



**UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN  
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES  
Y OCEANOGRÁFICAS**



## **Hidrólisis enzimática extracelular en sedimentos marinos en la Bahía Concepción**



Sofía Margarita Egli Donoso

Profesor Guía: Dr. Silvio Pantoja Gutiérrez  
Comisión. Dr. Marcelo Gutiérrez Astete  
Dr. Gerhard Jessen Reyes, Universidad Austral de Chile  
Dr. (c) Cristóbal Castillo Ilabaca

Concepción – Chile  
2021

## Agradecimientos

A quienes me ayudaron a la construcción del presente seminario de título

Cristóbal Castillo Ilabaca

Lilian Núñez Muñoz

Paola Cárdenas Véliz

Silvio Pantoja Gutiérrez

Nicolás Mayorga Faundez

Financiamiento de los Centros de Investigación Oceanográfica COPAS Sur-Austral (AFB170006) y COPAS Coastal (FB210021)

Y a mi familia siempre



# ÍNDICE

RESUMEN .....	4
INTRODUCCIÓN.....	5
METODOLOGÍA .....	9
Área de muestreo.....	9
Muestreo.....	10
Determinación de actividad enzimática extracelular .....	11
• Curva de calibración de la señal fluorométrica .....	13
• Cálculo de las tasas de EEA .....	13
Determinación de aminoácidos.....	13
• Hidrólisis del sedimento .....	13
• Neutralización .....	14
• Dilución y HPLC .....	15
Índice de degradación (DI) .....	15
Análisis Estadísticos .....	16
Análisis de componentes principales (PCA) .....	16
Análisis de varianza de 1 vía (ANOVA) .....	16
RESULTADOS.....	17
• Caracterización de la zona de estudio.....	17
Actividad enzimática extracelular (EAA).....	19
Aminoácidos.....	20
DISCUSIÓN .....	25
CONCLUSIÓN .....	28
REFERENCIAS.....	29
ANEXO.....	33

## RESUMEN

La actividad enzimática extracelular (EEA) de la microbiota sedimentaria está compuesta de comunidades bacterianas, fúngicas y protozoarias, que facilitan la degradación y el reciclaje de materia orgánica. Esto es fundamental para el funcionamiento de los ciclos biogeoquímicos del carbono y nitrógeno, mediante la hidrólisis de proteínas y carbohidratos.

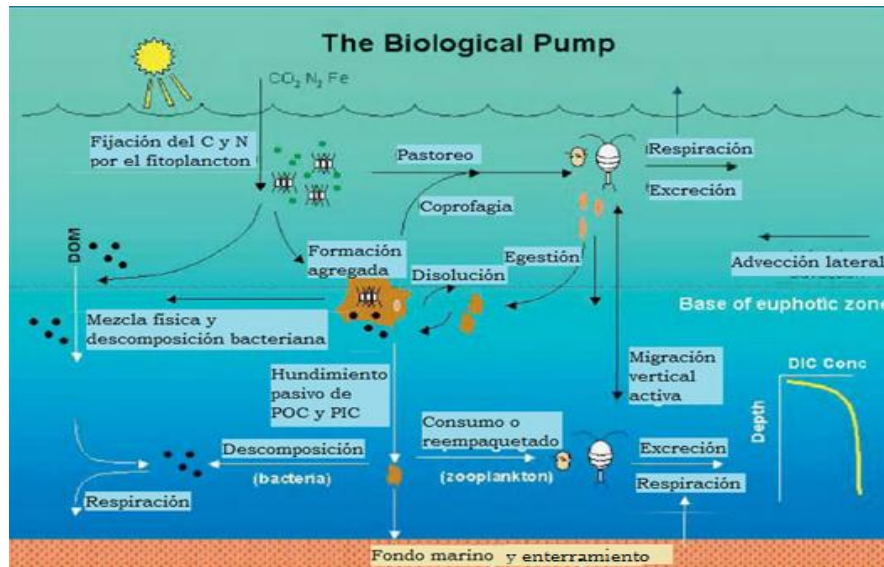
La bahía de Concepción (36°40 S 73°02 W) presenta alta materia orgánica debido a su productividad biológica. Sin embargo, ésta presenta variaciones tanto al contenido de materia orgánica como en las tasas de degradación y de EEA. En esta tesis se estudiaron 3 sitios de la bahía de Concepción, donde se midieron los parámetros físicos-químicos de la columna de agua y se extrajeron muestras de sedimento superficial para la cuantificación y comparación espacial de EEA, aminoácidos y tasas de degradación de proteínas. Se extrajo, además, un testigo de sedimento de 70 cm de profundidad para la comparación temporal (vertical) de las variables biogeoquímicas (EEA y aminoácidos). Las mediciones de dichos parámetros de sedimento superficial y del testigo fueron a partir de *slurries*, que consiste en mezclar una proporción similar de sedimento con agua de mar autoclavada con el fin de homogeneizar las muestras.

Se plantea como hipótesis que la EEA será mayor en sedimentos superficiales con mayor contenido de materia orgánica lábil en sitios cercanos a la costa, existiendo un gradiente longitudinal (costa-océano) y uno vertical (sedimento superficial-sedimento profundo). A pesar de la variabilidad de los resultados obtenidos se observa un gradiente de EEA y materia orgánica lábil que disminuye hacia el sitio más alejado de la bahía. Respecto al testigo de sedimento, los resultados indican disminución en las mismas variables conforme aumenta la profundidad del testigo. Sin embargo, la prueba estadística ANOVA concluye que no hay diferencias significativas en la relación de los parámetros.

## INTRODUCCIÓN

La materia orgánica disuelta (DOM) en el océano, se considera el mayor reservorio de carbono reducido (o carbono orgánico). Éste se produce mayoritariamente por el plancton fotosintético de las capas superficiales del océano, suministrando sustratos lábiles a vastas poblaciones microbianas heterotróficas (bacterias, hongos), como fuente de nitrógeno y fósforo (Hansell *et al.* 2009). Estos microorganismos heterótrofos son clave para procesos de descomposición de la materia orgánica, reciclaje de nutrientes y del flujo de carbono a través de las redes tróficas acuáticas (Azam *et al.* 1983, Boden & Hutt 2018).

El fitoplancton es el productor marino de materia orgánica más abundante, y, por lo tanto, su composición química determina la proporcionalidad en los compuestos de carbono y nitrógeno tanto de la columna de agua como del sedimento (Redfield *et al.* 1963). Los procesos físicos y biológicos que interactúan en la columna de agua permiten la exportación del carbono orgánico hasta el fondo marino (Ducklow & Steinberg 2001), estimándose que un 0.5% de la materia orgánica producida en la superficie del océano, se transporta verticalmente sin ser intervenido por la bomba biológica hasta alcanzar la superficie del sedimento y que solo el 0.1% se entierra en el sedimento (Hedges 1992, Hedges 2002), mientras que, la mayoría de la productividad fitoplanctónica (99%) se remineraliza en la columna de agua y en el sedimento superficial (Arnosti 2011). Los aminoácidos contenidos en las células del fitoplancton aportan la mayor parte del nitrógeno orgánico en el océano (Degens 1970), mientras que, en el sedimento superficial es alrededor del 20-50%, siendo además la principal fuente de nitrógeno orgánico en los sedimentos, debido a su alta labilidad para la mineralización microbiana (Pantoja & Lee 2003) (Figura 1).



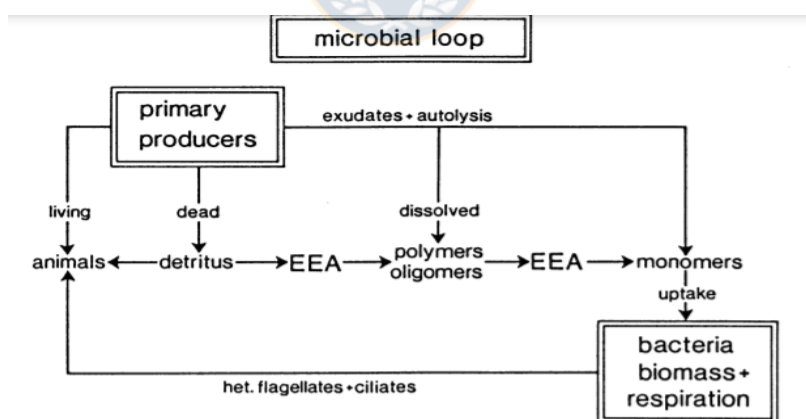
**Figura 1:** Bomba Biológica (biological pump). El  $\text{CO}_2$ ,  $\text{N}_2$  y Fe particulado ingresan al sistema marino para ser fijados por el fitoplancton hasta ser descompuestos, degradados, consumidos, excretados y hundido por efecto gravitacional y advección hacia el fondo marino. Modificado de Ducklow & Steinberg (2001).

Se ha demostrado que la comunidad microbiana sedimentaria hidroliza una gama amplia de sustratos de alto peso molecular, en comparación a las comunidades bacterianas de la columna de agua (Arnosti 2008). Para la incorporación de moléculas orgánicas, la membrana externa celular de los microorganismos heterótrofos además de proporcionar protección, como barrera, permite el paso de solutos polares de bajo peso molecular por transporte simple a través de proteínas triméricas, porinas o canales (Weiss 1991) desde la membrana externa al espacio periplásmico, incorporando sustratos de máximo peso molecular ca. 600 Da (Weiss 1991, Pantoja *et al.* 1997, Arnosti 2011). No obstante, la materia orgánica particulada y disuelta contiene compuestos de alto peso molecular (Chróst 1991), y a medida que estos sean hidrolizados externamente a la membrana, se incorporan hasta el periplasma (Billen 1991).

Para esto, las enzimas hidrolíticas extracelulares catalizan la hidrólisis de moléculas de alto peso molecular de la materia orgánica a sustratos suficientemente pequeños (< ca. 600 Da) permitiendo el paso a través de la membrana celular (Chróst 1991, Weiss 1991, Arnosti 2011). Dentro de la célula, parte de estos sustratos formarán parte de la biomasa, otra fracción será

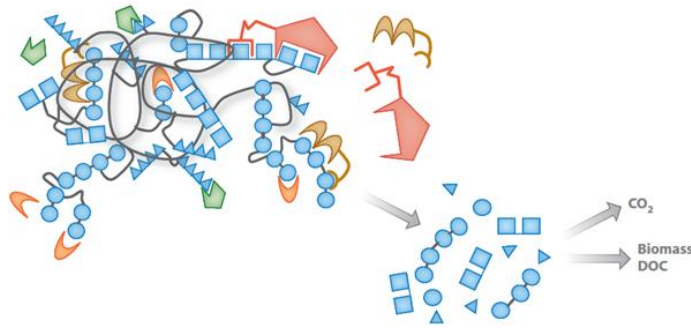
respirada como CO<sub>2</sub>, y otra fracción excretada como carbono orgánico disuelto (Liu *et al.* 2000) (Figura 2).

