



UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES
Y OCEANOGRÁFICAS



**Caracterización de la comunidad microbiana de la columna de
agua y sedimentos influenciados por salmonicultura en el**

fiordo Puyuhuapi

Constanza Araceli Vergara Vergara

Seminario de Título presentado al
DEPARTAMENTO DE OCEANOGRAFÍA
DE LA UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN

Para optar al Título de
BIÓLOGA MARINA

Concepción - Chile

2024

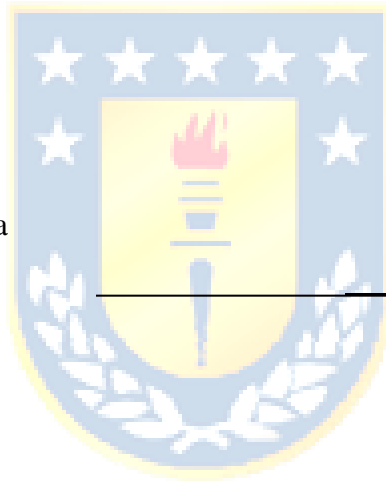
UNIVERSIDAD DE CONCEPCION
DEPARTAMENTO DE OCEANOGRAFIA

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

Profesor(a) Guía

Dr. Marcelo Gutiérrez Astete

Ha sido aprobada por la
Siguiete Comisión
Evaluadora



Dr. Silvio Pantoja Gutiérrez

Dr. (c) Cristóbal Castillo Ilabaca

Jefe de Carrera

Dr. Ariel Valenzuela Saldías

AGRADECIMIENTOS

El culminar esta etapa significativa en mi vida, me ha hecho reflexionar sobre el viaje que me ha llevado hasta aquí. Este recorrido ha estado marcado por innumerables desafíos y vicisitudes, pero también ha estado lleno de aprendizajes, crecimiento personal y momentos de profunda gratitud. En primer lugar, quiero expresar mi sincero agradecimiento a mis padres, hermanos y mi sobrino, Mateo. Su apoyo incondicional y amor ha sido un faro que me ha guiado a través de las tormentas y los días soleados de esta travesía. Su confianza en mí ha sido mi mayor motivación y estoy eternamente agradecida por cada sacrificio que han hecho para verme alcanzar mis metas y por sobre todo mis sueños por más lejanos se vean. A Tomás, quien ha sido mi roca durante este proceso, quiero agradecerle por su paciencia, comprensión y amor inmensurable. Sus palabras de aliento y su presencia constante ha sido un bálsamo en los momentos de duda y fatiga en esta etapa. A mis amigos, Sebas, Javier, Pau, Angela, Diego, Moiko, Cami, Vicho, Valeria y Ángel, quienes han estado a mi lado durante todas las altas y bajas de la vida universitaria, les doy las gracias por ser mi red de apoyo, por las risas compartidas, por los centralazos disfrazados de estudio que no funcionaron y terminaron en risas, anécdotas, los cuales nos permitieron conocernos más, y, además, por ser testigos de mi crecimiento y yo de el de ellos a lo largo de los años. A mi profesor guía, el Dr. Marcelo Gutiérrez, por aceptar guiarme en este proceso, buscando siempre la forma de mejorar, su experiencia y conocimiento fueron invaluable para el desarrollo de mi investigación. A las asistentes de investigación Celeste y Amanda que han colaborado conmigo para el óptimo desarrollo del trabajo en el laboratorio, quiero reconocer su dedicación y compromiso, y por sobre todo a Karina, su inmensurable ayuda, enseñanza y paciencia ante las interrogantes que surgieron en el trabajo de laboratorio ha sido fundamental para el desarrollo de mi investigación y formación profesional, estoy agradecida por su gran contribución. A Cristóbal, quien me orientó y ayudo a resolver dudas que surgieron en el camino con la mejor disposición. Finalmente, quiero expresar mi gratitud al Financiamiento proyecto Fondecyt 1200252 y al Centro de Oceanografía COPAS Coastal FB210021, quienes me permitieron llevar a cabo mi investigación, su invaluable apoyo y disposición de recursos permitieron forjar mi camino hacia la formación profesional.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

ÍNDICE DE FIGURAS	6
ÍNDICE DE TABLAS	9
RESUMEN.....	10
ABSTRACT	11
1. INTRODUCCIÓN	12
1.1.Características de los fiordos	12
1.2. Salmonicultura en fiordos de la Patagonia Chilena	12
1.3.Características de las comunidades microbianas de fiordos	13
2. HIPÓTESIS	16
3. OBJETIVOS	16
4. MATERIALES Y MÉTODOS	17
4.1.Área de estudio y recolección de muestras	17
4.2. Extracción de ADN y secuenciación	19
4.3. Análisis de clorofila, nutrientes y procesamiento de datos hidrográficos de CTD.....	19
4.4.Procesamiento de datos	20
5. RESULTADOS	23
5.1.Variabilidad hidrográfica de la columna de agua en los diferentes periodos de muestreo	23
5.2.Diversidad alfa (α -diversidad) en la columna de agua y sedimentos	27
5.2.1. Índice de diversidad de Shannon y Riqueza estimada por Chao1	27
5.3. Diversidad beta (diversidad β) de la columna de agua y sedimentos.....	37

5.3.1. Análisis de ordenación de escala multidimensional no métrica (NMDS) utilizando Bray-Curtis	37
5.4. Composición de las comunidades procarióticas.....	40
6. DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN.....	47
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura N°1. Ubicación de la concesión Ganso, y ubicación geográfica de las estaciones. E0: 44°44'34.2"S 72°43'56.7"W. E1: 44°44'13"S 72°44'17"W. Ec: 44°39'47"S 72°45'15"W.....	18
Figura N°2. Estructura hidrográfica vertical de temperatura (°C), salinidad (PSU) y oxígeno (mg/L) de los tres periodos de muestreo. Las líneas trazadas de colores representan a las estaciones del periodo (Ec, E0 y E1) en los meses de muestreo, agosto 2022 noviembre 2022 y abril 2023.....	24
Figura N°3. Diversidad alfa (índice de Shannon) dividido por profundidades (2 metros, 20 metros y 50 metros) y estaciones (E0, E1 y Ec). Cuanto mayor los valores del índice de Shannon, mayor diversidad de procariotas en las muestras.....	28
Figura N°4. Diversidad alfa (índice de Shannon) dividido según el periodo del muestreo (agosto 2022, noviembre 2022, y abril 2022) y estaciones (E0, E1 y Ec). Cuanto mayor los valores del índice de Shannon, mayor diversidad de procariotas en las muestras.....	29
Figura N°5. Diversidad alfa (índice de Shannon) en estaciones de muestreo (E0, E1 y Ec), a medida que muestras se alejan del punto cero (E0) la diversidad de Shannon aumenta (Ec). Cuanto mayor los valores del índice de Shannon, mayor diversidad de procariotas en las muestras.....	30
Figura N°6. . Diversidad alfa (índice de Shannon) en sedimentos dividido según el periodo del muestreo (agosto 2022, noviembre 2022, y abril 2022) y estaciones (E0, E1 y Ec). Cuanto mayor los valores del índice de Shannon, mayor diversidad de procariotas en las muestras	31
Figura N°7. Diversidad alfa (índice de Chao1) dividido por profundidades (2 metros, metros y 50 metros) y estaciones (E0, E1 y Ec). Cuanto mayor sean los índices de Chao1, mayor será la riqueza de especies esperada.....	33
Figura N°8. Diversidad alfa (índice de Chao1) dividido según el periodo del muestreo	

(agosto 2022, noviembre 2022, y abril 2022) y estaciones (E0, E1 y Ec). Cuanto mayor sean los índices de Chao1, mayor será la riqueza de especies esperada.....34

Figura N°9. Diversidad alfa (índice de Chao1) en estaciones de muestreo (E0, E1 y Ec), a medida que muestras se alejan del punto cero (E0) la diversidad de Chao1 aumenta (Ec). Cuanto mayor sean los índices de Chao1, mayor será la riqueza de especies esperada.....35

Figura N°10. Diversidad alfa (índice de Chao1) en sedimentos dividido según el periodo del muestreo (agosto 2022, noviembre 2022, y abril 2022) y estaciones (E0, E1 y Ec). Cuanto mayor sean los índices de Chao1, mayor será la riqueza de especies esperada.....36

Figura N°11. Escalamiento multidimensional no métrico (NMDS) basado en la distancia de disimilitud de Bray-Curtis de las muestras de la comunidad microbiana de la columna de agua del fiordo Puyuhuapi. Stress: 0.099. Colores representan las profundidades (2 metros, 20 metros y 50 metros), elipses establecen los límites de las profundidades con un 95% de confianza, en el ordenamiento en el espacio. Las flechas indican las variables ambientales, correlacionadas con un valor- $p \leq 0,05$ al eje de ordenación, proyectándose hacia las comunidades donde se relacionan. Las flechas indican la dirección del cambio más acelerado (el gradiente más elevado). Los nombres indican la estación (E0, E1 o Ec), el periodo (Ago, Nov o Abr) y la profundidad (2m, 20m o 50m).....38

Figura N°12. Escalamiento multidimensional no métrico (NMDS) basado en la distancia de disimilitud de Bray-Curtis de las muestras de la comunidad microbiana de sedimento del fiordo Puyuhuapi. Stress: 0.073. Colores representan las estaciones de muestreo en el ordenamiento espacio. Los nombres indican la estación (E0, E1 o Ec), el periodo (Ago, Nov o Abr) y la matriz (Sed: Sedimento).....39

Figura N°13. Caracterización taxonómica (abundancia relativa) de los Phylum procarióticos más representativos de la columna de agua, en las diferentes profundidades (2 metros, 20 metros y 50 metros) y sus estaciones (E0, E1 y Ec) en los distintos periodos de muestreo (agosto de 2022, noviembre de 2022 y abril de 2023). El $\leq 1\%$: Indica los

taxones no identificados como dominantes en cada grupo, con una abundancia relativa media $\leq 1\%$, alcanzando en todas las profundidades un promedio de: 2m: $0.9 \pm 1.38\%$ | 20m: $0.7 \pm 0.4\%$ | 50m: $1.3 \pm 0.71\%$41

Figura N°14. Caracterización taxonómica (abundancia relativa) de los Phylum procarióticos de los sedimentos más representativos y sus estaciones (E0, E1 y Ec) en los distintos periodos de muestreo (agosto de 2022, noviembre de 2022 y abril de 2023). El $\leq 1\%$: Indica los taxones no identificados como dominantes en cada grupo, con una abundancia relativa media $\leq 1\%$, alcanzando en todas las estaciones un promedio de $3.7\% \pm 0.9\%$42

Figura N°15. Caracterización taxonómica (abundancia relativa) de las Clases procarióticas más representativas de la columna de agua, en las diferentes profundidades (2 metros, 20 metros y 50 metros) y sus estaciones (E0, E1 y Ec) en los distintos periodos de muestreo (agosto de 2022, noviembre de 2022 y abril de 2023). El $\leq 1\%$: Indica los taxones no identificados como dominantes en cada grupo, con una abundancia relativa media $\leq 1\%$. alcanzando en todas las profundidades un promedio de: 2m: $2.5 \pm 2.7\%$ | 20m: $2.7\% \pm 2.7\%$ | 50m: $6.5 \pm 11.5\%$43

Figura N°16. Caracterización taxonómica (abundancia relativa) de las clases procarióticas de los sedimentos más representativos y sus estaciones (E0, E1 y Ec) en los distintos periodos de muestreo (agosto de 2022, noviembre de 2022 y abril de 2023). El $\leq 1\%$: Indica los taxones no identificados como dominantes en cada grupo, con una abundancia relativa media $\leq 1\%$, alcanzando en todas las estaciones un promedio de $8.68 \pm 1.38\%$44

Figura N°17. Caracterización taxonómica (abundancia relativa) de órdenes de procariontes más representativos de la columna de agua, en las diferentes profundidades (2 metros, 20 metros y 50 metros) y sus estaciones (E0, E1 y Ec) en los distintos periodos de muestreo (agosto de 2022, noviembre de 2022 y abril de 2023). El $\leq 1\%$: Indica los taxones no identificados como dominantes en cada grupo, con una abundancia relativa media $\leq 1\%$, alcanzando en cada profundidad un promedio de: 2m: $10.27 \pm 6.7\%$ | 20m: $11.97 \pm 4.02\%$ | 50m: $13.1 \pm 7\%$45

Figura N°18. Caracterización taxonómica (abundancia relativa) de las Orden procarióticas de los sedimentos más representativos y sus estaciones (E0, E1 y Ec) en los distintos periodos de muestreo (agosto de 2022, noviembre de 2022 y abril de 2023). El $\leq 1\%$: Indica los taxones no identificados como dominantes en cada grupo, con una abundancia relativa media $\leq 1\%$, alcanzando en todas las estaciones un promedio de $23.49 \pm 3.34 \%$46



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla N°1: Identificación de muestras y características biológicas y químicas.....	26
Tabla N°2: Prueba estadística de Kruskal-Wallis para diversidad de Shannon en matriz.....	27
Tabla N°3: Índice de diversidad de Shannon y Chao1 (columna de agua)	31
Tabla N°4: Prueba estadística de Kruskal-Wallis para Shannon y Chao1 en columna de agua y sedimentos	32
Tabla N°5: Prueba estadística de Kruskal-Wallis para diversidad de Chao1 en matriz...32	
Tabla N°6: Índice de diversidad de Shannon y Chao1 (Sedimentos)	36
Tabla N°7: Correlaciones entre variables ambientales y comunidades.....	37
Tabla N°8: <i>Prueba estadística de PERMANOVA</i>	39



RESUMEN

Los fiordos de la Patagonia Chilena están sujetos al efecto antropogénico, principalmente debido a la intensa actividad acuícola que se desarrolla en la zona. El presente estudio analizó la composición de la comunidad microbiana presente en la columna de agua y sedimentos del fiordo Puyuhuapi ($44^{\circ}19'$, $44^{\circ}59'$ S, Región de Aysén), el cual está influenciado por la salmonicultura. Se recolectaron muestras de agua a tres profundidades (2 metros, 20 metros y 50 metros) y sedimentos superficiales de tres estaciones (E0, E1 y E2) a diferentes distancias de un centro de cultivo y durante tres periodos estacionales (agosto-2022, noviembre-2022 y abril 2022). Se emplearon técnicas de secuenciación de ADN para determinar la diversidad alfa (diversidad de Shannon y Chao1) y la composición de las comunidades microbianas. Además, se analizaron las relaciones entre las variables ambientales (oxígeno, temperatura, salinidad, nitrato) y las comunidades microbianas.

Los resultados indican una disminución en la diversidad alfa en la superficie de la columna de agua en las estaciones más cercanas a las áreas de influencia de la salmonicultura, especialmente durante los periodos de mayor actividad en el centro de cultivo cercano. Se observaron diferencias significativas en la composición de las comunidades microbianas entre las estaciones de muestreo, tanto en la columna de agua como en los sedimentos. Además, se encontraron correlaciones significativas entre la composición de las comunidades microbianas y las variables ambientales mencionadas. El estudio proporciona evidencia de que la salmonicultura puede tener influencia en la diversidad y composición de las comunidades microbianas del fiordo Puyuhuapi. Estos cambios podrían tener consecuencias negativas en la salud del ecosistema, como la disminución del oxígeno y la alteración de los procesos biogeoquímicos. Se necesitan más estudios para comprender mejor los impactos ambientales de la salmonicultura en el fiordo Puyuhuapi y desarrollar estrategias para mitigarlos.

ABSTRACT

Patagonian Chilean fjords are subject to anthropogenic effects, mainly due to the intense aquaculture activity that takes place in the area. This study analyzed the composition of the microbial community present in the water column and sediments of the Puyuhuapi Fjord (44°19', 44°59' S, Aysén Region), which is influenced by salmon farming. Water and sediment samples were collected from three stations (E0, E1, and Ec) at different distances from salmon farming influence during three seasonal periods (August 2022, November 2022, and April 2023) and at three depths for the water column (2 meters, 20 meters, and 50 meters). DNA sequencing techniques were used to determine alpha diversity (Shannon diversity and Chao1) and the composition of microbial communities. Additionally, the relationships between environmental variables (oxygen, temperature, salinity, nitrate) and microbial communities were analyzed.

The results indicate a decrease in alpha diversity in surface waters at the stations closest to the salmon farming influence, especially during periods of higher activity of farms. Significant differences were observed in the composition of microbial communities between the sampling stations, both in the water column and sediments. Additionally, significant correlations were found between the composition of microbial communities and the environmental variables. This study provides evidence that salmon farming can influence the diversity and composition of microbial communities of the Puyuhuapi Fjord. These changes could have negative consequences on the health of the ecosystem, such as decreasing oxygen levels and altering biogeochemical processes. Further studies are needed to better understand the environmental impacts of salmon farming in the Puyuhuapi Fjord and develop mitigation strategies.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Características de los fiordos

Los fiordos se originan típicamente en los llamados cinturones de fiordos a lo largo de las latitudes medias a altas en ambos hemisferios (Howe, J. A. *et al*, 2010). Son fundamentalmente el producto de la erosión glaciaria, aunque los factores que contribuyen a ello pueden ser también cualquier heterogeneidad geológica y las tendencias estructurales del lecho rocoso subyacente (Gjessing 1956; Holtedahl 1967; Nesje & Whillans 1994). La Patagonia chilena, considerada una de las áreas estuarinas de mayor envergadura de fiordos en el mundo (41-55°S), está conformada por tres regiones: Los Lagos, Aysén y Magallanes, alcanzando los 240.000 km² (Labbé-Ibáñez, P, *et al*, 2015; Pantoja, S. *et al*, 2011). La topografía de la Patagonia chilena es irregular, conformada por empinadas laderas montañosas (>1000 m sobre el nivel del mar) que rodean a los fiordos, penetrando en el sistema estuarino/marino hasta profundidades que van de 200 a sobre 1000 m, determinando la importancia de la interacción entre los continentes y los fiordos (Iriarte, 2018). Estos fiordos se caracterizan por presentar aguas de baja salinidad en superficie y una mayor influencia de éstas en la zona más cercana al continente, provenientes de deshielos de glaciares, escurrimiento de ríos y precipitaciones (Silva, 2006), las que generan fuertes gradientes de densidad verticales y horizontales, modulados por la salinidad que provoca una estratificación superficial. Por otro lado, los estratos subsuperficiales y profundos presentan aguas de origen marino influenciadas por la entrada de aguas oceánicas de origen subantártico principalmente (Silva, 2006), las que presentan una alta carga de nitratos y fosfatos (~1 a 11 µM nitrato; ~0,6 a 1,2 µM fosfato; y ~ 0 a 12 µM silicato) (Silva *et al.*, 1998; Silva & Valdenegro, 2008). Actualmente, estos fiordos, están siendo afectados por el calentamiento global y la influencia de actividades antropogénicas, como la acuicultura, agricultura, silvicultura e hidroelectricidad, que alteran su estructura y funcionamiento, además de representar una grave amenaza para la “salud” de dicho ecosistema (Iriarte, 2018).

1.2 Salmonicultura en fiordos de la Patagonia Chilena

La actividad acuícola del salmón se centra en la zona sur de Chile, particularmente en los

fiordos y canales de la Región de Aysén (Buschman, *et al.*, 2006), identificados como zonas seguras para el desarrollo de esta actividad (Buschmann *et al.*, 1996). Las características oceanográficas del ecosistema marino de los fiordos patagónicos favorecen el cultivo de especies (Iriarte, 2018), sin embargo, dicha actividad representa amenazas ambientales importantes, como, por ejemplo, la liberación de grandes cantidades de materiales de desecho (Quiñones *et al.*, 2019). Entre estos encontramos heces junto con residuos de antibióticos y alimento no consumido, los cuales son liberados a la columna de agua y decantan en el fondo marino (Soto & Norambuena, 2004; Tironi *et al.*, 2010). La evidencia internacional indica que la salmonicultura genera impactos permanentes y graves sobre los ecosistemas, además de proporcionar una fuente emergente de sustratos orgánicos e inorgánicos para la actividad biológica dentro de los ecosistemas de los fiordos (Iriarte *et al.*, 2014). La materia orgánica disuelta (DOM), representa el principal sustrato que alimenta la actividad heterótrofa de los microorganismos marinos (Cole *et al.*, 1982; Azam *et al.*, 1983), siendo las bacterias y arqueas planctónicas de los principales grupos que consumen DOM marina (Azam, 1998; Cole, 1998; Turley *et al.*, 2000; Montero *et al.*, 2007, 2011; Attermeyer *et al.*, 2014). Considerando que los desechos orgánicos de la salmonicultura pueden representar una fuente de materia orgánica para la actividad heterotrófica microbiana, Montero *et al.* (2022), agregaron sustratos orgánicos derivados del alimento de los salmones, a comunidades microbianas planctónicas de fiordos Patagónicos resultando en un aumento en la actividad heterotrófica, junto a una disminución de la diversidad y cambios en la composición comunitaria.

