

Research Article

Respuesta del microfitoplancton a la adición de nitrato y ácido silícico en fiordos de la Patagonia chilena

Pamela Labbé-Ibáñez^{1,2}, José Luis Iriarte^{3,4} & Silvio Pantoja^{4,5}

¹Programa de Postgrado en Oceanografía, Departamento de Oceanografía
Universidad de Concepción, Concepción, Chile

²FICOLAB, Departamento de Botánica, Universidad de Concepción, Concepción, Chile

³Instituto de Acuicultura, Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile

⁴Programa COPAS Sur-Austral, Universidad de Concepción, Concepción, Chile

⁵Departamento de Oceanografía, Universidad de Concepción, Concepción, Chile

Corresponding author: Silvio Pantoja (spantoja@udec.cl)

RESUMEN. La Patagonia chilena está experimentando un aumento del uso del suelo y océano costero y el acelerado derretimiento de algunos glaciares, por lo que uno de los escenarios a futuro es que los fiordos adyacentes reciban cantidades variables de agua dulce y nutrientes inorgánicos. Se estudió la respuesta de ensamblajes de fitoplancton de los fiordos Reloncaví en invierno y Comau en primavera, a la adición de nitrato y ácido silícico en experimentos de microcosmos. Los ensamblajes fitoplanctónicos estudiados respondieron a la adición de nutrientes con incrementos en la abundancia celular biomasa autotrófica (clorofila-*a*) y cambios en la composición específica, destacando el cambio de dominancia de especies de diatomeas pennadas a céntricas formadoras de cadenas. Estos resultados dan indicios acerca de los factores que afectan a las comunidades microalgales en un escenario de cambio climático e intervención antrópica de los fiordos de la Patagonia Norte.

Palabras clave: microfitoplancton, diatomeas, nitrato, ácido silícico, fiordos, Patagonia chilena.

Response of microphytoplankton to the addition of nitrate and silicic acid in Chilean Patagonian fjords

ABSTRACT. Chilean Patagonia is experiencing an increase in the use of soil and coastal ocean and accelerated melting of some glaciers. One of the future scenarios is that the adjacent fjords would receive variable quantities of freshwater and inorganic nutrients. We studied the response of phytoplankton assemblages, of Reloncaví Fjord in winter and Comau Fjord in spring to the addition of nitrate and silicic acid in microcosm experiments. Phytoplankton assemblages responded to nutrient addition with increases in cell abundance, autotrophic biomass (chlorophyll-*a*) and with changes phytoplankton species composition, emphasizing alternation of pennate diatoms to centric chain-forming diatoms. These results provide evidence on the factors affecting natural microalgal communities in a climate change scenario and human intervention in Northern Patagonia.

Keywords: microphytoplankton, diatoms, nitrate, silicic acid, fjords, Chilean Patagonia.

INTRODUCCIÓN

La región de fiordos y canales de la Patagonia chilena (41-55°S) comprende alrededor de 240.000 km², siendo una de las regiones estuarinas más grandes del planeta. En la zona costera convergen aguas de baja salinidad (5-25) provenientes de deshielos de glaciares y escurrimiento de ríos, con alta concentración de ácido silícico

(2-30 μM, Silva *et al.*, 1998; González *et al.*, 2011), y aguas de origen antártico-subantártico (Silva, 2006), salinas (>31) con altas concentraciones de nitrato (>12 μM), y fosfato (>1 μM) (González *et al.*, 2011). Las concentraciones de ácido silícico son altamente variables, tanto a escala temporal como espacial nortesur, con una disminución de la concentración hacia la región subantártica (Iriarte *et al.*, 2007; Aracena *et al.*,

2011), debido a la estacionalidad de los caudales de los ríos.

La variabilidad en la concentración de nutrientes, asociada a la fluctuación estacional regional de la irradiación solar, influye fuertemente en la composición de ensambles de fitoplancton en la región de fiordos de la Patagonia (González *et al.*, 2010). La producción primaria en esta región es altamente estacional, con máximas tasas registradas durante primavera-verano (hasta $4 \text{ g C m}^{-2} \text{ d}^{-1}$) y valores mínimos durante los meses de invierno ($0,5 \text{ g C m}^{-2} \text{ d}^{-1}$) (Iriarte *et al.*, 2007; González *et al.*, 2010). La competencia interespecífica por algunos nutrientes considerados limitantes, tales como nitrógeno inorgánico, ácido silícico, y hierro en aguas costeras, modulan la composición de ensambles microalgales (Tilman *et al.*, 1982; Reynolds, 2006). Las razones atómicas de nutrientes N:P:Si:Fe y concentraciones en el ambiente determinarán la estructura del ensamble y finalmente la dominancia de ciertas especies de fitoplancton. Por ejemplo, dinoflagelados pueden utilizar fuentes de nitrógeno inorgánico y orgánico en ambientes costeros (Glibert & Terlizzi, 1999), y diatomeas incorporan ácido silícico para la formación de frústulos (valvas), siendo predominantes en áreas costeras templadas, especialmente en zonas de surgencia, desembocaduras de ríos, estuarios y fiordos, donde el aporte de silicio disuelto es alto (Avaria, 2006; Iriarte *et al.*, 2013). Las diatomeas contribuyen entre un 25 y 75% de la producción primaria oceánica global y juegan un rol clave en los ecosistemas marinos en la captura de CO_2 atmosférico (Nelson *et al.*, 1995; Treguer & Pondaven, 2000). De esto se infiere que cambios en el aporte de silicio disuelto, y por lo tanto cambios en la razón N:Si en zonas estuarinas y costeras, tendrían implicancias en el crecimiento de las diatomeas, y efectos sobre la producción primaria y biomasa fitoplanctónica.

En la zona austral de Chile, las diatomeas son predominantes en los ensambles fitoplanctónicos (Iriarte *et al.*, 2001, 2007; Alvez-de-Souza *et al.*, 2008). En fiordos y canales se encuentran mezclas de diatomeas marinas con estuarinas y de agua dulce (Avaria, 2006; Rebolledo *et al.*, 2011), que presentan fluctuaciones intra-anales en biomasa y diversidad debido a la variación estacional de la irradiación, que co-varía con la temperatura, precipitaciones y caudales de los ríos (González *et al.*, 2010). En primavera, la estructura base de la red trófica de los fiordos patagónicos está principalmente sustentada por diatomeas formadoras de cadenas debido al aumento de la radiación solar (Iriarte *et al.*, 2001), fotoperiodos extendidos, y al constante suplemento de ácido silícico proveniente de las descargas de agua dulce, y de

ortofosfato y nitrato desde el agua profunda bajo la picnoclina (Silva *et al.*, 1998). Adicionalmente, las condiciones físicas de flotabilidad, incremento de la estabilidad vertical y estratificación superficial propician la permanencia del fitoplancton en la zona fótica (~20 m) debido al aumento del aporte de aguas continentales en verano (Pizarro *et al.*, 2000). En algunas ocasiones, en los fiordos, esta estratificación estival provoca que la capa superficial de agua dulce con altas concentraciones de ácido silícico no logre mezclarse con la capa subsuperficial con altas concentraciones de N y P proveniente del océano, lo que genera una limitación estacional diferencial de estos nutrientes para la fotosíntesis (González *et al.*, 2011). Estas bajas concentraciones resultan en bajas razones N:Si (<1) en primavera y verano que podrían limitar la productividad primaria mediada por diatomeas. Se ha sido sugerido también que el nitrógeno inorgánico limitaría la producción primaria en la zona de fiordos del sur de Chile, debido a la presencia de una razón N:P < 10 comparada con la razón teórica de Redfield-Ketchum-Richards de 16:1 (Iriarte *et al.*, 2007). Por otra parte, Soto & Norambuena (2004) han señalado que el incremento de las actividades de acuicultura y antropogénicas en la zona costera del sur de Chile puede, potencialmente, incrementar las razón N:Si en los fiordos, favoreciendo el establecimiento de especies de fitoplancton que no son diatomeas, como flagelados (incluyendo dinoflagelados tecados y atecados), de los cuales hay una cantidad importante de especies que producen floraciones algales nocivas (Soto & Norambuena, 2004; Silva, 2006). Sin embargo, Carter *et al.* (2005) han documentado que diatomeas céntricas *Chaetoceros*, *Skeletonema* y *Thalassiosira* aumentan sus tasas de crecimiento como respuesta a la adición de nitrato. Tal vez asociado a esto, en el Mar Interior de Chiloé en la Patagonia chilena (41-43°S), los programas de monitoreo muestran floraciones frecuentes de diatomeas céntricas como *Leptocylindrus danicus*, *L. minimus* y *Chaetoceros convolutus*, y de dinoflagelados como *Dinophysis acuminata* y *Alexandrium catenella* (Iriarte *et al.*, 2013).