Por ende, la hidrólisis enzimática extracelular (EEA en inglés) se considera el paso inicial en la cascada de remineralización del carbono por parte de bacterias (Arnosti 2011) y hongos marinos (Gutiérrez *et al.* 2011), con la participación de ectoenzimas ubicadas entre la pared celular y el periplasma de los microorganismos, y las exoenzimas que están disueltas o asociadas a partículas (Chróst 1991, Martínez & Azam 1993). Estas enzimas son las encargadas de hidrolizar polímeros y oligómeros a monómeros o dímeros (Pantoja *et al.* 1997, Hoppe *et al.* 2002, Williams & Jochem 2006) rompiendo enlaces específicos para generar las subunidades de polímeros biosintéticos (Figura 2), como ésteres de fosfato, nucleótidos, péptidos, amino-azúcares, lípidos, polisacáridos estructurales y de almacenamiento (Williams & Jochem 2006). Una parte del carbono orgánico escapa a la degradación microbiana heterotrófica de la columna de agua y del sedimento superficial, enterrándose en el sedimento (Arnosti 2011). Igualmente, la EEA responde rápidamente a las entradas de materia orgánica por sedimentación (Meyer 1987, Arnosti *et al.* 1995) y disminuye con la profundidad del sedimento (Fabiano & Danovaro 1998).



**Figura 2:** Modelo del ciclo microbiano y la transformación de materia orgánica por bacterias vía actividad enzimática extracelular. Fuente: Liu *et al.* 2000.

Las enzimas extracelulares que reaccionan son principalmente hidrolasas (e.g., glicosidasas, peptidasas, esteridasas), enzimas que rompen los enlaces C-O y C-N de polímeros (Hoppe 1991) (Figura 3).



**Figura 3:** Esquema de la actividad hidrolítica de las enzimas sobre moléculas de alto peso molecular de la materia orgánica junto la liberación de productos no incorporados,  $\text{CO}_2$  por respiración y carbono orgánico disuelto. Fuente: Arnosti 2011.

El océano costero es influenciado por fuentes de materia orgánica por descargas de ríos con aportes terrestres y la exudación de plantas y algas (Billen 1991). Estos representan importantes contribuciones de nutrientes y materia orgánica lábil, que estimulan la heterotrofia y la red alimentaria microbiana, y con ello, los ciclos biogeoquímicos (Billen 1991). La bahía de Concepción es un área somera y semicerrada con dos conexiones a mar abierto (boca grande y boca chica) en dirección norte (Farias *et al.* 1996). Recibe aportes directos a la costa a través del Río Andalién (sureste) y del humedal Rocuant (suroeste) (Farias *et al.* 1996), además de derivados fotosintéticos producto de la fertilización por la surgencia (Billen 1991). Así, los parámetros hidrográficos y biogeoquímicos de la columna de agua de la bahía Concepción, están determinados por la variabilidad del viento local (Brandhorst 1971; Ahumada & Chuecas 1979), presentando cambios estacionales en el viento. Durante invierno predominan vientos norte, y la lluvia incrementa la descarga del río Andalién (Salamanca 1993), mientras que en verano dominan vientos sur, que en conjunto con la fuerza Coriolis genera el afloramiento de aguas profundas, lo que aumenta la productividad del ambiente y genera cambios en el agua de fondo producto de la surgencia, tanto en la bahía como en la área costera adyacente (Ahumada *et al.* 1983). A partir de estas condiciones se espera encontrar gradientes longitudinales (costa-océano) asociados a diferentes tasas de degradación de la materia orgánica y calidad de esta en sedimentos costeros.



**Hipótesis 1:** La actividad enzimática extracelular (EEA) es más alta en sedimentos con mayor contenido de materia orgánica lábil en sedimentos superficiales cercanos a la costa en comparación con sedimentos cercanos al borde continental, existiendo un gradiente longitudinal (costa-océano) y uno vertical (testigo de sedimento).

Objetivo: Determinar las tasas de hidrólisis enzimática extracelular y calidad de materia orgánica en sedimentos marinos costeros superficiales de la bahía de Concepción.

Objetivos específicos:

- Determinar y comparar las tasas de hidrólisis enzimática extracelular en sedimentos marinos.
- Determinar y comparar la composición de aminoácidos en sedimentos marinos.
- Generar un índice de degradación para la estimación de calidad de materia orgánica.



## **METODOLOGÍA**

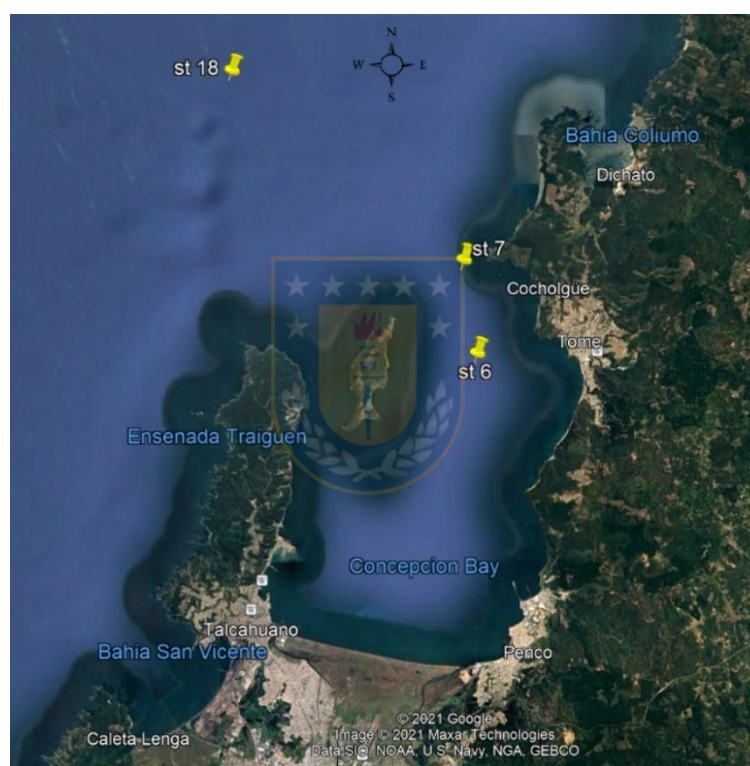
### **Área de muestreo**

La Bahía Concepción (Figura 4, 36°40 S 73°02 W) es un área somera de profundidad máxima 45 m, y semicerrada de 190 km aprox. de longitud. Se encuentra rodeada de industrialización y urbanización, donde los desechos domésticos e industriales son vertidos de manera directa e indirecta a través de la marisma Rocuant y río Andalién (Farías *et al.* 1996).

Los parámetros hidrográficos de la bahía se ven afectados por la variabilidad del viento local (Brandhorst 1971, Ahumada & Chuecas 1979), teniendo en cuenta dos regímenes de viento anuales, durante el invierno y durante el verano, cambiando igualmente las características hidrográficas del agua de fondo, la cual, en el transcurso del invierno el régimen se ve caracterizado por agua superficial subantártica (SAW), generando una alta concentración de oxígeno disuelto y baja concentración de nutrientes (Salamanca 1993), mientras que, durante el verano este régimen se vería afectado por el agua ecuatorial subsuperficial (ESSW), obteniendo alta productividad por aumento

de nutrientes a partir del agua subsuperficial que emerge producto de las surgencias (Arcos & Navarro, 1986). De este modo, se genera un gradiente vertical de oxígeno dentro de la bahía y una zona de mínimo oxígeno ocupa el fondo marino costero (Farías *et al.* 1996).

El sedimento de la bahía se caracteriza por un lodo reducido negro y blando (principalmente limo y arcilla), rico en materia orgánica (15-18%) con una fina capa (mm) de floculante suprayacente, en el que, condiciones anóxicas prevalecen en la interfaz sedimento-agua la mayor parte del año (Farías 1992).



**Figura 4:** Imagen satelital de la Bahía Concepción, y las estaciones de muestreo. Fuente: Google Earth, data 2021.

## Muestreo

La recolección de muestras de sedimento se llevó a cabo los días 9 y 10 de noviembre 2021 en la embarcación Kay Kay II de la Universidad de Concepción, en 3 sitios (estaciones) de la Bahía de Concepción (tabla 1).

**Tabla 1:** Coordenadas de las estaciones de muestreo y profundidades.

Sitio de muestreo	Rótulo	Coordenadas	Profundidad (m)	Equipo utilizado
Estación 6	St 6	36°36,5 S 73°00,5 W	34	Draga, corer
Estación 7	St 7	36°35,5 S 73°00,6 W	37	Draga
Estación 18	St 18	36°30,8 S 73°07,7 W	87	Draga

Con draga van Veen (0.5 m<sup>3</sup> de mordida) se obtuvo el sedimento superficial y, mediante rumhor corer se recolectó un testigo de sedimento de 73 cm de longitud. Además, con el CTD SBE 25 (seabird) con sonda multiparamétrica se midieron los parámetros fisicoquímicos en la columna de agua, y se consideraron las mediciones de bajada promediadas cada 1 m de profundidad (temperatura (°C), oxígeno (ml/L y % de saturación), fluorescencia (mg/m<sup>3</sup>), turbidez (NTU) y radiación fotosintética activa (PAR))

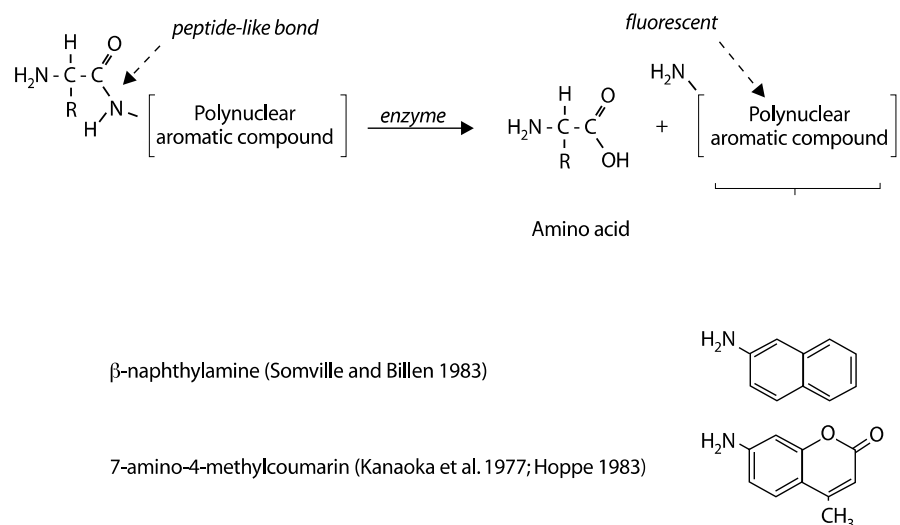
Las muestras fueron almacenadas en cámara fría (4°C), para ser posteriormente procesadas en el laboratorio de Geoquímica Orgánica Marina de la Universidad de Concepción.