1.3. Características de las comunidades microbianas de fiordos

Los microorganismos se encuentran representados por los dominios Bacteria, Archaea y Eukarya (Margesin, R., & Miteva, V. 2011), suelen vivir en comunidades microbianas complejas, en donde sus actividades están reguladas tanto por las interacciones entre ellos (Madigan M. T. *et al.*, 2019) y con el ambiente, incluyendo, variaciones naturales del entorno y la actividad humana que provocan alteraciones. Estos factores ambientales estresantes, junto con los metabolitos liberados por los microorganismos para adaptarse, crean oportunidades para que se establezcan nuevas especies en la comunidad (Cruz-Leyva, M, 2015).

Las comunidades microbianas presentes en los fiordos presentan variaciones espaciales (verticales y a través de los canales) que pueden estar influenciadas por cambios en la salinidad (Herlemann *et al.*, 2011; Campbell & Kirchman, 2013; Fortunato & Crump, 2015), variaciones estacionales relacionadas con las concentraciones y disponibilidad de nutrientes (Storesund *et al.*, 2015), y también, vinculadas a los cambios estacionales de temperatura y caudal de los ríos (Andersson *et al.*, 2010; Fortunato *et al.*, 2013; El-Swais *et al.*, 2015). Además, las comunidades microbianas de los fiordos glaciares presentan variaciones en la descarga de agua de deshielo (Zeng *et al.*, 2013; Gutiérrez *et al.*, 2015). En fiordos y aguas de latitudes altas influenciadas por agua de deshielo glacial, las comunidades bacterianas están conformadas principalmente por las clases Gammaproteobacteria y Alphaproteobacteria y el filo Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides (Zeng *et al.*, 2013; Piquet *et al.*, 2010). En el fiordo Puyuhuapi las comunidades procarióticas son dominadas por Bacteroidetes, Alpha y Gammaproteobacterias, que presentan cambios verticales y temporales influenciados principalmente por alteraciones en la salinidad y la concentración de oxígeno disuelto (Gutiérrez *et al.* 2018). Estacionalmente el aumento de temperatura del agua superficial estaría relacionado a una disminución de la riqueza y abundancia de algunos grupos, principalmente representantes de las familias Flavobacteriaceae, Rhodobacteraceae y Cenarchaeaceae (Gutiérrez *et al.* 2018). Los taxones afectados por el aumento de la temperatura son componentes clave del procesamiento de materia orgánica y el ciclo del Carbono y Nitrógeno, por lo que la disminución de la diversidad causada por el aumento de la temperatura podría afectar la biogeoquímica de los fiordos. Lo anterior, sumado al efecto del enriquecimiento orgánico, podría ejercer una presión selectiva en las comunidades procarióticas del fiordo, afectando directamente su abundancia, diversidad, y los procesos microbianos (Montero *et al.* 2022).

Es posible que las variaciones en el entorno tengan un impacto en las abundancias y la estructura taxonómica de las comunidades microbianas (Allison & Martiny, 2008), debido a sus respuestas rápidas a estos cambios, son consideradas un índice adecuado para detectar alteraciones ambientales (Robles, K., *et al.*, 2017). Estos cambios ambientales,

pueden promover la diversificación en el habitat, el cual podría conducir a un incremento de taxones específicos en el área. Según el estudio de Soto y Norambuena (2004), el impacto de la salmonicultura en las comunidades microbianas induce una reducción de la riqueza de especies bacterianas de hasta un 50% en comparación con los sitios controles. Además, se ha evidenciado un incremento de nutrientes (nitrógeno, fósforo, carbono y materia orgánica particulada), entre 2 a 5 veces mayores en las columnas de agua y sedimentos, lo que lleva a causar una eutrofización en el medio, causada por los alimentos y desechos que se pueden encontrar bajo estas balsas-jaulas (Aranda *et al.*, 2015). Bacterias asociadas a sedimentos, son elementos clave en los ciclos biogeoquímicos del medio marino (Brune & Cypionka, 2000), como bacterias de la familia Baggiatoaceae, que pueden causar cambios en el ambiente, mediante su absorción y liberación de sustancias como sulfuro, nitrógeno, fósforo y hierro (Aranda *et al.*, 2015). Ante la intensa presencia de actividad salmonícola en la zona, y el papel fundamental de las comunidades microbianas en los procesos biogeoquímicos, cabe preguntarse si ¿La salmonicultura en sus distintas etapas afectan la diversidad de las comunidades procarióticas y cuál es la escala de influencia? Una forma de establecer la influencia ambiental por la actividad antropogénica causada por la salmonicultura es mediante la caracterización de su diversidad en las diferentes etapas del proceso productivo durante el ciclo anual y a lo largo del gradiente de influencia.

2. HIPÓTESIS DE TRABAJO

Considerando los antecedentes planteados, el siguiente trabajo de investigación propone las siguientes hipótesis:

Hipótesis 1: La diversidad de la comunidad microbiana presente en la columna de agua y sedimentos del fiordo Puyuhuapi disminuye en las cercanías del centro de cultivo de salmones.

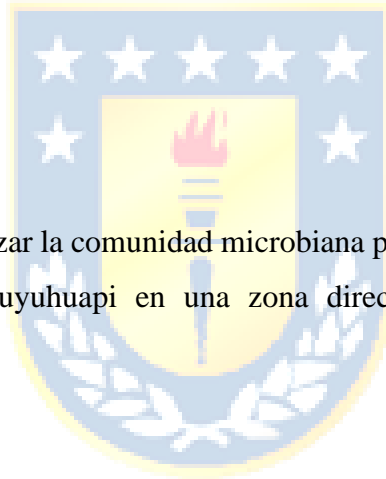
Hipótesis 2: El efecto de la salmonicultura sobre la diversidad de las comunidades microbianas en el fiordo Puyuhuapi disminuye durante el ciclo activo de la salmonicultura.

3. OBJETIVOS

Objetivo general: Caracterizar la comunidad microbiana presente en la columna de agua y sedimentos del fiordo Puyuhuapi en una zona directamente influenciada por la salmonicultura.

Objetivos específicos

1. Caracterizar la variabilidad hidrográfica en los distintos periodos de muestreo de la columna de agua.
2. Caracterizar la diversidad microbiana en la columna de agua en un gradiente de influencia de la salmonicultura en el fiordo Puyuhuapi.
3. Caracterizar la diversidad de las comunidades microbianas en el sedimento superficial del Fiordo Puyuhuapi en un gradiente de influencia de un centro de salmonicultura.



4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Área de estudio y recolección de muestras

El fiordo Puyuhuapi se sitúa en la Patagonia Chilena y presenta una extensión de 90 kilómetros de longitud entre los 44°19', 44°59'S. Corre en dirección Norte-Noreste mediante el canal Jacaf al norte y el canal Moraleda al sur (Schneider *et al.*, 2014) el que conecta con el océano abierto. Se caracteriza por presentar una batimetría compleja, alcanzando profundidades que superan los 400 metros (Schneider *et al.*, 2014). Las descargas de agua dulce que llegan al fiordo provienen del río Ventisquero ($40 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$ de caudal medio anual) y el río Cisnes ($218 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$ caudal medio anual), como también numerosos arroyos, y la lluvia caída ($\geq 2000 \text{ mm}$ por año) constituyen otras fuentes de agua dulce (Calvete & Sobarzo, 2011).

El área de muestreo y estudio se sitúa frente a la localidad de Puerto Cisnes (44°43'45"S, 72°45'28"W). Se consideraron tres zonas de muestreo ubicadas dentro del radio de influencia de la concesión de salmonicultura Ganso (*Figura 1*). La estación "E0" (44°44'34.2"S 72°43'56.7"W) se encuentra localizada dentro de la concesión del centro de cultivo, y la estación "E1" (44°44'13"S 72°44'17"W) a 773 metros de E0. Además, se contó con una estación control "Ec" (44°39'47"S 72°45'15"W), que se ubicó fuera del rango de influencia del centro de cultivo en el centro del fiordo, situada a una distancia de 9028 metros de la estación E0 (*Figura 1*).

Los muestreos se realizaron en agosto de 2022 (invierno austral), y se repitieron en noviembre de 2022 (primavera austral), para finalizar en abril de 2023 (otoño austral). Mediante la utilización de botellas Niskin se obtuvieron muestras de agua en cada una de las estaciones a distintas profundidades (2, 20 y 50 metros) para caracterizar la diversidad microbiana en la columna de agua y las características biogeoquímicas (ej. nutrientes y clorofila). Este estudio utilizó un CTD Seabird SBE-19 Plus® para realizar mediciones verticales continuas de oxígeno, salinidad y temperatura de la columna de agua. Adicionalmente, se recolectó sedimento superficial en cada estación establecida en el fiordo, mediante una draga. Las muestras de agua para la medición de diversidad fueron

depositadas en bidones de un litro para posteriormente ser filtradas *in situ* con filtros de 0.22 μm mediante una bomba peristáltica. Una vez filtradas las muestras de cada una de las estaciones y las profundidades, los filtros se almacenaron congelados en criotubos de 2 mL. Las muestras de agua recolectadas de la botella niskin para la medición de nutrientes y clorofila, se almacenaron en frascos de plástico de alta densidad para su posterior procesamiento en el laboratorio. El sedimento se colectó directamente en los criotubos en cada estación y periodos, y luego se almacenó en un congelador.

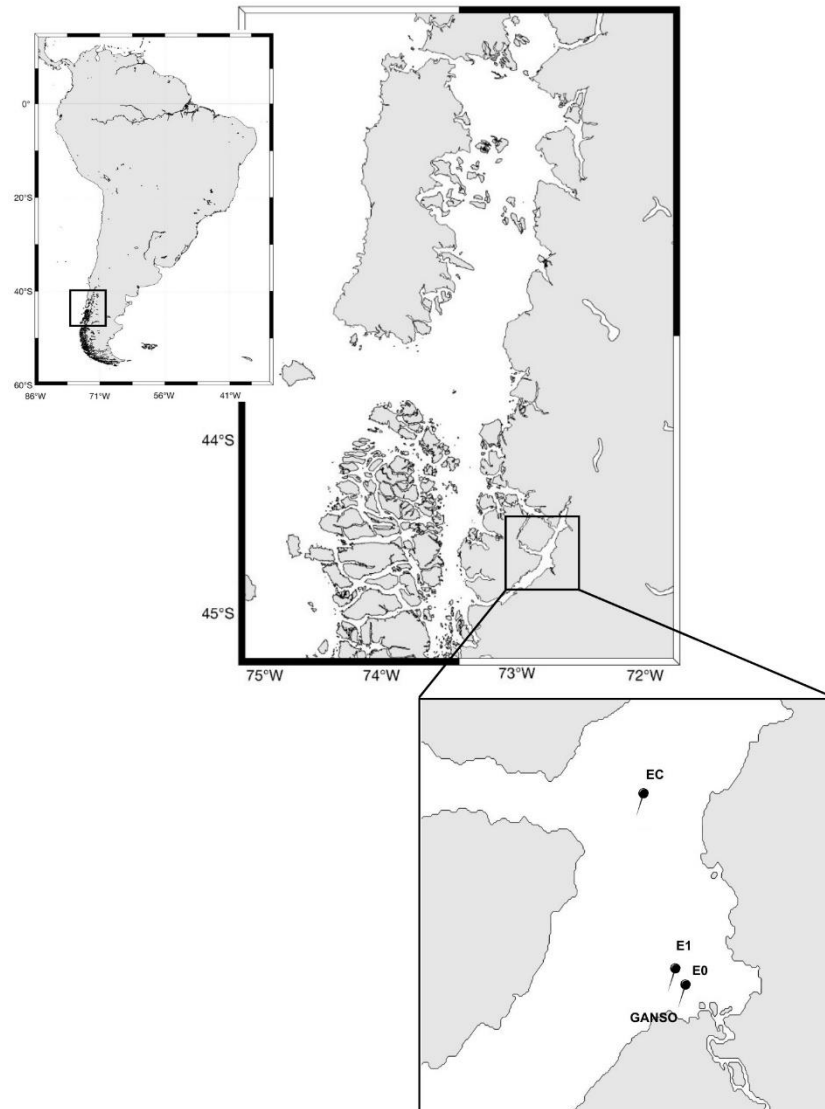


Figura 1. Ubicación de la concesión Ganso, y ubicación geográfica de las estaciones. E0: 44°44'34.2"S 72°43'56.7"W. E1: 44°44'13"S 72°44'17"W. Ec: 44°39'47"S 72°45'15"W. Elaboración propia.

4.2. Extracción de ADN y secuenciación

En el laboratorio de Geoquímica Orgánica Marina, del Departamento de Oceanografía en la Universidad de Concepción, se realizó la extracción de material genético de cada una de las 25 muestras de la columna de agua para determinar la diversidad alfa, beta y la abundancia relativa. Se utilizó PowerWater® DNA Isolation Kit (0.22 μm filters) siguiendo las instrucciones del protocolo del fabricante. Luego de la extracción, el ADN se cuantificó a través de un NanoDrop® 1000 Thermo Scientific. Posteriormente, se realizó la amplificación del gen 16S ARNr procariótico mediante la técnica de PCR. Cada uno de los PCR contenían 1 μL de ADN y 19 μL del mix de PCR, para el cual se utilizó 0,8 μL de cada primer 341F/907R (Muyzer & Smalla, 1998), en un tubo eppendorf de 1,5 mL. Además, se añadieron 10 μL de mezcla de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), 7,4 μL de agua libre de nucleasas y 1 μL de ADN. El procedimiento se repitió para cada una de las muestras de ADN, las cuales fueron llevadas al Termociclador BOECO TC-PRO® durante 120 minutos. La visualización de los PCR se realizó mediante la electroforesis en gel de agarosa. Para ello, se utilizaron 30 mL de buffer tampón tris-acetato-EDTA (TAE) al 1% y 0,3 g de agarosa. Se fundió la mezcla en un microondas a temperatura media en tandas de 20 segundos hasta obtener una solución transparente y homogénea. Posteriormente, se vació la solución en un molde al que se le instaló un peine en un extremo para formar las celdas de sembrado. Una vez obtenido el gel, se procedió a sembrar las celdas con las muestras. Para ello, se utilizó 1 μL de marcador de ADN RTU Leader. Además, se añadieron 3 μL de colorante de carga (6X Load Dye) y 5 μL de muestra de PCR a cada celda. Una vez sembradas las muestras, se corrió el gel a 80 voltios durante 50 minutos. Posteriormente, se realizó la tinción del gel con 30 mL de buffer tampón tris-acetato-EDTA (TAE) al 1% y 3 μL de Diamond Nucleic Acid Dye. El gel se dejó en oscuridad durante 10 minutos para que el tinte se asentara. Finalmente, se visualizó el gel con luz ultravioleta para observar la migración de los fragmentos de ADN amplificado en función del tamaño. Las muestras de ADN fueron enviadas a un laboratorio comercial (©Macrogen, Inc., Corea), para su secuenciación utilizando la plataforma Illumina. Los datos generados consistieron en lecturas de secuencias de ADN, las cuales fueron entregadas en formato FASTQ.

Para estimar la diversidad alfa beta y abundancia relativa, de cada una de las 9 muestras de sedimento, se realizó la extracción de ADN con DNeasy® PowerSoil® Pro-Kit, siguiendo las instrucciones del protocolo del fabricante. Luego de la extracción de ADN, se realizó la cuantificación de ADN en un NanoDrop® 1000 Thermo Scientific, para determinar las concentraciones de ADN de las muestras. Las comunidades procarióticas se amplificaron siguiendo el mismo procedimiento que las muestras de la columna de agua y posteriormente fueron enviadas a secuenciar a un laboratorio comercial de secuenciación (©Macrogen, Inc., Corea).

4.3. Análisis de clorofila, nutrientes y procesamiento de datos hidrográficos de CTD

Las muestras de agua fueron llevadas al laboratorio para su posterior filtración, mediante una bomba peristáltica con filtros muflados GFF (Glass Fiber Filters) de 0.7 μm , los cuales fueron almacenados en criotubos de 2 mL, con acetona al 90% a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. El procedimiento se realizó 24 horas antes de la medición de concentración de clorofila ($\mu\text{g/L}$), la cual se llevó a cabo mediante la técnica de fluorescencia (Parsons *et al.*, 1984). Adicionalmente, con el agua filtrada se realizó la medición de la concentración de nutrientes ($\mu\text{mol/L}$), mediante la técnica de absorbancia en un espectrofotómetro (Parsons *et al.*, 1984). Los resultados de las concentraciones a las distintas profundidades de la clorofila y los nutrientes fueron registrados en una planilla Excel y analizados por profundidades, estaciones y periodo de muestreo.

El procesamiento de datos del CTD se realizó en dos etapas. En la primera, se importaron los datos brutos en formato csv al software SBE Data Processing. En la segunda etapa, se corrigieron los errores en los datos, como valores atípicos, datos faltantes y/o datos mal registrados. Para ello, se utilizó la función load (). Una vez importados los datos, se realizaron las columnas verticales a partir de la función vertcat (), para las variables de profundidad, temperatura, salinidad y oxígeno disuelto, para posteriormente graficar los resultados.

4.4. Procesamiento de datos de secuencias

Las lecturas de las secuencias de la columna de agua y de los sedimentos se procesaron inicialmente en QIIME2 versión 2018.11 (Bolyen *et al.*, 2019), siguiendo los protocolos bioinformáticos estándar, para la filtración de calidad de las secuencias, la agrupación de Unidades Taxonómicas Operativas (OTU) se llevó a cabo utilizando vsearch. Posteriormente, obtenidos los archivos resultantes de QIIME2, los datos fueron importados a R utilizando el paquete de datos Phyloseq (McMurdie, P. J., & Holmes, S. 2013). Posterior a la eliminación de secuencias de cloroplastos, se realizó un remuestreo mediante el método de rarefacción en el que se utilizó el mínimo de secuencias por muestras (6809).

La diversidad α y β se llevaron a cabo mediante un análisis comparativo de la diversidad entre la columna de agua y sedimentos por separado, así como en los diferentes periodos de muestreo, estaciones y profundidad, la que se usó para evaluar diferencias de diversidad Shannon, medida comúnmente empleada para cuantificar la diversidad de especies de una comunidad (Shannon y Weaver, 1949) y riqueza Chao1, medida de riqueza de especies basado en la abundancia (Ríos, 2023). El método no paramétrico Kruskal-Wallis (Kruskal & Wallis, 1952) se realizó para evaluar las diferencias estadísticas de la diversidad y riqueza entre matriz, periodos, estaciones y profundidad del fiordo donde se recolectaron las muestras de la columna de agua y sedimentos. Se empleó un nivel de significancia de $p < 0,05$ como criterio para determinar la significancia estadística de las diferencias observadas.

Se realizó dos análisis de ordenación de escala multidimensional no métrica (NMDS) utilizando la distancia Bray-Curtis (calculada a nivel OTU), basada en las disimilitudes, para la visualización de la conexión entre las comunidades procariotas de la columna de agua y también de las comunidades procariotas de los sedimentos, para evaluar la influencia de los diferentes periodos, profundidades, estaciones y las variables ambientales a través de la función envfit del paquete Vegan (Oksanen *et al.*, 2019) en Rstudio. Adicionalmente, se empleó el análisis de permutaciones PERMANOVA (Anderson, M., 2005) para probar diferencias significativas entre comunidades de la

columna de agua y profundidad, columna de agua y periodos, y de sedimentos con las estaciones, mediante la función `Adonis2` (Análisis de varianza utilizando matrices de distancia) del paquete `Vegan` (Oksanen *et al.*, 2019). En cuanto a la caracterización taxonómica se llevó a cabo mediante la obtención de las abundancias relativas. Se utilizó la librería `phyloseq` para realizar análisis de datos de microbiomas. La función `transform_sample_counts()` de esta librería se usó para calcular las abundancias relativas. Para la manipulación de datos, se utilizó la librería `dplyr` (Wickham, H. *et al*, 2021). Para la creación de gráficos, se empleó la librería `ggplot2` (Wickham, H., 2016). La librería `ggpubr` (Kassambara, A., 2023) se utilizó para combinar los gráficos individuales en una única visualización mediante la función `ggarrange()`.