Las floraciones de fitoplancton en la zona sur-austral de Chile, incluyendo aquellas denominadas "Floraciones Algales Nocivas" tienen un alto impacto ambiental, ecológico y comercial, sin embargo, las causas permanecen desconocidas. Debido al aumento de las actividades de agricultura, acuicultura, silvicultura, y el acelerado derretimiento de algunos glaciales patagónicos (Pantoja *et al.*, 2011), uno de los escenarios probables es el aumento de las entradas de nutrientes a estos sistemas acuáticos, alterando las concentraciones y/o razones de nutrientes, con el consiguiente cambio en la composición específica de

las microalgas y la dominancia de especies potencialmente nocivas. Por lo anteriormente expuesto, es relevante determinar la relativa importancia de concentraciones de nutrientes inorgánicos sobre el crecimiento de ensamblajes naturales de fitoplancton en los fiordos patagónicos chilenos. Determinar la respuesta de corta escala (días) a factores que afectan el crecimiento del fitoplancton es clave para predecir la estructura de los ensamblajes de los niveles tróficos inferiores y su incidencia en los niveles tróficos superiores y, por lo tanto, el funcionamiento del ecosistema frente a cambios naturales de origen remoto (cambio global) o inducidos por la actividad humana (acuicultura).

El objetivo general de este estudio es determinar la respuesta de corto período del microfitoplancton a diferentes concentraciones de los nutrientes clave, nitrato, fosfato, y ácido silícico, dando énfasis a los cambios en composición taxonómica, abundancia y biomasa autotrófica, bajo condiciones de invierno y primavera, utilizando inóculos de ensamblajes naturales obtenidos desde dos fiordos patagónicos chilenos. Se quiere probar la hipótesis que la adición y remoción de nutrientes inorgánicos generan cambios en la composición de especies de microfitoplancton (diatomeas y dinoflagelados), independiente del inóculo inicial.

MATERIALES Y MÉTODOS

Áreas de estudio

a) El Fiordo Reloncaví (41°S) está localizado en el borde oriental del Pacífico sur, en la zona norte de la Patagonia chilena (Fig. 1), y se extiende por alrededor de 55 km. La boca del fiordo desemboca en el Estuario Reloncaví, recibiendo un flujo de agua dulce de $800 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$ de los ríos Puelo, Cochamó y Petrohué, con una importante carga de silicio disuelto. Este es uno de los tres fiordos patagónicos que no está influenciado por glaciares, por lo tanto no tiene grandes cantidades de sedimentos inorgánicos finos suspendidos en la columna de agua, en comparación a otros fiordos más australes (Pickard, 1971).

b) El Fiordo Comau (o Leftepu) (42,39°S, 72,44°W) está localizado en el borde oriental del Pacífico sur, en la zona norte de la Patagonia chilena (Fig. 1). El fiordo tiene aproximadamente 30 km de largo, se encuentra orientado hacia el noroeste, dirigiéndose en su última parte hacia el oeste, abierto al Golfo de Ancud a través del Canal Comau. Al igual que el Fiordo Reloncaví, no está influenciado por glaciares, y posee un alto escurrimiento de agua dulce hacia el fiordo debido a la presencia de vertientes de agua dulce e influencia de los ríos Blanco, Huinay y Vodudahue.

Las precipitaciones en el sector donde se encuentran ambos fiordos, son altamente estacionales, con un invierno lluvioso (junio-julio: >2000 mm) y un verano seco (diciembre-marzo: <800 mm) (Dávila *et al.*, 2002).

Diseño experimental

Para aislar la fracción de tamaño mayor a $20 \mu\text{m}$ del ensamblaje de fitoplancton se recolectaron muestras de agua en invierno del Fiordo Reloncaví y en primavera del Fiordo Comau con una bomba de teflón. Las muestras de agua se prefiltraron a través de un tamiz de nylon de $20 \mu\text{m}$ para obtener el inóculo de microfitoplancton. Los experimentos de adición se realizaron en cuatro tratamientos y en duplicado con distintas concentraciones de nitrato, fosfato y ácido silícico (Tabla 1), permitiendo comparar los efectos del incremento o deficiencia de estos nutrientes en el crecimiento y composición de los ensamblajes (Piehler *et al.*, 2004).

Los medios de cultivo experimentales se prepararon en agua de mar recolectada desde 5 m de profundidad en (1) Bahía Ilque (Fig. 1), a 60 km del Fiordo Reloncaví para el experimento de invierno, y (2) en el Fiordo Comau (Estación Huinay) para el experimento de primavera. A esa profundidad la radiación fotosintéticamente activa era de *ca.* 40% de la superficial. El agua fue extraída mediante una bomba de diafragma de teflón y almacenada en bidones de polietileno Nalgene de 50 L, filtrada con filtros de fibra de vidrio MFS de poro de $0,7 \mu\text{m}$ para remover fitoplancton y mantenida en oscuridad a 4°C hasta el inicio del experimento, 48 h más tarde. El agua fue repartida en botellas de policarbonato Nalgene de 4 L transparente a longitudes de onda entre 400 y 700 nm, a las cuales se les adicionó NO_3^- , PO_4^{3-} y Si(OH)_4 de acuerdo a cada tratamiento (Tabla 1). El agua de mar utilizada en los medios de cultivo tiene características similares en salinidad, temperatura, y concentración de nutrientes inorgánicos a aguas de los fiordos Comau y Reloncaví, con valores típicos de invierno y primavera.

Las botellas conteniendo los medios de cultivo experimentales con los inóculos de fitoplancton fueron incubadas en un estanque abierto de plástico de alta densidad de color blanco de 1 m^3 conteniendo 1000 L de agua, mantenido con agua circulante para mantener la temperatura constante durante los experimentos. El estanque se localizó en el laboratorio costero de la UACH Campus Puerto Montt bajo condiciones naturales de temperatura y radiación características de las estaciones de invierno (agosto) y primavera (diciembre). Para evitar la sedimentación de los organismos, las botellas de incubación fueron agitadas suavemente en forma manual tres veces al día (mañana,

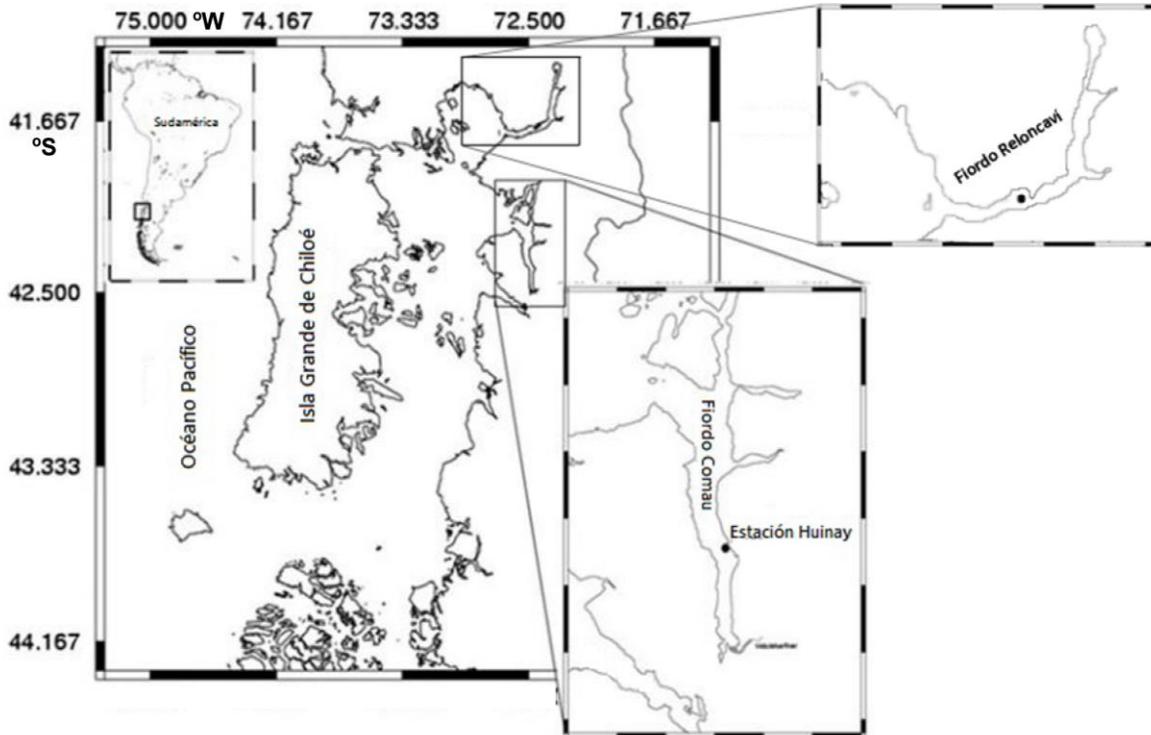


Figura 1. Mapa de ubicación de los sitios de recolección (círculos negros) de inóculos de fitoplancton en los fiordos Reloncaví (41°S) en invierno y Comau (42°S) en primavera.

mediodía y tarde). Los experimentos fueron realizados por 13 días en invierno y 11 días en primavera.

