el estudio realizado por Gibbons et al. (2013), se sugiere que aumentando el esfuerzo de muestreo y secuenciación se podría encontrar todas las bacterias existentes en los océanos en cualquier sitio, afirmando la existencia de un banco de semillas bacterianas común para todo el mundo, estando éstas en todas partes, como plantea tempranamente Baas-Becking en 1925.

La fuerte correlación entre los OTUs y las distancias basadas en abundancia (Bray-Curtis) y presencia-ausencia (Jaccard) evidencia cambios en las comunidades tanto en abundancia como en recambio de OTUs bacterianos. Este análisis permite demostrar que OTUs de baja abundancia no afectan el patrón observado en las muestras de las comunidades bacterianas. Al evaluar la estructura comunitaria y sus cambios en las dimensiones espacial y temporal, sólo encontramos diferencias significativas entre las comunidades bacterianas pertenecientes a distinto mes de muestreo. Las comunidades bacterianas que presentan mayores diferencias con el resto fueron las recolectadas durante septiembre (Fig 4). Este patrón se observó también al usar la clasificación taxonómica a nivel de filo obtenida por el procedimiento GAST. Al analizar los filos con mayor presencia en la muestra, observamos que en septiembre se produce una disminución en la abundancia relativa de Bacteroidetes; en contraste, la abundancia relativa del filo Actinobacteria aumenta. Las especies del phylum Bacteroidetes presentan adaptaciones que le permiten degradar complejos polímeros de materia orgánica (Bauer et al. 2006), son típicamente encontradas en sustratos enriquecidos en materia orgánica (DeLong et al. 1993, Rath et al. 1998) y asociados a blooms de fitoplancton (Fandino et al. 2005, Fandino et al. 2001), por otra parte el filo Actinobacteria está formado por bacterias abundantes en sedimentos (Bull et al. 2005) de metabolismo desde aeróbico hasta anaeróbico facultativo (Hogg 2005).

Las dinámicas oceanográficas del SCH presentan procesos altamente estacionales (Ahumada y Chuecas 1979, Shaffer et al. 1999, Sobarzo et al. 2007). Durante los muestreos se recolectaron muestras bentónicas en períodos donde dominan distintas masas de agua, por lo que una porción de la variabilidad observada en las comunidades bacterianas se encuentra relacionada a cambios oceanográficos. Consistente con lo descrito en la literatura (Robinson y Brink 1998, Sobarzo et al. 2007), durante el período de surgencias, vientos sur-suroeste favorecen la intrusión y afloramiento de Aguas Ecuatoriales Sub-superficiales ricas en nutrientes y pobres en oxígeno, mientras que durante el período otoño-invierno, los vientos cambian y comienza el predominio de vientos provenientes del norte-noreste, favoreciendo la profundización de aguas someras (subsistencia) y aumentando la presencia de Aguas Intermedias Antárticas, ricas en oxígeno y de baja salinidad (Schneider et al. 2003). En efecto, durante agosto y septiembre de 2008 (fecha en la que comienzan a soplar vientos favorables a la surgencia) se observa una disminución en la salinidad en las capas superficiales de la columna, sin embargo se registraron valores altos de salinidad en profundidad, asociados a la influencia de Aguas Ecuatoriales Sub-superficiales.

El análisis de redundancia basado en distancia ha sido propuesto como un método conveniente para evaluar los patrones microbiológicos usando variables ambientales (Ramette 2007). Éste análisis, en conjunto con el uso de criterios de selección de modelos (Akaike y R^2), nos permitieron converger en las variables que explican mejor los cambios en la estructura de las comunidades bacterianas. A partir de las 15 variables ambientales, se seleccionó salinidad a 79 m, profundidad donde el oxígeno disuelto = 1 mL L⁻¹ (ambas propiedades específicas de masas de aguas) y la profundidad de la estación de muestro (relacionada con la ubicación geográfica—batimétrica—de donde fue colectada la muestra), las que explicaron un 42.4% de la variación. La elección de una cuarta variable, sugerida sólo usando Akaike, tuvo poco sentido ya que cualquier variable seleccionada aumentaba en la misma medida la explicación del modelo. La porción de la variancia no explicada (57.6 %), podría explicarse por interacciones de tipo biológicas, las que podrían generar un patrón más complejo y difícil de dilucidar

(Bakus 2007), tales como cambios estacionales en la producción primaria (Letelier et al. 2009) o variaciones en la biomasa de bacterias bentónicas formadoras de tapices presentes en el Sulfureto de Humboldt, las que sostienen complejas comunidades microbianas (Gallardo et al. 2013). Diferencias en las estructuras comunitarias pueden deberse a varios factores, Agogué et al. (2011) encontraron una asociación específica entre taxón y masa de agua, por su parte Yoshida et al. (2008) encontraron diferencias estacionales asociadas presumiblemente a cambios en la disponibilidad de nutrientes y Ulloa et al. (2012) encontró diferencias en el metabolismo comunitario asociado en bacterias pelágicas, asociadas a la influencia de al oxígeno disuelto. En aguas dulces se han realizado estudios sobre cambios en la estructura de las comunidades bacterianas, donde éstas han presentado cambios en su estructura vertical debido a cambios en oxígeno disuelto (García et al. 2013, Martínez-Alonso et al. 2008, Rotaru et al. 2012).

CONCLUSIONES

Las comunidades de bacterias bentónicas del Sulfureto de Humboldt, estudiadas mediante el uso de técnicas moleculares, reveló una comunidad rica en especies y gran diversidad que cambia estacionalmente debido a procesos oceanográficos. La respuesta de las comunidades frente a cambios oceanográficos fue observada utilizando OTUs, éstos cambian tanto en abundancia como en presencia-ausencia entre las muestras, revelando diferencias en la estructura de las comunidades sólo en la dimensión tiempo, siendo septiembre el mes que más se diferenció del resto. Usando asignación taxonómica al nivel de filo, Bacteroidetes y Actinobacteria fueron los filos que presentaron mayores cambios al comparar septiembre con el resto de los meses muestreados. Finalmente, se observó que la marcada estacionalidad del Sistema de Corrientes de Humboldt produce variaciones en la estructura de las comunidades bacterianas, las que responden principalmente a cambios en la salinidad, al oxígeno disuelto en la columna de agua y la profundidad de la cual se recolectaron las muestras bentónicas.

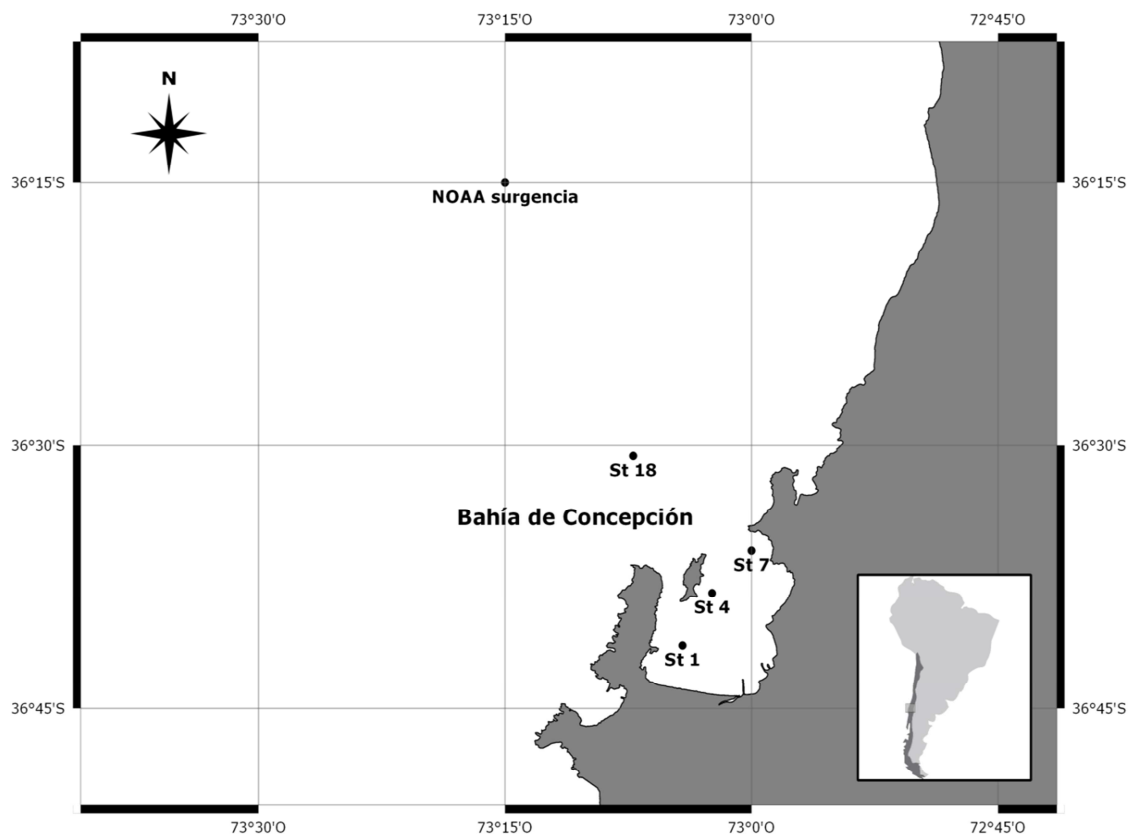


Figura N° 1: Sitios de muestreo. Se extrajeron muestras bentónicas y datos de surgencia, desde la base de datos del NOAA, en la Bahía de Concepción y plataforma continental adyacente, Región del Biobío, Chile.