5. RESULTADOS

5.1. Variabilidad hidrográfica de la columna de agua en los diferentes periodos de muestreo

Los datos hidrográficos obtenidos en invierno, en el mes de agosto de 2022 evidencian en superficie (3 metros) temperaturas bajas en ambos puntos de muestreo con un valor máximo de 8°C. Se presenta una estratificación térmica inversa, en la temperatura a medida que se incrementa la profundidad se registra una temperatura mayor que en la superficie, con un valor máximo de 10°C (Figura 2). Desde los 60 metros hasta los 100 metros de profundidad la temperatura fue constante, por debajo de los 100 metros, la temperatura disminuyó con la profundidad a los 9°C. En primavera (noviembre de 2022), la temperatura en la superficie aumentó en ambas estaciones, y disminuyó a medida que la profundidad se incrementó, se observa una termoclina alrededor de los 25 metros. En otoño de 2023 (abril), la temperatura en superficie disminuyó, con una termoclina cercana a los 50 metros, descendiendo a un valor mínimo de 8°C (Figura 2). Se observaron cambios estacionales en la temperatura en los primeros 50 m, con un máximo durante primavera y mínimos en invierno, sin embargo, para cada periodo no se observaron mayores diferencias en los perfiles de temperatura entre estaciones (Figura 2).

La salinidad mostró en general valores más bajos en superficie (< 25 PSU) hasta aproximadamente los 6 metros durante todos los periodos, incrementando a valores por sobre los 30 PSU bajo los 10 metros (Figura 2). Los tres periodos presentan una haloclina cercana a los 10 metros de profundidad. A medida que la columna de agua se profundiza, se incrementa la salinidad (33 PSU). Los valores más altos en la superficie ocurrieron en agosto de 2022 con un valor máximo de 22 PSU, en comparación a noviembre de 2022 que muestra contribuciones de agua dulce con una salinidad disminuida que alcanza un valor mínimo de 8 PSU, la que en abril de 2023 presentó un leve incremento (14-17 PSU).

En relación con el oxígeno disuelto (OD), se registró una mayor concentración en superficie tanto en agosto, noviembre y abril para las tres estaciones con un valor máximo de 11 mg/L. A los 10 metros de profundidad aproximadamente el oxígeno disuelto

desciende a lo largo de la columna de agua, con valores alrededor de 6 mg/L a los 130 metros de profundidad aproximadamente, y un valor mínimo de 3 mg/L en abril de 2022.

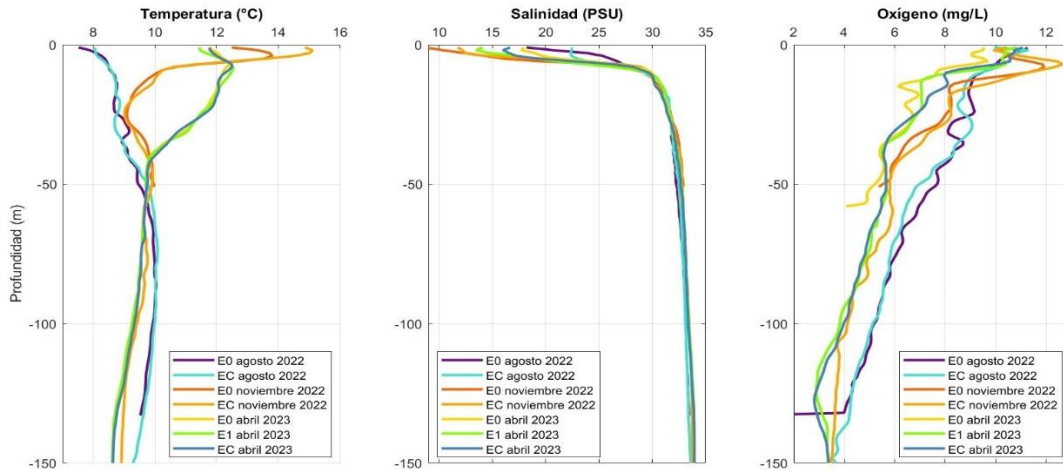


Figura 2. Estructura hidrográfica vertical de temperatura (°C), salinidad (PSU) y oxígeno (mg/L) de los tres periodos de muestreo. Las líneas trazadas de colores representan a las estaciones del periodo (Ec, E0 y E1) en los meses de muestreo, agosto 2022 noviembre 2022 y abril 2023.

Durante agosto de 2022, en la superficie (2 metros) se alcanzaron niveles máximos de clorofila de 3.04 $\mu\text{g/L}$, disminuyendo a mayor profundidad, con un valor mínimo de 0.11 $\mu\text{g/L}$ a los 50 metros. En noviembre de 2022, la concentración de clorofila registró en la superficie un valor de 1.68 $\mu\text{g/L}$, el que a un valor máximo de 5.06 $\mu\text{g/L}$ a los 20 metros, para disminuir a un valor mínimo de 0.19 $\mu\text{g/L}$. Finalmente, en abril de 2023, la concentración de clorofila alcanzó un valor de 3.94 $\mu\text{g/L}$ en la superficie, el que disminuyó con la profundidad a 0.08 $\mu\text{g/L}$ en los 50 metros (Tabla 1).

Las concentraciones de nitrato en la columna de agua en agosto de 2022 mostraron un valor máximo de 8.38 $\mu\text{mol/L}$ en la superficie, incrementándose conforme se profundiza la columna de agua, a un valor de 11.56 $\mu\text{mol/L}$ a los 50 metros. En noviembre de 2022 el valor en la superficie fue de 1.21 $\mu\text{mol/L}$, el que aumento con la profundidad a un valor de 17.01 $\mu\text{mol/L}$ a los 20 metros, hasta alcanzar un valor máximo de 21.85 $\mu\text{mol/L}$ a los

50 metros de profundidad. Abril de 2023 alcanzó en la superficie 1.41 $\mu\text{mol/L}$, el que incrementó con la profundidad a un valor de 16.59 $\mu\text{mol/L}$ a los 20 metros y de 24.9 $\mu\text{mol/L}$ a la profundidad máxima muestreada (Tabla 1).

En agosto de 2022, en superficie se alcanzó una concentración máxima de fosfato de 8.39 $\mu\text{mol/L}$, la que disminuyó a un nivel mínimo con la profundidad hasta los 50 metros (0.51 $\mu\text{mol/L}$). En noviembre, se alcanzó en la superficie un valor de 1.21 $\mu\text{mol/L}$, el que aumentó con la profundidad a un valor máximo de 2.26 $\mu\text{mol/L}$ a los 50 metros. En abril de 2023, las concentraciones de fosfato alcanzaron un nivel de 0.12 $\mu\text{mol/L}$ en la superficie, el cual aumentó con la profundidad alcanzando a los 50 metros un valor máximo de 2.14 $\mu\text{mol/L}$ (Tabla 1).

La concentración de silicato en la superficie de la columna de agua en agosto de 2022 alcanzó un valor de 9.8 $\mu\text{mol/L}$, aumentando a un valor máximo con la profundidad, de 11.84 $\mu\text{mol/L}$. En noviembre de 2022, el valor en superficie fue de 19.02 $\mu\text{mol/L}$, disminuyendo con la profundidad, a un valor de 12.93 $\mu\text{mol/L}$ a los 50 metros. En otoño de 2023, en la superficie, el silicato de 10.61 $\mu\text{mol/L}$, el que aumentó a un valor máximo de 17.06 $\mu\text{mol/L}$ con la profundidad de la columna de agua a los 50 metros (Tabla 1).

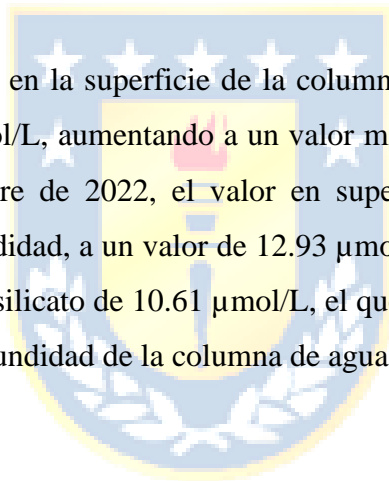


Tabla 1. *Identificación de muestras y características biológicas y químicas.*

Periodo de tiempo	Muestra	Estación	Profundidad (metros)	Clorofila- α ($\mu\text{g/L}$)	Nitrato ($\mu\text{mol/L}$)	Fosfato ($\mu\text{mol/L}$)	Silicato ($\mu\text{mol/L}$)
Agosto 2022	E0_ago_2m	E0	2	2.27	8.38	8.39	8.40
	E0_ago_50m	E0	50	0.11	11.56	1.32	11.84
	E1_ago_2m	E1	2	3.04	3.4	0.51	9.8
	E1_ago_20m	E1	20	0.35	16.87	1.78	8.86
	E1_ago_50m	E1	50	0.55	17.23	1.8	11.76
	Ec_ago_2m	Ec	2	1.57	4.15	0.52	9.63
	Ec_ago_50m	Ec	50	0.21	16.67	1.58	10.74
Noviembre 2022	E0_nov_2m	E0	2	1.68	0.75	0.21	18.76
	E0_nov_20m	E0	20	3.2	14.33	1.54	9.42
	E0_nov_50m	E0	50	0.26	15.7	2.08	9.94
	E1_nov_2m	E1	2	2.42	0.91	0.19	17.22
	E1_nov_20m	E1	20	1.87	17.01	1.71	10.36
	E1_nov_50m	E1	50	0.24	21.85	2.26	14.48
	EC_nov_2m	EC	2	1.93	1.21	0.18	19.02
	EC_nov_20m	EC	20	5.06	9.61	0.93	8.99
	EC_nov_50m	EC	50	0.19	20.76	2.11	12.93
	Abril 2023	E0_abr_2m	E0	2	3.94	1.43	0.12
E0_abr_20m		E0	20	0.16	15.78	1.3	9.28
E0_abr_50m		E0	50	0.08	21.39	2.14	17.5
E1_abr_2m		E1	2	4.22	1.26	0.09	5.13
E1_abr_20m		E1	20	0.24	13.06	1.28	10.34
E1_abr_50m		E1	50	0.06	24.9	1.88	15.64
EC_abr_2m		EC	2	0.94	1.3	0.07	10.61
EC_abr_20m		EC	20	0.21	16.59	1.44	10.96
EC_abr_50m		EC	50	0.05	20.21	1.67	17.06

Corresponden a muestras de la columna de agua.

5.2. Diversidad alfa (α -diversidad) en la columna de agua y sedimentos

5.2.1. Índice de diversidad de Shannon y Riqueza estimada por Chao1

De un total de 618130 secuencias del gen ARNr 16s de bacterias y arqueas, se obtuvo un total de 7439 OTU bacterianas y 75 OTU de arqueas para las 34 muestras de columna de agua y sedimentos, posterior a la eliminación de cloroplastos.

Se obtuvo el índice de Shannon para cada muestra de la comunidad microbiana en la columna de agua y sedimentos. El índice de Shannon promedio para la columna de agua fue de $4,30 \pm 0,71$, mientras que en sedimentos fue mayor, con un índice de $6,07 \pm 0,22$. El análisis estadístico de Kruskal-Wallis encontró diferencias significativas (Tabla 2) en la diversidad entre la columna de agua y sedimentos (valor-p $\leq 0,05$).

Tabla 2. Prueba estadística de Kruskal-Wallis para diversidad de Shannon en matriz

Variable	df	Valor p
Matriz	1	0,00001125

Al agrupar las diferentes profundidades, los valores de diversidad de Shannon en la columna de agua fluctuaron entre 2,25 y los 5,38 con valores más altos a 50 metros en Ec (Figura 3). La mayor variabilidad se observó a los 50 metros en E0, la que también mostró los valores menores. El promedio de todas las estaciones, a los 20 metros presentó un índice de Shannon con un valor más alto de $4,50 \pm 0,36$ (Tabla 3). El análisis estadístico de Kruskal-Wallis no arrojó diferencias significativas (Tabla 4) en la diversidad (valor-p $\geq 0,05$) entre las profundidades.

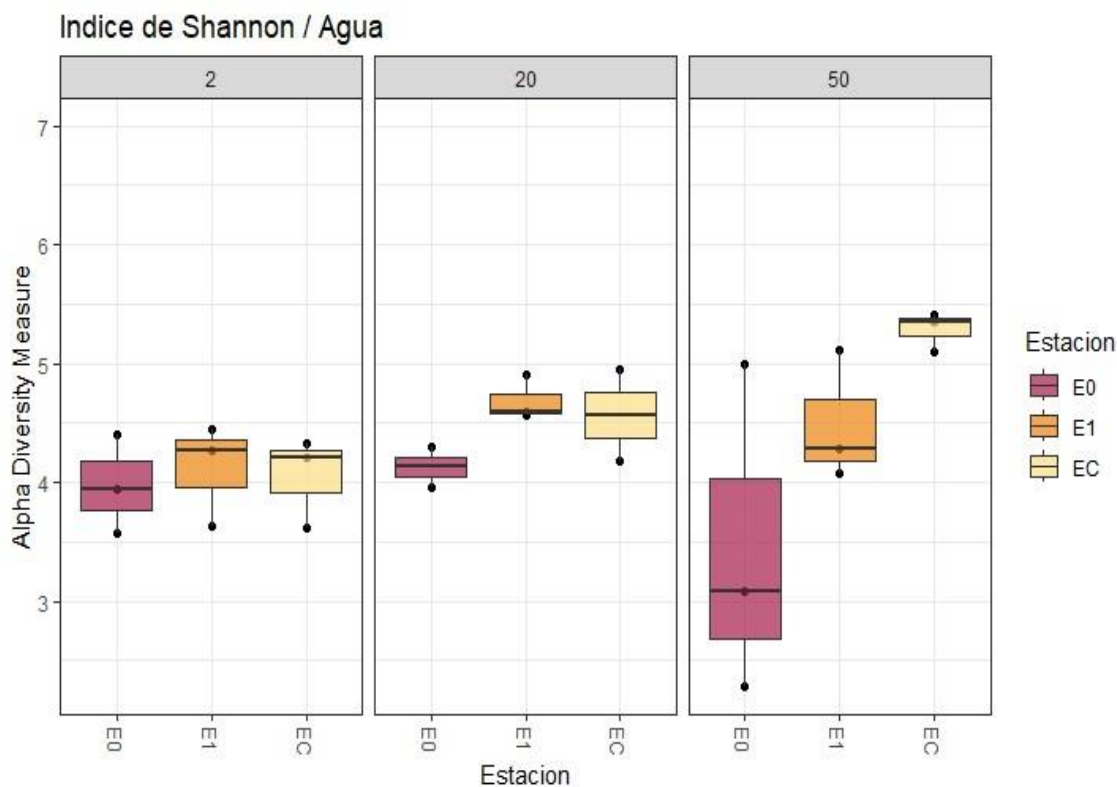


Figura 3. Diversidad alfa (índice de Shannon) dividido por profundidad (2 metros, 20 metros y 50 metros) y estaciones (E0, E1 y E2). La diversidad de cada profundidad incluye los valores de todos los periodos analizados.

Al agrupar los datos por periodo de muestreo, los valores de diversidad en la columna de agua entre periodos oscilaron entre los 2,25 y los 5,38. En Agosto de 2022 (Figura 4) se observó el valor más alto de diversidad de Shannon, con un promedio de $4,72 \pm 0,44$ (Tabla 3). Durante Noviembre 2022 y Abril 2023, se observó una tendencia a aumentar la diversidad desde la estación E0 a la estación E2 (Figura 4). El periodo de noviembre de 2022 presentó una mayor variabilidad en E2. El análisis estadístico de Kruskal-Wallis arrojó diferencias significativas (Tabla 4) en la diversidad (valor- $p \leq 0,05$) entre los periodos de muestreo.

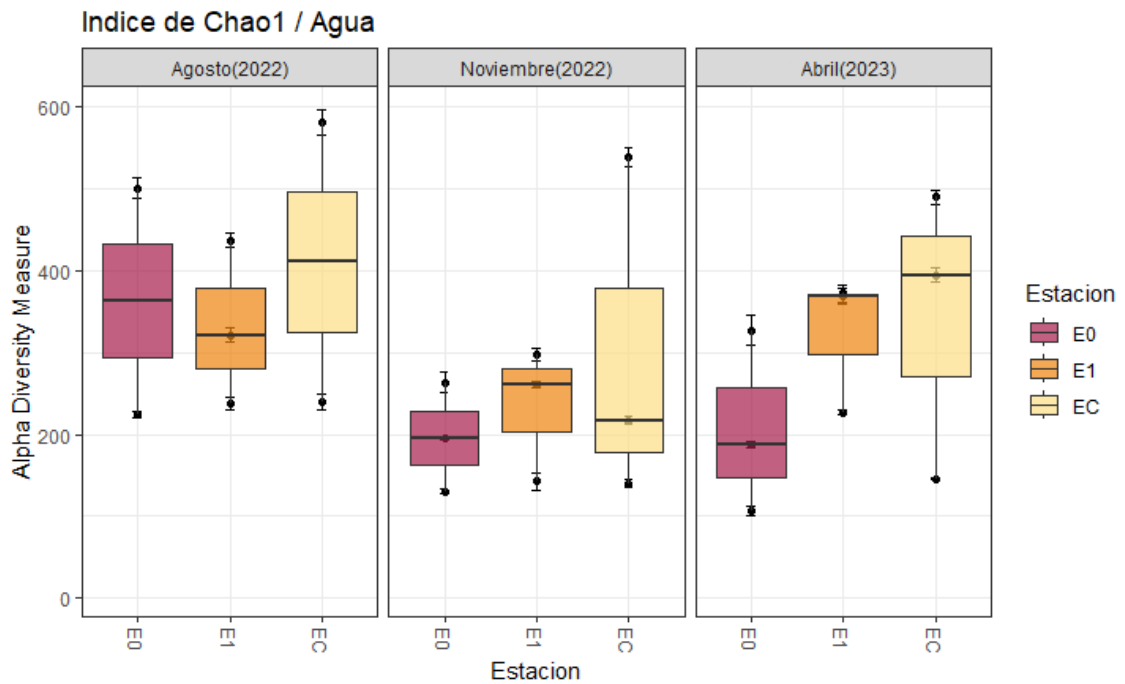


Figura 4. Diversidad alfa (índice de Shannon) para la columna de agua agrupada según el periodo del muestreo (agosto 2022, noviembre 2022, y abril 2022) y estaciones (E0, E1 y Ec).

Al agrupar todos los datos, la variabilidad de la diversidad de Shannon entre estaciones (Figura 5) resultó mayor en Ec con un promedio entre las muestras de $4,64 \pm 0,64$ y la menor diversidad se observó en E0 con un promedio entre las muestras de $3,81 \pm 0,84$ (Tabla 3). A medida que las estaciones se alejan del centro en los tres periodos, se incrementó la diversidad de Shannon, sin embargo no se observaron diferencias significativas (Tabla 4). El análisis estadístico de Kruskal-Wallis no arrojó diferencias significativas (Tabla 4) en la diversidad (valor- $p \leq 0,05$) entre las estaciones.

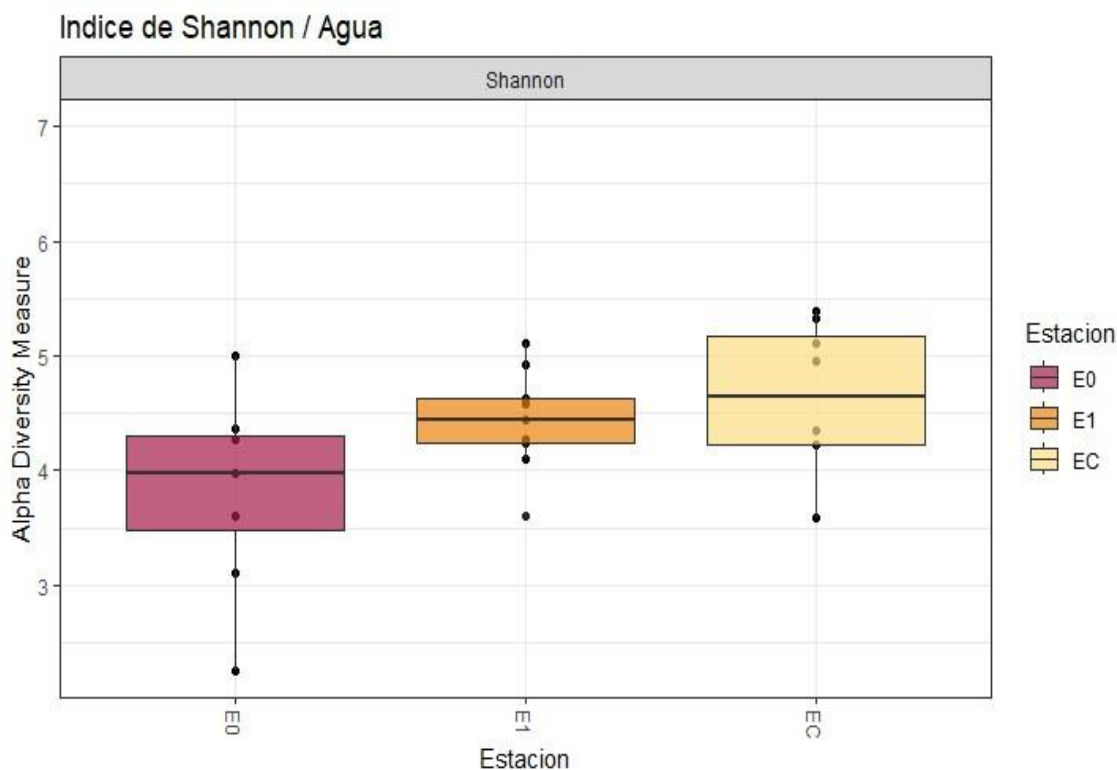


Figura 5. Diversidad alfa (índice de Shannon) en la columna de agua agrupada por estaciones de muestreo (E0, E1 y Ec), a medida que muestras se alejan del punto cero (E0) la diversidad de Shannon aumenta (Ec).