Biomasa autotrófica (clorofila-*a*)

La clorofila-*a* fue determinada cada dos días en submuestras de 50 mL de todas las réplicas de cada tratamiento mediante filtración con bomba de vacío y filtros GF/F de tamaño de poro de 0,7 μm . Las muestras fueron almacenadas a -18°C en sobres de papel aluminio y en bolsas selladas.

Adicionalmente, se determinó la concentración de clorofila-*a* en cada clase de tamaño al final de las incubaciones para lo cual se realizó el fraccionamiento por clases de tamaño de fitoplancton en submuestras de 50 mL mediante filtración: (1) el nanofitoplancton (2-20 μm) se obtuvo tamizando la submuestra por 20 μm y re-filtrando el filtrado $<20 \mu\text{m}$ en membrana de policarbonato de poro 2 μm , (2) el picofitoplancton se obtuvo filtrando la fracción $<2 \mu\text{m}$ en filtro GF/F de poro 0,7 μm (0,7-2 μm), y (3) el microfitoplancton se obtuvo por sustracción de la concentración de clorofila-*a* de las fracciones de nano + picoplancton de la lectura de la muestra de clorofila-*a* de fitoplancton (total). Los filtros fueron almacenados a -18°C en sobres de papel aluminio y en bolsas selladas. La concentración de

clorofila-*a* se determinó de acuerdo a Parsons *et al.* (1984) en un fluorómetro digital Turner P-700.

Abundancia celular y composición taxonómica de fitoplancton

Se removieron alícuotas de 50 mL cada dos días de incubación, se almacenaron en tubos Falcon, fijadas y preservadas en 1% lugol. El conteo de las células de microfitoplancton ($>20 \mu\text{m}$) se realizó mediante sedimentación en cámara Utermöhl de 10 mL. Para el reconocimiento de grupos y géneros/taxa integrantes del ensamble se obtuvo 10 mL de muestra y se dejó decantar en cámaras de sedimentación por 12 h. El fondo de la cámara se observó mediante microscopía invertida de acuerdo a Hasle (1978) y la abundancia se expresó en (cél L^{-1}).

Nutrientes inorgánicos

Para la estimación de la concentración de NO_3^- , PO_4^{3-} y Si(OH)_4 durante las incubaciones, se extrajeron muestras de 60 mL de agua filtrada que fueron almacenadas en frascos PET de alta densidad (Nalgene), previamente lavados con ácido, y congeladas (-18°C) hasta su análisis. Esta metodología estuvo basada en Parsons *et al.* (1984).

Tabla 1. Concentraciones de NO_3^- , PO_4^{3-} y $\text{Si}(\text{OH})_4$ y razón N:Si y N:P en el tiempo inicial y final para cada uno de los tratamientos, obtenidos desde los microcosmos durante los periodos de incubación en invierno y en primavera. Valores expresados en μM .

Temporada	Tratamiento	Día inicial						Día final					
		NaNO_3	NaH_2PO_4	$\text{Na}_2\text{O}_5\text{Si}$	Razón N:Si	Razón N:P		NaNO_3	NaH_2PO_4	$\text{Na}_2\text{O}_5\text{Si}$	Razón N:Si	Razón N:P	
Invierno 2009	T1	21,61	2,47	17,62	1,23	8,77	0,60	0,53	3,17	0,19	1,12		
	T2	22,04	2,07	2,60	8,48	10,64	9,30	1,07	9,20	1,01	8,73		
	T3	21,80	2,18	54,38	0,40	10,02	6,24	1,19	35,68	0,17	5,25		
	T4	3,16	2,27	24,09	0,13	1,40	1,50	1,36	11,52	0,13	1,11		
Primavera 2009	T1	23,24	2,71	21,32	1,09	8,56	10,04	0,00	15,57	0,64	n/d		
	T2	20,93	2,43	2,10	9,97	8,63	10,74	0,93	13,37	0,80	11,56		
	T3	23,53	2,03	60,26	0,39	11,59	10,87	0,00	41,39	0,26	n/d		
	T4	2,22	2,28	22,22	0,10	0,97	0,26	0,33	20,13	0,01	0,79		
Razón teórica Redfield		1,07						1,07					

*n/d: no determinado

Análisis estadístico

Para detectar diferencias cualitativas de la respuesta de taxa y grupos de fitoplancton a la adición de nutrientes, se realizaron análisis de estadística descriptiva, comparando la importancia relativa de taxa y grupos en los tiempos inicial y final de cada experimento. Para detectar la relevancia de la adición de nutrientes en la abundancia total y la biomasa autotrófica de los ensambles de fitoplancton estudiados, se realizaron análisis de varianza con réplicas balanceadas de un factor (ANOVA) (Zar, 1984), utilizando como variables dependientes la abundancia total de células de fitoplancton y la biomasa autotrófica, y como factores los tratamientos (cuatro niveles: T1, T2, T3, T4), para cada uno de los experimentos estacionales. El supuesto de homogeneidad de varianzas fue validado de acuerdo a las pruebas de Cochran y *a posteriori* de Tukey.

RESULTADOS

Abundancia de microfitoplancton en los experimentos

En el experimento del Fiordo Reloncaví en invierno, se observó un lento aumento en la abundancia de células en todos los tratamientos a partir del inóculo inicial (33 cél mL^{-1} en promedio), con abundancias inferiores a $1.000 \text{ cél mL}^{-1}$ durante los primeros siete días de incubación (Fig. 2a). Se registraron diferencias significativas entre los tratamientos T1 y T4 (ANOVA: $F = 2,89$; $P < 0,05$). La abundancia máxima en este experimento se observó en el tratamiento T1 (N+P+20Si), con una abundancia de $7.235 \text{ cél mL}^{-1}$. El tratamiento sin adición de nitrato (T4) resultó en una abundancia baja ($<1.500 \text{ cél mL}^{-1}$) y homogénea durante los 13 días, mientras que en los tratamientos sin adición de ácido silícico (T2: N+P-Si) y tres veces la adición de ácido silícico (T3: N+P+60Si) se registraron abundancias máximas de *ca.* $2.600 \text{ cél mL}^{-1}$ después de los 9 días (Fig. 2a). Las concentraciones de nitrato, fosfato y ácido silícico disminuyeron durante los 13 días del experimento (Figs. 6a- 6c, Tabla 1).

El ensamble de microfitoplancton al inicio del experimento de invierno estuvo constituido principalmente por diatomeas céntricas, siendo las más abundantes *Skeletonema* spp., *Detonula* spp., *Thalassiosira* spp. y *Leptocylindrus* spp., dominando *Skeletonema* spp. en los tratamientos T1, T3 y T4, y *Detonula* spp. en T2. En el ensamble de invierno se mantuvo la dominancia de especies de diatomeas céntricas durante todo el experimento. Sin embargo, al finalizar el experimento, en el tratamiento T3, la dominancia de especies se alternó de *Skeletonema* spp. hacia *Thalassiosira* spp., mientras que en los tratamientos T1,