Tabla N° 1: Información asociada a los muestreos

Sitio	Fecha	Lat. S	Long. W	Profundidad	Total V6 pyrotags	Actino V6 pyrotag
Estación 1	Diciembre 2007	36.69°	73.07°	12m	11166	172
Estación 1	Abril 2008	36.69°	73.07°	12m	38348	307
Estación 1	Septiembre 2008	36.69°	73.07°	12m	18140	716
Estación 1	Enero 2009	36.69°	73.07°	12m	9713	79
Estación 4	Diciembre 2007	36.64°	73.04°	25m	11414	154
Estación 4	Abril 2008	36.64°	73.04°	25m	28067	450
Estación 4	Septiembre 2008	36.64°	73.04°	25m	15099	794
Estación 4	Enero 2009	36.64°	73.04°	25m	12427	28
Estación 7	Diciembre 2007	36.60°	73.00°	35m	20225	387
Estación 7	Abril 2008	36.60°	73.00°	35m	23890	369
Estación 7	Septiembre 2008	36.60°	73.00°	35m	13437	1096
Estación 7	Enero 2009	36.60°	73.00°	35m	13497	67
Estación 18	Diciembre 2007	36.51°	73.12°	88m	24461	207
Estación 18	Abril 2008	36.51°	73.12°	88m	15438	1426
Estación 18	Septiembre 2008	36.51°	73.12°	88m	19044	1849
Estación 18	Enero 2009	36.51°	73.12°	88m	22854	117

Las designaciones de las Estaciones de muestreos corresponden a los números asignados durante la Expedición Thioploca-Chile 1994, organizada por el Prof. V.A. Gallardo, números que han sido utilizados posteriormente en muchos seminarios de título, tesis de postgrado y la serie de tiempo COPAS (Gallardo et al. en prensa).

Tabla N° 2: Variables oceanográficas

Mensuales (CTD en t0	18 de Diciembre 2007	26 de Marzo 2008	23 de Septiembre 2008	09 de Enero 2009
Oxígeno disuelto (ml/L)	0.18	0.17	0.26	0.10
Temperatura (°C)	9.62	11.04	10.57	10.55
Salinidad (psu)	34.54	34.57	34.59	34.56
Densidad (kg/m3)	1026.66	1026.43	1026.54	1026.51
Prof. de Oxígeno =1ml/L	23.35	38.84	43.47	32.00
Mensuales (CTD ent-1)	21 de Noviembre 2007	29 de Febrero 2008	19 de Agosto 2008	16 de Diciembre 2008
Oxígeno disuelto (ml/L)	0.39	0.13	0.74	0.13
Temperatura (°C)	9.20	10.81	10.91	10.85
Salinidad (psu)	34.52	34.53	34.49	34.56
Densidad (kg/m3)	1026.71	1026.44	1026.39	1026.46
Prof. de Oxígeno=1ml/L	30.98	58.33	72.57	23.43
Surgencia NOAA (m/s)	18 de Diciembre 2007	26 de Marzo 2008	23 de Septiembre 2008	09 de Enero 2009
Primera semana previa	1.55E-04	-2.92E-05	-3.21E-06	1.26E-04
Segunda semana previa	-1.49E-05	1.34E-04	-3.21E-06	3.44E-04
Tercera semana previa	7.68E-05	8.21E-05	-3.21E-06	2.28E-04
Cuarta semana previa	1.54E-04	6.93E-05	-3.21E-06	3.91E-04
Espaciales	ST1	ST4	ST7	St18
Profundidad (m)	12	25	35	88

Las mediciones de oxígeno disuelto, temperatura, salinidad y densidad corresponden a valores registrados a 79 m de profundidad; prof. del oxígeno = 1 mL L⁻¹, corresponde a la profundidad donde la concentración de oxígeno es 1 mL L⁻¹. La surgencia se evaluó usando valores semanales para la primera, segunda, tercera y cuarta semana que precedieron al muestreo.

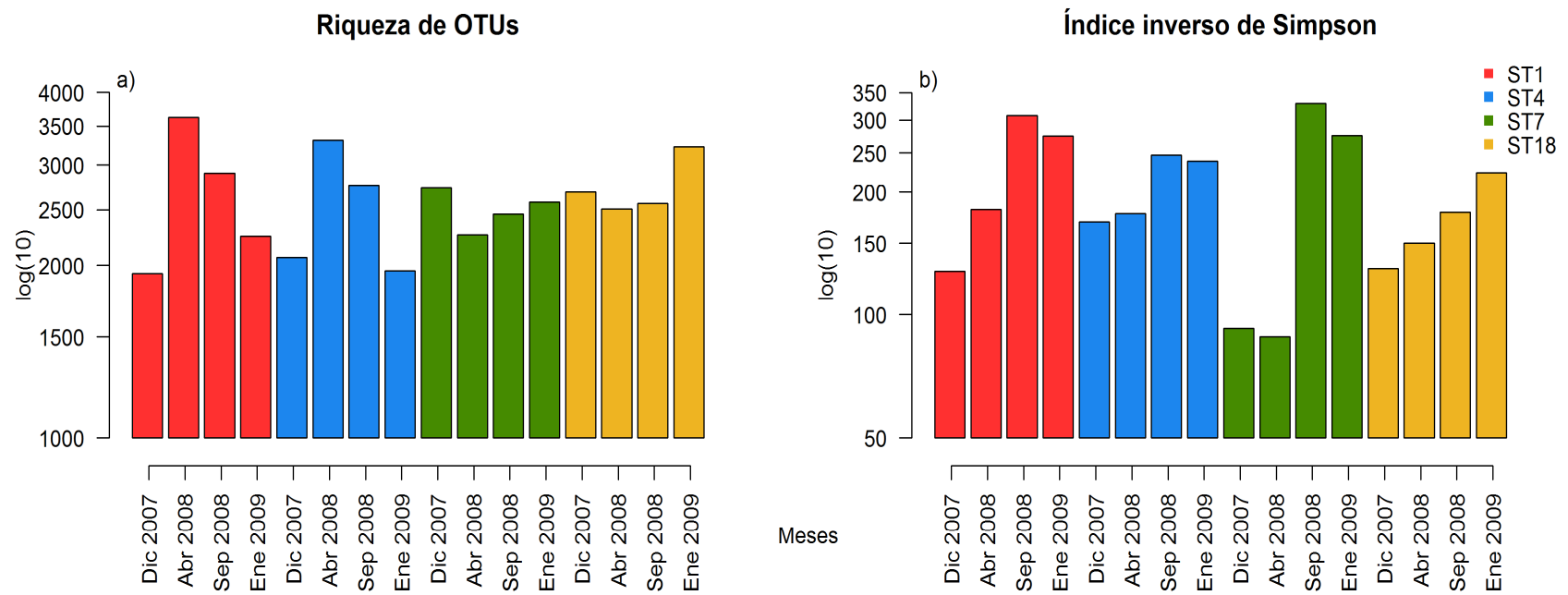


Figura N° 2: Diversidad y Riqueza. Riqueza y diversidad de OTUs para cada muestra. Los colores representan a los sitios de muestreo, rojo para la estación 1; azul para la estación 4; verde para la estación 7 y amarillo para la estación 18. El eje y, presenta valores de la riqueza y diversidad de OTUs según corresponde.

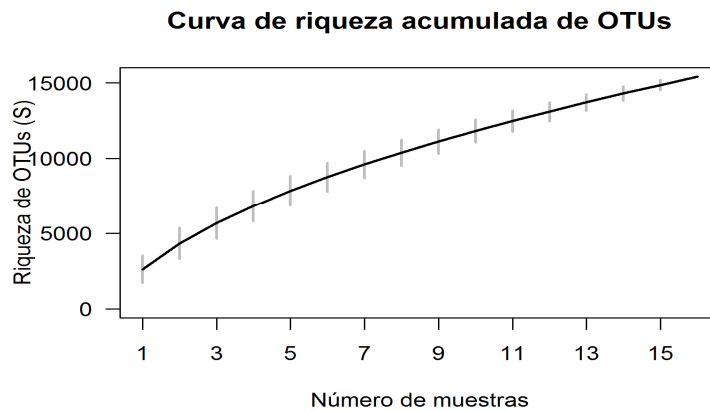


Figura N° 3: Curva de riqueza acumulada de OTUs. Riqueza de OTUs acumulada usando las 16 muestras en orden aleatorio. Líneas grises corresponde a los intervalos de confianza de 95%.

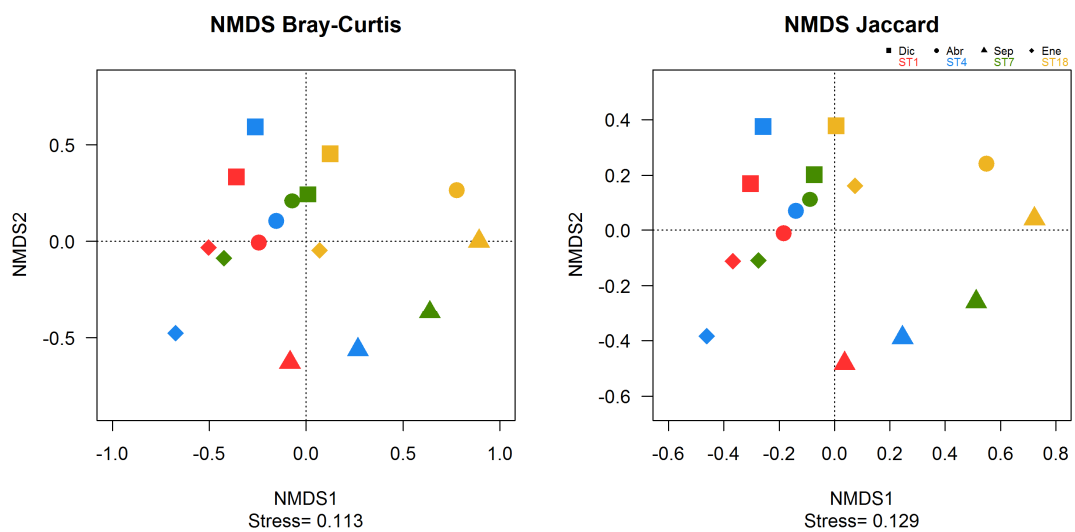


Figura N° 4: NMDS basado en abundancia y presencia-ausencia. Figuras presenta el ordenamiento basado en abundancia (Fig. 4a) y presencia-ausencia (Fig. 4b). Colores representan a los sitios de muestreo, rojo para la estación 1; azul para la estación 4; verde para la estación 7 y amarillo para la estación 18, y las figuras representan a los meses muestreados, cuadrados para Diciembre del 2007; círculos para Abril del 2008; triángulos para Septiembre del 2008 y rombos para Enero del 2009.