En el sedimento superficial, el valor más alto del índice de Shannon se observó durante noviembre de 2022 (Figura 6), en E0 con un valor de $6,19 \pm 0,13$. A medida que las estaciones se alejan, se reportó una disminución del índice de Shannon (Tabla 6), con un valor de $5,96 \pm 0,16$ en Ec. El periodo de abril de 2023 obtuvo un menor índice de Shannon, con un valor de $5,96 \pm 0,25$. El análisis estadístico de Kruskal-Wallis no arrojó diferencias significativas (Tabla 4) en la diversidad de Shannon en sedimentos (valor- $p \geq 0,05$) entre las estaciones, como tampoco arrojó diferencias significativas en los periodos en los sedimentos.

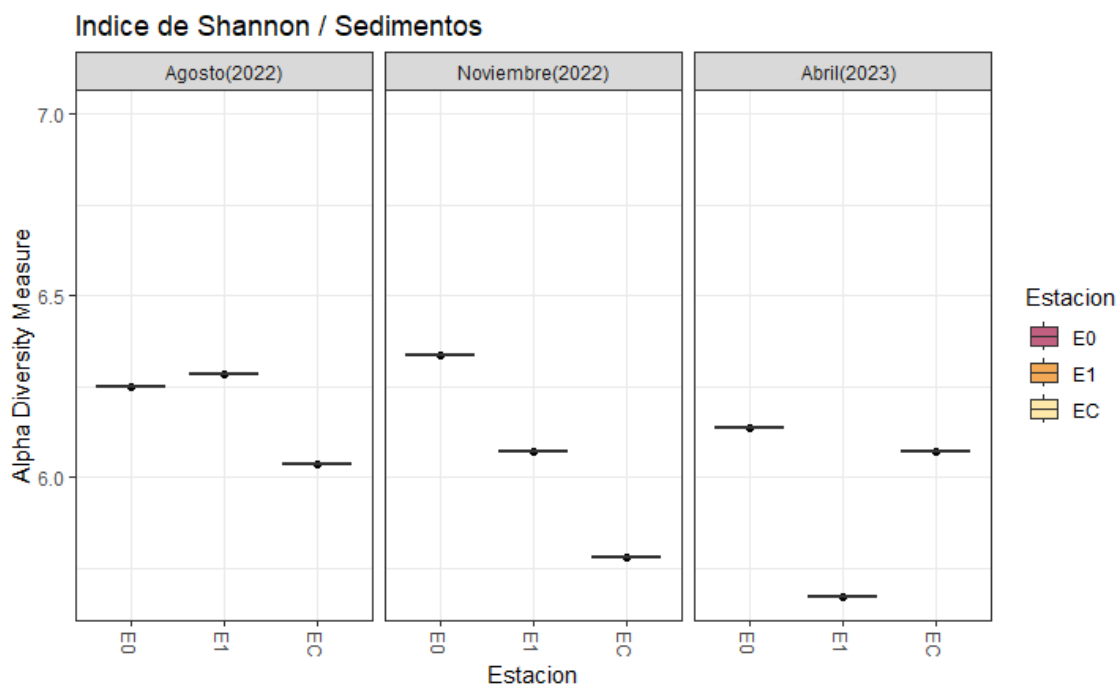


Figura 6. Diversidad alfa (índice de Shannon) en sedimentos superficiales según el periodo del muestreo (agosto 2022, noviembre 2022, y abril 2022) y estaciones (E0, E1 y Ec).

Tabla 3. Índice de diversidad de Shannon y Chao1 (columna de agua)

Variable	Shannon	Chao1
Periodo		
Agosto 2022	4,72 ± 0,44	363,29 ± 143,72
Noviembre 2022	4,04 ± 0,66	242,95 ± 126,25
Abril 2023	4,23 ± 0,85	291,09 ± 129,52
Estación		
E0	3,81 ± 0,84	241,90 ± 126,03
E1	4,43 ± 0,44	296,37 ± 89,67
Ec	4,64 ± 0,64	343,37 ± 179,69
Profundidad		
2 metros	4,04 ± 0,35	201,75 ± 66,34
20 metros	4,50 ± 0,36	287,82 ± 76,66
50 metros	4,40 ± 1,09	391,002 ± 162,32

Tabla 4. Prueba estadística de Kruskal-Wallis para Shannon y Chao1 en columna de agua y sedimentos

Variable	Shannon	Chao1
Columna de agua	Valor-p	Valor-p
Periodo	0,0497	0,1025
Estación	0,0864	0,2391
Profundidad	0,1538	0,0241
Sedimentos		
Periodo	0,3932	0,4298
Estación	0,1479	0,1133

Valores en negrita corresponden a valor-p \leq 0,05.

El índice de Chao1 promedio para la columna de agua fue de $295,30 \pm 140,07$, en tanto sedimentos obtuvo un mayor índice con un valor de $882,37 \pm 185,32$. El análisis estadístico de Kruskal-Wallis encontró diferencias significativas (Tabla 5) en la diversidad entre la columna de agua y sedimentos (valor-p \leq 0,05).

Prueba estadística de Kruskal-Wallis para diversidad de Chao1 en matriz

Variable	df	Valor p
Matriz	1	0,0000134

Valor en negrita corresponde a valor-p \leq 0,05.

La riqueza de especies en la columna de agua, medida por el índice de Chao1, presentó variaciones entre 106,06 y 581,28, con valores máximos a 50 metros de profundidad en la estación Ec (Figura 7). La mayor fluctuación se encontró también a 50 metros en la estación E0. Al promediar todas las estaciones, el índice de Chao1 a 50 metros alcanzó el valor más alto, con un promedio de $391,002 \pm 162,32$ (Tabla 3). Un análisis estadístico de Kruskal-Wallis reveló diferencias significativas (Tabla 4) en la diversidad (valor-p \leq 0,05) entre las diferentes profundidades.

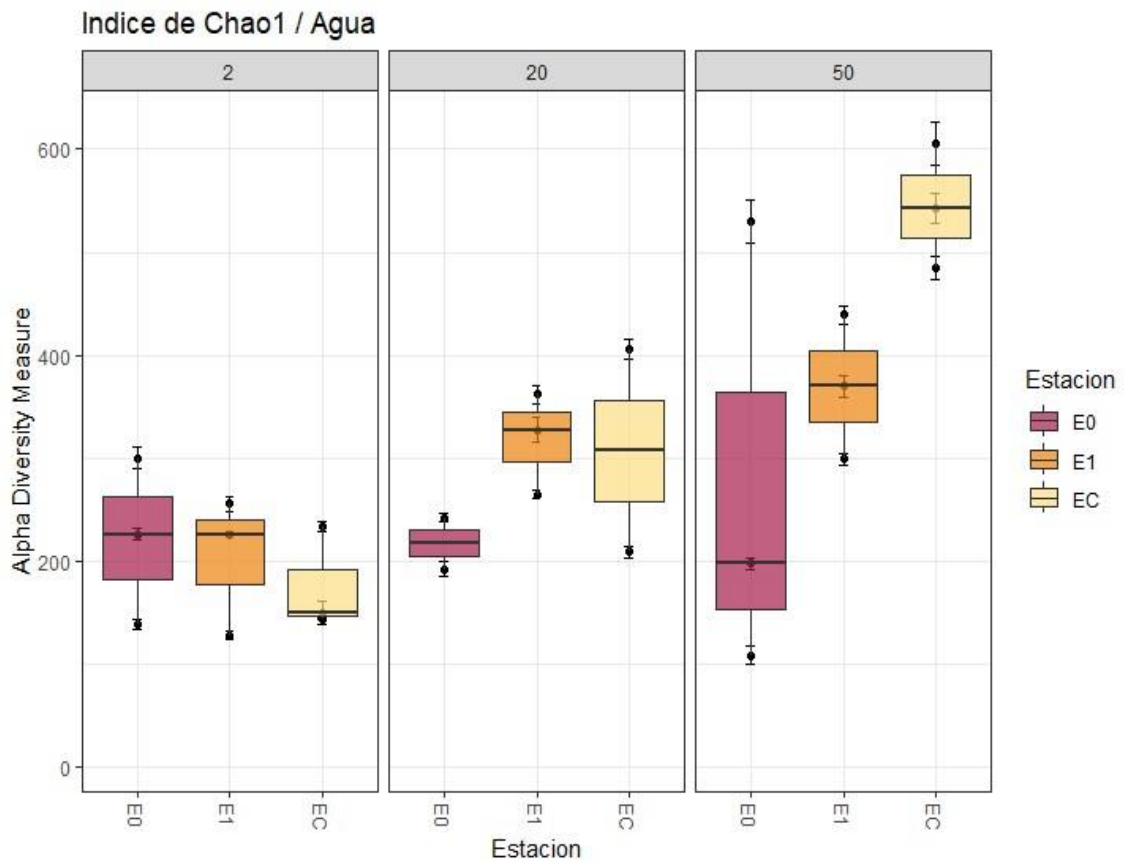


Figura 7. Diversidad alfa (índice de Chao1) por profundidades (2 metros, 20 metros y 50 metros) y estaciones (E0, E1 y Ec).

A agrupar los diferentes periodos, la riqueza de especies en la columna de agua, medida por el índice de Chao1, mostró que agosto de 2022 (Figura 8) tuvo el valor más alto, con un promedio de $363,29 \pm 143,72$ (Tabla 3). La mayor fluctuación se observó en noviembre de 2022 en la estación Ec. Sin embargo, el análisis estadístico de Kruskal-Wallis no encontró diferencias significativas (Tabla 4) en la diversidad (valor- $p \geq 0,05$) entre los diferentes periodos de muestreo.

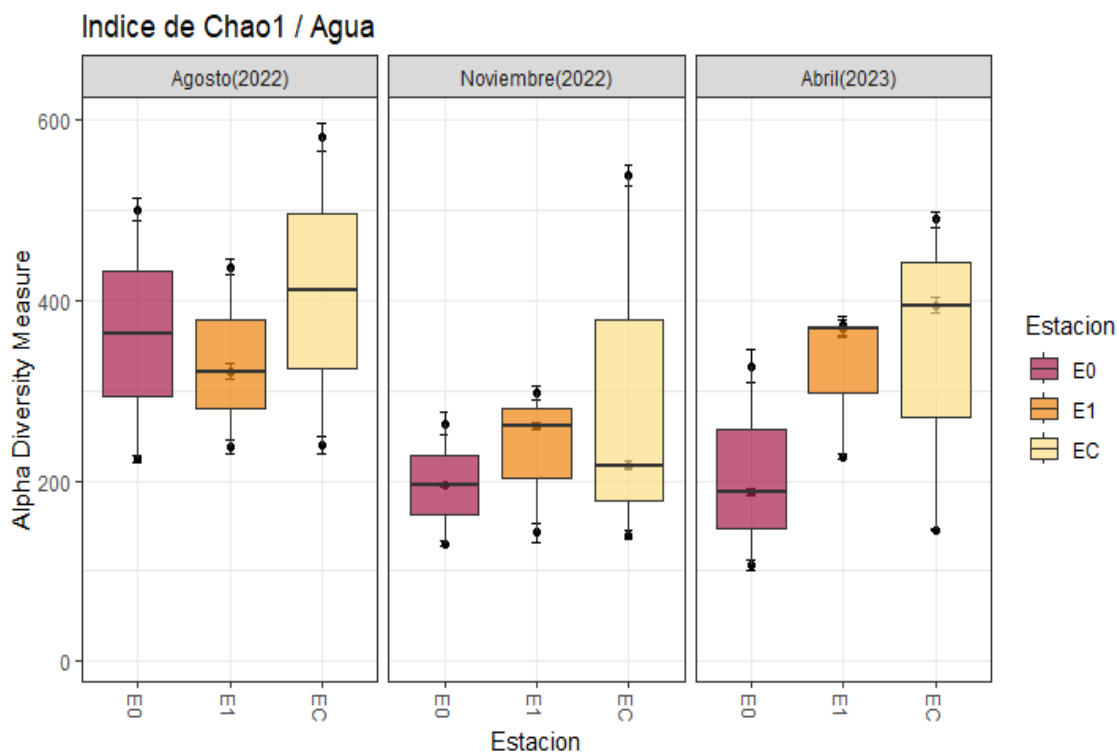


Figura 8. Diversidad alfa (índice de Chao1) en la columna de agua según el periodo del muestreo (agosto 2022, noviembre 2022, y abril 2022) y estaciones (E0, E1 y Ec).

Al agrupar todos los datos y separarlos por estaciones, la riqueza de especies en la columna de agua, medida por el índice de Chao1, fue más variable en la estación Ec (Figura 9), con un promedio de $343,37 \pm 179,69$ entre las muestras. La menor variabilidad se encontró en la estación E0, con un promedio de $241,90 \pm 126,03$ (Tabla 3). Se observó un aumento en la riqueza de Chao1 a medida que las estaciones se alejaban del centro en los tres periodos. Sin embargo, el análisis estadístico de Kruskal-Wallis no encontró diferencias significativas (Tabla 4) en la diversidad (valor- $p \geq 0,05$) entre las estaciones.

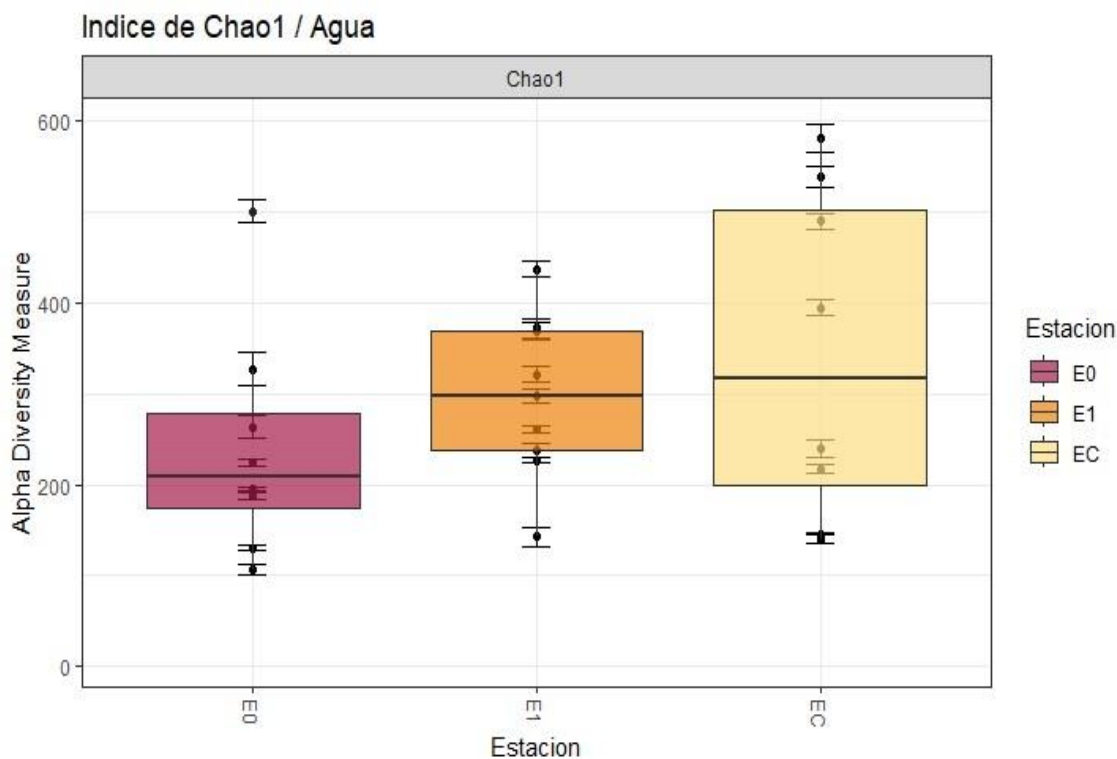


Figura 9. Diversidad alfa (índice de Chao1) en estaciones de muestreo (E0, E1 y Ec) al agrupar todos los datos obtenidos, a medida que muestras se alejan del punto cero (E0) la diversidad de Chao1 aumenta (Ec).

En el sedimento superficial, el índice de Chao1 alcanzó un valor más alto en noviembre de 2022 (Figura 10) de $1019,95 \pm 110,70$ en la estación E0, además, se observó una disminución en la riqueza de Chao1 a medida que las estaciones se alejaban del centro, con un valor de $746,07 \pm 168,88$ en Ec (Tabla 6). El periodo de abril de 2023 presentó el menor índice de Chao1, con un valor de $823,66 \pm 146,65$. Sin embargo, el análisis estadístico de Kruskal-Wallis no encontró diferencias significativas (Tabla 4) en la diversidad de Shannon en sedimentos entre las estaciones (valor- $p \geq 0,05$), ni tampoco entre periodos (valor- $p \geq 0,05$).

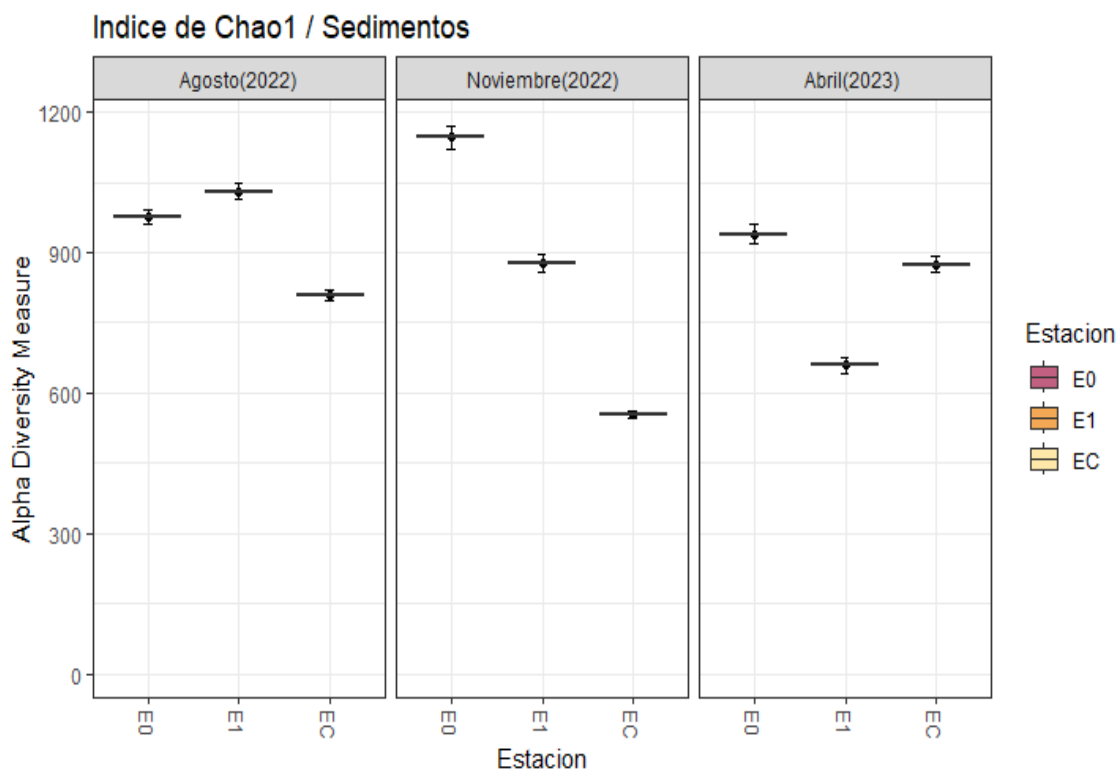


Figura 10. Diversidad alfa (índice de Chao1) en sedimentos superficiales según el periodo del muestreo (agosto 2022, noviembre 2022, y abril 2022) y estaciones (E0, E1 y Ec).