### **Determinación de actividad enzimática extracelular**

Para las 3 estaciones de sedimento superficial se realizaron incubaciones en triplicados, mientras que para el testigo de sedimento se utilizaron estratos segmentados, y dependiendo de la cantidad de sedimento disponible, algunos estratos fueron mezclados, resultando 5 muestras en los primeros 10 cm (0-2, 2-4, 4-6, 6-8, 8-10 cm) y 7 muestras para la sección más profunda (10-14, 16-20, 26-30, 36-40, 46-50, 56-60 y 66-70 cm). Así, se trabajó con 21 muestras en total (9 muestras de sedimento superficial y 12 muestras desde el testigo).

Las incubaciones para estimar la EEA se realizaron en *slurries* con 10 a 14 ml de sedimento y 10 ml de agua de mar autoclavada (Pantoja *et al.* 2011) en viales ámbar de 40 ml. Cada *slurrie* se inoculó con 200  $\mu$ L de sustrato fluorogénico similar de proteínas (L-leucina-4-metil-7-cumarinilamida (MCA-

Leu)) para obtener una concentración final de 50  $\mu\text{M}$  (Meyer 1987) (Figura 5). La estimación de EEA se midió durante 2 horas en intervalos de 30 a 50 min.



**Figura 5.** Mecanismo general de la reacción de sustratos fluorogénicos para la determinación de hidrólisis enzimática extracelular de macromoléculas (Pantoja 2000).

Durante cada intervalo 1 ml de *slurry* se centrifugó a 1,5 RCF por 90 s y al sobrenadante (500  $\mu\text{L}$  aprox.) se midió la fluorescencia en la fracción filtrada a 365 nm de excitación y 455 nm de emisión UV en un fluorómetro Turner Design (Figura 6).



**Figura 6:** Esquema con resumen del procedimiento llevado a cabo para la determinación de la fluorescencia.

- **Curva de calibración de la señal fluorométrica**

Las curvas de calibración se determinaron midiendo la fluorescencia del producto de la hidrólisis, 4-metil-7-cumarinilamida (MCA) en agua de mar autoclavada.

Se preparó una solución stock 4,24 mM de MCA de la cual se añadió una alícuota de 20  $\mu\text{L}$  de MCA a 2 ml de agua de mar autoclavada para preparar una solución de trabajo que se usará a través de diluciones seriadas para generar la curva de calibración de concentraciones 4,20  $\mu\text{M}$ ; 2,10  $\mu\text{M}$ ; 1,05  $\mu\text{M}$ ; 0,52  $\mu\text{M}$ ; 0,26  $\mu\text{M}$  y 0,13  $\mu\text{M}$ .

- **Cálculo de las tasas de EEA**

Las tasas de degradación de los sustratos por hidrólisis se calcularon de acuerdo con cinética de primer orden, en donde la tasa constante de degradación (k) corresponde a la pendiente de la curva de  $\ln[C_0/(C_0-P)]$  versus el tiempo de incubación, donde P es la concentración del producto (MCA) a partir del sustrato inicial  $C_0$  (Pantoja & Lee 1994).

### **Determinación de aminoácidos**

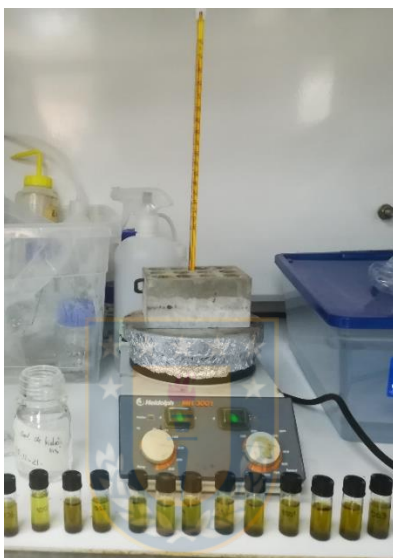
Para cuantificar aminoácidos (aminoácidos individuales hidrolizados totales, THAA) como indicador de calidad de la materia orgánica, se utilizó 200 mg del sedimento liofilizado en un total de 32 muestras (4 réplicas para la St 6, y dos replicas para las estaciones St 7 y St 18, respectivamente, y 24 estratos del testigo) en viales de 5 ml.

Se cuantificaron 15 THAA: ácido aspártico (Asp), ácido glutámico (Glu), serina (Ser), histidina (His), glicina (Gly), treonina (Thr), arginina (Arg), alanina (Ala), tirosina (Tyr), metionina (Met), valina (Val), fenilalanina (Phe), isoleucina (Ile), leucina (Leu) y lisina (Lis). Para ello, se realizó hidrólisis y neutralización previa derivatización e inyección en el HPLC.

- **Hidrólisis del sedimento**

La hidrólisis del sedimento permite romper los enlaces peptídicos de las proteínas contenidas con el fin de obtener aminoácidos individuales

cuantificables. Para ello, se preparó 50 ml de la solución de hidrólisis con 30 ml de ácido clorhídrico (HCl) 7 N, 5 ml de fenol 2% y 5 ml de ácido trifluoroacético (TFA) 10% y se completó con agua MiliQ. Se agregaron 3 ml de la solución de hidrólisis a las muestras en los viales de 5 ml y se expusieron a nitrógeno gaseoso ( $N_2$ ) para la remoción de oxígeno. Se dejaron en una placa calefactora a  $120^{\circ}C$  durante 1 hora 30 minutos (Figura 7) a partir del protocolo del Laboratorio de Geoquímica orgánica de la Universidad de Concepción, según Pantoja & Lee (1999).

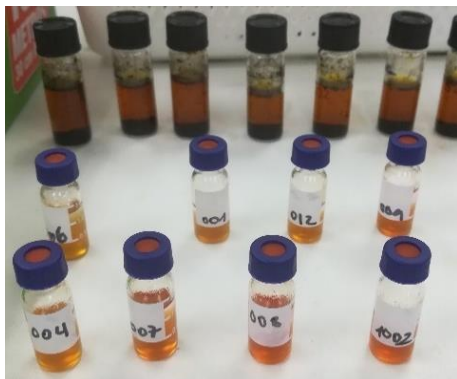


**Figura 7:** Muestras hidrolizadas con solución ácida (coloración amarilla) junto a la placa calefactora en el que se completará la hidrólisis de proteínas posterior a la actividad térmica (coloración café opaca).

- **Neutralización**

La neutralización de las muestras hidrolizadas es necesaria para inyectar las muestras en el HPLC cambiando el pH ácido a pH neutro. Por consiguiente, se prepararon soluciones de neutralización con hidróxido de sodio (NaOH) a concentraciones 6 N, 1 N y 0.1 N, a partir de diluciones seriadas con 24 g de NaOH, aforando a 100 ml de agua Mili-Q (6 N). Se removieron 16,7 ml de la solución y se aforó (1 N) y con 10 ml de la solución anterior se aforó nuevamente (0.1 N); proporciones establecidas a través de cálculos de concentración y volumen.

200  $\mu\text{L}$  de muestra ácida fue traspasa a vial de 1 ml en el que se generó una serie de neutralización con 300  $\mu\text{L}$  - 600  $\mu\text{L}$  de soluciones básicas (Figura 8), y con tiras de papel de pH se visualizaba el resultado de neutralización (Figura 9).



**Figura 8:** Muestras neutralizadas (coloración naranja) en vial de 1 ml, a partir de las muestras hidrolizadas con solución ácida.



**Figura 9:** Papel de pH en el rango 1-14 que define la muestra hasta tornarse neutro-básica (color verde azul).

- **Dilución y HPLC**

Entre 20 o 50  $\mu\text{L}$  de las muestras neutralizadas se diluyeron con metanol 40% (MeOH 40%/agua Mili-Q 60%) hasta completar un vial de 1 ml. Los aminoácidos individuales son derivatizados con 25 mg de reactivo OPA (o-ftalaldehído) y 1.5 ml de buffer acetato 0.1 M para asegurar la detección por fluorescencia.

Luego se llevó a cabo la inyección de las muestras en conjunto del blanco (metanol 40%) y el estándar 1  $\mu\text{M}$  en el cromatógrafo líquido (HPLC) Shimadzu (modelo Nexera-LCMS-2020) con detector de fluorescencia. La fase móvil consistió en un gradiente en el tiempo con solventes metanol 40% y buffer acetato de sodio 25 mM pH 5.7 a 1 ml/min, y se utilizó una columna C18 (250 mm x 4.6 mm).

### **Índice de degradación (DI)**

A partir del porcentaje relativo de cada THAA, se calculó el DI para sedimentos marinos. Este explica la degradación de la materia orgánica

según indique su labilidad a la descomposición enzimática y tasa de degradación de primer orden que resume el peso relativo de 14 aminoácidos (excluye lisina) (Dauwe *et al.* 1999), a través de la suma del DI de los aminoácidos individuales estandarizados con el factor bibliográfico propuesto por Dauwe *et al.* (1999) para cada uno (tabla 4), por medio del promedio y la desviación estándar del conjunto de datos a partir de todas las muestras.

$$\text{Fórmula 1: } \frac{DI = (C_{aa} - AVG_{aa}) * \text{Factor Coeficiente}}{SD_{aa}}$$

Donde  $C_{aa}$  = concentración ( $\mu\text{mol/g}$ ) del aminoácidos de la muestra;  $AVG_{aa}$  = promedio de las concentraciones aminoácidos de las muestras;  $SD_{aa}$  = desviación estándar.