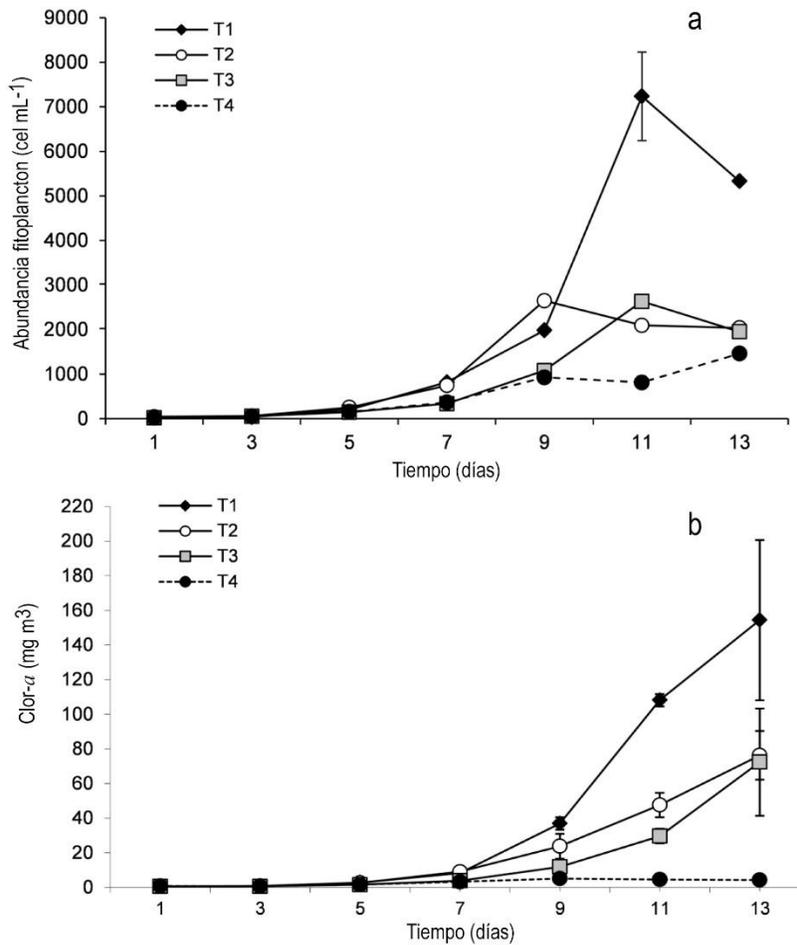


Figura 2. Cambio en a) abundancia (cél mL⁻¹) y b) clorofila *a* (mg m⁻³) del ensamble de fitoplancton del Fiordo Reloncaví durante el experimento de invierno en los cuatro tratamientos (T1, T2, T3 y T4). Valores expresados como promedio \pm error estándar (n = 2).

T2 y T4, se mantuvo la dominancia de *Skeletonema* spp. y *Detonula* spp. (Fig. 4a).

En el experimento de primavera en el Fiordo Comau, la abundancia celular de los ensambles de microfitoplancton fueron menores a las del experimento de invierno en Reloncaví. Los tratamientos T1 y T2 respondieron con abundancias relativamente altas en los días 7 y 9, respectivamente. Se detectaron diferencias significativas entre los tratamientos T1 con respecto a T3 y T4 (ANOVA: $F = 5,27$; $P < 0,05$). El tratamiento T1 alcanzó una abundancia máxima de 1.049 cél mL⁻¹ en el día 11, mientras que el tratamiento T2 alcanzó una abundancia máxima de 546 cél mL⁻¹ al día 9 de incubación. Los tratamientos T3 y T4 registraron abundancias muy bajas y constantes durante todo el experimento (Fig. 3a). Las concentraciones de nitrato, fosfato y ácido silícico disminuyeron durante los 11 días del experimento (Figs. 6d-6f, Tabla 1).

El ensamble de microfitoplancton inicial de primavera estuvo compuesto principalmente por diatomeas céntricas *Leptocylindrus* spp. y *Rhizosolenia* spp. y pennadas *Thalassionema* spp., *Cylindrotheca* sp. y *Pseudonitzschia* spp., siendo dominante *Pseudonitzschia* spp., en los tratamientos T1 y T2, y *Leptocylindrus* spp. en los tratamientos T3 y T4. Al finalizar el experimento, la composición del ensamble cambió y las diatomeas céntricas dominaron en todos los tratamientos, con *Chaetoceros* spp. dominando en el tratamiento T1, *Skeletonema* spp. en los tratamientos T2 y T3, y *Rhizosolenia* spp. en T4 (Fig. 4b).

Biomasa autotrófica (clorofila-*a*) del ensamble de fitoplancton en los experimentos

En los experimentos de invierno y primavera se observó un retardo en la respuesta de la biomasa autotrófica con valores >20 mg clor-*a* m⁻³ después de

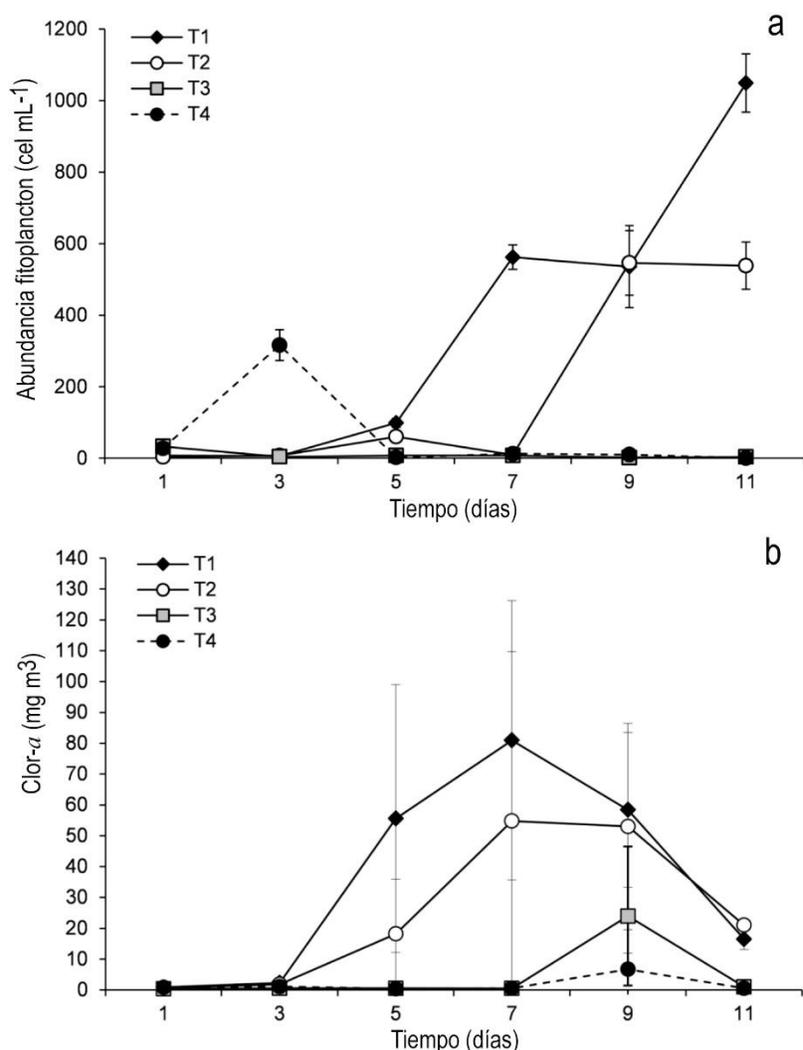


Figura 3. Respuesta de corto plazo de a) abundancia (cél mL⁻¹) y b) clorofila-*a* (mg m⁻³) del ensamble de fitoplancton del Fiordo Comau durante el experimento de primavera en los cuatro tratamientos (T1, T2, T3 y T4). Valores expresados como promedio \pm error estándar (n = 2).

5-9 días (Figs. 2b-3b). La concentración de clorofila-*a* en la incubación de Reloncaví en invierno fue significativamente diferente entre los tratamientos T1 y T4 (ANOVA: $F = 3,85$; $P < 0,05$). El efecto de la adición de nitrato se observó en los tratamientos T1, T2 y T3, con concentraciones máximas promedio entre 80 y 160 mg clor-*a* m⁻³, mientras que en el tratamiento T4, sin adición de nitrato, se mantuvo bajo 5 mg clor-*a* m⁻³ hasta el final de la incubación (Fig. 3b). Al igual que la abundancia del microfitoplancton, el notorio incremento de la concentración de clorofila-*a* se relacionó con la disminución de nitrato, que disminuyó a los valores más bajos en el tratamiento T1 (Fig. 6a).

Durante el experimento de primavera del Fiordo Comau, la concentración de clorofila-*a* aumentó en los

tratamientos T1 y T2 desde el día 5 hasta alcanzar su máxima concentración el día 7, con valores entre 55 y 85 mg clor-*a* m⁻³ (Fig. 3b). La concentración de clorofila-*a* fue significativamente diferente entre los tratamientos T1 y T4 (ANOVA: $F = 16,09$; $P < 0,05$). En los tratamientos T3 y T4 alcanzó sus máximas concentraciones en el día 9 (20 y 5 mg clor-*a* m⁻³, respectivamente), decreciendo hasta niveles muy cercanos a cero (Fig. 3b). La clorofila-*a* en T4 no superó 10 mg m⁻³ durante el experimento.