Tabla 6. Índice de diversidad de Shannon y Chao1 (Sedimentos)

Variable	Shannon	Chao1
Periodo		
Agosto 2022	6,06 ± 0,27	858,92 ± 295,97
Noviembre 2022	6,19 ± 0,13	938,44 ± 115,31
Abril 2023	5,96 ± 0,25	823,66 ± 146,65
Estación		
E0	6,24 ± 0,09	1019,95 ± 110,70
E1	6,01 ± 0,31	855,00 ± 186,96
Ec	5,96 ± 0,16	746,07 ± 168,88

5.3. Diversidad beta (diversidad β) de la columna de agua y sedimentos

5.3.1. Análisis de ordenación de escala multidimensional no métrica (NMDS)

El análisis NMDS basado en la distancia Bray-Curtis reveló diferencias en el ordenamiento en las comunidades en diferentes profundidades de la columna de agua, como se observa en el agrupamiento de la Figura 11. Adicionalmente, estas agrupaciones por profundidad se separaron estacionalmente (agosto 2022, noviembre 2022 y abril 2023; Figura 11).

Los vectores de las variables ambientales (salinidad, temperatura, oxígeno y nitrógeno), indicaron la dirección de máxima variación en la composición de las comunidades a lo largo del eje (Tabla 7). La mayor salinidad y concentración de nitrato se relacionó con las muestras de 50 metros de profundidad en las tres estaciones. El aumento de oxígeno se vinculó con las muestras superficiales (2 metros) entre agosto y noviembre de 2022. En noviembre de 2022 (primavera austral) y abril de 2023 (otoño austral) se observó una marcada similitud de comunidades procarióticas entre los 2 y 20 metros de profundidad, coincidiendo con un aumento de la temperatura.

Tabla 7. *Correlaciones entre variables ambientales y comunidades*

Variable ambiental	Valor p
Temperatura	0,032
Salinidad	0,001
Oxígeno	0,001
Clorofila	0,058
Nitrato	0,001
Fosfato	0,605
Silicato	0,738

Valores en negrita corresponden a valor- $p \leq 0,05$ graficados como vectores en NMDS columna de agua.

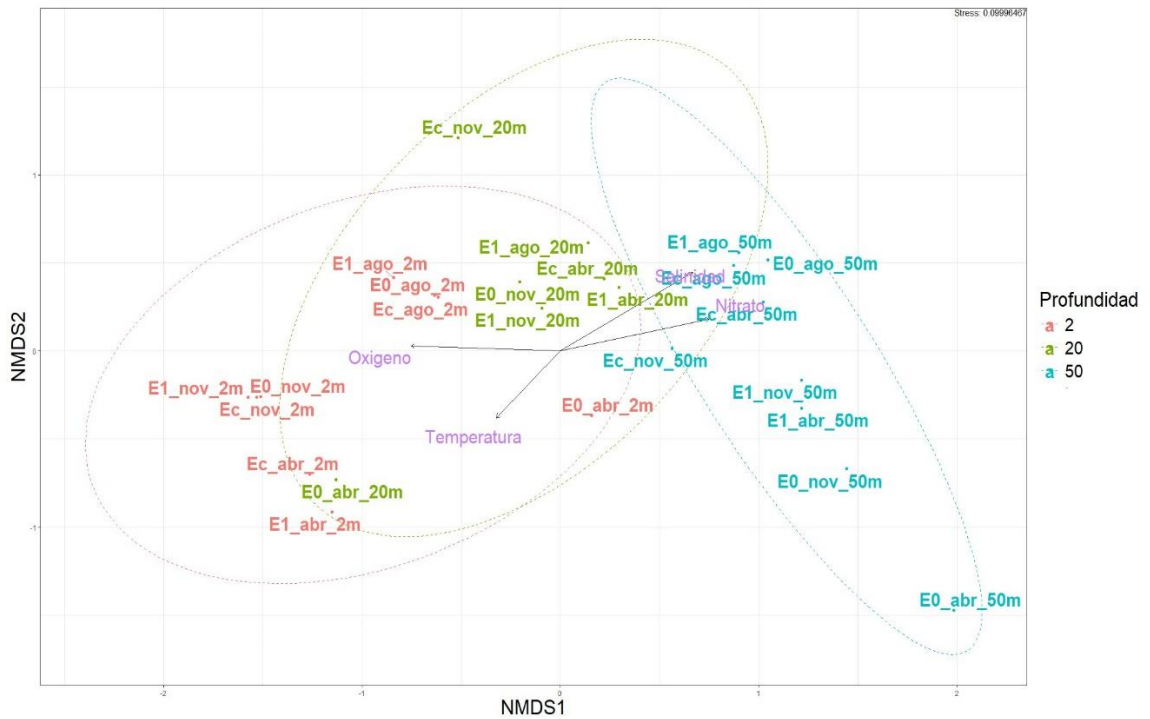


Figura 11. Escalamiento multidimensional no métrico (NMDS) basado en la distancia de disimilitud de Bray-Curtis de las muestras de la comunidad microbiana de la columna de agua del fiordo Puyuhuapi. Stress: 0.099. Colores representan las profundidades (rojo: 2 metros, verde: 20 metros y azul: 50 metros), mediante elipses que establecen los límites de las profundidades con un 95% de confianza, en el ordenamiento en el espacio. Las flechas indican las variables ambientales, correlacionadas con un valor- $p \leq 0,05$ al eje de ordenación, proyectándose hacia las comunidades donde se relacionan. Las flechas indican la dirección del cambio más acelerado (el gradiente más elevado). Los nombres indican la estación (E0, E1 o Ec), el periodo (Ago, Nov o Abr) y la profundidad (2m, 20m o 50m).

Las comunidades procariotas del sedimento del fiordo Puyuhuapi, si bien exhiben una alta similitud en el espacio de ordenamiento, revelan una clara zonificación según las estaciones de muestreo.

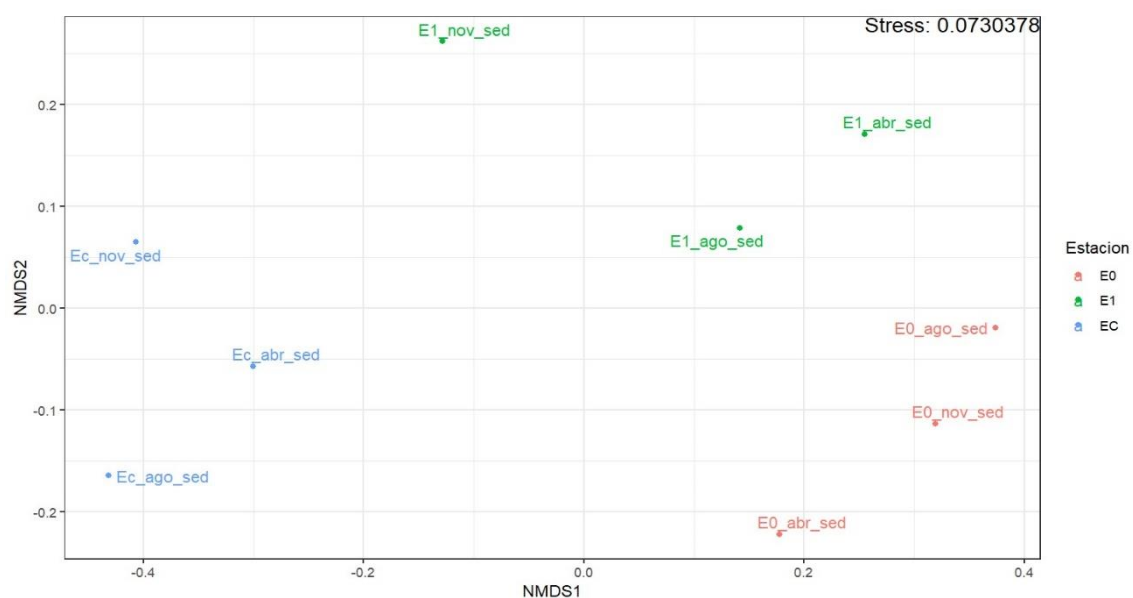


Figura 12. Escalamiento multidimensional no métrico (NMDS) basado en la distancia de disimilitud de Bray-Curtis de las muestras de la comunidad microbiana de sedimento del fiordo Puyuhuapi. Stress: 0,073. Colores representan las estaciones de muestreo en el ordenamiento espacio. Los nombres indican la estación (E0, E1 o Ec), el periodo (Ago, Nov o Abr) y la matriz (Sed: Sedimento).

El análisis estadístico de PERMANOVA se basó en la disimilaridad de Bray-Curtis, mediante 999 permutaciones. Confirmó diferencias significativas en la composición de las comunidades procarióticas, determinadas por sus variables ambientales (Tabla 8). Dentro de la columna de agua, la profundidad fue un factor notable (valor- $p \leq 0,05$) para diferenciar significativamente a las comunidades. En cuanto a los sedimentos, las estaciones de muestreo mostraron un efecto igualmente significativo en la composición procariota (valor- $p \leq 0,05$).

Tabla 8. Prueba estadística de PERMANOVA

Variable	df	SumOfSqs	R2	F	Valor-p
Columna de agua					
Profundidad	2	2,4013	0,3301	5,422	0,001
Periodo	2	1,3089	0,17998	2,4142	0,012
Sedimentos					
Estación	2	0,5607	0,4313	2,275	0,004

Valores en negrita corresponden a valor- $p \leq 0,05$.

5.4. Composición de las comunidades procarióticas

En el análisis de las muestras de la columna de agua y sedimento recogidas durante los tres periodos de muestreo, se identificaron 57 Phylum procarióticos. Los taxones de bacterias y arqueas que exhiben una abundancia relativa superior al 1% de cada secuencia, en varios niveles taxonómicos fueron designados como dominantes. El análisis de la composición microbiana en la columna de agua destacó por la presencia y predominancia del phylum Proteobacteria (Figura 13). Este phylum se encontró presente en las tres profundidades (2, 20 y 50 metros) y en todas las estaciones estudiadas, sin embargo, obtuvo su mayor abundancia a los 50 metros en E0, oscilando entre 59,8% hasta el 89,4%, siendo abril de 2023 (otoño austral) el periodo que obtuvo la mayor abundancia en E0. En abril 2023 a los 2 metros, Ec presentó un aumento en la abundancia relativa de Proteobacterias en comparación a las otras estaciones, alcanzando una abundancia del 61%. Bacteroidetes se posicionó como el segundo phylum más abundante en la superficie de las tres estaciones, con una notable mayor presencia en noviembre de 2022 (primavera austral; Figura 13). Su abundancia relativa fluctuó entre 44,5% y 46,9%, siendo la estación Ec la que registró el mayor porcentaje (46,9%). El phylum Actinobacteria se presentó en las tres profundidades, a los 2 metros, se observó un patrón similar de distribución con valores entre 1,5% y 4,7%. A 20 metros, los valores fueron dispares, con E1 en agosto de 2022 (invierno austral) obteniendo el mayor porcentaje (13,2%). A 50 metros, el patrón fue en aumento a medida que las estaciones se alejaban del centro de cultivo, con valores entre 0,2% y 8,9%. Se observó un dominio de los phylum SAR406 y Planctomycetes, a los 50 metros de profundidad, con una abundancia relativa que aumentó a medida que las estaciones se alejaban del centro, registrándose valores de abundancia conjunta entre 1,1% y 19,4%. Adicionalmente, el phylum Verrucomicrobia estuvo presente en las tres profundidades, con valores que alcanzaron hasta el 17,6%, siendo el mayor valor registrado en la estación E0 a una profundidad de 20 metros durante el mes de abril, sin embargo en superficie en noviembre de 2022 obtuvo su menor porcentaje con un 0,1% solo en la estación E1. A los 50 metros, mostró una tendencia a aumentar la proporción de Verrucomicrobia en función de las estaciones que se alejan del centro.

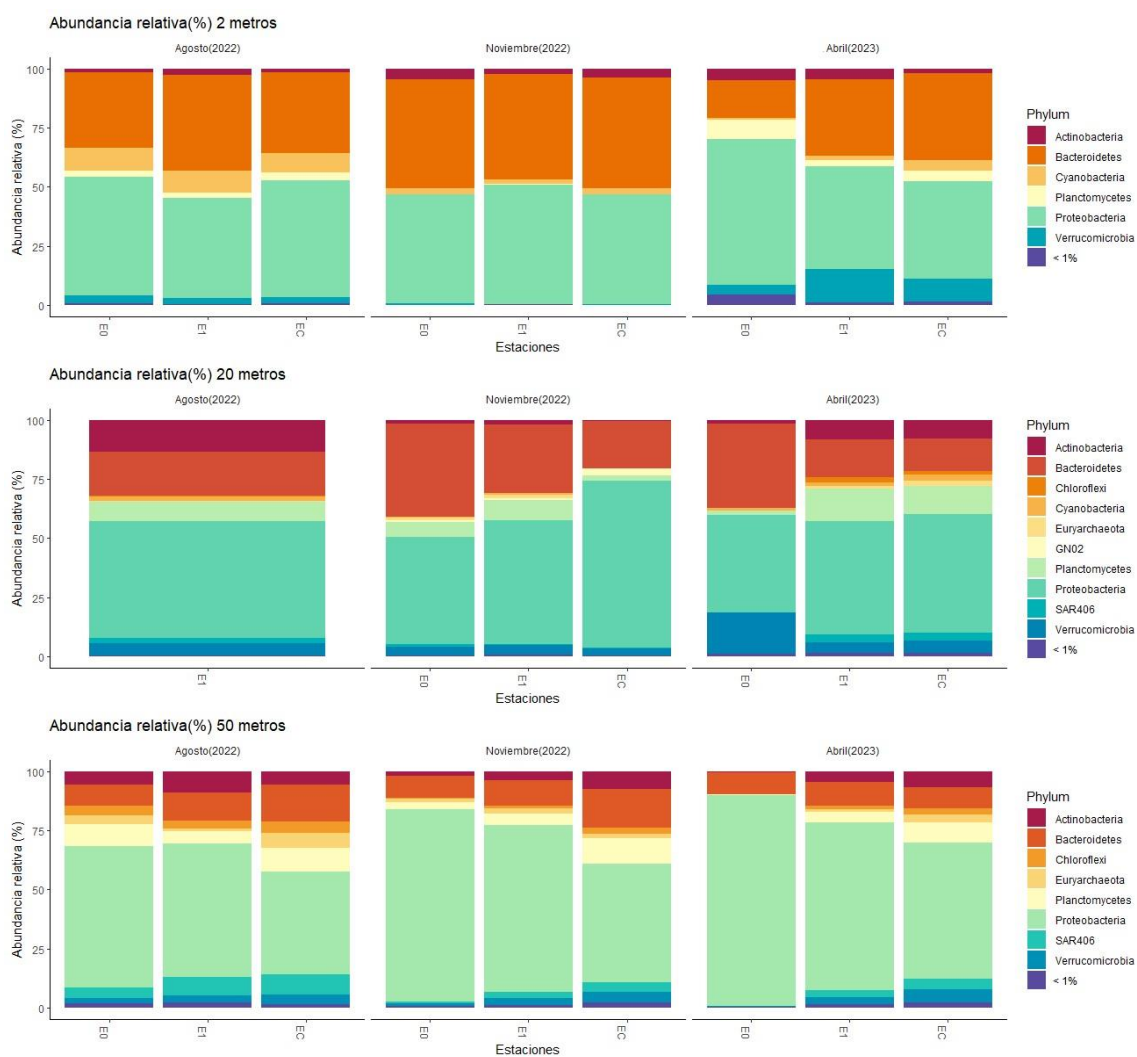


Figura N°13. Caracterización taxonómica (abundancia relativa) de los Phylum procarióticos más representativos de la columna de agua, en las diferentes profundidades (2 metros, 20 metros y 50 metros) y sus estaciones (E0, E1 y E2) en los distintos periodos de muestreo (agosto de 2022, noviembre de 2022 y abril de 2023). El $\leq 1\%$: Indica los taxones no identificados como dominantes en cada grupo, con una abundancia relativa media $\leq 1\%$, alcanzando en todas las profundidades un promedio de: 2m: $0,9 \pm 1,38\%$ | 20m: $0,7 \pm 0,4\%$ | 50m: $1,3 \pm 0,71\%$.

En cuanto a los sedimentos (Figura 14), a nivel de phylum hubo leves diferencias, mostrando patrones similares en los tres periodos y sus estaciones con respecto. Proteobacterias se encontró en mayor proporción con valores entre 33,4% hasta 43%. Los phylum Bacteroidetes, Actinobacteria y Chloroflexi en conjunto obtuvieron porcentajes que fluctuaron entre 27,1% hasta el 45%. Acidobacteria también predominó fluctuando entre 4,7% hasta 9,7%. Chloroflexi predominó con una fluctuación entre el 8% y 14,5% en sedimentos.

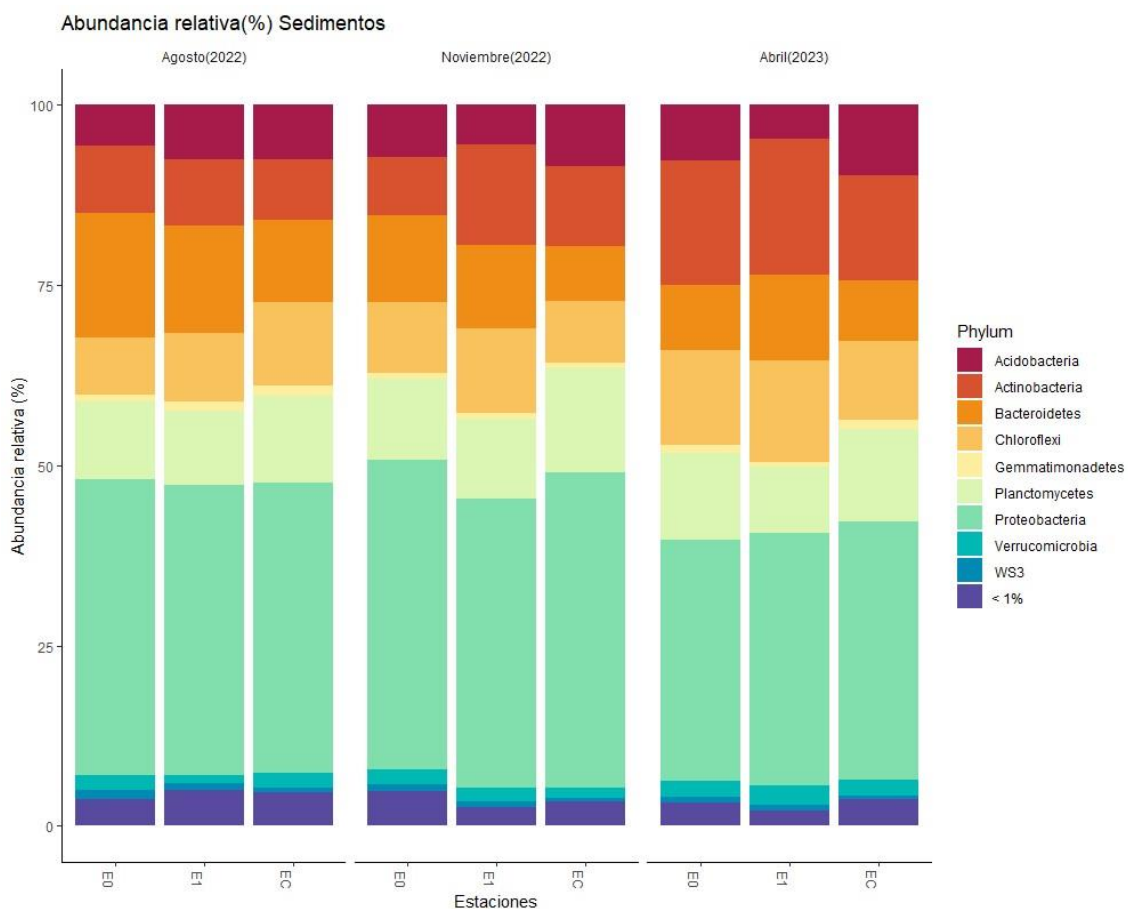


Figura N°14. Caracterización taxonómica (abundancia relativa) de los Phylum procararióticos de los sedimentos más representativos y sus estaciones (E0, E1 y E2) en los distintos periodos de muestreo (agosto de 2022, noviembre de 2022 y abril de 2023). El $\leq 1\%$: Indica los taxones no identificados como dominantes en cada grupo, con una abundancia relativa media $\leq 1\%$, alcanzando en todas las estaciones un promedio de $3,7\% \pm 0,9\%$.