Tabla 3: Riqueza esperada de OTUs.

Muestra	Tipo de estimación	Modelo	S observada	S esperada	ES
ST1 Dic	Sin descuento	ThreeMixedExp	1932	6585.4	534.7
	Con descuento	TwoMixedExp	708	889.2	71.8
ST1 Abr	Sin descuento	FourMixedExp	3605	13435.1	2232.2
	Con descuento	ThreeMixedExp	2128	2954.7	488.4
ST1 Sep	Sin descuento	FourMixedExp	2897	7722.4	3122.9
	Con descuento	ThreeMixedExp	2374	4160.3	1681.3
ST1 Ene	Sin descuento	FourMixedExp	2248	11203.4	3257.6
	Con descuento	ThreeMixedExp	1175	1819.8	529.1
ST4 Dic	Sin descuento	ThreeMixedExp	2059	6413.5	483.8
	Con descuento	TwoMixedExp	758	974.9	73.1
ST4 Abr	Sin descuento	FourMixedExp	3301	9746	867.3
	Con descuento	ThreeMixedExp	1745	2299.8	204.1
ST4 Sep	Sin descuento	FourMixedExp	2754	7974.2	782.5
	Con descuento	ThreeMixedExp	1422	1937.3	190
ST4 Ene	Sin descuento	ThreeMixedExp	1947	7926.1	1804.3
	Con descuento	TwoMixedExp	1087	1628.6	368.6
ST7 Dic	Sin descuento	FourMixedExp	2722	10968.9	1948
	Con descuento	ThreeMixedExp	1440	2107.4	373.1
ST7 Abr	Sin descuento	FourMixedExp	2253	7564.3	1296.1
	Con descuento	ThreeMixedExp	1209	1737	296.6
ST7 Sep	Sin descuento	FourMixedExp	2253	7564.3	1296.1
	Con descuento	ThreeMixedExp	1209	1737	296.6
ST7 Ene	Sin descuento	ThreeMixedExp	2574	8344.2	533.5
	Con descuento	TwoMixedExp	937	1154.8	73.7
ST18 Dic	Sin descuento	ThreeMixedExp	2662	7720.6	430.4
	Con descuento	TwoMixedExp	1043	1255.6	69
ST18 Abr	Sin descuento	ThreeMixedExp	2497	5693.5	496.2
	Con descuento	TwoMixedExp	1569	2169.1	188.5
ST18 Sep	Sin descuento	ThreeMixedExp	2556	3966.9	89.6
	Con descuento	TwoMixedExp	947	1101.9	24.8
ST18 Ene	Sin descuento	ThreeMixedExp	3205	11337.4	1051.6
	Con descuento	TwoMixedExp	1584	2065.2	190
SH total	Sin descuento	FourMixedExp	15226	46658.3	2615.9

S, riqueza; ES, error estándar de la estimación; Descuento, consiste en un ajuste para disminuir los valores de riqueza observada y esperada para disminuir la inflación producto de errores de secuenciación y OTUs de baja abundancia. TwoMixedExp: Mixture-of-two-exponentials-mixed Poisson, la distribución de la abundancia estocástica

(de los conteos de frecuencia) es una mezcla de dos exponenciales, y la distribución mixta de Poisson es entonces una mezcla de dos geometrías. `ThreeMixedExp: Mixture-of-three-exponentials-mixed Poisson`, la distribución de la abundancia estocástica (de los conteos de frecuencia) es una mezcla de tres exponenciales, y la distribución mixta de Poisson es entonces una mezcla de tres geometrías. `FourMixedExp: Mixture-of-four-exponentials-mixed Poisson`, la distribución de la abundancia estocástica (de los conteos de frecuencia) es una mezcla de cuatro exponenciales, y la distribución mixta de Poisson es entonces una mezcla de cuatro geometrías.

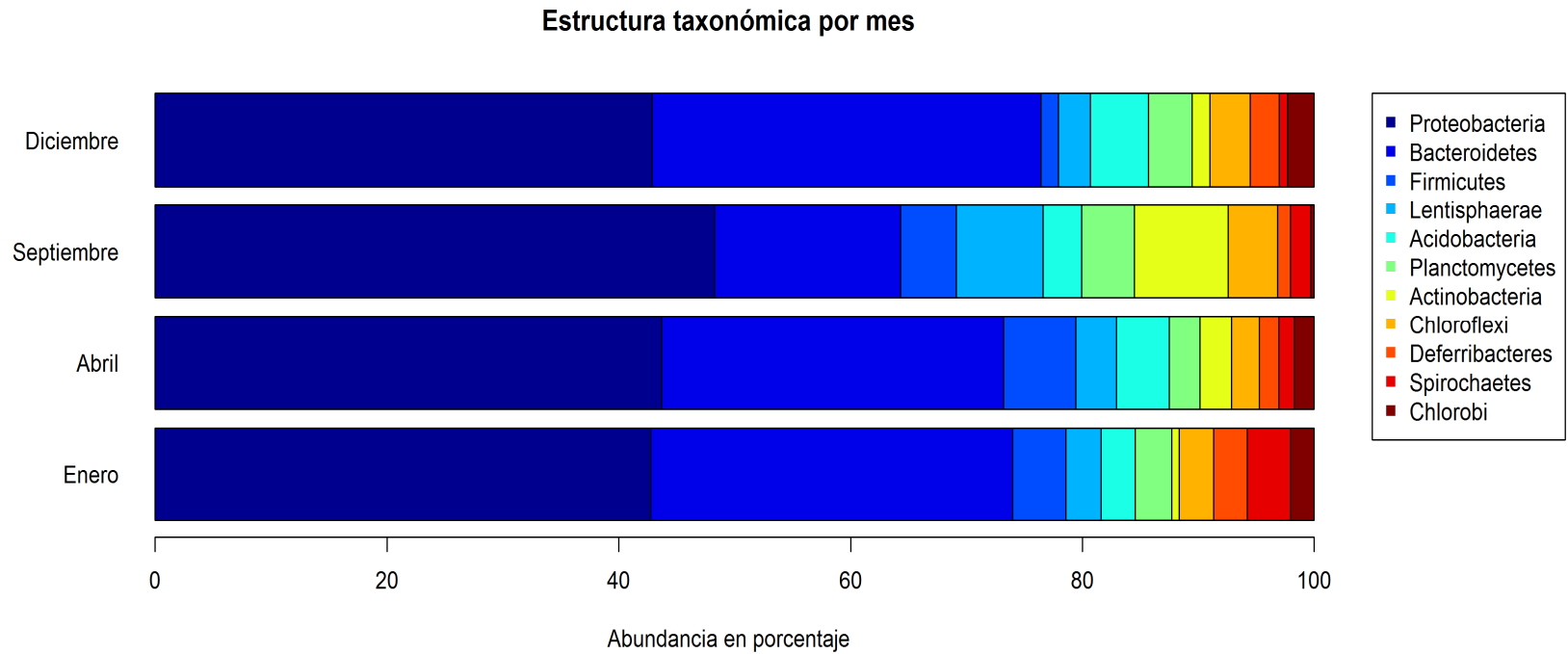


Figura N° 5: Estructura taxonómica de las comunidades bacterianas del Sulfureto de Humboldt. Estructura de la comunidad bacteriana representada usando la abundancia porcentual de los filos con abundancia > 1% al sumar las 16 muestras.