## **Análisis Estadísticos**

### **Análisis de componentes principales (PCA)**

Como primer paso para establecer una comparación de las variables observadas, se utilizó el método estadístico PCA con el programa RStudio. Este es un algoritmo matemático que reduce la dimensión de la matriz de datos y conserva la mayor parte de la variación entre la data por medio de la obtención de los componentes principales (Jolliffe 2002) (2 rectas que convergen). Esto se genera a través de la estandarización con la varianza de los resultados obteniendo una combinación lineal con la dispersión de dicha matriz. El fin es facilitar la interpretación visual entre las variables (EEA, THAA y DI) a través de la agrupación de datos.

### **Análisis de varianza de 1 vía (ANOVA)**

Para poner a prueba las Hipótesis 1 se realizó el test estadístico ANOVA de 1 vía, utilizando el programa Sigmaplot versión 12, a partir de los datos de EEA ( $\text{nmol/g h}$ ), THAA ( $\mu\text{mol/g}$ ) y DI, asegurando que cumpla los supuestos estadísticos de normalidad de los datos y homocedasticidad de varianza.



Como método posteriori se realizó el Tuckey test con el fin de comparar diferencias significativas entre estaciones.

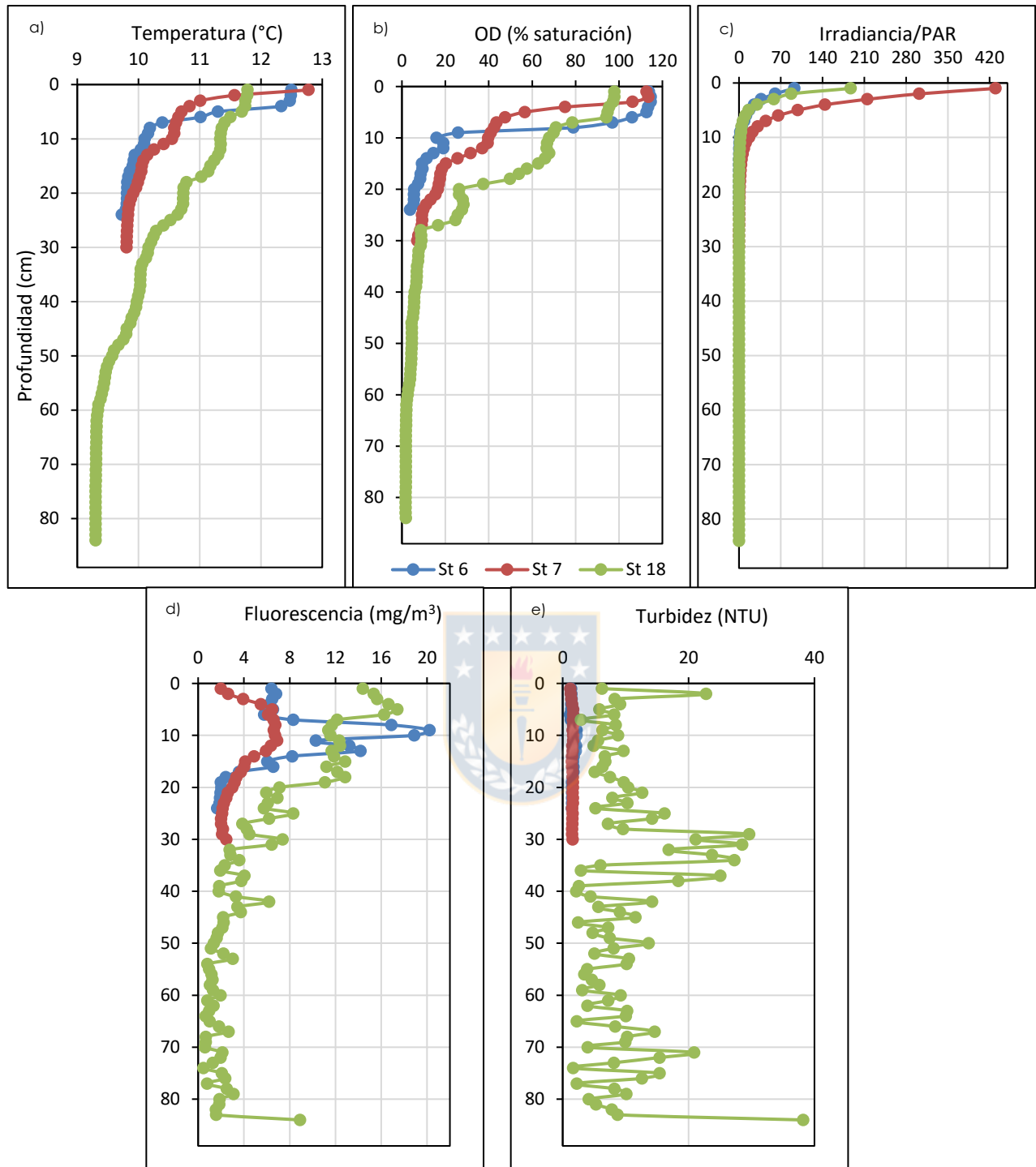
## RESULTADOS

- **Caracterización de la zona de estudio**

Los sedimento costeros (St 6 y St 7) presentaron características organolépticas similares (olor fuerte, oscuros, fango denso y espeso) y con presencia de fauna bentónica (poliquetos), mientras que el sedimento alejado a la costa (St 18) se caracterizó con olor tenue, fango más claro y con mayor contenido líquido y, con presencia de filamentos de la bacteria del género *Thioploca*.

De los parámetros medidos en el agua de fondo; la St 7 presentó valores más altos (temperatura (°C), oxígeno disuelto (OD) (% de saturación), y radiación fotosintética activa (PAR)) respecto a las otras estaciones, con excepción de la fluorescencia(mg/m<sup>3</sup>) y turbidez (NTU) (tabla 2 y Figura 10).





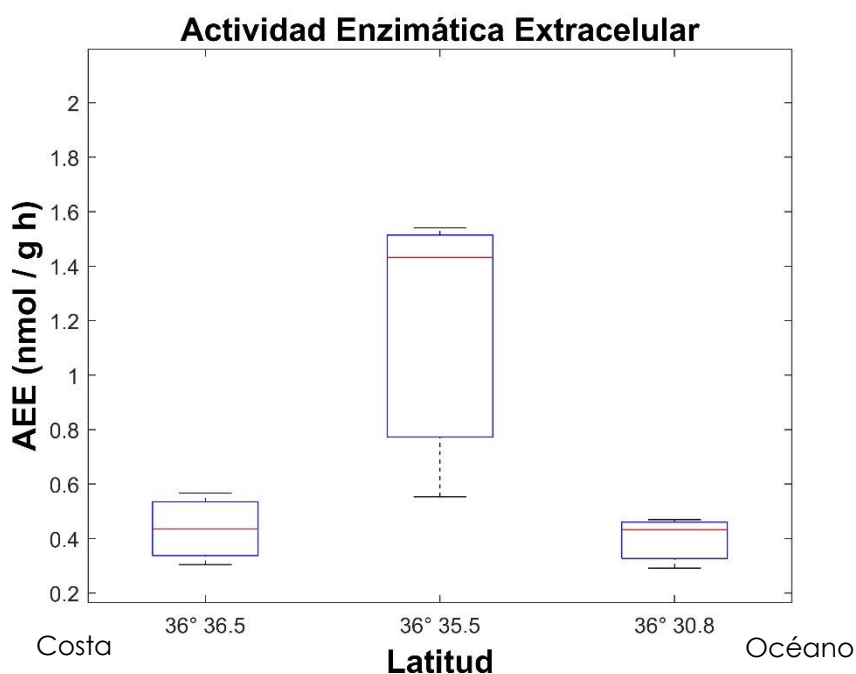
**Figura 10:** Parámetros promediados cada 1 metro en la columna de agua. a) Temperatura (°C); b) % de saturación de oxígeno disuelto (OD); c) Irradiancia/PAR; d) Fluorescencia (mg/m<sup>3</sup>) y e) Turbidez (NTU) de las estaciones medidas (líneas St 6: azul, St 7: roja, St 18: verde).

**Tabla 2:** Parámetros medidos en la zona de agua de fondo de la bahía Concepción.

	<b>St 6</b>	<b>St 7</b>	<b>St 18</b>
OD (ml/L)	0,2	0,4	0,1
OD (% saturación)	3,7	7,0	1,8
Irradiancia (PAR)	0,0003	0,008	0,001
Temperatura (°C)	9,7	9,8	9,3
Salinidad (PSU)	34,5	34,5	34,5
Fluorescencia (mg/m <sup>3</sup> )	1,6	2,4	8,9
Turbidez (NTU)	1,4	1,6	38.2

### Actividad enzimática extracelular (EAA)

A través de la reacción fluorométrica con MCA-leu, se obtuvo que la St 7 ubicada en la boca grande de la bahía presentó mayor tasa de EEA ( $1.18 \pm 0.54$  nmol/g h), seguida de la St 6 ( $0.44 \pm 0.13$  nmol/g h) con la menor profundidad y ubicada más al interior de la bahía, y finalmente, la St 18 ( $0.40 \pm 0.09$  nmol/g h) ubicada fuera de la bahía con más de 80 m de profundidad (Figura 11).



**Figura 11:** Comparación de la tasa enzimática de hidrólisis extracelular (promedio y DS) en nmol/g h de sedimento superficial de las estaciones 6, 7 y 18, respectivamente, de la bahía Concepción (promedio  $\pm$  DS).

A partir del ANOVA se determinó que las diferencias de EEA (nmol/g h) entre las estaciones de la bahía Concepción fueron significativas con un  $p = 0.045$ . Sin embargo, la prueba posterior (Tuckey test) no identificó diferencias significativas entre las estaciones.