En el análisis de las muestras de la columna de agua y sedimento recogidas durante los tres periodos de muestreo, se identificaron 134 Clases de procarientes. El análisis de la composición microbiana en la columna de agua destacó por la presencia y predominancia de la clase Gammaproteobacteria (Figura 15). Esta clase se encontró presente y predominante en las tres profundidades (2, 20 y 50 metros) y en todas las estaciones estudiadas, oscilando entre los 11,8% hasta 60,2%, valor más alto que alcanzó en noviembre a los 20 metros (primavera austral). Flavobacteria predominó en las tres profundidades, con porcentajes que fluctuaron entre los 7,7% hasta 45,6%, obteniendo los valores más altos en noviembre en la superficie y los menores valores a los 50 metros. La

clase Alphaproteobacteria también predominó, con mayores porcentajes en la superficie entre 10% hasta 26,7%, mientras que a los 20 metros predominó con valores que oscilan entre los 7,7% hasta 23,5%. A los 50 metros tanto para noviembre (primavera austral) como para abril (otoño austral) la mayor predominancia fue en Ec, con un promedio de $14,8 \pm 2,82$ %. Epsilonproteobacteria predominó solo a los 50 metros con un mayor porcentaje en E0 en el periodo de abril de 2023 (otoño austral), con un 76%, disminuyendo en medida las estaciones se alejan del centro.

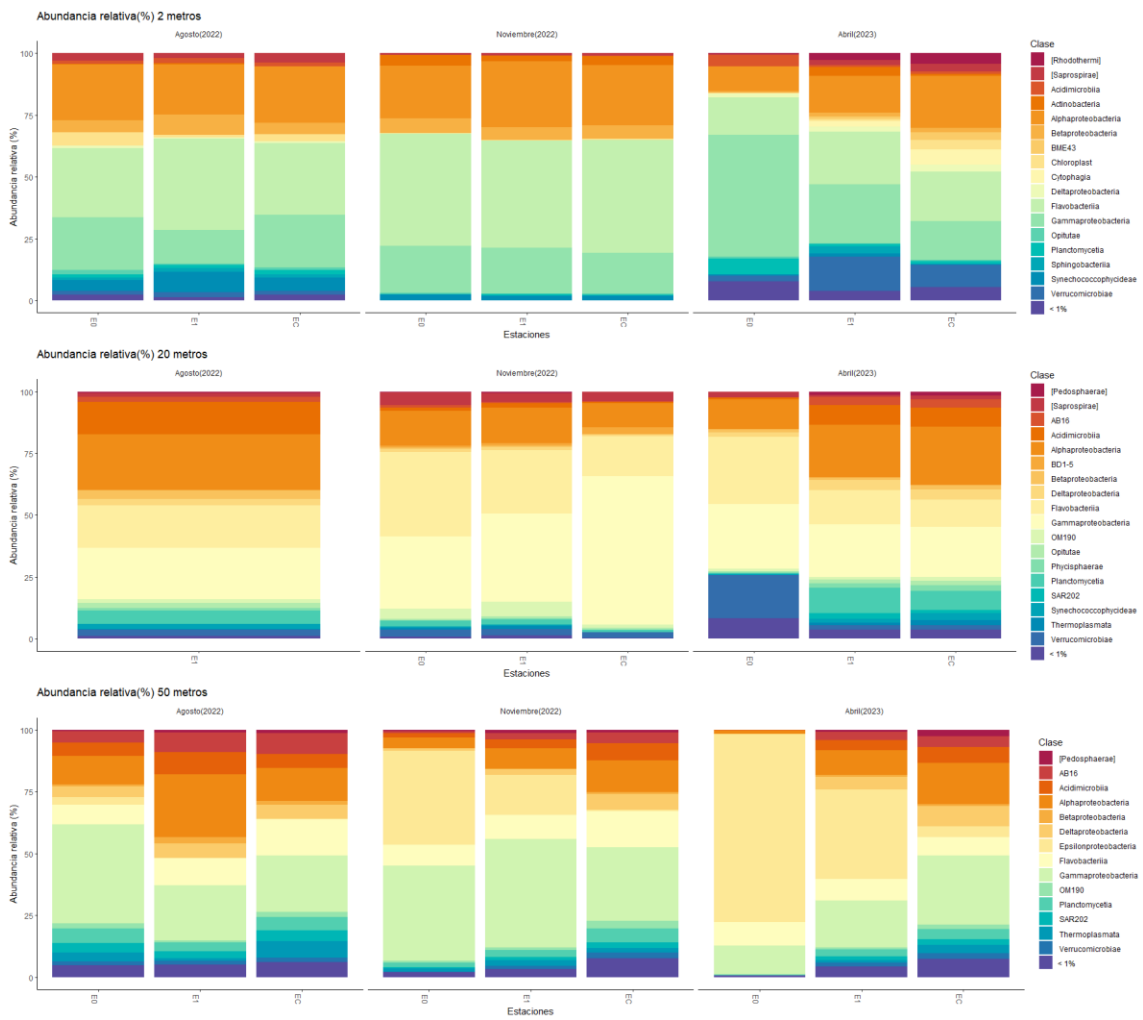


Figura N°15. Caracterización taxonómica (abundancia relativa) de las Clases procarióticas más representativas de la columna de agua, en las diferentes profundidades (2 metros, 20 metros y 50 metros) y sus estaciones (E0, E1 y Ec) en los distintos periodos de muestreo (agosto de 2022, noviembre de 2022 y abril de 2023). El $\leq 1\%$: Indica los taxones no identificados como dominantes en cada grupo, con una abundancia relativa media $\leq 1\%$. alcanzando en todas las profundidades un promedio de: 2m: $2,5 \pm 2,7\%$ | 20m: $2,7\% \pm 2,7\%$ | 50m: $6,5 \pm 11,5\%$.

En cuanto a los sedimentos, se detectó un patrón consistente a través de las tres estaciones y durante los tres periodos de muestreo (Figura 16), destacando la presencia de la clase Deltaproteobacteria, fluctuando entre el 16,9% hasta 27,4% entre los periodos y estaciones. La clase Gammaproteobacteria también predominó los sedimentos, con valores que fluctuaron entre los 8,4% hasta 16,1%. Otra clase predominante de los sedimentos, Planctomycetia con valores entre el 8,3% hasta 12,9%. Otra clase predominante de los sedimentos fue Anaerolineae, la que obtuvo porcentajes de abundancia relativa entre los 6,3% hasta 11,3%. Acidimicrobiia en mayor porcentaje en abril de 2023, oscilando entre el 10,9 al 11,8%.

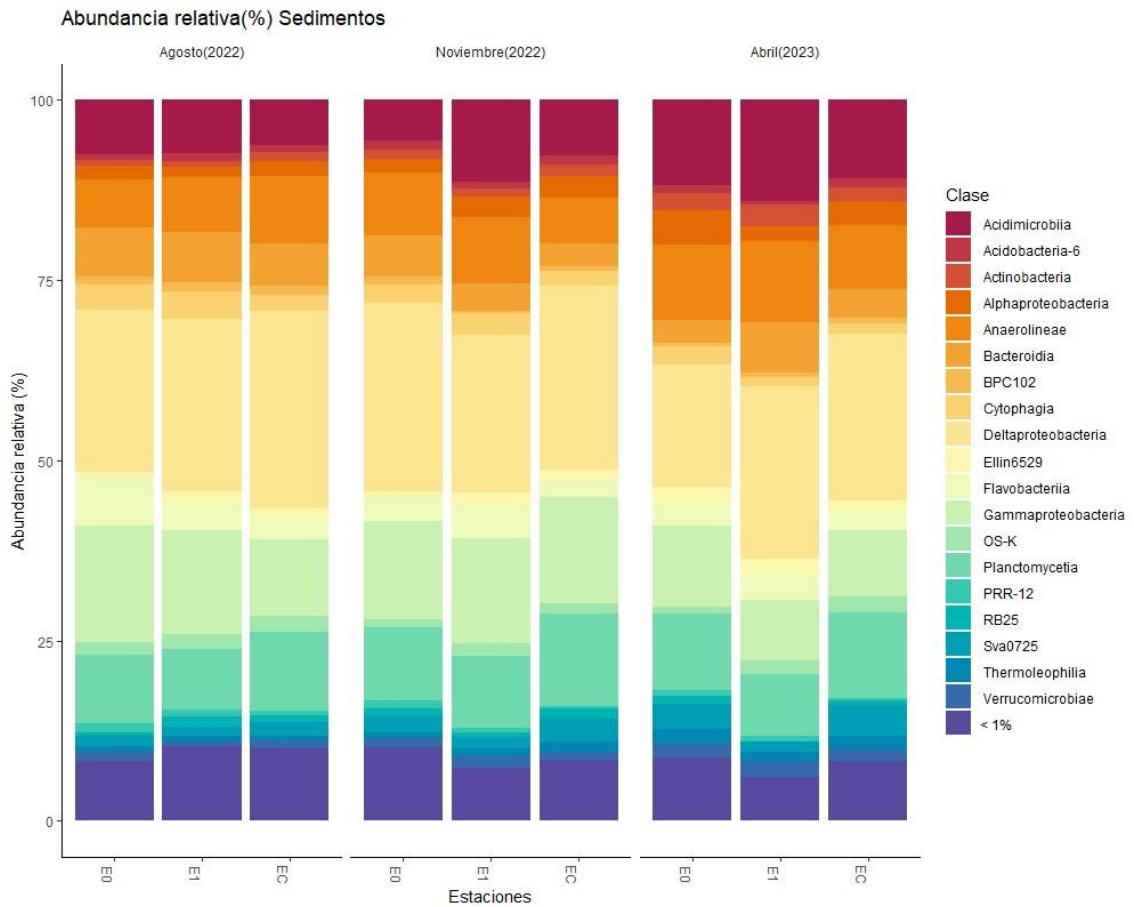


Figura N°16. Caracterización taxonómica (abundancia relativa) de las clases procarióticas de los sedimentos más representativos y sus estaciones (E0, E1 y E2) en los distintos periodos de muestreo (agosto de 2022, noviembre de 2022 y abril de 2023). El $\leq 1\%$: Indica los taxones no identificados como dominantes en cada grupo, con una abundancia relativa media $\leq 1\%$, alcanzando en todas las estaciones un promedio de $8,68 \pm 1,38\%$.

En el análisis de las muestras de la columna de agua y sedimento recogidas durante los tres periodos de muestreo, se identificaron 183 órdenes de procariontes. El orden con mayor abundancia relativa en la columna de agua fue entre los 2 y 20 metros Flavobacteriales desde el 10,9% hasta el 45,4%, mientras que a los 50 metros representó solo desde 7,7% hasta el 14,1% (Figura 17). El orden Alteromonadales obtuvo una mayor abundancia a los 2 metros, disminuyendo en medida se profundiza la columna de agua, con valores que oscilaron entre 2,1% hasta 39,1%. El orden Rickettsiales mostró una predominancia a medida se profundiza la columna de agua, con valores entre los 2,7% y 18%. Campylobacteriales predominó solo en los 50 metros de profundidad alcanzando en Ec su mayor abundancia, siendo abril el periodo en el cual obtuvo un mayor incremento con el 76% en E0.

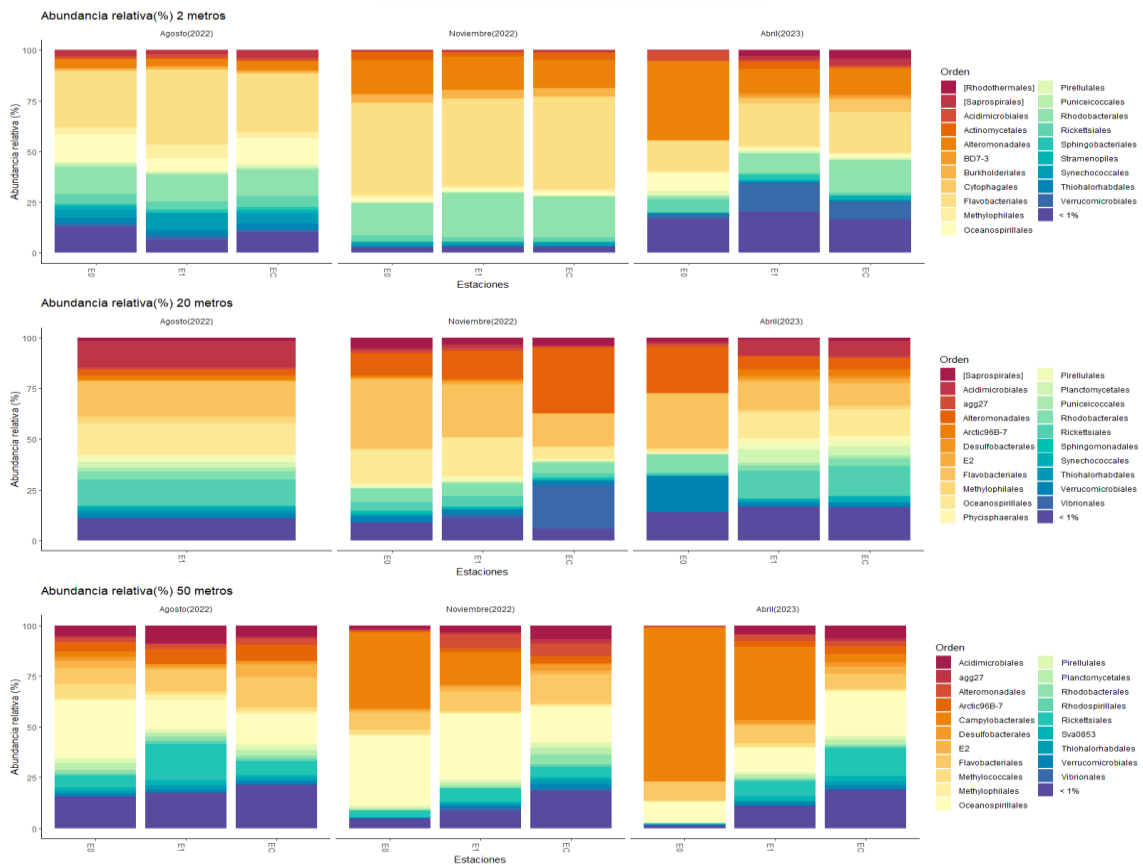


Figura N°17. Caracterización taxonómica (abundancia relativa) de órdenes de procariontes más representativos de la columna de agua, en las diferentes profundidades (2 metros, 20 metros y 50 metros) y sus estaciones (E0, E1 y Ec) en los distintos periodos de muestreo (agosto de 2022, noviembre de 2022 y abril de 2023). El $\leq 1\%$: Indica los taxones no identificados como dominantes en cada grupo, con una abundancia relativa media $\leq 1\%$, alcanzando en cada profundidad un promedio de: 2m: $10,27 \pm 6,7\%$ | 20m: $11,97 \pm 4,02\%$ | 50m: $13,1 \pm 7\%$.

En cuanto a los sedimentos, se detectó un patrón consistente a través de las tres estaciones y durante los tres periodos de muestreo (Figura 18), destacando la predominancia de Acidimicrobiales con valores de abundancia relativa de 5,6% hasta 14,1%. El orden Pirellulales predominó en sedimentos con valores que fluctuaron entre 2% y 11,9%. Desulfobacterales predominó, oscilando entre un 8,2% hasta el 15,3%, con mayores porcentajes en E0 en el periodo de agosto y noviembre.

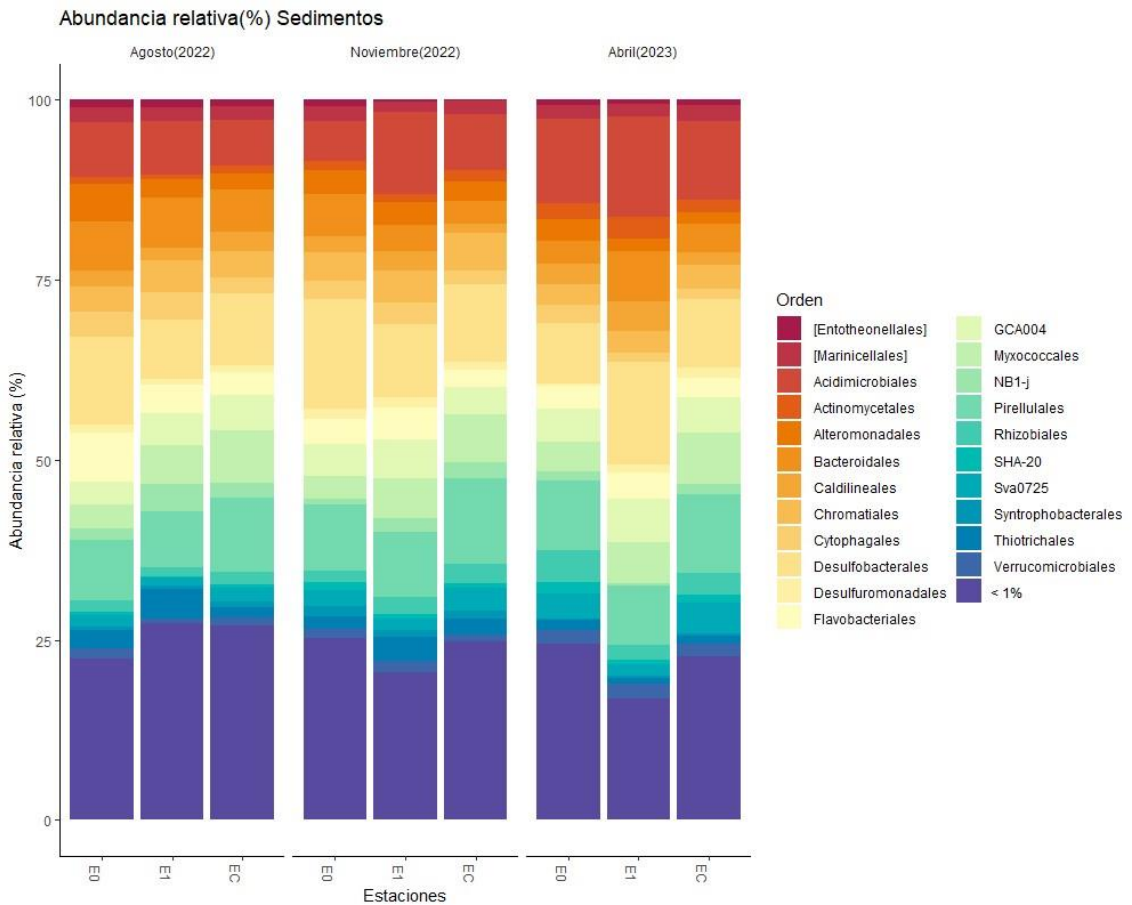


Figura N°18. Caracterización taxonómica (abundancia relativa) de órdenes de procariontes de los sedimentos más representativos y sus estaciones (E0, E1 y E2) en los distintos periodos de muestreo (agosto de 2022, noviembre de 2022 y abril de 2023). El $\leq 1\%$: Indica los taxones no identificados como dominantes en cada grupo, con una abundancia relativa media $\leq 1\%$, alcanzando en todas las estaciones un promedio de $23,49 \pm 3,34 \%$.

6. DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN

La salmonicultura es una actividad importante en la economía del país, se ha incrementado su producción principalmente en fiordos de la Patagonia, como los de la Región de Aysén (fiordo Puyuhuapi). Según el estudio de Soto *et al* (2020) mencionan que la salmonicultura chilena tiene un impacto ambiental significativo, lo que refuerza el estudio de Quiñones *et al* (2019), en el cual indican que la producción de salmón no está exenta de deficiencias sanitarias y ambientales. Estas generan emisiones de nutrientes y materia orgánica que pueden alterar los procesos biogeoquímicos y la estructura de las comunidades microbianas (Buschmann *et al.*, 2019; Xu *et al.*, 2018). Estas comunidades microbianas son los principales impulsores de estos procesos, los que sustentan la vida marina (Azam *et al.*, 1983; Barbier *et al.*, 2019). Su papel en la descomposición de la materia orgánica, el ciclo del nitrógeno y la fijación de carbono es crucial para la salud y el funcionamiento del ecosistema.

El presente estudio evaluó la influencia de la salmonicultura en la diversidad de las comunidades microbianas presentes en la columna de agua y sedimentos del fiordo Puyuhuapi. Mediante la caracterización de la variabilidad hidrográfica y su influencia en las comunidades, la diversidad microbiana en la columna de agua y la diversidad microbiana en el sedimento superficial en un gradiente de influencia de un centro de cultivo de salmones. Los resultados obtenidos contribuyen al conocimiento sobre la diversidad microbiana y el impacto de la salmonicultura en el fiordo Puyuhuapi en una escala de tiempo estacional (agosto 2022, noviembre 2022 y abril 2022).

Variabilidad hidrográfica de la columna de agua en los diferentes periodos de muestreo

En los primeros 10 metros de profundidad, la temperatura superficial del agua evidenció un comportamiento estacional, probablemente producido por las fluctuaciones estacionales de radiación. En noviembre de 2022 (primavera austral), tanto la estación E0 como la estación Ec, registraron una estratificación térmica más pronunciada en comparación a las estaciones de agosto de 2022 (invierno austral) y abril de 2023 (otoño

austral). En agosto de 2022, pese a ser más homogénea y obtener una menor temperatura en superficie, debido al aumento del caudal de los ríos y las precipitaciones (Gutiérrez *et al.*, 2018), se presentó bajo la capa superficial con temperaturas más bajas, la estratificación térmica inversa, obteniendo esta capa intermedia un incremento en su temperatura. Esto coincide con lo reportado en otros estudios en el fiordo Puyuhuapi acerca de la inversión térmica (Schneider *et al.*, 2014), la que podría ser el resultado de la advección de aguas oceánicas (Pérez-Santos *et al.*, 2014), que provienen por el canal Jacaf al norte del fiordo y el canal Moraleda al sur del fiordo.