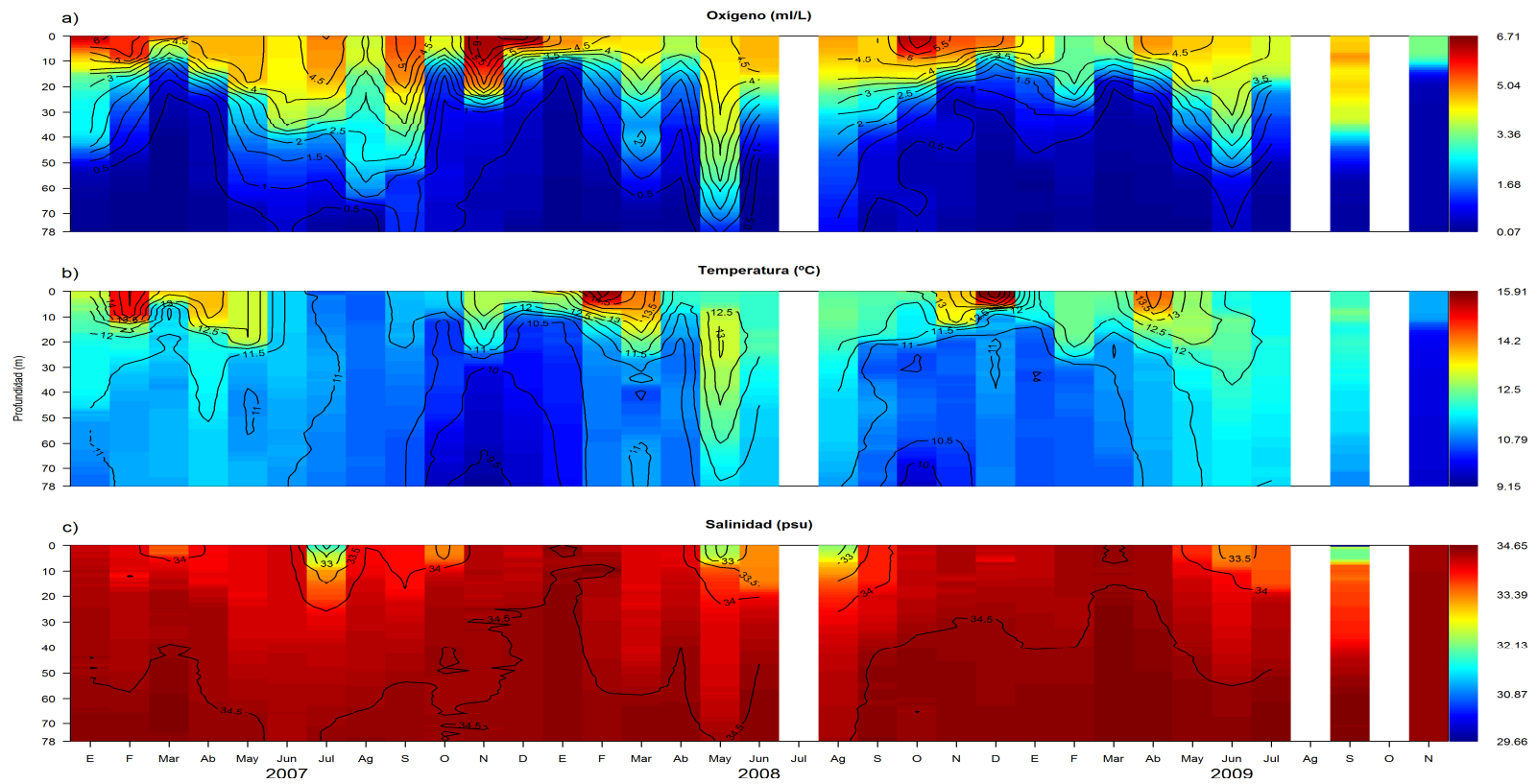


Figura N° 6: Evolución temporal de la estructura vertical del oxígeno, temperatura y salinidad. Datos oceanográficos provienen de la serie de tiempo de registrada en la Estación 18 por el centro oceanográfico COPAS. La data de agosto del 2008 fue reemplazado el promedio de los agostos de 2002, 2004, 2005 y 2006.

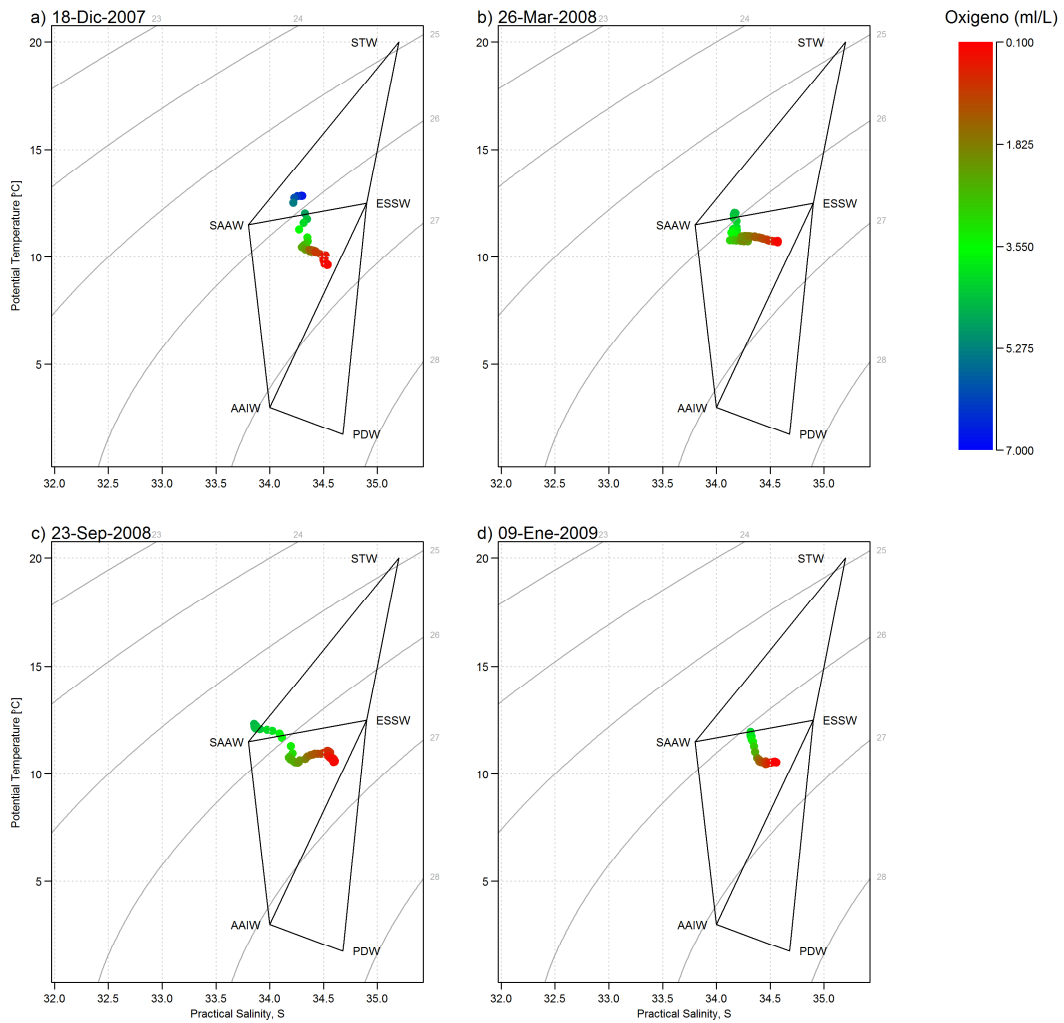


Figura N° 7: Diagramas T-S-O fecha más cercana al muestreo. Datos oceanográficos provienen de la serie de tiempo de registrada en la Estación 18 por el centro oceanográfico COPAS. Se utilizó la técnica de triángulos de mezcla y la descripción de las masas de agua de Silva et al. (2009) para caracterizar las masas de agua presentes en la fecha más cercana a cada muestreo bentónico.

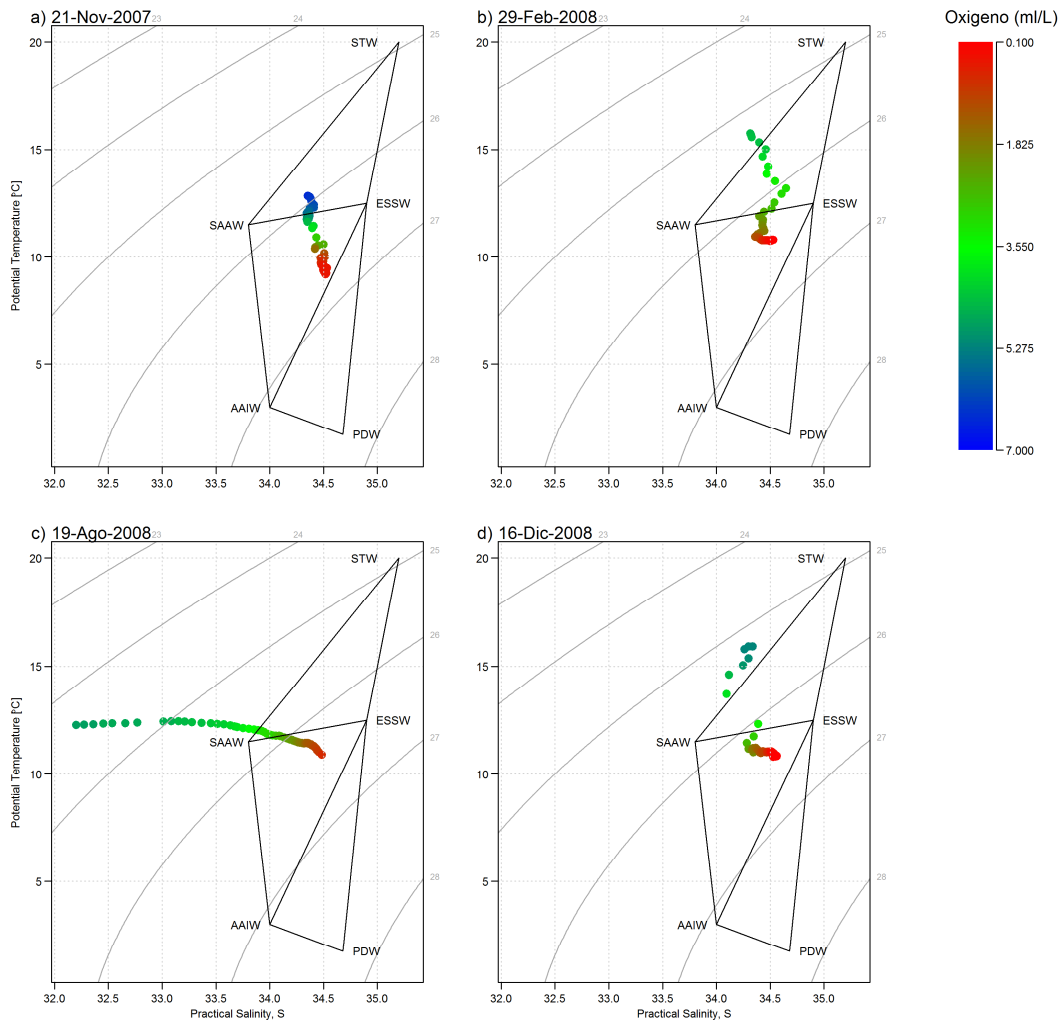


Figura N° 8: Diagramas T-S-O un mes antes de la fecha más cercana al muestreo.