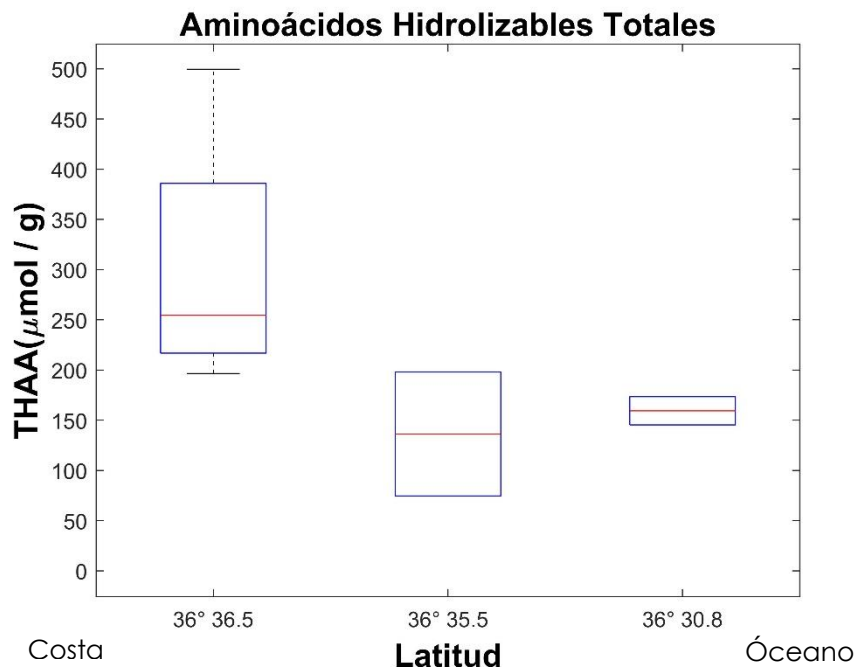
El testigo de sedimento de la St 6 presenta mayor EEA en el estrato superficial con valores de 13.5 nmol/g h, disminuyendo hacia la zona más profunda. No obstante, en el cm 7 hubo un aumento en la EEA respecto al estrato anterior, alcanzando 5.3 nmol/g h. Bajo los 20 cm la EEA se mantuvo constante en un rango de 0.3 a 0.05 nmol/g h (Figura 14.a).

Debido a que solo se contó con un dato por estrato, no se realizó test estadístico.



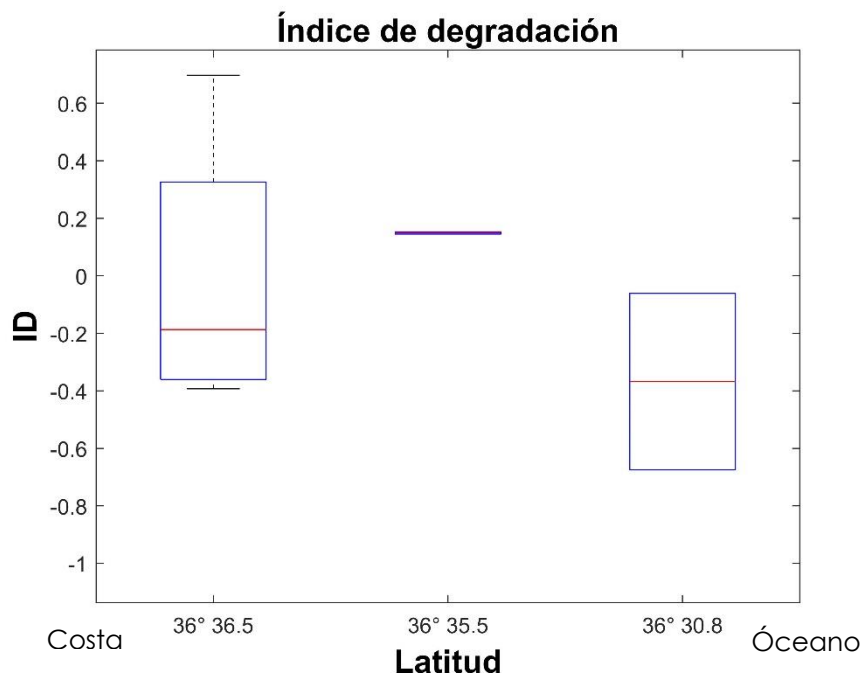
### **Aminoácidos**

A través del promedio de las concentraciones ( $\mu\text{mol/g}$ ) se observó que en el sedimento superficial la St 6 presentó mayor concentración de THAA ( $301.3 \pm 137.3 \mu\text{mol/g}$ ), mientras que la St 18 en promedio fue mayor que la St 7 ( $159.4 \pm 19.0 \mu\text{mol/g}$  y  $136.3 \pm 83.2 \mu\text{mol/g}$ , respectivamente) (Figura 12).



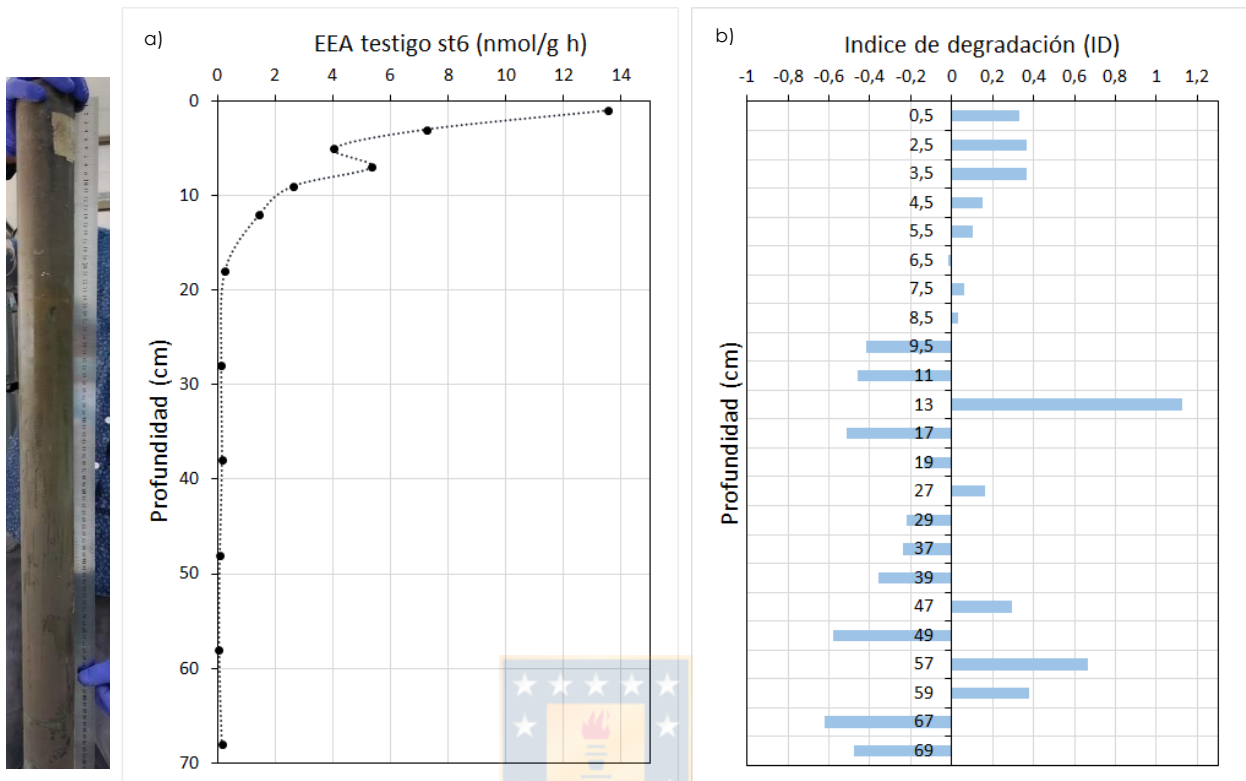
**Figura 12:** comparación de las concentraciones de aminoácidos individuales ( $\mu\text{mol/g}$ ) de cada réplica del sedimento superficial (St 6, St 7 y St 18, respectivamente) de la bahía Concepción (promedio  $\pm$  DS).

El índice de degradación en las zonas más cercanas a la costa (St 6 y St 7) tuvieron mayor tendencia a valores positivos (materia orgánica lábil), no obstante, la St 6 presentó contrastes en su réplicas, donde 3 de 4 resultaron índices negativos y, la otra, resultó ser positiva respecto a las demás réplicas, mientras que el índice de degradación en la St 18 indicó valores negativos asociados a presencia de material orgánico refractario (Figura 13).



**Figura 13:** Comparación del ID de aminoácidos totales del sedimento superficial de las estaciones 6, 7 y 18, respectivamente, de la bahía Concepción (promedio  $\pm$  DS).

Por parte del testigo de sedimento, en general se observa que el promedio de la concentración ( $\mu\text{mol/g}$ ) del total de aminoácidos individuales tiende a disminuir a mayor profundidad, sin embargo, se observan estratos con aumento en su concentración total respecto al estrato anterior, como observa en a los 7 cm, 10 cm, 27 cm, 49 cm y 67 cm (Figura 17). Por otro lado, el DI mostró un descenso en la labilidad de la materia orgánica con el aumento de profundidad en el testigo, sin embargo, de igual manera se observan estratos profundos que tienden a valores positivos, como a los 13 cm, y posteriormente en menor magnitud los cm 47, 57 y 59 que tienden por definición a contenido lábil (Figura 14.b).



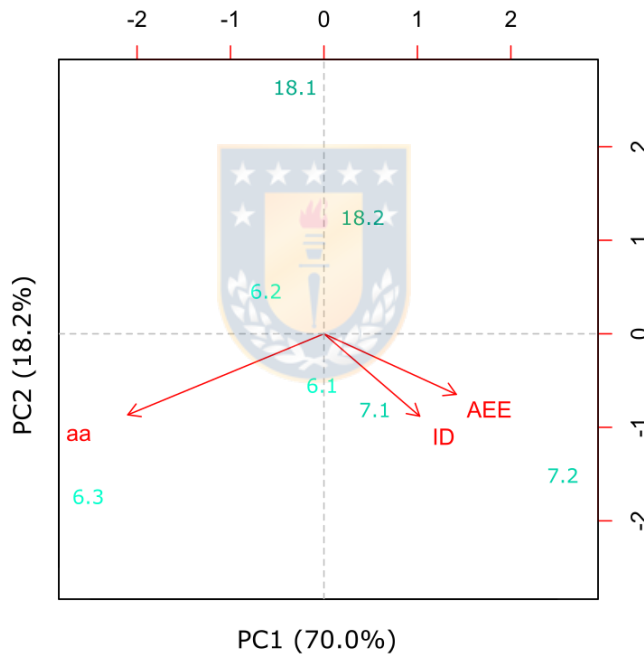
**Figura 14:** A la izquierda se observa el testigo de sedimento de la St 6 (Bahía de Concepción) de 73 cm de longitud utilizado para las mediciones. El perfil de la izquierda (a) entrega la tasa enzimática extracelular en nmol/g h y el perfil de la derecha (b) el Índice de degradación de los aminoácidos totales en testigo de sedimento de la St 6.