El fiordo Puyuhuapi, posee una capa superficial altamente variable estacionalmente en términos de salinidad, lo que lleva a una estratificación vertical estacional dentro del fiordo y durante todo el año (Schneider *et al.*, 2014). Esto se refleja en que la salinidad superficial tiende a ser mayor en agosto de 2022 (invierno austral), mientras que, en noviembre de 2022 disminuyó considerablemente, lo que probablemente se relaciona con el flujo de agua dulce proveniente de la descarga del Río Cisnes y Ventisquero, escorrentía, derretimiento de hielo y nieve (Gutiérrez *et al.*, 2018).

El oxígeno disuelto, obtuvo en los primeros 10 metros un valor mayor, que descendió abruptamente en cada periodo estacional en la columna de agua, lo que llevó a alcanzar niveles bajos de oxígeno de alrededor de los 3 mg/L, sin embargo, no se alcanzan a considerar niveles hipóxicos (concentración de OD \leq 2 mg/L; Díaz & Rosenberg, 1995), sucesos recurrentes en el fiordo (Silva & Vargas, 2014). Estos niveles bajos de oxígeno sugieren un aumento de la materia orgánica en el fondo (Findlay *et al.*, 1995; Kutti *et al.*, 2007, 2008; Aranda *et al.*, 2010; Hargrave 2010), el que provoca una disminución del oxígeno disuelto en la columna de agua y también del potencial de oxidación-reducción en sedimentos (Hargrave *et al.*, 1993; Sanz-Lázaro & Marín 2008). Al aumentar la descomposición de materia orgánica excesiva en el medio, aumentará el consumo de oxígeno microbiano en las aguas más profundas, formando sulfuro de hidrógeno en condiciones anaeróbicas (Gray *et al.*, 2002; Hyland *et al.*, 2005).

La concentración de clorofila-a en la superficie en agosto de 2022 se encuentra dentro del

rango normal para el invierno en el fiordo Puyuhuapi (Ruiz-Pinto *et al.*, 2017). La disminución con la profundidad es consistente con la menor penetración de luz a mayor profundidad, limitando la fotosíntesis. En noviembre de 2022, el valor mínimo de clorofila-a en superficie fue inferior al rango reportado por Vargas *et al.* (2020) para noviembre (2,5 – 5,0 $\mu\text{g/L}$). El aumento de la clorofila-a con la profundidad en Ec hasta un máximo de 5,06 $\mu\text{g/L}$ a 20 metros de profundidad no se ha observado en estudios previos para noviembre (primavera austral), sin embargo en el fiordo Comau se registraron en enero de 2009, durante el verano austral, concentraciones $> 5,3 \mu\text{g/L}$ (Iriarte *et al.*, 2013), que se debió a una alta radicación fotosintética activa. La concentración máxima de clorofila-a en superficie es similar a la reportada por Vargas *et al.* (2020) para abril (3,5–4,0 $\mu\text{g/L}$). La disminución con la profundidad hasta un mínimo de 0,08 $\mu\text{g/L}$ a 50 metros es consistente con lo observado por Sotomayor *et al.* (2017).

La mayor concentración de nitrato en superficie se observó en agosto de 2022 (invierno austral). El estudio de Montecino *et al.* (2019) también encontró mayores concentraciones de nitrato en invierno en el fiordo Puyuhuapi con un rango hasta 8,7 $\mu\text{mol/L}$, no encontrando diferencias entre estaciones con y sin cultivos de salmones. Estos altos valores pueden deberse según el estudio de Iriarte *et al.* (2007).

La concentración de fosfato en la cabeza del fiordo Puyuhuapi, presentó una estructura vertical definida, caracterizada por una disminución en superficie, debido al consumo de los microorganismos fotosintetizadores (Silva & Calvete, 2002), el que va aumentando acorde se profundiza la columna de agua, debido a la remineralización de la materia orgánica. Lo que coincide con el presente estudio el cual presentó niveles de fosfato bajos en la superficie, los que fueron en aumento a medida la columna se profundizaba. La concentración de fosfato en la columna de agua no presentó diferencias significativas.

Existieron concentraciones de silicato en la superficie en el mes de noviembre de 2022 (primavera austral) $\geq 17,22 \mu\text{mol/L}$ superiores en la fecha en comparación al estudio de Silva (2006) del fiordo Comau y Puyuhuapi, el cual dice que el silicato posee niveles más altos en invierno, de 20,69 $\mu\text{mol/L}$ (julio 2012) lo que dadas las condiciones de

temperatura, el aporte fluvial, promueven su aumento. Se sugiere en este estudio, que en noviembre (primavera) aún hay una influencia del canal Moraleda, los aportes fluviales del invierno y el derretimiento de glaciares, entre otros adyacentes, podrían estar aportando concentraciones de silicato en la capa superficial en la fecha.

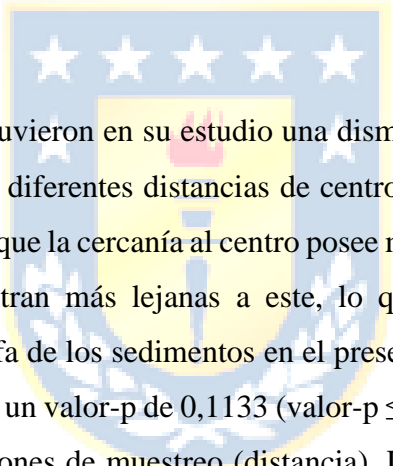
Diversidad alfa (α -diversidad) en la columna de agua y sedimentos

Los resultados de este estudio revelan que existe una gran diferenciación entre las muestras de la columna de agua y las de sedimentos, con una mayor riqueza y diversidad en las muestras de sedimento. Lo anterior es consistente con lo descrito por Eilertsen *et al.* (2013) en su estudio, con respecto a la diversidad de Shannon de los microorganismos, obteniendo un mayor índice en sedimentos en la estación control y debajo de jaulas de salmonicultura que en la columna de agua. Esto sugiere una mayor disponibilidad de materia orgánica como fuente de energía para una amplia gama de microorganismos, los que generan microambientes dentro de los sedimentos, con diferentes condiciones de oxígeno, pH y nutrientes, que favorecen la proliferación de diversos microorganismos. (Wang *et al.*, 2016).

Montero *et al.* (2022) sugieren que la materia orgánica derivada de la actividad salmonícola (alimentos no consumidos) durante las operaciones de cultivo podría ejercer una reducción de la riqueza de especies de una fracción significativa de los taxones más representativos del fiordo Puyuhuapi. Esto concuerda con los resultados de la diversidad alfa (Shannon y Chao1), que pese a no presentar diferencias significativas entre estaciones (distancia), se observa una disminución en la estación E0 en la superficie de la columna de agua a los 2 metros de profundidad, la que mediante la prueba estadística de Kruskal-Wallis presentó diferencias significativas en la riqueza Chao1, sin embargo, la diversidad de Shannon no presentó diferencias significativas. Esta discrepancia según lo mencionado por García-Martínez *et al.* (2023), se puede deber a que el índice de Chao1 es más sensible que el índice de Shannon a la presencia de especies raras en comunidades microbianas, lo que sugiere que la falta de diferencias significativas en el índice de Shannon no descarta la posibilidad de que haya diferencias en la riqueza de especies entre las comunidades. Estos resultados sugieren que la diversidad alfa en la columna de agua podría estar

parcialmente influenciada por la salmonicultura en la medida las estaciones se alejan del centro en la superficie de la columna de agua.

Se observó una mayor diversidad a los 50 metros de profundidad en el periodo de agosto de 2022 (invierno austral), acentuado en Ec, que coincide con el periodo de descanso, proceso en el cual la salmonicultura reducen sus operaciones de cultivo para permitir la recuperación del ecosistema acuático. Esto sugiere que el ciclo activo de crecimiento y cosecha (noviembre 2022 / abril 2023), poseen según el índice de diversidad de Shannon y riqueza de Chao, una disminución de la diversidad que podría estar relacionado a la operación del centro. Estos resultados se comprobaron con la prueba estadística de Kruskal-Wallis, la que arrojó diferencias significativas en la diversidad microbiana entre periodos de muestreo.



Buschmann *et al.* (2019) obtuvieron en su estudio una disminución en la diversidad alfa en bacterias en sedimentos a diferentes distancias de centros de cultivo de salmón en el fiordo Comau, evidenciando que la cercanía al centro posee menores niveles de diversidad que aquellas que se encuentran más lejanas a este, lo que discrepa con los valores obtenidos en la diversidad alfa de los sedimentos en el presente estudio, pese a no existir diferencias significativas con un valor-p de 0,1133 (valor-p \leq 0,05; según el estadístico de Kruskal-Wallis), entre estaciones de muestreo (distancia). De hecho, la estación control (Ec), presentó una disminución de la diversidad alfa (Shannon y Chao1) en comparación con la estación de mayor cercanía (E0). Si bien la tendencia al aumento del índice de diversidad a medida que las estaciones se acercan al centro de salmonicultura sugiere un posible efecto de la distancia, este estudio no encontró diferencias significativas.

Composición microbiana de la columna de agua y sedimentos

El escalamiento multidimensional no métrico permitió establecer asociaciones de la comunidad microbiana en la columna de agua, presentando diferencias verticales (profundidad) y estacionales (periodos de muestreo) en el gradiente, las que obtuvieron diferencias significativas (valor-p \leq 0,05) en cuanto a la composición, no así entre estaciones de muestreo (valor-p \geq 0,05). El ordenamiento en el espacio dimensional

demostró asociaciones acordes a la temperatura y oxígeno relacionadas con comunidades de la superficie, como también la salinidad y nitrógeno con comunidades más profundas. Estas relaciones entre estas variables y la comunidad microbiana fueron significativas (valor-p \leq 0,05). Así, la composición de las comunidades microbianas presentes en la columna de agua evidenció una fuerte segregación mediante el análisis de escalamiento multidimensional no paramétrico, marcada acorde se profundiza la columna de agua, lo que explicaría la correlación entre la composición a través del gradiente para las concentraciones de oxígeno, la salinidad y las concentraciones de nitrato. Adicionalmente, los periodos estacionales determinaron la correlación de la temperatura con las comunidades microbianas, lo que coincide con el estudio de Gutiérrez *et al.* (2018) en el que evidenciaron patrones de distribución de las comunidades procarióticas entre masas de agua en el ordenamiento en el espacio. Consistentemente, en este trabajo se comprobó diferencias significativas entre las profundidades (valor-p = 0,001, pseudo-F= 5,42) y periodos de muestreo (valor-p = 0,012, pseudo-F= 2,4).

La estructura de microbiomas presentes en sedimentos marinos generalmente se considera sensible a los cambios en las propiedades fisicoquímicas del agua y al historial los sedimentos en escalas de tiempo más largas que en la columna de agua, lo que genera en el sitio que dominen algunas especies de bacterias en el medio (Sapp *et al.* 2007; Bjørlykke 2014). En este trabajo se establecieron diferencias en las comunidades microbianas de sedimentos superficiales entre las estaciones de muestreo (valor-p \leq 0,05), lo que sugiere un potencial efecto de la distancia al centro de cultivo.

Caracterización de las comunidades microbianas

Órdenes como Flavobacteriales (Phylum Bacteroidetes; Clase Flavobacteriia), Rhodobacterales (Phylum Proteobacteria; Clase Alphaproteobacteria), Actinomycetales (Phylum Actinobacteria; Clase Actinobacteria) y Oceanospirillales (Phylum Proteobacteria; Clase Gammaproteobacteria) fueron abundantes en superficie. El orden Flavobacteriales, es uno de los más abundantes procariontes planctónicos marino, especialmente en aguas superficiales con un alto contenido de oxígeno (Gómez-Consarnau, L., *et al.*, 2012), siendo conocidos por su capacidad de degradar una amplia

gama de compuestos orgánicos (Teeling, H., *et al.*, 2012). El orden Rhodobacterales, son bacterias fotosintéticas, que pueden utilizar la luz solar como fuente de energía (Pinhassi, J., *et al.*, 2004). Según el estudio de Holmfeldt, K., *et al.* (2007), el orden Actinomycetales son conocidos por su capacidad de degradar materia orgánica compleja, mientras que las bacterias Oceanospirillales, son consideradas uno de las más abundantes en procariontes planctónicos marino.

A nivel de órdenes, Alteromonadales (Phylum Proteobacteria; Clase Gammaproteobacteria), Flavobacteriales (Phylum Bacteroidetes; Clase Flavobacteriia), Rhodobacterales (Phylum Proteobacteria; Clase Alphaproteobacteria) y Verrucomicrobiales (Phylum Verrucomicrobia; Clase Verrucomicrobiae), representaron los predominantes en superficie. Alteromonadales son conocidas por su capacidad para degradar una amplia gama de compuestos orgánicos, incluyendo proteínas, polisacáridos y lípidos en aguas frías, lo que contribuye al ciclo de nutrientes en el ecosistema (López & Rodríguez, 2004). Se han adaptado a condiciones de baja temperatura, lo que les permite prosperar en aguas profundas y polares (Bowman & McCuaig, 2003).

En aguas más profundas, los órdenes más representativos fueron Desulfobacterales (Phylum Proteobacteria; Clase Deltaproteobacteria), Flavobacteriales (Phylum Bacteroidetes; Clase Flavobacteriia) y Oceanospirillales (Phylum Proteobacteria; Clase Gammaproteobacteria). El orden Desulfobacterales son bacterias anaeróbicas que utilizan sulfato como aceptor final de electrones en la respiración (Muyzer, G., & Stams, A., 2008) y habitan en ambientes marinos con bajo contenido de oxígeno.

Las bacterias presentes en los sedimentos del fiordo juegan un papel crucial en la descomposición de la materia orgánica y el ciclo de nutrientes. En cuanto a los órdenes que predominaron sedimentos en el fiordo, Acidimicrobiales (Phylum Actinobacteria; Clase Acidimicrobiia), Myxococcales (Phylum Proteobacteria; Clase Deltaproteobacteria), GCA004 (Phylum Chloroflexi; Clase Anaerolineae), Pirellulales (Phylum Planctomycetes; Clase Planctomycetia). Entre los órdenes más prevalentes encontramos, Acidimicrobiales que son bacterias que prosperan en ambientes ácidos y

descomponen una amplia gama de compuestos orgánicos (Ward, N. L., *et al.* 2009). Myxococcales regulan las poblaciones bacterianas y descomponen materia orgánica en los sedimentos (Reichenbach, H., 2001). En cambio el orden GCA004, no pueden crecer en presencia de oxígeno y fermentan materia orgánica para producir energía (Hugenholtz *et al.*,1998).

Los resultados del estudio sugieren que la salmonicultura puede estar asociada a cambios en la diversidad y composición de las comunidades microbianas del fiordo Puyuhuapi. Esto se evidenció por la disminución de la diversidad alfa en la superficie de la columna de agua en las estaciones más cercanas al centro de cultivo de salmones, así como por las diferencias significativas en la composición de las comunidades microbianas entre las estaciones de muestreo.

Las variables ambientales, como el oxígeno, la temperatura, la salinidad y el nitrato, fueron importantes factores que determinaron la composición de las comunidades microbianas en la columna de agua. Si bien, no se estudió ni experimentó con la descomposición de la materia orgánica, estudios anteriores apuntan a que éste es un factor importante que determina la composición de las comunidades microbianas en los sedimentos.

La principal contribución de este estudio se encuentra en tener una aproximación del potencial efecto de la salmonicultura sobre la diversidad y composición de las comunidades microbianas a una escala anual del proceso productivo en los fiordos de la Patagonia Chilena. Este análisis proporciona una comprensión más detallada de cómo la actividad salmonícola podría tener una influencia sobre la ecología microbiana en este ecosistema estuarino, información que puede ser esencial para evaluar los impactos ambientales y diseñar estrategias de manejo más efectivas. Los cambios en la diversidad y composición de las comunidades microbianas podrían tener consecuencias negativas en la salud del ecosistema, como la disminución del oxígeno y la alteración de los procesos biogeoquímicos. Se necesitan más estudios para comprender mejor los impactos ambientales de la salmonicultura en el fiordo Puyuhuapi y desarrollar estrategias para

mitigarlos.

Finalmente, los resultados obtenidos permiten aceptar parcialmente la hipótesis 1, ya que, la distancia en la columna de agua y sedimentos en la diversidad alfa no fue un factor determinante para establecer una disminución de la diversidad en medida las estaciones se acercan, pese a obtener en los índices una tendencia a disminuir en las cercanías del centro. Sin embargo, la profundidad y periodos en alfa fueron concluyentes y coincidiendo con la composición de las comunidades microbianas las que fueron significativas en una segregación por profundidad y periodos en la columna de agua, por lo que la disminución esta más bien relacionada a la profundidad y periodo, los sedimentos permitieron comprobar mediante la diversidad beta resultados concluyentes, lo que podría explicar que la distancia si es un factor determinante.

En cuanto a la hipótesis 2, este estudio reveló que la columna de agua proporciona resultados concluyentes tanto en diversidad alfa como beta de la comunidad microbiana, mostrando una imagen clara de la riqueza de especies dentro de las estaciones y la variación en la composición de especies entre diferentes periodos de muestreo y sus profundidades. Por otro lado, los sedimentos muestran resultados menos concluyentes en cuanto a la diversidad alfa, con una disminución observada durante el ciclo activo (Noviembre 2022). Sin embargo, es importante destacar que se observan diferencias significativas en la composición de las comunidades entre estaciones en los sedimentos, lo que sugiere una respuesta diferencial de las especies a las condiciones que pueden registrar en el tiempo. Lo que lleva a aceptar parcialmente la hipótesis.

En ambos casos se sugiere a futuras investigaciones, corregir el diseño experimental, aumentando el periodo de tiempo de estudio para obtener una visión más amplia de la influencia de la salmonicultura, además se sugiere considerar el tamaño de las muestras en sedimentos, ya que su reducido número puede haber llevado a producir sesgos en la determinación de la diversidad, debido a las difíciles condiciones para obtener estas muestras.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Allison, SD., & Martiny, JB. (2008). Resistance, resilience, and redundancy in microbial communities. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(Suppl 1), 11512-11519. doi: 10.1073/pnas.0801925105

Andersen, AF., Riemann, L., & Bertilsson, S. (2010). Pyrosequencing reveals contrasting seasonal dynamics of taxa within Baltic Seabacterioplankton communities. *ISME J.*, 4, 171-181. doi: 10.1038/ismej.2009.108

Anderson, M. J. (2005). PERMANOVA: a FORTRAN computer program for permutational multivariate analysis of variance, 24 pp. Department of Statistics, University of Auckland.

Aranda, CP., Valenzuela, C., Matamala, Y., Godoy, F. A., & Aranda, N. (2015). Sulfur-cycling bacteria and ciliated protozoans in a Beggiatoaceae mat covering organically enriched sediments beneath a salmon farm in a southern Chilean fjord. *Marine Pollution Bulletin*, 100(1), 270-278. doi: 10.1016/j.marpolbul.2015.08.040

Aranda, C., Paredes, J., Valenzuela, C., Lam, P. y Guillou, L. (2010). Análisis molecular basado en el gen 16S rRNA de bacterias formadoras y acompañantes que cubren sedimentos marinos enriquecidos orgánicamente subyacentes a una granja de salmón en el sur de Chile (Isla Calbuco). *Gayana (Concepción)*, 74 (2), 125-135.

Attermeyer, K, Hornik, H, Kayler, ZE, Bahr, A, Zwirnmann, E, Grossart, HP, *et al.* (2014). Enhanced bacterial decomposition with increasing addition of autochthonous to allochthonous carbon without any effect on bacterial community composition. *Biogeosciences*, 11, 1479–1489. doi: 10.5194/bg-11-1479-2014

Azam, F. (1998). Microbial control of oceanic carbon flux: the plot thickens. *Science*, 280, 694–696. doi: 10.1126/science.280.5364.694

Azam, F., Fenchel, T., Field, JG., Gray, J. S., Meyer-Reil, LA., & Thingstad, F. (1983). The ecological role of water-column microbes in the sea. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 10, 257-263. doi: 10.3354/meps010257

Barbier, EB., Hacker, SD., & Kennedy, CJ. (2019). The role of marine microbial communities in ecosystem structure and function. *Annual Review of Marine Science*, 11, 469-499.

BioRad. (1999). *The DCode™ Universal Mutation Detection system* [Product Manual]. BioRad Laboratories.