Datos oceanográficos provienen de la serie de tiempo de registrada en la Estación 18 por el centro oceanográfico COPAS. Se utilizó la técnica de triángulos de mezcla y la descripción de las masas de agua de Silva et al. (2009) para caracterizar las masas de agua presentes aproximadamente un mes antes de cada muestreo bentónico.

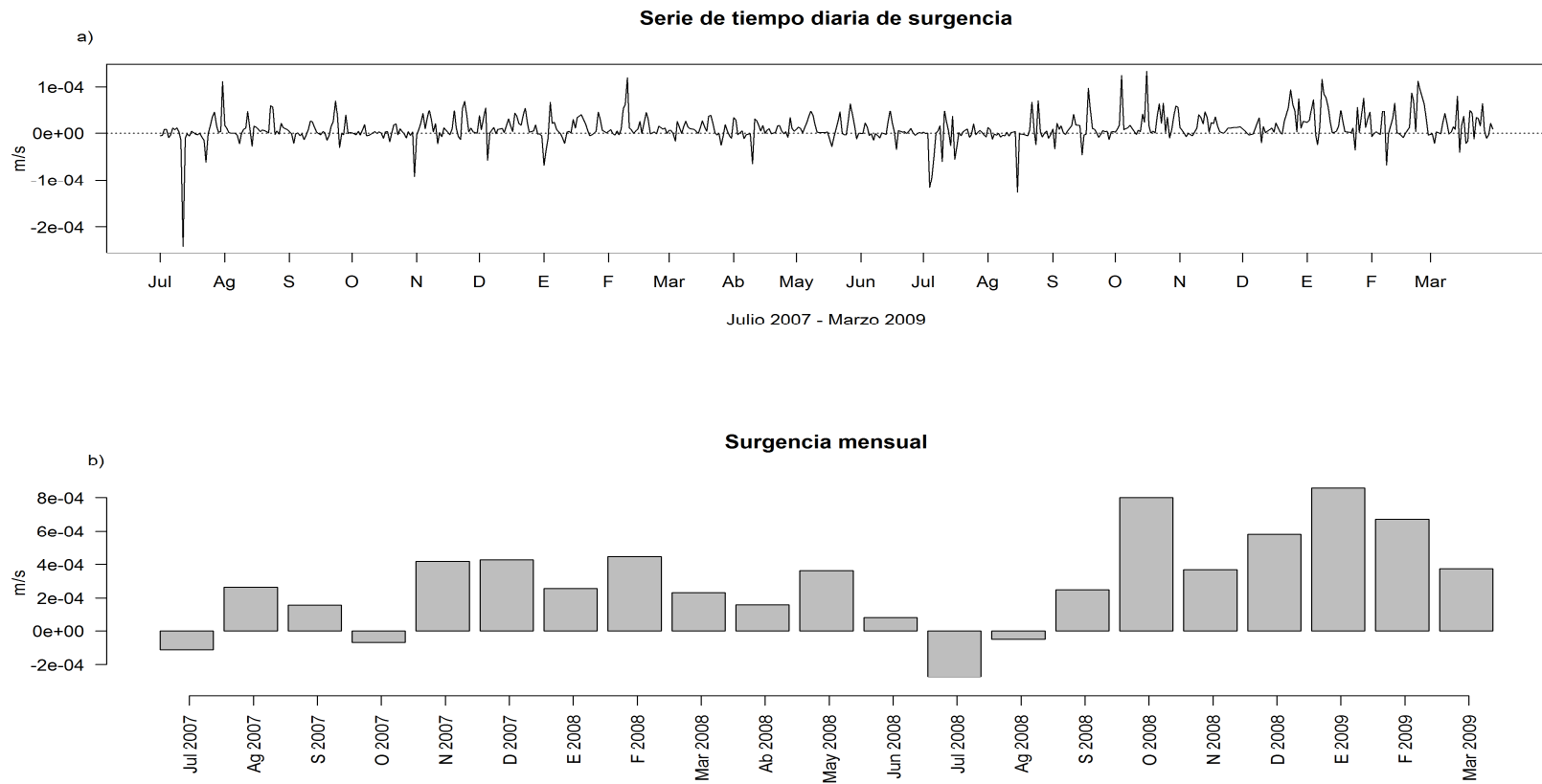


Figura N° 9: Serie de tiempo diaria y mensual de surgencia basada en datos del NOAA (36.25°S y 73.25°O). Figura presenta serie de tiempo diaria (Fig. 9a) y de valores diarios acumulados por mes (Fig. 9b).

Tabla N 4: Selección de variables oceanográficas basado en AIC y R² para optimizar ARbd.

a)

Variables	Paso 1: BC ~			Valor p (AIC)
	AIC	R ²		
Salinidad t ₀	19.64	0.1001389	0.0016	**
Oxígeno t ₀	19.893	0.08576521	0.0038	**
Prof. Oxígeno=1ml/L t ₋₁	19.895	0.08566349	0.0042	**
Salinidad t ₋₁	19.971	0.0813497	0.0058	**
Surgencia Semana -4	20.014	0.07883013	0.0061	**
Oxígeno t ₋₁	20.05	0.07675655	0.0077	**
Surgencia Semana -3	20.042	0.07724067	0.0081	**
Prof. Oxígeno=1ml/L t ₀	20.106	0.07352454	0.0094	**
Profundidad	20.283	0.06324271	0.0188	*
Densidad t ₋₁	20.349	0.05936993	0.0236	*
Surgencia Semana -2	20.48	0.05163738	0.0369	*
Surgencia Semana -1	20.625	0.04296901	0.0503	.
Temperatura t ₋₁	20.589	0.04516787	0.0504	.
Temperatura t ₀	21.294	0.00210988	0.382	
Densidad t ₀	21.442	-0.00715617	0.5655	

b)

Variables	Paso 2: BC ~ Salinidad t ₀ +			Valor p (AIC)
	AIC	R ²		
Prof. Oxígeno=1ml/L t ₋₁	18.768	0.1901626	0.0012	**
Surgencia Semana -4	18.886	0.1841678	0.0037	**
Profundidad	19.046	0.1759494	0.0052	**
Surgencia Semana -3	19.195	0.1682408	0.0101	*
Surgencia Semana -1	19.202	0.1678806	0.0112	*
Surgencia Semana -2	19.373	0.1589326	0.0184	*
Salinidad t ₋₁	19.568	0.1486233	0.0369	*
Oxígeno t ₀	19.576	0.1482196	0.0373	*
Temperatura t ₋₁	19.711	0.1409686	0.0551	.
Densidad t ₋₁	19.75	0.1388714	0.0591	.
Prof. Oxígeno=1ml/L t ₀	19.842	0.1339112	0.0827	.
Oxígeno t ₋₁	20.057	0.1222241	0.1524	
Temperatura t ₀	20.094	0.1201865	0.1679	
Densidad t ₀	20.093	0.1202451	0.1698	

c)

Paso 2: BC ~ Salinidad t_0 + Prof. Oxígeno= $1 \text{ mL L}^{-1} t_1$ +				
Variables	AIC	R ²	Valor p (AIC)	
Profundidad	17.61	0.2797927	0.0013	**
Temperatura t_0	18.842	0.2221774	0.0838	.
Surgencia Semana -1	18.842	0.2221774	0.0847	.
Densidad t_1	18.842	0.2221774	0.0851	.
Surgencia Semana -3	18.842	0.2221774	0.0859	.
Oxígeno t_1	18.842	0.2221774	0.0865	.
Surgencia Semana -2	18.842	0.2221774	0.0865	.
Temperatura t_1	18.842	0.2221774	0.088	.
Salinidad t_1	18.842	0.2221774	0.0904	.
Oxígeno t_0	18.842	0.2221774	0.0907	.
Densidad t_0	18.842	0.2221774	0.091	.
Surgencia Semana -4	18.842	0.2221774	0.0911	.
Prof. Oxígeno= $1 \text{ ml/L } t_0$	18.842	0.2221774	0.094	.

d)

Paso 2: BC ~ Salinidad t_0 + Prof. Oxígeno= $1 \text{ mL L}^{-1} t_1$ + Profundidad				
Variables	AIC	R ²	Valor p (AIC)	
Salinidad t_1	17.231	0.322866	0.0464	*
Surgencia Semana -1	17.231	0.322866	0.0474	*
Oxígeno t_0	17.231	0.322866	0.0479	*
Surgencia Semana -4	17.231	0.322866	0.0482	*
Temperatura t_0	17.231	0.322866	0.0489	*
Densidad t_1	17.231	0.322866	0.0489	*
Surgencia Semana -3	17.231	0.322866	0.0492	*
Oxígeno t_1	17.231	0.322866	0.0504	.
Surgencia Semana -2	17.231	0.322866	0.0517	.
Prof. Oxígeno= $1 \text{ ml/L } t_0$	17.231	0.322866	0.0523	.
Temperatura t_1	17.231	0.322866	0.0539	.
Densidad t_0	17.231	0.322866	0.0556	.

Pasos para la estimación de las variables oceanográficas que mejor explican la varianza observada en las muestras. AIC: índice de información de Akaike, R²: ajuste de R cuadrados, Valor p de AIC estimado con 10000 permutaciones, Código de significancia: 0= '***', 0.001= '**', 0.01= '*', 0.05= '.', 0.1= ' ' 1. Filas de color gris son aquellas seleccionadas en cada paso como la variable que más aporta en la explicación del modelo usando ambos criterios.