Clorofila-*a* fraccionada por tamaños de fitoplancton

La clorofila-*a* fraccionada por tamaños fue determinada al final del experimento de invierno en Reloncaví (día 13) y primavera en Comau (día 11). Este análisis fue

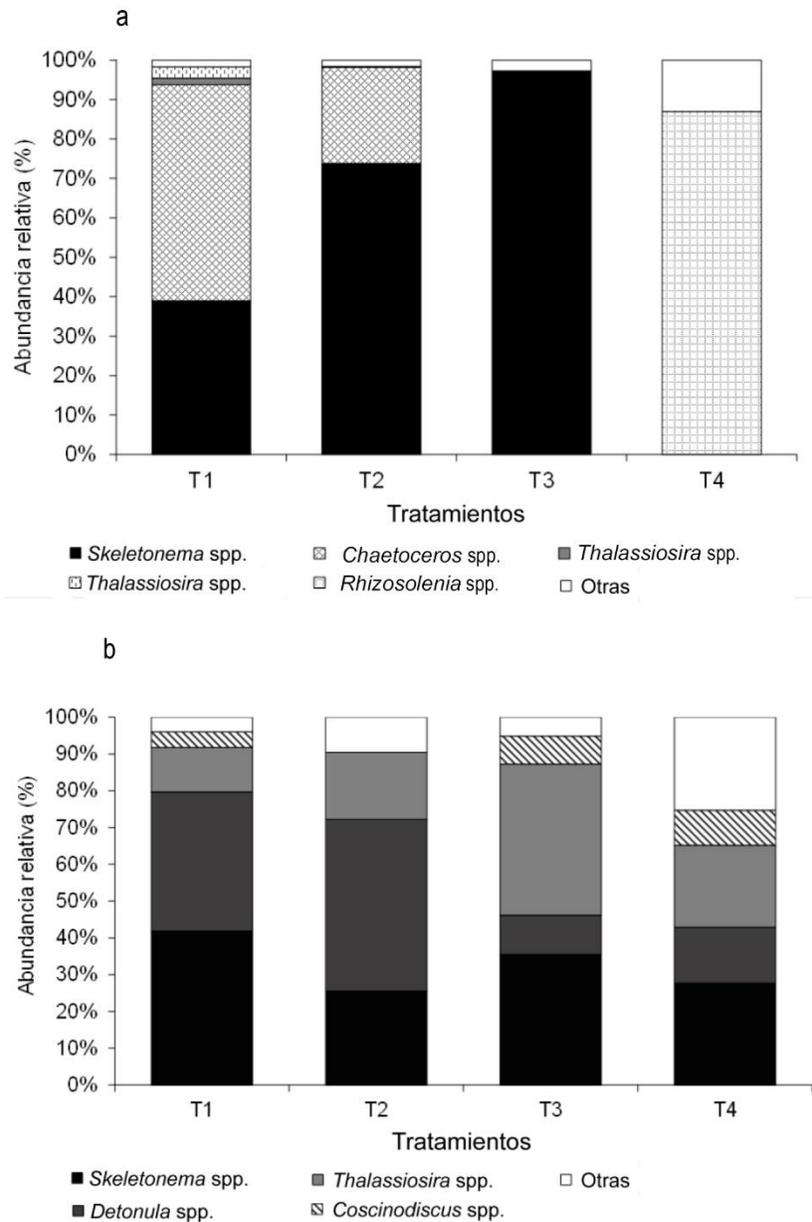


Figura 4. Abundancia relativa (%) de los taxa de microfitoplancton más representativos en los ensambles de fitoplancton al finalizar los experimentos de a) Fiordo Reloncaví en invierno, b) Fiordo Comau en primavera.

realizado para determinar la importancia relativa de la biomasa de clorofila-*a* del microfitoplancton (>20 μm) respecto de las otras dos fracciones de tamaño, picofitoplancton (<2-0,7 μm), y nanofitoplancton (2-20 μm), considerando que en experimentos que involucran filtraciones usualmente quistes de microorganismos de tamaño menor pasan a través de los filtros y potencialmente colonizan los microcosmo de experimentación. Este artefacto de la metodología permite por otra parte obtener un ambiente de experimentación más cercano a la realidad.

Durante el experimento de invierno en el Fiordo Reloncaví (Fig. 5a) se observaron claras diferencias entre tratamientos en la contribución de las fracciones de microfitoplancton y nanofitoplancton, con una contribución homogénea de picofitoplancton a la biomasa total. El ensamble del tratamiento T1 mostró que el microfitoplancton fue la fracción que más aportó a la biomasa autotrófica, con un porcentaje superior al 70%, y el nanofitoplancton contribuyó con un porcentaje de alrededor del 20%. La contribución de picofitoplancton a la clorofila-*a* total fue menor al 5%

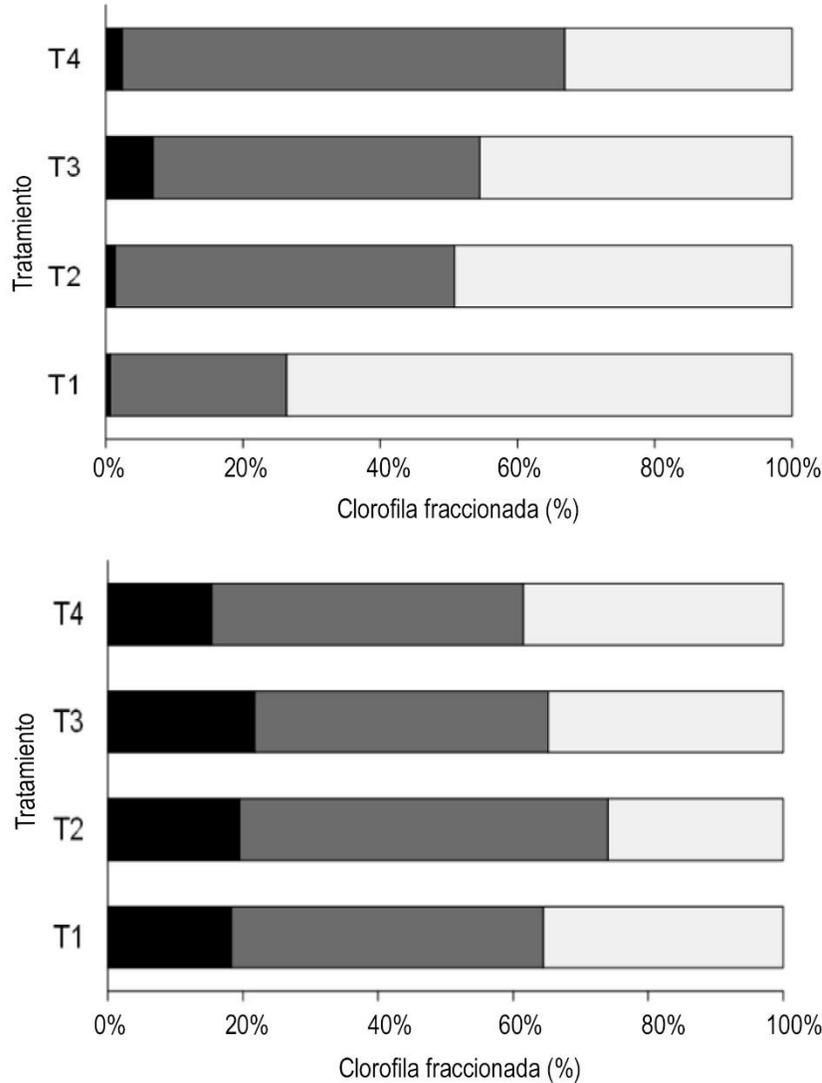


Figura 5. Contribución de clorofila-*a* fraccionada por tamaño del fitoplancton respecto de clorofila-*a* del ensamble de fitoplancton al finalizar los experimentos. a) Fiordo Reloncaví en invierno, b) Fiordo Comau en primavera. Cuadrado negro: 0,7-2 μm (picofitoplankton), cuadrado gris: 2-20 μm (nanofitoplankton), cuadrado sin relleno: >20 μm (microfitoplankton).

en ambos días. En el tratamiento T2, se observó un marcado cambio desde el día 7 al 13, aumentando el aporte de la fracción de nanofitoplankton desde 20 a 50% aproximadamente. En el tratamiento T3, la fracción del microfitoplankton aumentó alrededor de 10% del día 7 al 13. En el tratamiento T4, el microfitoplankton aumentó en 30% hacia el día 13.

Durante el experimento de primavera del Fiordo Comau se observó un aumento de la contribución de la fracción correspondiente al nanofitoplankton a la biomasa total en todos los tratamientos (Fig. 5b). El ensamble sometido al tratamiento T1 mostró un aumento en el porcentaje de clorofila-*a* de la fracción

de nanofitoplankton en 20%, disminuyendo el microfitoplankton de 55 a 35% y el picofitoplankton manteniéndose en un valor cercano al 20%. En el tratamiento T2, el microfitoplankton experimentó un descenso desde un 75% aproximadamente, a 35%, aumentando las fracciones de tamaño pequeño del pico y nanofitoplankton. En los tratamientos T3 y T4, se observó un aumento de la biomasa de la fracción del microfitoplankton, hasta un valor de 35% (T3) y 40% (T4). En el tratamiento T3, el picofitoplankton disminuyó drásticamente de 97%, hasta alrededor de 20%, mientras que en T4 la variación fue desde 60 hasta 18%. El nanofitoplankton en T3 aumentó de 3 a 40%.