Mediante el test ANOVA realizado para THAA ( $\mu\text{mol/g}$ ) y DI entre las estaciones de la bahía Concepción, se determinó que no hay diferencias significativas entre estos resultados ( $p = 0.246$ ,  $p = 0.516$ , respectivamente).

El aminoácido individual que presentó mayor recurrencia tanto en sedimentos superficiales (Figura 18) como en sedimento profundo (Figuras 19 y 20) fue la treonina (Thr), y en menores concentraciones la histidina (His) y alanina (Ala). Además, la serina (Ser) únicamente en el testigo de sedimento contó con valores más altos en comparación al sedimento superficial de las estaciones, viéndose aumentos en la parte superficial (hasta los 7 cm de profundidad), a los 17 cm y desde los 27 a 40 cm del testigo. La his en el testigo de sedimento presentó un aumento en el estrato 27 cm.

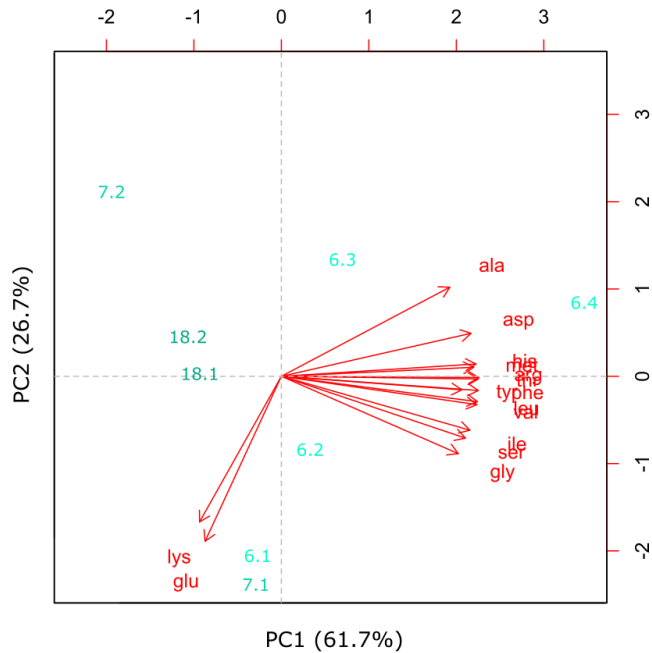
## Análisis de componentes principales

La relación entre las variables se resumió en la Figura 15 que incluye las variables EEA (nmol/g h), THAA ( $\mu\text{mol/g}$ ) y DI, de a las estaciones de muestreo y sus réplicas (St 6 = 6.1, 6.2 y 6.3; St 7 = 7.1 y 7.2; St 18 = 18.1 y 18.2). El PCA1 describe con un 70% de confianza la agrupación de los datos, observándose que los componentes de EEA y DI contribuyen a la St 7, y los aminoácidos totales componen principalmente la St 6. Mientras que la Figura 16 reúne los aminoácidos individuales en la St 6 principalmente con un 61.7% de confianza.



**Figura 15:** PCA de los componentes de EEA (nmol/g h), THAA ( $\mu\text{mol/g}$ ) y DI en sedimento superficial (St 6, St 7 y St 18).





**Figura 16:** PCA de 15 aminoácidos totales individuales en relación con el sedimento superficial (St 6, St 7 y St 18).

## DISCUSIÓN

### Sedimento superficial

Para la comparación de la variable de aminoácidos entre estaciones se generó dificultades debido a la diferencias de replicas. Se observó que la St 6 presentó mayor concentración de THAA ( $301.3 \pm 137.3 \mu\text{mol/g}$ ), mientras que la St 7 y St 18 mantuvieron un rango similar entre sí ( $136.3 \pm 83.2 \mu\text{mol/g}$  y  $159.4 \pm 19.0 \mu\text{mol/g}$ , respectivamente), donde la St 18 en promedio presentó mayor concentración en comparación a la St 7 como se vio en la figura 12. Entre ambas estaciones costeras, la St 7 presenta mayor tendencia a materia orgánica lábil en (figura 13), esto, podría compararse con los valores obtenidos en la actividad de hidrólisis extracelular (EEA) que fue mayor y correspondiente a la mismas comunidad del sedimento muestreado respecto a las otras estaciones (Figura 11), y se relacionaría entre estaciones cercanas a la costa (St 6 y St 7) con un mayor contenido de materia lábil y aminoácidos. Además, se podría considerar que estas estaciones tienen mayores aportes terrígenos, pero como se mencionó estos generan aportes

orgánicos refractarios y con menor contenido de aminoácidos, por lo que podría explicar el menor contenido de aminoácidos individuales en la St 7 (Cowie and Hedges, 1992). La comunidad de microorganismos presente es una característica del sedimento de cada estación, en el que la diferencia de esto explique que haya microorganismos que degraden mayor cantidad de materia orgánica, como si predominasen hongos marinos o bacterias. Pantoja & Lee (2003) cuantificaron concentraciones de aminoácidos (THAA-C/TOC (TOC: carbono orgánico total, siglas en inglés)) y la fracción de THAA-nitrógeno relativo en nitrógeno total en sedimento superficial (hasta los 5 cm), estimando que las estaciones ubicadas más cerca de la superficie terrestre presentaban mayor concentración de THAA-C/TOC. Consecuentemente, los resultados de Pantoja & Lee (2003) mostraron que la St 7 (con 0.34 THAA-C/TOC) fue ligeramente mayor que la St 6 (0.25 THAA-C/TOC), y 17 veces mayor que la St 18 (0.02 THAA-C/TOC), no concordando con los resultados medidos en el presente trabajo entre la St 6 y St 7, ya que la St 6 presentó mayor concentración de THAA (Figura 12 y Figura 16).

El PCA agrupó los aminoácidos totales a la St 6, y la EEA e DI a la St 7 (Figura 15), asociando los parámetros medidos principalmente a las estaciones cercanas a la costa (St 6 y 7), y desune la St 18 (ubicada fuera de la bahía). Entonces, si bien los resultados graficados muestran diferencias y el PCA muestra agrupaciones visibles entre ellos, el test estadístico ANOVA concluye que las variabilidades vistas no son significativas entre las estaciones 6, 7 y 18.

#### Testigo de sedimento (hasta 70 cm)

Para un testigo de sedimento, frecuentemente se espera que a medida que aumenta la profundidad en el sedimento el contenido de materia orgánica lábil disminuya, debido mayoritariamente a efectos de descomposición por parte de los micro y macroorganismos bentónicos (Brown *et al.* 1972). Esto se observó en los perfiles del testigo presentando tendencia al decrecimiento. Sin embargo, en el perfil de concentración de THAA individuales (Figura 19) hubo un peak de histidina en el estrato 27 y peaks de treonina y serina en zonas profundas, en el que la treonina alcanzó valores similares al superficial.

Se ha documentado que la treonina y serina están asociadas a las frústulas de sílices de diatomeas y proporcionan protección contra la degradación microbiana (Hecky *et al.* 1973), lo que podría estar vinculado a su aparición en la superficie del testigo y en la zona profunda.

De igual forma, la concentración de aminoácidos totales se observaron peaks debido a los aumentos de aminoácidos individuales (Figura 17). Además, a los 13 cm de profundidad la labilidad aumentó 2 veces por sobre el estrato superficial. Cowie y Hedges (1992) en un testigo de 50 cm de la bahía Dabbo, Washington, estimaron que la composición elemental de la materia orgánica sedimentaria (%OC, %N, THAA) tendió a caer más notoriamente desde los 10-15 cm de profundidad, sin embargo, se observó que a pesar de que la fluctuaciones decayeran, hubo aumentos en las concentraciones de proteínas en estratos profundos similar o levemente mayor al estrato superficial, coincidiendo con la dispersión en la concentración de aminoácidos de este trabajo.

### Aminoácidos

La naturaleza de cada péptido es variable, por lo que las tasas de hidrólisis de componentes proteicos podrían variar según su estructura (Pantoja & Lee 1999). Cowie & Hedges (1992) caracterizaron los aminoácidos proteicos enterrados en sedimento según su fuente de origen, resultando esta similares entre sí. Con ello se determinó que organismos como fitoplancton, zooplancton, bacterias y hongos son los mayores generadores de aminoácidos (50-140 mg cada 100 mg de carbono orgánico), seguido de las macroalgas (macrófitos) (~30 mg cada 100 mg de carbono orgánico) y finalmente, con bajos aportes las plantas vasculares, en el que las plantas no leñosas otorgan mayor cantidad (~18 mg cada 100 mg de carbono orgánico) que los tejidos leñosos. Sin embargo, la materia orgánica producida en la columna de agua y que alcanza la superficie del sedimento para ser utilizado por la comunidad microbiana, es menor a 0.1% (Cowie & Hedges 1992).

Los aminoácidos individuales no exhibieron una tendencia clara a la estación o a sedimento más profundo. La treonina muestra ser el aminoácido con mayor predominancia en cada muestra. Cowie y Hedges (1992) mostró máximos invernales de glicina, treonina, ácido aspártico y alanina a 30 m de profundidad, y una disminución de ácido aspártico a 60 m de profundidad, y a 30 m de profundidad exhibieron mínimos invernales la tirosina, metionina y fenilalanina, lo que podría ser consistente estacionalmente debido que el muestreo se realizó a fines de invierno y comienzos de otoño. Finalmente, el mismo autor mostró que el ácido glutámico se enriquece mientras que la arginina se agota a 60 m y relativo a los 30 m de profundidad y no observaron

patrones estacionales consistentes, esto no coincidió con el presente estudio, debido a que las concentraciones para ambos aminoácidos fueron bajas. Los aminoácidos intracelulares presentes en el plasma celular como ácido glutámico, fenilalanina y metionina (Hecky *et al.* 1973), son más susceptibles a la degradación que los aminoácidos asociados a la pared celular, como la glicina, serina y alanina (Wang *et al.* 2018), no obstante, los aminoácidos individuales mencionados a excepción de la ala presentaron concentraciones bajas.