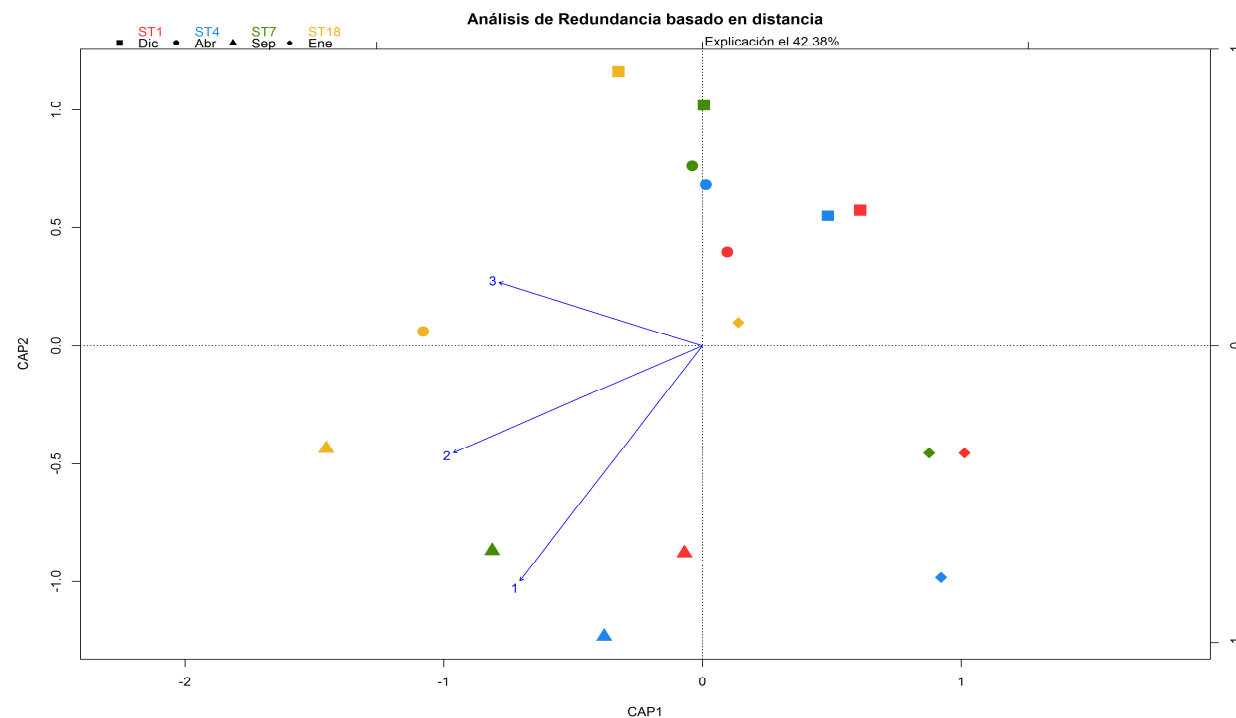


Figura N° 10: ARbd usando las comunidades bacterianas y 4 variables oceanográficas. Ordenamiento basado en la distancia de Bray-Curtis entre las muestras. Cada flecha corresponde a una variable seleccionada utilizando R^2 como criterio para la selección del mejor modelo. Flechas indican en la dirección que diferencian las muestras y la longitud a la intensidad con la que explican éstas diferencias. 1, Salinidad a 79 m en el mes correspondiente al muestreo; 2, Profundidad donde oxígeno =1 mL/L en el mes anterior al muestreo; 3, Profundidad del sitio de muestreo donde se colectó la muestra. Los números de las variables oceanográficas están ordenados según la variación que, dentro del subconjunto de variables seleccionadas como las que forman parte del mejor modelo para explicar los cambios en las comunidades de bacterias bentónicas del Sulfureto de Humboldt.

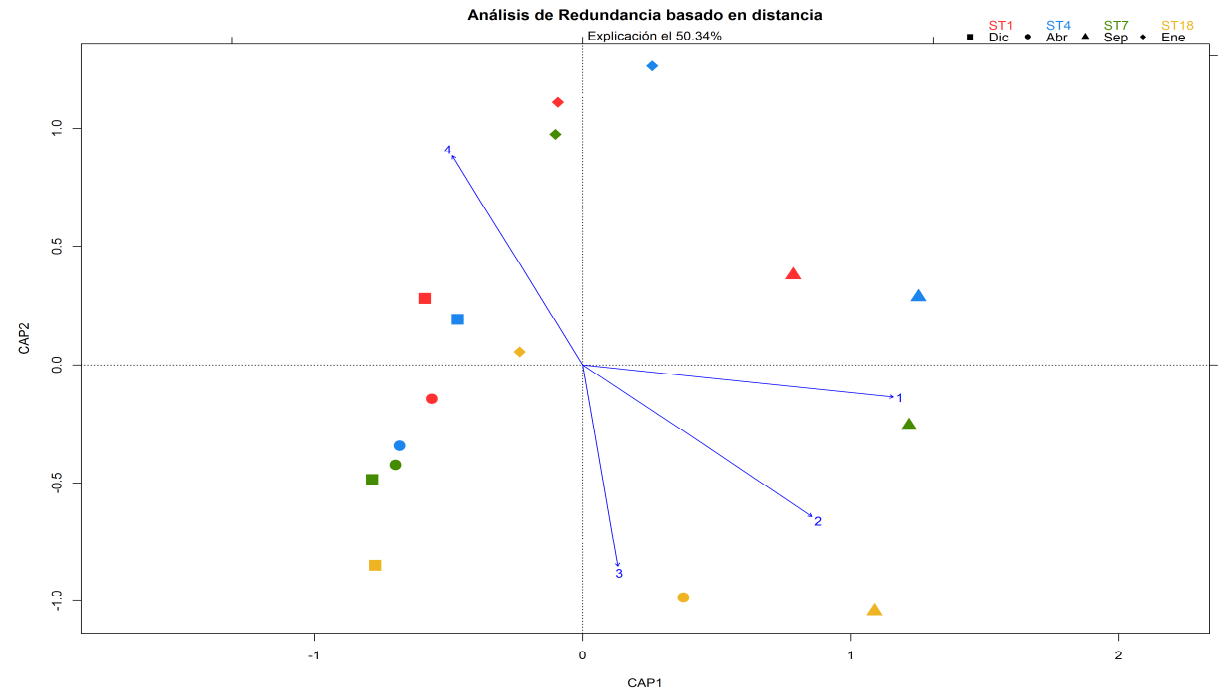


Figura N° 11: ARbd usando las comunidades bacterianas y 3 variables oceanográficas. Ordenamiento basado en la distancia de Bray-Curtis entre las muestras. Cada flecha corresponde a una variable seleccionada utilizando el criterio de información de Akaike para la selección del mejor modelo. Las flechas indican en la dirección que diferencian las muestras y la longitud a la intensidad con la que explican éstas diferencias. 1, Salinidad a 79 m en el mes correspondiente al muestreo; 2, Profundidad donde oxígeno =1mL/L en el mes anterior al muestreo; 3, Profundidad del sitio de muestreo donde se colectó la muestra; 4, Índice de surgencia en la cuarta semana que precede al muestreo. Los números de las variables oceanográficas están ordenados según la variación que, dentro del subconjunto de variables seleccionadas como las que forman parte del mejor modelo para explicar los cambios en las comunidades de bacterias bentónicas del Sulfureto de Humboldt.

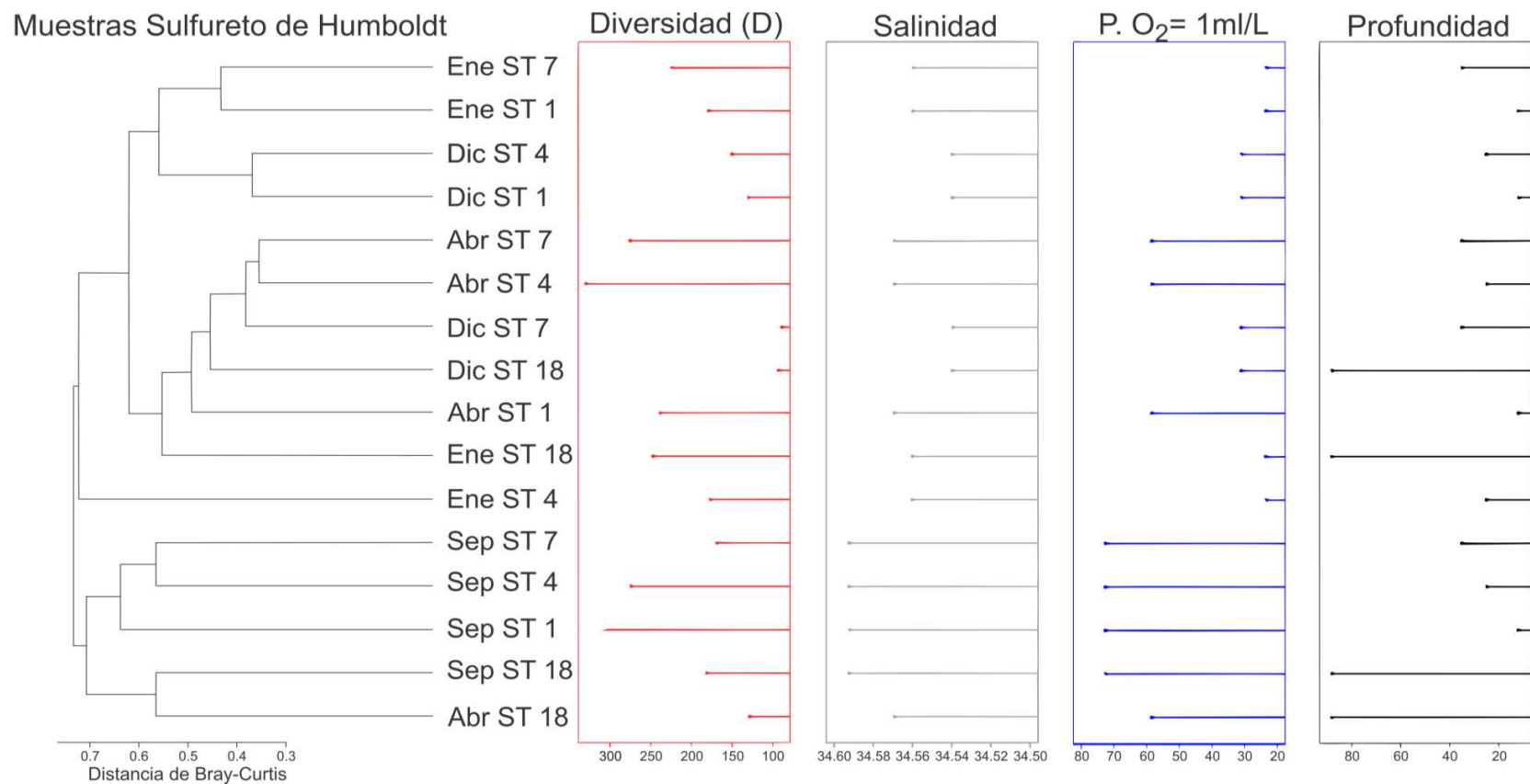


Figura N° 12: Diagrama resumen. Dendrograma, diversidad (índice inverso de Simpson) y variables oceanográficas (79 m de profundidad) que mejor explican los cambios en la estructura comunitaria de las comunidades de bacterias bentónicas del Sulfureto de Humboldt. Los valores de diversidad, salinidad, profundidad a la que la columna de agua presenta 1 mL L⁻¹ de oxígeno disuelto y la profundidad del sitio de muestreo de donde se extrajo cada muestra, se encuentran alineados horizontalmente con el rotulo de la muestra en el dendrograma.