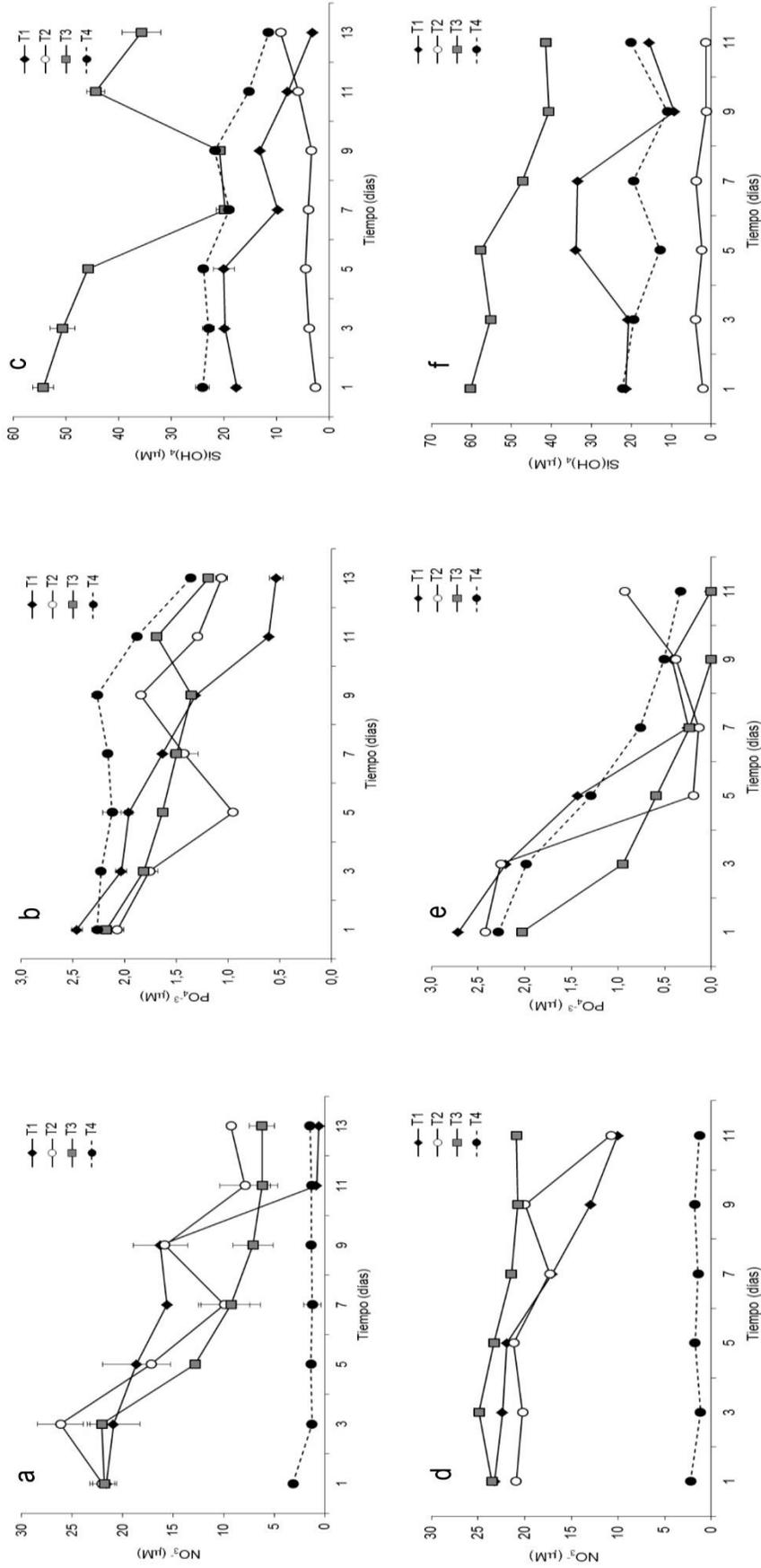


Figura 6. a, d) Concentraciones de NO_3^- , b, e) PO_4^{3-} , c, f) Si(OH)_4 en los microcosmos durante la incubación de los ensambles de fitoplancton del a, b, c) Fiordo Reloncaví en invierno, d, e, f) Fiordo Comau en primavera. Valores expresados como promedio \pm error estándar ($n = 2$) en μM .

DISCUSIÓN

En este estudio se detectó la respuesta del fitoplancton a la adición de nitrato y ácido silícico en términos de abundancia celular, biomasa autotrófica y composición taxonómica de los ensamblajes provenientes del Fiordo Reloncaví en invierno, y Fiordo Comau en primavera. Se ha sugerido que la interacción entre la disponibilidad de nutrientes y las condiciones limitantes de irradiación son los factores que modulan la productividad primaria en esta zona condicionando la dinámica de los ensamblajes de fitoplancton vía los cambios que experimentan debido a la variabilidad estacional de los factores antes mencionados (Saggiomo *et al.*, 1994; Iriarte *et al.*, 2007). Los resultados obtenidos muestran en primera instancia que en el sistema de fiordos de la Patagonia las diatomeas son parte importante del fitoplancton, contribuyendo en gran medida a la estructura trófica de estos ambientes (Alves-Souza *et al.*, 2008; González *et al.*, 2010). Los ensamblajes de fitoplancton de ambos fiordos mostraron una respuesta lenta frente a la adición de nitrato y ácido silícico, y después de los primeros 5 días de incubación se detectaron incrementos rápidos de abundancia celular y biomasa autotrófica en los tratamientos T1, T2 y T3 en los experimentos de invierno y primavera.

Los resultados para los tratamientos con adición de NO_3^- y Si(OH)_4 (T1, T3), y sin adición de NO_3^- (T4) la abundancia y biomasa autotrófica fue la más baja, sugiriendo que los ensamblajes de fitoplancton de los fiordos estudiados se encuentran controlados principalmente por nitrato durante invierno y primavera, mientras que el ácido silícico podría actuar como cofactor limitando el crecimiento de las diatomeas. En estudios anteriores se ha sugerido que el nitrato limita el crecimiento de fitoplancton en los fiordos de Chile (Saggiomo *et al.*, 1994; Iriarte *et al.*, 2007), congruente también con las observaciones de Iriarte *et al.* (2013), quienes atribuyen al nitrato la modulación de la abundancia, biomasa y composición del fitoplancton en la región norte de la Patagonia. Las razones $\text{Si(OH)}_4/\text{NO}_3^- < 1$ determinadas en el Mar Interior de Chiloé también indican una deficiencia de nitrógeno inorgánico (Iriarte *et al.*, 2007; González *et al.*, 2010).

El fitoplancton en los fiordos de la zona sur-austral de Chile se compone de alrededor de 130 especies, de las cuales aproximadamente el 70% son diatomeas durante todo el año (Alves-de-Souza *et al.*, 2008). En experimentos previos en microcosmos se ha demostrado que la adición de pulsos de nitrato influye en la dinámica de fitoplancton y que las diatomeas tienden a predominar en las etapas iniciales de las incubaciones (Dugdale, 1967; Margalef, 1978; Iriarte *et*

al. 2013). Esto concuerda con los resultados obtenidos en esta investigación, ya que en todos ellos se observó predominio de diatomeas tanto al inicio como al final de los experimentos, independiente de la estacionalidad y del lugar de origen de los inóculos (Reloncaví y Comau), lo que indica que el ácido silícico podría jugar un rol como factor co-controlador. La concentración de fósforo bajó a niveles no detectables en experimentos T1 y T3 de primavera, donde el ácido silícico estaba presente en concentraciones iniciales de 20 y 40 μM . Esta caída coincide con disminuciones a niveles no detectables de la concentración de clorofila y abundancia celular fitoplanctónica en los experimentos T3 y T4, lo que podría indicar algún tipo de limitación por fosfato. Explicaciones alternativas también son factibles como deficiencia interna de fósforo del inóculo inicial, o uso eficiente de fósforo por la fracción menor a 20 μm .