La prueba estadística PCA agrupa los THAA mayoritariamente a la St 6, como se observó en la tendencia de los aminoácidos totales en general para esta estación.

## CONCLUSIÓN

1. Los sedimentos superficiales del interior de la bahía de Concepción se caracterizaron por presentar mayor EEA (St 7), mayor contenido de aminoácidos (St 6) y mayor presencia de materia orgánica lábil, en comparación con sedimentos alejados de la costa (St 18) y sedimentos más antiguos (profundidad en sedimentos) (Tabla 3).
2. El sedimento ubicado fuera de la bahía (St 18) presentó valores negativos en el DI (mayor materia orgánica refractaria), lo que podría presumir que hubiera un alto consumo de materia orgánica lábil por parte de la comunidad microbológica o que los aportes de materia orgánica lábil al sedimento marino fuesen bajos.
3. Las concentraciones de oxígeno del agua de la zona profunda en las 3 estaciones se encontraban en niveles subóxicos (1.7% a 7% saturación de OD).

**Tabla 3:** Resumen de los resultados de cada estación y se establece entre las mismas una comparación de las variables medidas.

	<i>Tasa de EEA</i>	<i>Concentración de DI aminoácidos</i>	<i>de DI</i>
St 6	Baja (similar a la st 18)	Alta	+/-

St 7	Alta	Baja (similar a la st 18)	+
St 18	Baja	Baja	-

4. Con el análisis exploratorio (PCA) se observaron variaciones entre los parámetros de las estaciones costeras que sugieren un gradiente longitudinal (costa-océano). Sin embargo, el análisis estadístico (ANOVA) determinó que las variaciones entre estas 3 estaciones no son significativas entre sí, por lo tanto, la hipótesis 1 no se acepta.
5. En el caso del testigo de sedimento que presentó irregularidades en la degradación de la materia orgánica en diferentes estratos, en comparación a la EEA y contenido de aminoácidos, se mantiene que la degradación va decreciendo al menos hasta los 10 cm de profundidad, debido a que posteriormente hay intervalos de aumentos en la degradación, que podrían estar asociados a efectos biológicos (bioperturbación) o eventos naturales (tsunamis/terremotos).



## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ahumada, R & Chuecas, L (1979). Algunas características hidrográficas de la Bahía de Concepción (36°40\*S; 73°02\*W) y áreas adyacentes, Chile. *Gayana Miscelánea* 8, 1–59.
2. Ahumada, R, Rudolph, A & Martínez, V (1983). Circulation and fertility of waters in Concepción Bay. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 16, 95-105.
3. Arcos, D & Navarro, N (1986). Análisis de un índice de surgencia para la zona de Talcahuano, Chile (Lat. 37°S). *Investigación Pesquera* 33, 91–98.
4. Arnosti, C (1995). Measurement of depth-and site-related differences in polysaccharide hydrolysis rates in marine sediments. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 59(20), 4247-4257
5. Arnosti, C (2011). Microbial extracellular enzymes and the marine carbon cycle. *Annual review of marine science*, 3, 401-425.
6. Arnosti, C (2008). Functional differences between Arctic seawater and sedimentary microbial communities: contrasts in microbial hydrolysis of complex substrates. *FEMS microbiology ecology*, 66(2), 343-351.

7. Azam, F, Fenchel, T, Field, JG, Gray, JS, Meyer-Reil, LA & Thingstad, F (1983). The ecological role of water-column microbes in the sea. In *Marine ecology progress series*, 257-263.
8. Billen, G (1991). Protein degradation in aquatic environments. In *Microbial enzymes in aquatic environments* (pp. 123-143). Springer, New York, NY.
9. Boden, R & Hutt, LP (2018). Chemolithoheterotrophy: means to higher growth yields from this widespread metabolic trait. In *Aerobic Utilization of Hydrocarbons, Oils and Lipids. Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*. Springer.
10. Brandhorst, W (1971). Condiciones oceanográficas estivales frente a la costa de Chile. *Revista Biología Marina, Valparaíso* 4, 34–84.
11. Brown, FS, Baedeker, MJ, Nissenbaum, A, & Kaplan, IR (1972). Early diagenesis in a reducing fjord, Saanich Inlet, British Columbia—III. Changes in organic constituents of sediment. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 36(11), 1185-1203.
12. Chróst, RJ (1991). Environmental control of the synthesis and activity of aquatic microbial ectoenzymes. In *Microbial enzymes in aquatic environments* (pp. 29-59). Springer, New York, NY.
13. Cowie, GL & Hedges, JI (1992). Sources and reactivities of amino acids in a coastal marine environment. *Limnology and Oceanography*, 37(4), 703-724.
14. Dauwe, B, Middelburg, JJ, Herman, PM, & Heip, CH (1999). Linking diagenetic alteration of amino acids and bulk organic matter reactivity. *Limnology and Oceanography*, 44(7), 1809-1814.
15. Degens, ET (1970). Molecular nature of nitrogenous compounds in seawater and recent marine sediments. In: Hood, D.W. (Ed.), *Organic Matter in Natural Waters*. University of Alaska Press, pp. 77–106.
16. Ducklow, HW, Steinberg, DK & Buesseler, KO (2001). Exportación de carbono del océano superior y la bomba biológica. *Oceanography-Washington DC-Sociedad de oceanografía*, 14 (4), 50-58.
17. Fabiano, M & Danovaro, R (1998). Enzymatic activity, bacterial distribution, and organic matter composition in sediments of the Ross Sea (Antarctica). *Applied and Environmental Microbiology*, 64(10), 3838-3845.
18. Farías, L (1992). Efectos Inducidos por la Contaminación Orgánica Sobre la Macrofauna Bentónica de la Bahía de Concepción, Estimados

- Mediante el Uso de Trazadores  $^{234}\text{Th}$  y  $^{210}\text{Pb}$ . Tesis de Magister, Universidad de Concepción, 126 pp.
19. Farias, L, Chuecas L & Salamanca M (1996). Effect of coastal upwelling on Nitrogen Regeneration from sediments and Ammonium Supply to the Water Column in Concepcion Bay, Chile. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 43(2), 137-155
  20. Gutiérrez, MH, Pantoja, S, Tejos, E & Quiñones, RA (2011). The role of fungi in processing marine organic matter in the upwelling ecosystem off Chile. *Marine biology*, 158(1), 205-219.
  21. Hansell, DA, Carlson, CA, Repeta, DJ & Schlitzer, R (2009). Materia orgánica disuelta en el océano: una controversia estimula nuevos conocimientos. *Oceanografía*, 22 (4), 202-211.
  22. Hedges, JI (1992). Ciclos biogeoquímicos globales: avances y problemas. *Química marina*, 39 (1-3), 67-93.
  23. Hedges, JI (2002). Sedimentary organic matter preservation and atmospheric  $\text{O}_2$  regulation. In *Chemistry of marine water and sediments* (pp. 105-123). Springer, Berlin, Heidelberg.
  24. Hecky, RE, Mopper, K, Kilham, P, & Degens, ET (1973). The amino acid and sugar composition of diatom cell-walls. *Marine biology*, 19(4), 323-331.
  25. Hoppe, HG (1991). Microbial extracellular enzyme activity: a new key parameter in aquatic ecology. In *Microbial enzymes in aquatic environments* (pp. 60-83). Springer, New York, NY.
  26. Hoppe, HG, Arnosti, C & Herndl, GJ (2002). Ecological significance of bacterial enzymes in the marine environment. *Enzymes in the Environment: Activity, Ecology, and Applications*, 73-107.
  27. Jolliffe, IT (2002). Principal component analysis for special types of data (pp. 338-372). Springer New York.
  28. Liu, KK, Atkinson, L, Chen, CT, Gao, S, Hall, J, Macdonald, RW & Quiñones, R (2000). Exploring continental margin carbon fluxes on a global scale. *Eos, Transactions American Geophysical Union*, 81(52), 641-644.
  29. Martínez, J & Azam, F (1993). Periplasmic aminopeptidase and alkaline phosphatase activities in a marine bacterium: implications for substrate processing in the sea. *Marine Ecology-Progress Series*, 92, 89-89.
  30. Meyer-Reil, LA (1987). Seasonal and spatial distribution of extracellular enzymatic activities and microbial incorporation of dissolved organic