BIBLIOGRAFÍA

- Agogué H, Lamy D, Neal PR, Sogin ML, Herndl GJ (2011) Water mass-specificity of bacterial communities in the North Atlantic revealed by massively parallel sequencing. *Molecular Ecology*, 20: 258-274.
- Ahumada R, Chuecas L (1979) Algunas características hidrográficas de la Bahía Concepción (36°40'S - 73°02'W) y áreas adyacentes, Chile. *Gayana Miscelánea*, 8: 1-56.
- Azam F, Malfatti F (2007) Microbial structuring of marine ecosystems. *Nature reviews Microbiology*, 5: 782-791.
- Baas-Becking L (1925) Studies on the Sulphur Bacteria. *Annals of Botany*, os-39: 613-650.
- Bakus GJ (2007) *Quantitative Analysis of Marine Biological Communities: Field Biology and Environment*. Wiley, New Jersey, USA.
- Bauer M, Kube M, Teeling H, Richter M, Lombardot T, Allers E, Würdemann CA, Quast C, Kuhl H, Knaust F, Woebken D, Bischof K, Mussmann M, Choudhuri JV, Meyer F, Reinhardt R, Amann RI, Glöckner FO (2006) Whole genome analysis of the marine Bacteroidetes 'Gramella forsetii' reveals adaptations to degradation of polymeric organic matter. *Environmental Microbiology*, 8: 2201-2213.
- Bérdy J (2005) Bioactive Microbial Metabolites. *Journal of Antibiotics*, 58: 1-26.
- Bik HM, Porazinska DL, Creer S, Caporaso JG, Knight R, Thomas WK (2012) Sequencing our way towards understanding global eukaryotic biodiversity. *Trends in Ecology & Evolution*, 27: 233-243.

- Blanco JL, Thomas AC, Carr ME, Strub PT (2001) Seasonal climatology of hydrographic conditions in the upwelling region off northern Chile. *Journal of Geophysical Research: Oceans*, 106: 11451-11467.
- Bull AT, Stach JE, Ward AC, Goodfellow M (2005) Marine actinobacteria: perspectives, challenges, future directions. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 87: 65-79.
- Bunge J (2011) Estimating the number of species with CatchAll. *Pacific Symposium on Biocomputing*, 16: 121-130.
- De Wit R, Bouvier T (2006) "Everything is everywhere, but, the environment selects"; what did Baas Becking and Beijerinck really say? *Environmental Microbiology*, 8: 755-758.
- Delong EF, Franks DG, Alldredge AL (1993) Phylogenetic diversity of aggregate-attached vs free-living marine bacterial assemblages. *Limnology and Oceanography*, 38: 924-934.
- Deutschbauer AM, Chivian D, Arkin AP (2006) Genomics for environmental microbiology. *Current Opinion in Biotechnology*, 17: 229-235.
- Dickie IA (2010) Insidious effects of sequencing errors on perceived diversity in molecular surveys. *New Phytologist*, 188: 916-918.
- Fakruddin M, Chowdhury A (2012) Pyrosequencing-An Alternative to Traditional Sanger Sequencing. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*, 8: 14-20.
- Fandino LB, Riemann L, Steward GF, Azam F (2005) Population dynamics of Cytophaga-Flavobacteria during marine phytoplankton blooms analyzed by real-time quantitative PCR. *Aquatic Microbial Ecology*, 40: 251-257.

- Fandino LB, Riemann L, Steward GF, Long RA, Azam F (2001) Variations in bacterial community structure during a dinoflagellate bloom analyzed by DGGE and 16S rDNA sequencing. *Aquatic Microbial Ecology*, 23: 119-130.
- Forde BM, O'Toole PW (2013) Next-generation sequencing technologies and their impact on microbial genomics. In: *Briefings in Functional Genomics*, 1-14.
- Fossing H, Gallardo VA, Jorgensen BB, Huttel M, Nielsen LP, Schulz H, Canfield DE, Forster S, Glud RN, Gundersen JK, Kuver J, Ramsing NB, Teske A, Thamdrup B, Ulloa O (1995) Concentration and transport of nitrate by the mat-forming sulphur bacterium *Thioploca*. *Nature*, 374: 713-715.
- Gallardo VA, Carrasco FD, Roa R, Cañete JI (1995) Ecological patterns in the benthic macrobiota across the continental shelf off central Chile. *Ophelia*, 40: 167-188.
- Gallardo VA, Espinoza C (2007) Large multicellular filamentous bacteria under the oxygen minimum zone of the eastern South Pacific: a forgotten biosphere. *Proc. SPIE 6694, Instruments, Methods, and Missions for Astrobiology X, Proc. of SPIE Vol. 6694 66941H-66941 -66941H66911*.
- Gallardo VA, Fonseca A, Musleh S, Espinoza C (2013) Extrapolations of Standing-Stocks of Big Bacteria in Humboldt Eastern Boundary Current Ecosystem (HEBCE). *Oceanography*, 1:
- Garcia SL, Salka I, Grossart H-P, Warnecke F (2013) Depth-discrete profiles of bacterial communities reveal pronounced spatio-temporal dynamics related to lake stratification. *Environmental Microbiology Reports*, 5: 549-555.
- Gibbons SM, Caporaso JG, Pirrung M, Field D, Knight R, Gilbert JA (2013) Evidence for a persistent microbial seed bank throughout the global ocean. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110: 4651-4655.

- Gihring TM, Green SJ, Schadt CW (2012) Massively parallel rRNA gene sequencing exacerbates the potential for biased community diversity comparisons due to variable library sizes. *Environmental Microbiology*, 14: 285-290.
- Goodfellow M, Fiedler HP (2010) A guide to successful bioprospecting: informed by actinobacterial systematics. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 98: 119-142.
- Hagström Å, Pinhassi J, Zweifel UL (2000) Biogeographical diversity among marine bacterioplankton. *Aquatic Microbial Ecology*, 21: 231-244.
- Hansel CM, Fendorf S, Jardine PM, Francis CA (2008) Changes in Bacterial and Archaeal Community Structure and Functional Diversity along a Geochemically Variable Soil Profile. *Applied and Environmental Microbiology*, 74: 1620-1633.
- Hoffman RN, Leidner SM (2005) An Introduction to the Near-Real-Time QuikSCAT Data. *Weather and Forecasting*, 20: 476-493.
- Hogg S (2005) *Essential Microbiology*. John Wiley & Sons, 456.
- Huse SM, Dethlefsen L, Huber JA, Welch DM, Relman DA, Sogin ML (2008) Exploring Microbial Diversity and Taxonomy Using SSU rRNA Hypervariable Tag Sequencing. *PLoS Genet*, 4: e1000255.
- Huse SM, Huber J, Morrison H, Sogin M, Welch D (2007) Accuracy and quality of massively parallel DNA pyrosequencing. *Genome Biology*, 8: R143.
- Huse SM, Welch DM, Morrison HG, Sogin ML (2010) Ironing out the wrinkles in the rare biosphere through improved OTU clustering. *Environmental Microbiology*, 12: 1889-1898.
- Jacob B, Daneri G, Quinones RA, Sobarzo M (2011) Community metabolism, phytoplankton size structure and heterotrophic prokaryote production in a highly

productive upwelling zone off northern Chile. *Marine Ecology Progress Series*, 430: 23-34.

Jensen PR, Mincer TJ, Williams PG, Fenical W (2005) Marine actinomycete diversity and natural product discovery. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 87: 43-48.

Karl DM (2007) Microbial oceanography: paradigms, processes and promise. *Nature Reviews Microbiology*, 5: 759-769.

Kelley D (2013) oce: Analysis of Oceanographic data. R package version 0.9-12. <http://CRAN.R-project.org/package=oce>.

Kruskal JB (1964) Nonmetric multidimensional scaling: A numerical method. *Psychometrika*, 29: 115-129.

Legendre P, Anderson MJ (1999) Distance-based Redundancy Analysis: Testing Multispecies Responses In Multifactorial Ecological Experiments. *Ecological Monographs*, 69: 1-24.

Letelier J, Pizarro O, Nuñez S (2009) Seasonal variability of coastal upwelling and the upwelling front off central Chile. *Journal of Geophysical Research: Oceans*, 114: C12009.

Mantel N, Valand RS (1970) A Technique of Nonparametric Multivariate Analysis. *Biometrics*, 26: 547-558.

Martínez-Alonso M, Méndez-Álvarez S, Ramírez-Moreno S, González-Toril E, Amils R, Gaju N (2008) Spatial Heterogeneity of Bacterial Populations in Monomictic Lake Estanya (Huesca, Spain). *Microbial Ecology*, 55: 737-750.