Las diatomeas pennadas por lo general tienen una razón superficie/volumen (S/V) mayor que las céntricas y se correlacionan preferentemente con altas concentraciones de nitrato en el ambiente, con razones Si:N bajas y poseen por lo general, constantes de saturación (K_s) más altas para el nitrato y ácido silícico (Reynolds, 2006; Alves-de-Souza *et al.*, 2008). Esto propicia la dominancia de este tipo de diatomeas en ensamblajes de fitoplancton presentes en aguas cuyas concentraciones de nitrato son más altas o cuya proporción N:Si favorece al nitrato, siendo opuesto el caso de la mayor concentración de ácido silícico, lo que hace posible el establecimiento y la dominancia de especies de diatomeas céntricas, formadoras de cadenas con afinidad por nitrato y constantes de saturación más bajas. La formación de cadenas es una estrategia ecológica que permite a las células aumentar la superficie expuesta al medio, mayor movilidad y por ende mayor acceso a los nutrientes y una disminución de la probabilidad de depredación por parte de otros organismos del plancton (Reynolds, 2006). Así, de acuerdo a la razón Si:N con la cual se ven favorecidas las distintas especies de diatomeas es que se clasifican en los grupos funcionales D1 (S/V $> 1,5 \mu\text{m}^{-1}$; correlación con altas concentraciones de nitrato), D2 (S/V $\sim 1,0 \mu\text{m}^{-1}$; correlación con concentraciones de nitrato y ácido silícico) y D3 (S/V $0,5-0,8 \mu\text{m}^{-1}$; correlación con altas concentraciones de ácido silícico), todo esto dentro de la clasificación de las diatomeas como un grupo estrategia-K, capaces de crecer en variados tipos de ambientes con diferentes y a veces contrastantes características (Reynolds, 2006; Alves-de-Souza *et al.*, 2008).

Durante el invierno en el Fiordo Reloncaví, *Skeletonema* fue el género de diatomea céntrica que predominó en los ensamblajes al inicio de las incuba-

ciones. *Skeletonema* es una diatomea cuya mayor abundancia en los fiordos de Chile, se presenta en invierno y ecológicamente se clasifica en el grupo funcional D3, el cual reúne a especies asociadas a condiciones estratificadas, altas concentraciones de ácido silícico y una relación S/V menor en comparación a otras especies de diatomeas (S/V 0,5-0,8 μm^{-1}) (Alves-de-Souza *et al.*, 2008), como las que se pueden encontrar en los fiordos durante la época invernal. Además de *Skeletonema*, las especies de mayor abundancia en los ensambles incubados correspondieron a géneros de diatomeas céntricas: *Detonula*, *Thalassiosira* y *Leptocylindrus* clasificadas en el grupo funcional D3. En el tratamiento T2 del Fiordo Reloncaví (sin adición de ácido silícico) el ensamble responde al cambio en concentración con el aumento en la abundancia de *Detonula* spp. por sobre las otras especies debido a que de las mencionadas anteriormente, es aquella con menor razón S/V. Por lo tanto, posee una constante de saturación media (K_s) para el $\text{Si}(\text{OH})_4$ más baja y necesita menores concentraciones de ácido silícico para desarrollarse de manera óptima (Reynolds, 2006; Alves-de-Souza *et al.*, 2008; Schapira *et al.*, 2008).

Algo similar ocurrió en T3 en invierno en el Reloncaví, el tratamiento con aumento de $\text{Si}(\text{OH})_4$ a 60 μM , en el cual *Thalassiosira* spp. pasó a ser la especie dominante del ensamble. Esta diatomea, a diferencia de *Detonula* spp., tiene una razón S/V mayor que *Skeletonema* o cualquiera de las otras microalgas relativamente abundantes en el ensamble, por lo que aprovecha el aumento en ácido silícico en el ambiente por su mayor K_s (Reynolds, 2006; Alves-de-Souza *et al.*, 2008). En T4, el tratamiento sin enriquecimiento de NO_3^- , continuó la dominancia de *Skeletonema* spp., con la diferencia que debido al descenso de la concentración de nitrato, la abundancia celular del ensamble, en general, declinó en el transcurso del experimento. Como resultado de la adición de nutrientes, independiente del tratamiento, los ensambles de invierno de Reloncaví se iniciaron con la dominancia de especies de diatomeas céntricas y, una vez concluido el período de incubación, continuaron siendo dominados por *Skeletonema* y otras diatomeas céntricas.

Durante el experimento de primavera en Comau, la dominancia de los ensambles estuvo compuesta por diatomeas céntricas y pennadas. La diatomea pennada *Pseudonitzschia* spp. y la céntrica *Leptocylindrus* spp. registraron las abundancias más altas en T1 y T2, y en T3 y T4, respectivamente. Además de estas especies, *Cylindrotheca* spp., *Thalassionema* spp. y *Rhizosolenia* spp. fueron otras diatomeas más abundantes durante la etapa inicial de las incubaciones (Fig. 4b). En

primavera, los aportes de aguas oceánicas y por lo tanto, de nitrato y mezcla son mayores (González *et al.*, 2011). Esto se refleja en la composición de los ensambles, debido a que la mayoría de las especies más abundantes pertenecen al grupo funcional D1, que se caracteriza por agrupar organismos correlacionados principalmente con altas concentraciones de nitrato y cuya razón S/V es alta en relación a otras especies (S/V $> 1,5 \mu\text{m}^{-1}$) (Alves-de-Souza *et al.*, 2008). Frente a la adición de nitrato y ácido silícico, dominaron las diatomeas céntricas resilientes en el ensamble *Skeletonema* spp., *Chaetoceros* spp. y *Rhizosolenia* spp., pertenecientes a los grupos funcionales D2 y D3. En T1 (Fig. 4b), *Skeletonema* spp. aumentó su abundancia y la especie dominante fue *Chaetoceros* spp., clasificada dentro del grupo D2, que incluye a organismos correlacionados con altas concentraciones de nitrato y ácido silícico, con una razón S/V $\sim 1 \mu\text{m}^{-1}$ (Alves-de-Souza *et al.*, 2008). En los tratamientos T2 y T3 *Skeletonema* spp. resultó dominante (Fig. 4b), alcanzando más de 95% de abundancia relativa en el tratamiento T3 (N+P+60Si). En el tratamiento T4, la abundancia celular cayó drásticamente como resultado de la carencia de nitrato, siendo dominado por algunas células de la diatomea del grupo D3, *Rhizosolenia* spp. (Fig. 4b). De esta manera, los ensambles dominados por diatomeas céntricas continuaron siéndolo hasta el término de las incubaciones y los ensambles dominados por diatomeas pennadas cambiaron hacia el predominio de diatomeas céntricas producto de la adición de nutrientes.

Durante el experimento de invierno el microfitoplancton de Reloncaví fue responsable de 20 a 75% de la biomasa autotrófica, excepto en el tratamiento T2 (sin adición de ácido silícico), relacionándose con la composición de taxa del fitoplancton conformada principalmente por especies formadoras de cadenas (*Skeletonema*, *Thalassiosira*, *Detonula*). Estas especies muestran una correlación con ácido silícico, lo que se corresponde con los resultados de las concentraciones y razones de nitrato, ácido silícico y fosfato en el medio al finalizar las incubaciones, las cuales muestran un descenso en la concentración de nitrato y, por ende, una disminución de la razón N:Si y N:P (Tabla 1). Todas estas características produjeron también una disminución o mantenimiento de la fracción del nanofitoplancton, excepto en el tratamiento T2, en el cual el nano- y microfitoplancton alcanzaron una proporción similar, mientras que el picofitoplancton se mantuvo homogéneo o declinó en los experimentos (Fig. 4a).

Cambios en la proporción y concentración de nitrato y ácido silícico podrían ser algunos de los detonantes de floraciones nocivas de microalgas, especialmente si

se considera los cambios acelerados que está experimentando el ambiente producto del uso cada vez más intensivo de la zona costera, por actividades de acuicultura, silvicultura, agricultura y uso de fuentes lacustres o pluviales para generación de energía. Varias de las diatomeas encontradas en los ensambles durante y al finalizar las incubaciones correspondieron a especies que han sido observadas en los programas de monitoreo de fitoplancton en el sistema de fiordos de la Patagonia Norte y han sido identificadas como especies nocivas para la acuicultura, como por ejemplo *Leptocylindrus* spp., *Rhizosolenia* spp. y *Chaetoceros* spp., las cuales producen mortalidad de salmónidos debido a asfixia por destrucción del tejido branquial.