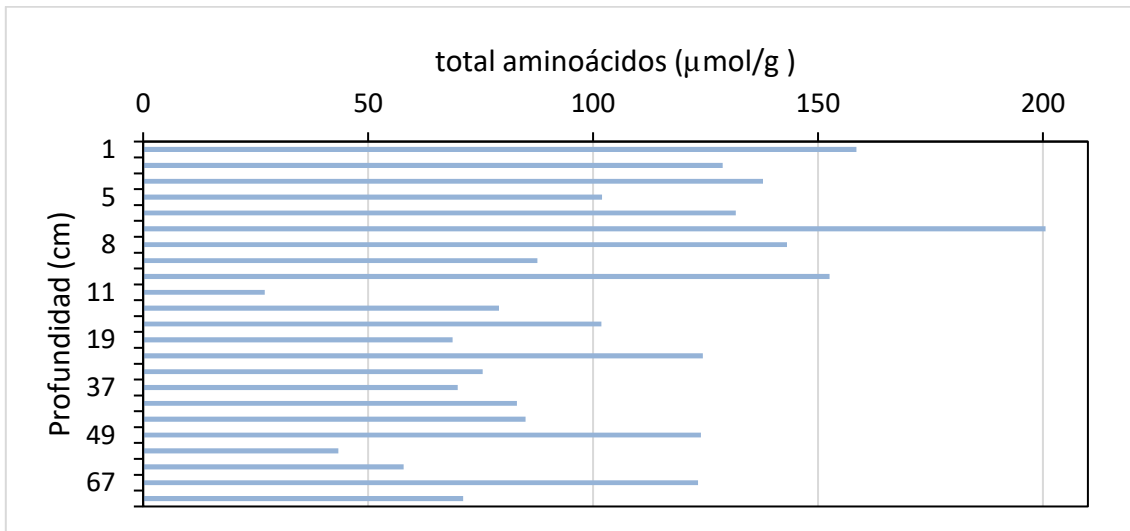
- substrates in marine sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, 53(8), 1748-1755.
31. Pantoja, S & Lee, C (1994). Cell-surface oxidation of amino acids in seawater. *Limnology and Oceanography*, 39(7), 1718-1726.
  32. Pantoja, S & Lee, C (1999). Molecular weight distribution of protein in Long Island Sound sediments. *Limnology and Oceanography*, 44, 1323–1330.
  33. Pantoja S (2000). Organic Chemical Reaction Rates in the Ocean: Molecular Approaches to Studying Extracellular Biochemical Processes. In *Chemical Processes in Marine Environments* (pp. 141-158). Springer, Berlin, Heidelberg.
  34. Pantoja, S & Lee, C (2003). Remineralización de aminoácidos y labilidad de la materia orgánica en sedimentos costeros chilenos. *Geoquímica orgánica*, 34 (8), 1047-1056.
  35. Pantoja, S, Lee, C & Marecek, JF (1997). Hydrolysis of peptides in seawater and sediment. *Marine Chemistry*, 57(1-2), 25-40.
  36. Pantoja, S, Gutiérrez, MH, Ampuero, P & Tejos, E (2011). Degradation capability of the coastal environment adjacent to the Itata River in central Chile (36.5° S). *Biogeosciences Discussions*, 8(1).
  37. Redfield, A, Ketchum B & Richards, F (1963). The influence of organisms on the composition of water. En: M. N. Hill (Ed). *The Sea* v.2. WileyInterscience, pp. 26-77.
  38. Salamanca, M (1993). Sources and Sinks of 210Pb in Concepcion Bay, Chile. Ph.D. Dissertation, Marine Sciences Research Center, State University of New York, 251 pp.
  39. Wang, K, Chen, J, Jin, H, Li, H, & Zhang, W (2018). Organic matter degradation in surface sediments of the Changjiang estuary: Evidence from amino acids. *Science of the Total Environment*, 637, 1004-1013.
  40. Weiss, MS, Abele, U, Weckesser, J, Welte, WU, Schiltz, E & Schulz, GE (1991). Molecular architecture and electrostatic properties of a bacterial porin. *Science*, 254(5038), 1627-1630.
  41. Williams, CJ & Jochem, FJ (2006). Ectoenzyme kinetics in Florida Bay: implications for bacterial carbon source and nutrient status. *Hydrobiologia*, 569(1), 113-127.



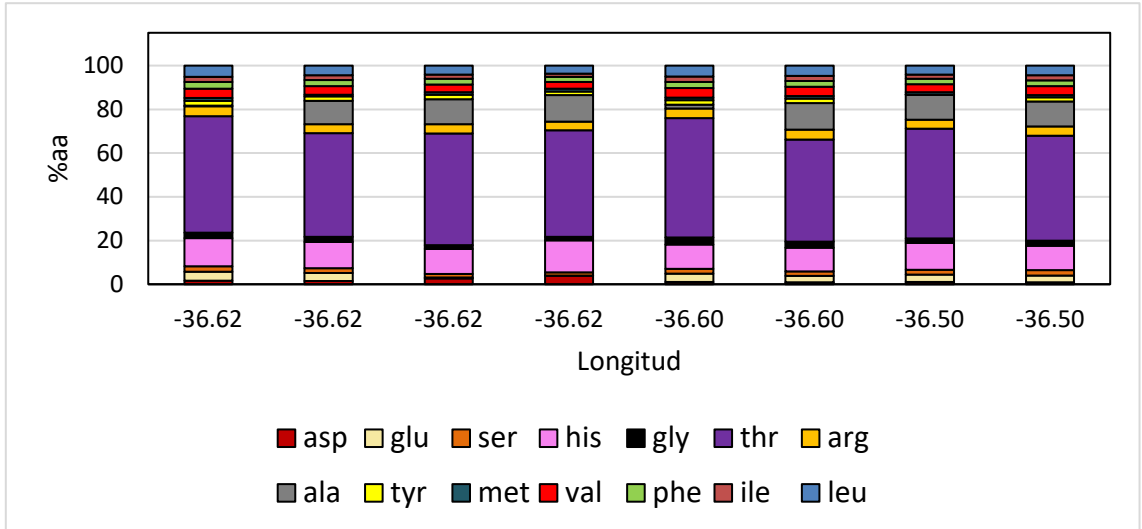
ANEXO

**Tabla 4:** A partir de la base de datos de Dauwe *et al.* (1999) se utilizó el factor coeficiente para la determinación del DI, que calcularon en diferentes tipos de sedimentos.

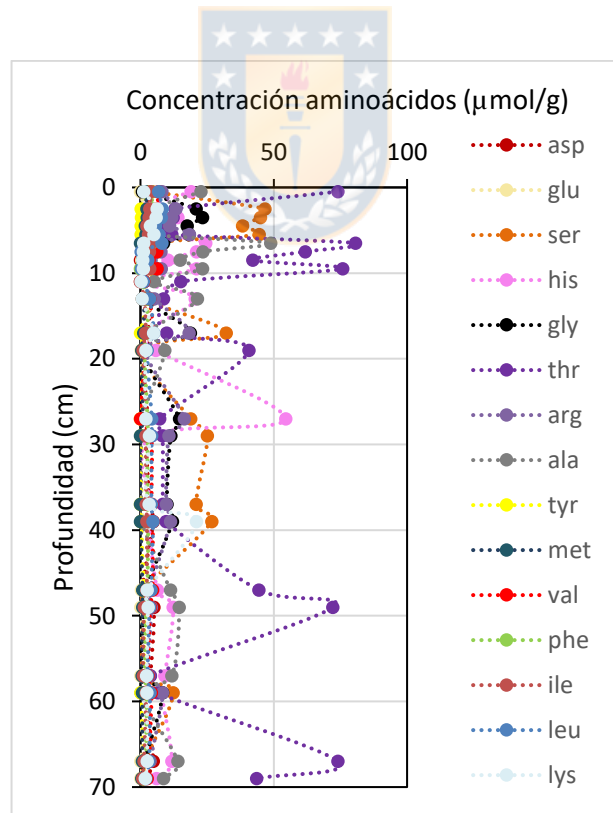
<i>Aminoácidos individuales</i>	<i>Factor Coeficiente</i>
<i>asp</i>	-0,102
<i>glu</i>	0,065
<i>ser</i>	0,015
<i>his</i>	0,158
<i>gly</i>	-0,099
<i>thr</i>	-0,129
<i>arg</i>	-0,115
<i>ala</i>	-0,043
<i>tyr</i>	0,178
<i>met</i>	0,134
<i>val</i>	-0,044
<i>phe</i>	0,134
<i>ile</i>	0,139
<i>leu</i>	0,169



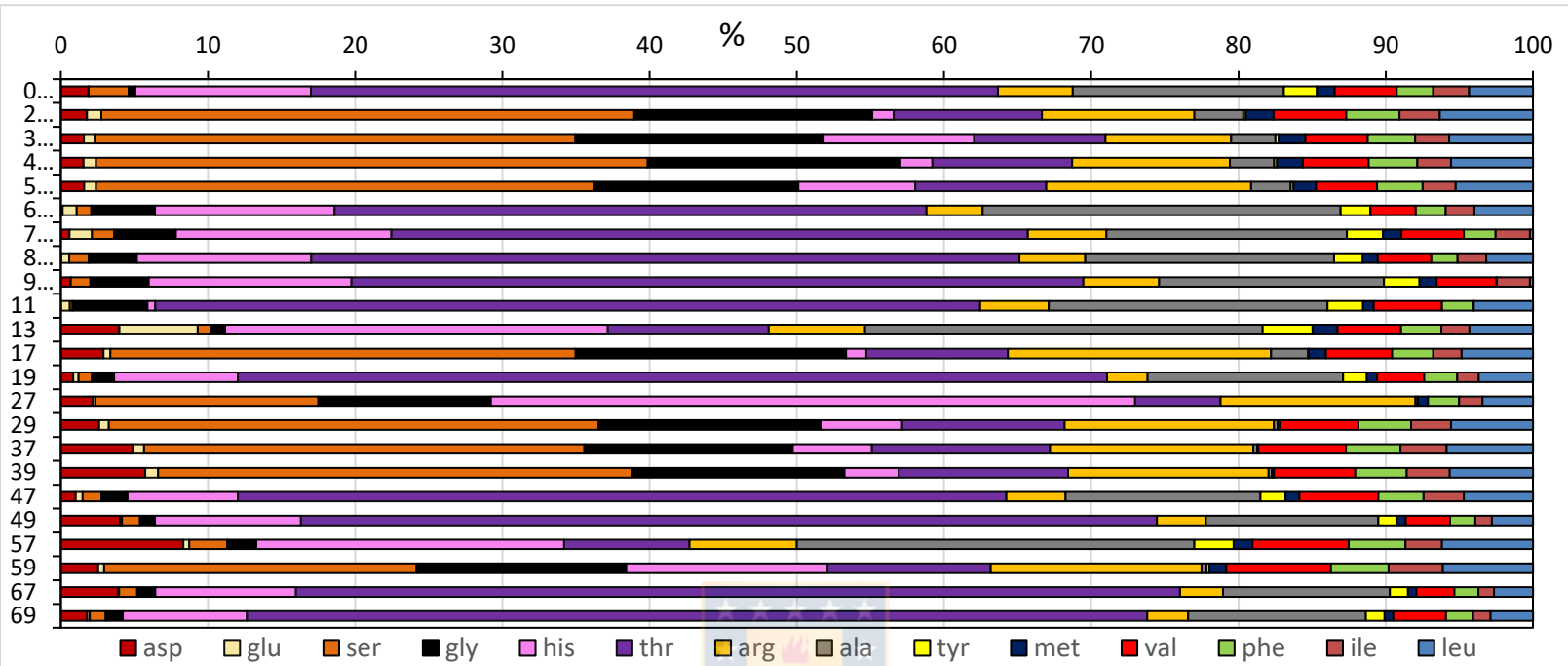
**Figura 17:** Suma de las concentraciones (µmol/g) de aminoácidos individuales de los estratos del testigo.



**Figura 18:** Porcentaje de mol de aminoácido medidos para las estaciones (de izquierda a derecha St 6 (R4, R3, R2 y R1), St 7 (R1 y R2) y St 18 (R1 y R2)).



**Figura 19:** Concentración ( $\mu\text{mol/g}$ ) de aminoácidos individuales en la vertical de sedimento de la St 6.



**Figura 20:** Porcentaje de mol de aminoácidos medidos en la vertical del sedimento de la St 6.