Bjørlykke, K. (2014). Relationships between depositional environments, burial history and rock properties. Some principal aspects of diagenetic process in sedimentary basins.

Sedimentary Geology, 301, 1-14.

BOECO. (2023). *Termociclador BOECO TC-PRO®* [Manual de usuario]. BOECO GmbH & Co. KG.

Bolyen, E., Rideout, JR., Dillon, MR., Bokulich, NA., Abnet, CC., Al-Ghalith, GA., ... & Knight, R. (2019). Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nature Biotechnology*, 37(8), 852-857. doi:10.1038/s41587-019-0209-9.

Bowman, JP., & McCuaig, R. D. (2003). "Diversity and ecophysiology of psychrophilic bacteria in marine environments." *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 67(1), 66-100.]

Brune, A., Frenzel, P., & Cypionka, H. (2000). Significance of sediment-bound bacteria for the cycling of organic matter in the Namibian coastal upwelling area. *Marine Ecology Progress Series*, 195, 1-14.

Buschmann, AH., Cabello, F., & Young, K. (2019). Salmon aquaculture and the environment: The good, the bad, and the ugly. *Reviews in Aquaculture*, 11, 364-387.

Buschmann, AH., Riquelme, V., Hernández-González, MC., Varela, D., Jiménez, JE., Henríquez, L. A., et al. (2006). A review of the impacts of salmonid farming on marine coastal ecosystems in the southeast Pacific. *ICES Journal of Marine Science*, 63, 1338-1345. doi: 10.1016/j.icesjms.2006.04.021

Buschmann, A., López, D., & Medina, A. (1996). A review of the environmental effects and alternative production strategies of marine aquaculture in Chile. *Aquacultural Engineering*, 15, 397-421.

Cabello, FC., Godfrey, HP., Tomova, A., Ivanova, L., Doelz, H., Millanao, A., & Buschmann, A. H. (2013). Antimicrobial use in aquaculture re-examined: its relevance to antimicrobial resistance and to animal and human health. *Environmental Microbiology*, 15, 1917-1942.

Calvete, C., & Sobarzo, M. (2011). Quantification of the surface brackish water layer and frontal zones in southern Chilean fjords between Boca del Guafo (43°30'S) and Estero Elefantes (46°30'S). *Continental Shelf Research*, 31, 162-171.

Campbell, B. J., & Kirchman, D. L. (2013). Bacterial diversity, community structure and potential growth rates along an estuarine salinity gradient. *ISME J.*, 7, 210–220. doi: 10.1038/ismej.2012.93

Cole ST, Brosch R, Parkhill J, et al (1998). Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature.*;393(6685):537-44

Cole, JJ, Likens, GE, & Strayer, DL (1982). Photosynthetically produced dissolved organic carbon: an important carbon source for planktonic bacterial. *Limnol. Oceanogr.* 27, 1080–1090. doi: 10.4319/lo.1982.27.6.1080

Cruz-Leyva, M, Zamudio-Maya, M, Corona-Cruz, A, González-de la Cruz, J, & Rojas-Herrera, R (2015). Importancia y estudios de las comunidades microbianas en los recursos y productos pesqueros. *Ecosistemas y recursos agropecuarios*, 2(4), 99-115.

Díaz, R. & R. Rosenberg (1995). Marine benthic hypoxia: A review of its ecological effects and the behavioural response of benthic macrofauna. *Oceanography and Marine Biology*, 33: 245 – 303.

Eilertsen, I., Sørheim, H. T., & Grossart, H.-P. (2013). Microbial diversity and community structure in sediments underlying salmon farms in Norway. *FEMS Microbiology Ecology*, 86(2), 347-358.

El-Swais, H., Dunn, K. A., Bielawski, J. P., Li, WK., and Walsh, DA. (2015). Seasonal assemblages and short-lived blooms in coastal northwest Atlantic Ocean bacterioplankton. *Environ. Microbiol.* 17, 3642–3661. doi: 10.1111/1462-2920.12629

Findlay, RH., Watling, L., & Mayer, L. M. (1995). Environmental impact of salmon net-pen culture on marine benthic communities in Maine: a case study. *Estuaries*, 18, 145-179.

Fortunato, CS., & Crump, BC. (2015). Microbial gene abundance and expression patterns across a river to ocean salinity gradient PLoS ONE 10: e0140578. doi: 10.1371/journal.pone.0140578

Fortunato, CS., Eiler, A., Herfort, L., Needoba, JA., Peterson, TD., and Crump, BC. (2013). Determining indicator taxa across spatial and seasonal gradients in the Columbia River coastal margin. *ISME J.* 7, 1899–1911. doi: 10.1038/ismej.2013.79

García-Martínez, JL., López-López, A., & Herrera-Cervera, JA. (2023). Diferencias entre el índice de Shannon y el índice de Chao1 para medir la diversidad de comunidades microbianas. *Revista de Biología Tropical*, 71(1), 234-245.

Gjessing, J. (1956). Om iserosjon, fjorddal – dalendedannelse. *Norsk Geografisk Tidsskrift*, 15, 243–269.

Gómez-Consarnau, L., González, J. M., Coll-Lladó, M., Gourdon, P., Pascher, T., Neutze, R., ... & Pedrós-Alió, C. (2012). High-throughput sequencing of the Sargasso Sea bacterioplankton community reveals an important role for Flavobacteria in organic matter cycling. *Environmental Microbiology*, 14(11), 2842-2853.

Gray, JS., Wu, RSS., & Or, YY. (2002). Effects of hypoxia and organic enrichment on

the coastal marine environment. *Marine ecology progress series*, 238, 249-279.

Gutiérrez MH, Narváez D, Daneri G, Montero P, Pérez-Santos I and Pantoja S (2018) Linking Seasonal Reduction of Microbial Diversity to Increase in Winter Temperature of Waters of a Chilean Patagonia Fjord. *Front. Mar. Sci.* 5:277. doi: 10.3389/fmars.2018.00277

Gutiérrez, MH, Galand, PE, Moffat, C, and Pantoja, S (2015). Melting glacier impacts community structure of Bacteria, Archaea and Fungi in a Chilean Patagonia fjord. *Environ. Microbiol.* 17, 3882–3897. doi: 10.1111/1462-2920.12872

Hargrave, BT. (2010). Empirical relationships describing benthic impacts of salmon aquaculture. *Aquaculture Environment Interactions*, 1(1), 33-46.

Hargrave, BT., Duplisea, DE., Pfeiffer, E., & Wildish, DJ. (1993). Seasonal changes in benthic fluxes of dissolved oxygen and ammonium associated with marine cultured Atlantic salmon. *Marine Ecology Progress Series*, 249-257.

Herlemann, DPR., Labrenz, M., Jürgens, K., Bertilsson, S., Waniek, JJ., & Andersson, A. F. (2011). Transition in bacterial communities along the 200 km salinity gradient of the Baltic Sea. *ISME J.* 5, 1571–1579. doi: 10.1038/ismej.2011.41

Holmfeldt, K., Solonenko, S., Shah, M., & Bär-Gilissen, M-J. (2007). Diversity and distribution of marine benthic archaea and bacteria. *FEMS Microbiology Ecology*, 61(1), 96-111.

Holtedahl, H. (1967). Notes on the formation of fjords and fjord-valleys. *Geografiska Annaler Series A, Physical Geography*, 49, 188– 203.

Howe, JA., Austin, WE., Forwick, M., Paetzel, M., Harland, R., & Cage, AG. (2010). Fjord systems and archives: A review. *Geological Society, London, Special Publications*, 344(1), 5-15.

Hugenholtz, P., et al. (1998). "Novel rRNA gene sequences from the Berkeley Pit environmental clone library." *Environmental Microbiology*, 1(1), 61-67.)

Hyland, J., Balthis, L., Karakassis, I., Magni, P., Petrov, A., Shine, J., ... & Warwick, R. (2005). Organic carbon content of sediments as an indicator of stress in the marine benthos. *Marine ecology progress series*, 295, 91-103.

Iriarte JL, (2018) Natural and Human Influences on Marine Processes in Patagonian Subantarctic Coastal Waters. *Front. Mar. Sci.* 5:360. doi: 10.3389/fmars.2018.00360

Iriarte, JL, Ardelan, M. V, Cuevas, L. A, González, HE, Sánchez, N, & Mykkestad, AM (2014). Size-spectrum based differential response of phytoplankton to nutrient and iron-

organic matter combinations in microcosm experiments in a Chilean Patagonian fjord. *Phycol. Res.* 62, 136–146. doi: 10.1111/pre.12050

Iriarte, J.L., Pantoja, S., & Rutllant, J.A. (2007). Nutrient dynamics and water column stoichiometry in the Puyuhuapi Fjord and the Reloncaví Sound, southern Chile. *Continental Shelf Research*, 27(13), 1773-1787.

Kassambara, A. (2023). ggpubr: ‘ggplot2’ Based Publication Ready Plots. R package version 0.6.05.

Kruskal, W.H., & Wallis, W. A. (1952). Use of ranks in one-criterion variance analysis. *Journal of the American Statistical Association*, 47(260), 583-621.

Kutti, T., Ervik, A., & Hansen, P. K. (2007). Effects of organic effluents from a salmon farm on a fjord system. I. Vertical export and dispersal processes. *Aquaculture*, 262(2-4), 367-381.

Kutti, T., Ervik, A., & Høisæter, T. (2008). Effects of organic effluents from a salmon farm on a fjord system. III. Linking deposition rates of organic matter and benthic productivity. *Aquaculture*, 282(1-4), 47-53.

Labbé-Ibáñez, P, Iriarte, J.L., & Pantoja, S (2015). Response of microphytoplankton to the addition of nitrate and silicic acid in Chilean Patagonian fjords. *Latin American Journal of Aquatic Research*, 43(1), 80-93.

López-Pérez, M., & Rodríguez-Valera, F. (2004). "The importance of cold-adapted microorganisms in the marine environment." *Current Opinion in Microbiology*, 7(3), 237-243

Madigan, M.T., Bender, K.S., Buckley, D.H., Sattley, W.M., Stahl, D.A., & Brock, T.D. (2019). *Brock biology of microorganisms* (15th ed.). Pearson Education Limited.

Margesin, R., and Miteva, V. (2011). Diversity and ecology of psychrophilic microorganisms. *Res Microbiol* 162: 346–361.

Marín, V.H., Delgado, L.E., & Bachmann, P. (2008). Conceptual PHES-system models of the Aysén watershed and fjord (Southern Chile): testing a brainstorming strategy. *Journal of Environmental Management*, 88(4), 1109-1118.

McMurdie, P.J., & Holmes, S. (2013). phyloseq: An R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. *PLoS ONE*, 8(4), e61217. doi: 10.1371/journal.pone.0061217

Montecino, V., Soto, D., & Iriarte, J.L. (2019). Spatiotemporal variability of dissolved inorganic nitrogen in a Patagonian fjord system under the influence of salmon farming:

Potential implications for ecosystem functioning. *Science of the Total Environment*, 650, 2774-2785.

Montero, P, Daneri, G, Cuevas, LA, González, HE, Jacob, B, Lizárraga, L, *et al* (2007). Productivity cycles in the coastal upwelling area of Concepción: the importance of diatoms and bacterioplankton in the organic carbon flux. *Prog. Oceanogr.*75, 518–530. doi: 10.1016/j.pocean.2007.08.013

Montero, P., Daneri, G., González, HE., Iriarte, J. L., Tapia, FJ., Lizárraga, L., *et al.* (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(2-3), 202-215. doi: 10.1016/j.csr.2010.09.003

Montero, P., Gutiérrez, MH., Daneri, G., & Jacob, B. (2022). The effect of salmon food-derived DOM and glacial melting on activity and diversity of free-living bacterioplankton in Chilean Patagonian fjords. *Frontiers in Microbiology*, 12, 772900. doi: 10.3389/fmicb.2021.772900

Nesje, A & Whillans, IM (1994). Erosion of the Sognefjord. *Geomorphology*, 9, 33-45.

Oksanen, J., Blanchet, F. G., Friendly, M., Kindt, R., Legendre, P., McGlinn, D., ... Wagner, H. (2019). *vegan: Community Ecology Package* (Version 2.5-6) [Computer software].

Pantoja, S., Iriarte, J., & Daneri, G. (2011). Oceanography of the Chilean Patagonia. *Continental Shelf Research*, 31, 149-153.

Parsons, TR., Maita, Y., & Lalli, CM. (1984). A manual of chemical and biological methods for seawater analysis. *Pergamon Press*. doi: 10.25607/OBP-1830

Pérez-Santos, I., Garcés-Vargas, J., Schneider, W., Ross, L., Parra, S., & Valle-Levinson, A. (2014). Double-diffusive layering and mixing in Patagonian fjords. *Progress in Oceanography*, 127, 20-32. doi: 10.1016/j.pocean.2014.03.012

Pinhassi, J., Zweifel, UL., & Hagström, Å. (2004). Photosynthetic production by prochlorococcus in the central North Pacific gyre. *Deep-Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers*, 51(7), 1021-1034.

Piquet, AMT, Scheepens, JF, Bolhuis, H, Wiencke, C, and Buma, AGJ (2010) Variability of protistan and bacterial communities in two Arctic fjords (Spitsbergen). *Polar Biology*, 33: 1521–1536.

Quiñones, RA, Fuentes, M, Montes, RM, Soto, D, and León-Muñoz, J (2019). Environmental issues in Chilean salmon farming: a review. *Rev. Aquac.* 11, 375–402. doi: 10.1111/raq.12337

Reichenbach, H. (2001). "The ecology of the myxobacteria." *Cellular and Molecular Life Sciences*, 58(14), 1992-2000.)

Ríos, WL. (2023). Caracterización de microbiomas bacterianos presentes en suelos cacaoteros con alta y baja concentración de cadmio del municipio de Yacopí - Cundinamarca. (*Tesis de Maestría en Ciencias - Microbiología*). Universidad Nacional de Colombia.

Robles, K., Glasner, B., Alfaro, F., Andrade, S., Salazar, A., & De la Iglesia, R. (2017). Exploradores de indicadores ambientales: Análisis de parámetros fisicoquímicos, metales y comunidad microbiana en Fiordos y Ríos Patagónicos [Póster presentado en la Conferencia: Global Change and Patagonian Ecosystem Response: Present and Future Challenge, 2017]. doi: 10.13140/RG.2.2.22733.44000

Ruiz-Pinto, L., Montecino, V., Pizarro, O., & Sotomayor, A. (2017). Seasonal patterns of chlorophyll-a and phytoplankton in a highly dynamic Patagonian fjord (Puyuhuapi, Chile). *Marine Biology*, 164(1), 14.

Saiki, RK., Scharf, SJ., Faloona, FA., Mullis, KB., Horn, GT., Erlich, HA., & Arnheim, N. (1988). Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, 230(4732), 1350-1354. doi:10.1126/science.230.4732.1350

Sanz-Lázaro, C., & Marín, A. (2008). Assessment of finfish aquaculture impact on the benthic communities in the Mediterranean Sea. *Aquaculture I. Dynamic biochemistry, process biotechnology and molecular biology*, 2, 21e32.

Sapp, M., Wichels, A., Wiltshire, K. H., & Gerds, G. (2007). Bacterial community dynamics during the winter–spring transition in the North Sea. *FEMS Microbiology Ecology*, 59(3), 622-637.

Schneider, W., Pérez-Santos, I., Ross, L., Bravo, L., Seguel, R., & Hernández, F. (2014). On the hydrography of Puyuhuapi Channel (Chilean Patagonia). *Progress in Oceanography*, 129, 8–18. doi: 10.1016/j.pocean.2014.03.007.

Shannon, CE., & Weaver, W. (1949). The mathematical theory of communication. University of Illinois Press.

Silva, N. & C. Calvete. 2002. Características físicas y químicas de canales australes chilenos entre el golfo de Penas y el estrecho de Magallanes (Crucero CIMAR – Fiordo 2). *Cienc. Tecnol. Mar.*, 25 (1): 23 – 88.

Silva, N. & Valdenegro, A. (2008). Caracterización oceanográfica de canales australes chilenos entre la boca del Guafo y los canales Pulluche – Chacabuco (CIMAR 8 fiordos). *Cienc. Tecnol. Mar.*, 31 (1): 05 – 44

Silva, N. (2006). Oxígeno disuelto, pH y nutrientes en canales y fiordos australes. En Avances en el conocimiento oceanográfico de las aguas interiores chilenas, Puerto Montt a cabo de Hornos (N. Silva & S. Palma, Eds.), (pp. 37-43). Valparaíso: *Comité Oceanográfico Nacional* - Pontificia Universidad Católica de Valparaíso.

Silva, N., and Vargas, CA. (2014). Hypoxia in Chilean Patagonia fjords. *Prog. Oceanogr.* 129, 62–74. doi: 10.1016/j.pocean.2014.05.016

Silva, N., Calvete, C., & Sievers, H. (1998). Masas de agua y circulación general para algunos canales australes chilenos entre Puerto Montt y laguna San Rafael (Crucero CIMAR-Fiordo 1). *Ciencia y Tecnología del Mar*, 21, 17–48.

Smith, J., Jones, R., & Williams, T. (2023). Environmental factors influencing microbial community structure in a coastal ecosystem. *Journal of Marine Science*, 70(2), 234-245

Soto, D., & Norambuena, F. (2004). Evaluation of salmon farming effects on marine systems in the inner seas of southern Chile: a large-scale mensurative experiment. *Journal of Applied Ichthyology*, 20, 493-501. doi: 10.1111/j.1439-0426.2004.00591.x

Soto, D., León-Muñoz, J., Soria-Galvarro, Quiñones, y S. Marín. 2020. Propuesta de evaluación del desempeño ambiental de la salmonicultura chilena a escala de ecosistemas. *Informe científico*, Centro Interdisciplinario para la Investigación Acuícola (INCAR) y WWF Chile. Concepción, octubre 2020

Sotomayor, A., Pizarro, O., Montecino, V., & Zúñiga, G. (2017). Influencia del deshielo de glaciares en la concentración de nutrientes y clorofila-a en el Fiordo Puyuhuapi (44°S), Chile. *Anales del Instituto de la Patagonia*, 45(1), 5-16.

Storesund, JE., Erga, SR., Ray, JL., Thingstad, TF., & Sandaa, RA. (2015). Top-down and bottom-up control on bacterial diversity in a western Norwegian deep-silled fjord. *FEMS Microbiology Ecology*, 91, fiv076. doi: 10.1093/femsec/fiv076

Teeling, H., Fuchs, B. M., Becher, D., Klockow, C., Gardebrecht, A., Bennis, CM., ...Amann, R. (2012). Substrate-specific bacterioplankton responses to upwelling in the California Current. *Environmental Microbiology*, 14(11), 2835-2841.

Tironi, A., Marin, V., & Campuzano, F. (2010). A management tool for assessing aquaculture environmental impacts in Chilean Patagonian fjords: Integrating hydrodynamic and pellets dispersion models. *Environmental Management*, 45(5), 953-962. doi: 10.1007/s00267-010-9467-5

Turley, CM., Bianchi, M., Christaki, U., Conan, P., Harris, JRW., Psarra, S., et al. (2000). Relationship between primary producers and bacteria in an oligotrophic sea-the Mediterranean and biogeochemical implications. *Marine Ecology Progress Series*, 193, 11–18. doi: 10.3354/meps193011

Vargas, CA., Martinez, RA., 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(2), 187-201. doi: 10.1016/j.csr.2010.06.016

Vargas, CA., Sotomayor, A., Pizarro, O., & Montecino, V. (2020). Efectos del cambio climático en el ecosistema del Fiordo Puyuhuapi (44°S), Chile. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 55(2), 118-127.

Wang, Y., Zhang, Y., & Li, Y. (2016). Effects of organic matter enrichment on microbial diversity and community structure in an intertidal mudflat of the Yangtze Estuary, China. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(14), 6331-6342.

Ward, NL., et al. (2009). "Acidimicrobiales: a novel order of acidophilic bacteria isolated from geothermal soils." *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 59(Pt 11), 2909-2915.

Wickham, H. (2016). *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*. Springer-Verlag New York.

Wickham, H., François, R., Henry, L., & Müller, K. (2021). *dplyr: A Grammar of Data Manipulation*. R package version 1.0.7.

Xu, J., Zhang, Y., & Wang, G. (2018). Effects of salmon aquaculture on the diversity and composition of sediment microbial communities in the East China Sea. *Environmental Science & Pollution Research*, 25, 31458-31467.

Zeng, YX., Zhang, F., He, JF., Lee, SH., Qiao, ZY., Yu, Y., et al. (2013). Bacterioplankton community structure in the Arctic waters as revealed by pyrosequencing of 16S rRNA genes. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 103, 1309–1319. doi: 10.1007/s10482-013-9912-6