CONCLUSIONES

En condiciones de microcosmos y de respuestas a corto plazo de los ensambles fitoplanctónicos estudiados se concluye que la adición de nitrato y ácido silícico producen un aumento de la abundancia y biomasa autotrófica, asociados a cambios en la composición del ensamble de fitoplancton independiente del inóculo inicial, resultando en el predominio de especies de diatomeas céntricas formadoras de cadenas *Thalassiosira* spp., *Skeletonema* spp. y *Leptocylindrus* spp., independiente de la estación del año y del origen del inóculo inicial (Fiordo Reloncaví en invierno y Fiordo Comau en verano). Estos resultados permiten plantear escenarios de respuesta de los ensambles fitoplanctónicos de fiordos de la Patagonia chilena frente a cambios en las concentraciones y razones de nutrientes en el ambiente, ya sea por cambio climático global natural y de incremento en las actividades antrópicas que impactan a estos ecosistemas, como la acuicultura y el uso de suelo, entre otros.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos al equipo de trabajo de la Estación Científica de Huinay, en especial a la Dra. Vreni Häussermann y Sr. Gunther Forsterra, por el apoyo logístico brindado durante la estadía de investigación, a la Dra. Patricia Gómez por sus comentarios y sugerencias durante la redacción del manuscrito, a Lilian Núñez por su apoyo en el trabajo de laboratorio, y a la Editora Asociada de LAJAR Dra. Beatriz Modenutti y dos evaluadores anónimo quienes con sus comentarios contribuyeron a mejorar este artículo. P. Labbé-Ibáñez agradece el apoyo financiero de la beca MECESUP UCO0602, así como del Programa COPAS Sur-Austral y de la Dirección de Postgrado de la Universidad de Concepción. Esta investigación fue financiada por el Proyecto FONDECYT 1080187 y por

el Programa COPAS Sur-Austral PFB-31 de la Universidad de Concepción. El Hanse-Wissenschaftskolleg (HWK) en Delmenhorst, Alemania, apoyó a SP durante parte del trabajo editorial.

REFERENCIAS

- Alves-de-Souza C., M.T. González & J.L. Iriarte. 2008. Functional groups in marine phytoplankton assemblages dominated by diatoms in fjords of southern Chile. *J. Plankton Res.*, 30: 1233-1243.
- Aracena, C., C.B. Lange, J.L. Iriarte, L. Rebolledo & S. Pantoja. 2011. Latitudinal patterns of export production recorded in surface sediments of the Chilean Patagonian fjords (41-55°S) as a response to water column productivity. *Cont. Shelf Res.*, 31: 340-355.
- Avaria, S. 2006. Fitoplancton de canales y fiordos australes. In: N. Silva & S. Palma (eds.). Avances en el conocimiento oceanográfico de las aguas interiores chilenas, Puerto Montt a Cabo de Hornos. Comité Oceanográfico Nacional, Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, Valparaíso, pp. 89-92.
- Carter, C.M., A.H. Ross, D.R. Schiel, C. Howard-Williams & B. Hayden. 2005. *In situ* microcosm experiment on the influence of nitrate and light on phytoplankton community composition. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 326: 1-13.
- Dávila, P., D. Figueroa & E. Müller. 2002. Freshwater input into the coastal ocean and its relationship with the salinity distribution off austral Chile (35°-55°S). *Cont. Shelf Res.*, 22: 521-534.
- Dugdale, R.C. 1967. Nutrient limitation in the sea: dynamics, identification, and significance. *Limnol. Oceanogr.*, 12: 685-695.
- Glibert, P.M. & D.E. Terlizzi. 1999. Co-occurrence of elevated urea levels and dinoflagellate blooms in temperate estuarine aquaculture ponds. *Appl. Environ. Microbiol.*, 65: 5594-5596.
- González, H.G., L. Castro, G. Daneri, J.L. Iriarte, N. Silva, C.A. Vargas, R. Giesecke & N. Sánchez. 2011. Seasonal plankton variability in Chilean Patagonia fjords: carbon flow through the pelagic food web of Aysén fjord and plankton dynamics in the Moraleda Channel basin. *Cont. Shelf Res.*, 31: 225-243.
- González, H.G., M.J. Calderón, L. Castro, A. Clément, L.A. Cuevas, G. Daneri, J. Iriarte, L. Lizarraga, R. Martínez, E. Menschel, N. Silva, C. Carrasco, C. Valenzuela, C. Vargas & C. Molinet. 2010. Primary production and its fate in the pelagic food web of the Reloncaví Fjord and plankton dynamics of the Interior Sea of Chiloé, Northern Patagonia, Chile. *Mar. Ecol. Progr. Ser.*, 402: 13-30.

- Hasle, G.R. 1978. The inverted microscope method. *Phytoplankton Manual*. UNESCO, Paris, pp. 88-96.
- Iriarte, J.L., A. Kusch, J. Osses & M. Ruiz. 2001. Phytoplankton biomass in the sub-Antarctic area of the Straits of Magellan (53°S), Chile during spring-summer 1997-1998. *Polar Biol.*, 24: 154-162.
- Iriarte, J.L., H.E. González, K.K. Liu, C. Rivas & C. Valenzuela. 2007. Spatial and temporal variability of chlorophyll and primary productivity in surface waters of southern Chile (41.5-43°S). *Estuar. Coast. Shelf Sci.*, 74: 471-480.
- Iriarte, J.L., S. Pantoja, H.E. González, G. Silva, H. Paves, P. Labbé, L. Rebolledo, M. Van Ardelan & V. Häussermann. 2013. Assessing the micro-phytoplankton response to nitrate in Comau Fjord (42°S) in Patagonia, Chile, using microcosm approach. *Environ. Monit. Assess.*, 185: 5055-5070.
- Margalef, R. 1978. Life-forms of phytoplankton as survival alternatives in an unstable environment. *Oceanol. Acta*, 1: 493-509.
- Nelson, D.M., P. Treguér, M.A. Brzezinski, A. Leynaert & B. Quéguiner. 1995. Production and dissolution of biogenic silica in the ocean: reviewed global estimates, comparison with regional data and relationship to biogenic sedimentation. *Global Biogeochem. Cy.*, 9: 359-372.
- Pantoja, S., J.L. Iriarte & G. Daneri. 2011. Oceanography of the Chilean Patagonia. *Cont. Shelf Res.*, 31: 149-153.
- Parsons, T.R., Y. Maita & C. Lalli. 1984. A manual of chemical and biological methods for seawater analysis. Pergamon Press, London, 173 pp.
- Pickard, G.L. 1971. Some physical oceanographic features of inlets of Chile. *J. Fish. Res. Bd. Can.*, 28: 1077-1106.
- Piehl, M.F., L.J. Twomey, N.S. Hall & H.W. Paerl. 2004. Impacts of inorganic nutrient enrichment on phytoplankton community structure and function in Pamlico Sound, NC, USA. *Estuar. Coast. Shelf Sci.*, 61: 197-209.
- Pizarro, G., J.L. Iriarte, V. Montecino, J.L. Blanco & L. Guzmán. 2000. Distribución de la biomasa fitoplanctónica y productividad primaria máxima de fiordos y canales australes (47°-50°S) en octubre 1996. *Cienc. Tecnol. Mar*, 23: 25-48.
- Rebolledo, L., H.E. González, P. Muñoz, J.L. Iriarte, C.B. Lange, S. Pantoja & M. Salamanca. 2011. Siliceous productivity changes in Gulf of Ancud sediments (42°S, 72°W), southern Chile, over the last 150 years. *Cont. Shelf Res.*, 31: 356-365.
- Reynolds, C.S. 2006. *The ecology of phytoplankton*. Cambridge University Press, New Jersey, 645 pp.
- Saggiomo, V., A. Goffart, G.C. Carrada & J.H. Hecq. 1994. Spatial patterns of phytoplanktonic pigments and primary production in a semienclosed perian-tarctic ecosystem: the Straits of Magellan. *J. Mar. Syst.*, 5: 119-142.
- Schapiro, M., D. Vincent, V. Gentilhomme & L. Seuront. 2008. Temporal patterns of phytoplankton assemblages, size spectra and diversity during the wane of a *Phaeocystis globosa* spring bloom in hydrologically contrasted coastal waters. *J. Mar. Biol. Assoc. U.K.*, 88(4): 649-662.
- Silva, N. 2006. Oxígeno disuelto, pH y nutrientes en canales y fiordos australes. In: N. Silva & S. Palma (eds.). *Avances en el conocimiento oceanográfico de las aguas interiores chilenas, Puerto Montt a Cabo de Hornos*. Comité Oceanográfico Nacional, Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, Valparaíso, pp. 31-36.
- Silva, N., C. Calvete & H.A. Sievers. 1998. Masas de agua y circulación general para algunos canales australes entre Puerto Montt y Laguna San Rafael, Chile (Crucero CIMAR-Fiordo 1). *Cienc. Tecnol. Mar*, 21: 17-48.
- Soto, D. & F. Norambuena. 2004. Evaluation of salmon farming effects on marine systems in the inner seas of southern Chile: a large-scale mensurative experiments. *J. Appl. Ichthyol.*, 20: 493-501.
- Tilman, D., S.S. Kilham & P. Kilham. 1982. Phytoplankton community ecology: the role of limiting nutrients. *Ann. Rev. Ecol. Syst.*, 13: 349-372.
- Treguér, P. & P. Pondaven. 2000. Global change: silica control of carbon dioxide. *Nature*, 406: 358-359.
- Zar, J.H. 1984. *Biostatistical analysis*. Prentice Hall, New Jersey, 718 pp.

Received: 22 August 2013; Accepted: 17 September 2014