- Mincer TJ, Fenical W, Jensen PR (2005) Culture-dependent and culture-independent diversity within the obligate marine actinomycete genus *Salinispora*. *Applied and Environmental Microbiology*, 71: 7019-7028.
- Montero P, Daneri G, Cuevas LA, González HE, Jacob B, Lizárraga L, Menschel E (2007) Productivity cycles in the coastal upwelling area off Concepción: The importance of diatoms and bacterioplankton in the organic carbon flux. *Progress in Oceanography*, 75: 518-530.
- Morgan GB, Lackey JB (1965) Ecology of a sulfuretum in a semi-tropical environment. *Zeitschrift für allgemeine Mikrobiologie*, 5: 237-248.
- National Oceanic and Atmospheric Administration (2013) QuikSCAT Global Ocean Surface Wind Stress and Wind Stress Curl, Science Quality. ERDDAP, Versión 1.46., Disponible en: <http://coastwatch.pfeg.noaa.gov/erddap/griddap/>
- Oksanen J, Blanchet G, Kindt R, Legendre P, Minchin P, O'Hara RB, Simpson G, Solymos P, Stevens H, Wagner H (2012) vegan: Community Ecology Package. R package version 2.0-4. <http://CRAN.R-project.org/package=vegan>.
- Open University (1995) *Seawater, Second Edition: Its Composition, Properties and Behaviour*. Butterworth-Heinemann, Oxford.
- Pedrós-Alió C (2012) The Rare Bacterial Biosphere. *Annual Review of Marine Science*,
- Quince C, Lanzen A, Davenport R, Turnbaugh P (2011) Removing Noise From Pyrosequenced Amplicons. *BMC Bioinformatics*, 12: 38.
- R Core Team (2012) *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, <http://www.R-project.org/>.

- Ramette A (2007) Multivariate analyses in microbial ecology. *FEMS Microbiology Ecology*, 62: 142-160.
- Rath J, Wu KY, Herndl GJ, DeLong EF (1998) High phylogenetic diversity in a marine-snow-associated bacterial assemblage. *Aquatic Microbial Ecology*, 14: 261-269.
- Robinson AR, Brink KH (1998) *The Sea: The global coastal ocean: regional studies and syntheses*. Wiley & Sons, New York, USA.
- Rotaru C, Woodard T, Choi S, Nevin K (2012) Spatial Heterogeneity of Bacterial Communities in Sediments from an Infiltration Basin Receiving Highway Runoff. *Microbial Ecology*, 64: 461-473.
- Schneider W, Fuenzalida R, Rodríguez-Rubio E, Garcés-Vargas J, Bravo L (2003) Characteristics and formation of Eastern South Pacific Intermediate Water. *Geophysical Research Letters*, 30: 1581-1584.
- Shaffer G, Hormazabal S, Pizarro O, Salinas S (1999) Seasonal and interannual variability of currents and temperature off central Chile. *Journal of Geophysical Research C: Oceans*, 104: 29951-29961.
- Silva N, Rojas N, Fedele A (2009) Water masses in the Humboldt Current System: Properties, distribution, and the nitrate deficit as a chemical water mass tracer for Equatorial Subsurface Water off Chile. *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography*, 56: 1004-1020.
- Sobarzo M, Bravo L, Donoso D, Garcés-Vargas J, Schneider W (2007) Coastal upwelling and seasonal cycles that influence the water column over the continental shelf off central Chile. *Progress in Oceanography*, 75: 363-382.

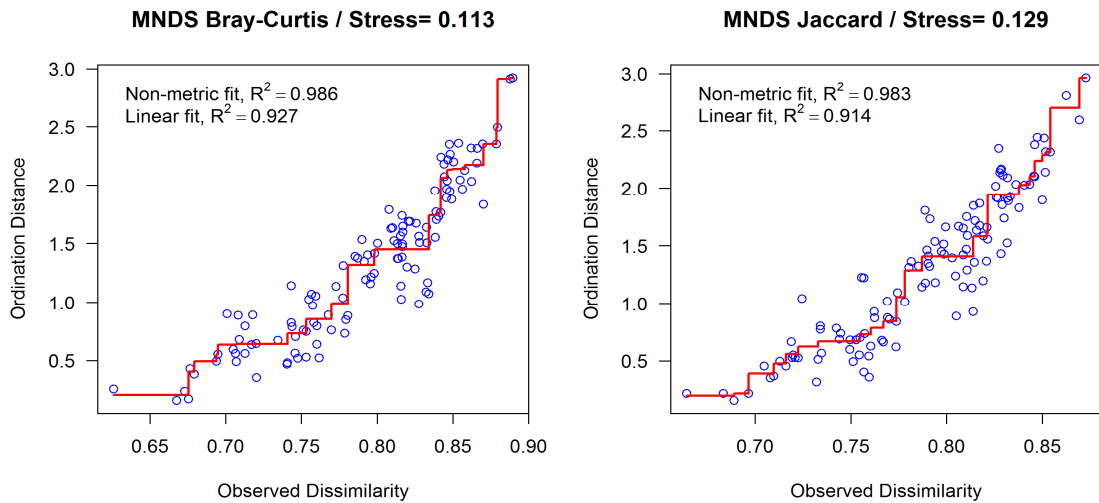
- Sogin ML, Morrison HG, Huber JA, Mark Welch D, Huse SM, Neal PR, Arrieta JM, Herndl GJ (2006) Microbial diversity in the deep sea and the underexplored "rare biosphere". *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103: 12115-12120.
- Stewart F, Sharma A, Bryant J, Eppley J, DeLong E (2011) Community transcriptomics reveals universal patterns of protein sequence conservation in natural microbial communities. *Genome Biology*, 12: R26.
- Sul WJ, Oliver TA, Ducklow HW, Amaral-Zettler LA, Sogin ML (2013) Marine bacteria exhibit a bipolar distribution. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110: 2342-2347.
- Tamaki H, Wright CL, Li X, Lin Q, Hwang C, Wang S, Thimmapuram J, Kamagata Y, Liu W-T (2011) Analysis of 16S rRNA Amplicon Sequencing Options on the Roche/454 Next-Generation Titanium Sequencing Platform. *PLoS ONE*, 6: e25263.
- Ulloa O, Canfield DE, DeLong EF, Letelier RM, Stewart FJ (2012) Microbial oceanography of anoxic oxygen minimum zones. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109: 15996-16003.
- Ward AC, Bora N (2006) Diversity and biogeography of marine actinobacteria. *Curr Opin Microbiol*, 9: 279-286.
- Yoshida A, Seo Y, Suzuki S, Nishino T, Kobayashi T, Hamada-Sato N, Kogure K, Imada C (2008) Actinomycetal Community Structures in Seawater and Freshwater Examined by DGGE Analysis of 16S rRNA Gene Fragments. *Marine Biotechnology*, 10: 554-563.
- Zeileis A, Grothendieck G (2005) zoo: S3 Infrastructure for Regular and Irregular Time Series. *Journal of Statistical Software*, 14: 1-27.

Zhou J, Xia B, Treves DS, Wu L-Y, Marsh TL, O'Neill RV, Palumbo AV, Tiedje JM (2002) Spatial and Resource Factors Influencing High Microbial Diversity in Soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 68: 326-334.

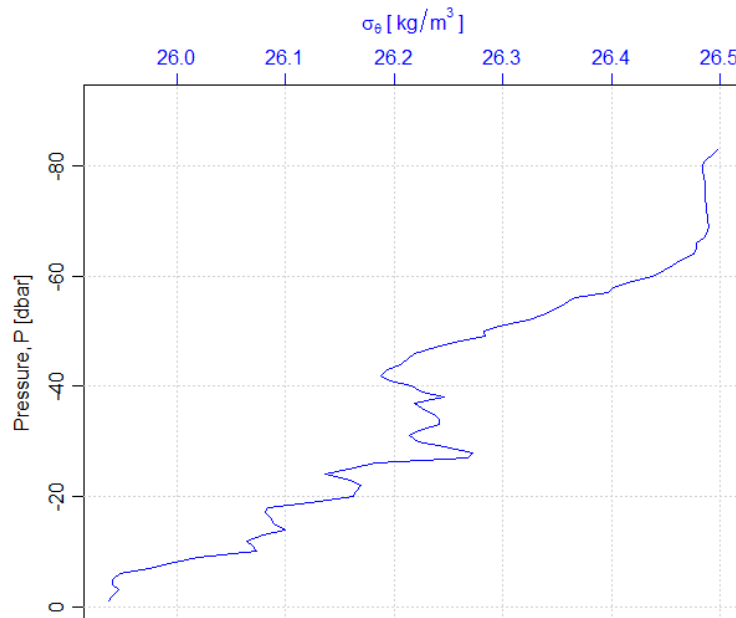
Zinger L, Amaral-Zettler LA, Fuhrman JA, Horner-Devine MC, Huse SM, Welch DBM, Martiny JBH, Sogin M, Boetius A, Ramette A (2011) Global Patterns of Bacterial Beta-Diversity in Seafloor and Seawater Ecosystems. *PLoS ONE*, 6: e24570.

Zopfi J, Böttcher ME, Jørgensen BB (2008) Biogeochemistry of sulfur and iron in Thioploca-colonized surface sediments in the upwelling area off central Chile. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 72: 827-843.

ANEXOS



Anexo N° 1: Grafico del estrés de ajuste en NMDS. Grafico de estrés y ajuste del Escalamiento Multidimensional No-Métrico similitud entre (o disimilitud) calculada usando las comunidades muestreadas. Usando Bray-Curtis (a) y Jaccard (b).



Anexo N° 2: Diagrama de densidad versus profundidad Agosto 2008. Comportamiento anómalo del registro de Agosto 2008.