



Universidad de Concepción

Dirección de Postgrado

Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas - Programa de Postgrados en  
Oceanografía

**Influencia de factores físico-químicos en la distribución  
vertical del pico-nanoplancton en la Zona de Mínimo  
Oxígeno (ZMO) del norte de Chile: La influencia relativa del  
bajo pH/bajo O<sub>2</sub>**

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

EDSON ALEXIS JUNIOR PISCOYA CAMPOS  
CONCEPCIÓN-CHILE  
2022

Profesor Guía: Dr. Cristian Vargas Gálvez

Profesor co-Guía: Dr. Peter von Dassow

Departamento de Oceanografía, Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas  
Universidad de Concepción

Universidad de Concepción  
Dirección de Postgrado

La Tesis de Magíster en Oceanografía titulada “*Influencia de factores físico-químicos en la distribución vertical del pico-nanoplancton en la Zona de Mínimo Oxígeno (ZMO) del norte de Chile: La influencia relativa del bajo pH/bajo O<sub>2</sub>*”, del Sr. Edson Alexis Junior Piscoya Campos y realizado bajo la Facultad de Ciencia Naturales y Oceanográficas, Universidad de Concepción, ha sido aprobada por la siguiente Comisión de Evaluación:

Dr. Cristian Vargas.  
Profesor Guía  
Universidad de Concepción, Chile

---

Dr. Peter von Dassow  
Profesor Co-Guía  
Pontificia Universidad Católica de Chile

---

Dr. Marcelo Gutiérrez  
Miembro Comité de Tesis  
Universidad de Concepción, Chile

---

Dra. Montserrat Aldunate  
Evaluador Externo  
Universidad de Concepción, Chile

---

Dr. Diego Narváez  
Director de Programa  
Departamento de Oceanografía  
Universidad de Concepción

---

## **Dedicatoria**

A mis padres, *Yobana Campos y Eduardo Piscoya* por su apoyo y motivación en todas las etapas de mi vida.

A Mis hermanas *Nelsi y Delsi* que son mis dos luceros en esta vida

A mi abuelo *Rosendo Piscoya* que estoy seguro estaría orgulloso.

Al Dr. *Wilmer Carbajal* que fue un gran amigo  
y la persona que más me motivó a seguir  
con mis estudios e hizo posible poder  
empezar esta etapa de magíster.

## Agradecimientos

Me gustaría agradecer profundamente a mi profesor guía Dr. Cristian Vargas, por su apoyo, confianza, motivación y paciencia durante esta etapa de magíster, especialmente por su orientación y capacitación en el desarrollo de esta tesis.

Al laboratorio de *Ecosistemas Costeros & Cambio Ambiental Global (ECCALab)*; a Montserrat Aldunate, por sus enseñanzas, entusiasmo y predisposición en todo momento del desarrollo de los experimentos, a Antonio Cuevas, Lorena Arias, Natalia Osma y Tamara Cuevas por brindarme su confianza y por su ayuda en aspectos metodológicos y logísticos.

Al Dr. Peter von Dassow y Dr. Diego Narváez por sus comentarios, sugerencias y por formar parte de la comisión evaluadora. Al Dr. Fabián Tapia por todo el apoyo brindado en poder continuar y culminar el magíster. Al Dr. Rubén Escribano, por facilitarme las instalaciones del Laboratorio de Biología Marina (Dichato) para la realización de los experimentos.

Finalmente, agradecer al Instituto Milenio de Oceanografía (IMO) y a la Dirección de Postgrado de la Universidad de Concepción por financiar mis estudios de magíster.

## CURRICULUM VITAE

Edson Alexis Junior Piscocoy Campos

Nacido el 20 de septiembre, 1992 en Chiclayo, Perú

**2009 – 2014:** Biólogo pesquero, Licenciado en Biología – Pesquería, Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Perú.

**2019 – 2022:** Magíster en Ciencias con Mención en Oceanografía, Universidad de Concepción, Chile.

### PUBLICACIONES

Piscocoy, E., von Dassow, P., Aldunate, M., Vargas, C. 2022. Physical-chemical factors influencing the vertical distribution of phototrophic pico-nanoplankton in the Oxygen Minimum Zone (OMZ) off Northern Chile: The relative influence of low pH/low O<sub>2</sub> conditions. (Enviado 17/01/2022 a *Marine Environmental Research*).

### AREAS DE INVESTIGACIÓN

Principal: Oceanografía biológica

Secundaria: Oceanografía química

Otras: acidificación del océano

### ESTADÍAS DE INVESTIGACIÓN O ENTRENAMIENTO

Laboratorio de Ecosistemas Costeros & Cambio Ambiental Global (ECCALab), Centro de Ciencias Ambientales EULA, Universidad de Concepción, Cristian Vargas.

Curso de programación en R para análisis de datos. Universidad de Concepción. Chile, 8 de mayo – 7 de julio 2019.

Taller N°4 de Escritura y Edición para apoyar la Producción Científica. Universidad de Concepción. Chile, 16 – 19 de noviembre 2021.

#### CONGRESOS Y SIMPOSIOS

2021: 12th International Phycological Congress – IPC2021, 22-26 de marzo 2021. Resumen:  
Is the oxycline a barrier to phytoplankton in the oxygen minimum zone? The response of *Imantonia* sp. to low O<sub>2</sub>, high CO<sub>2</sub>, low pH conditions.

# Índice de Contenidos

Resumen .....	I
Abstract.....	III
1 INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Fitoplancton: definición, características e importancia .....	1
1.2 Rol y distribución del oxígeno en la columna de agua.....	3
1.3 Formación y distribución de las ZMOs .....	4
1.4 El pH y la presión parcial del dióxido de carbono ( $p\text{CO}_2$ ) como factores de estrés ...	7
1.5 Estresores múltiples en los océanos: Calentamiento global, desoxigenación y acidificación de los océanos .....	9
2 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS .....	12
2.1 Hipótesis .....	12
2.2 Objetivo principal .....	12
2.3 Objetivos específicos .....	12
3 MATERIALES Y MÉTODOS.....	13
3.1 Área de estudio .....	13
3.2 Análisis físico – químico .....	14
3.3 Estimación de la abundancia celular .....	16
3.3.1 Análisis de Citometría de flujo.....	16
3.3.2 Microscopía de Epifluorescencia.....	17
3.4 Experimento de perturbación en condiciones de bajo pH/bajo $\text{O}_2$ .....	17
3.5 Análisis Estadístico .....	19
4 RESULTADOS .....	20
4.1 Capítulo 1. “Influencia de factores físico - químicos en la distribución vertical del pico-nanoplancton en la Zona de Mínimo Oxígeno (ZMO) del norte de Chile: La influencia relativa del bajo pH/bajo $\text{O}_2$ ” .....	20
5 DISCUSIÓN.....	59
6 CONCLUSIONES.....	67

## Índice de Figuras

Figura 1.1 Principales Zonas de Mínimo Oxígeno (ZMO) en el mundo. Incluyendo (a) profundidad superior (m) de hipoxia de agua intermedia ( $O_2 < 1,4 \text{ ml L}^{-1}$ ) y (b) espesor (m) de la hipoxia del agua intermedia ( $O_2 < 1,4 \text{ ml L}^{-1}$ ). Extraído de Moffitt et al. (2015) .....7

Figura 3.1 Área de estudio durante la expedición LowpHOX II incluyendo las tres estaciones de muestreo (T1, T3 y T5) frente al norte de Chile ( $20^\circ\text{S}$ ), imagen compuesta de la temperatura superficial ( $^\circ\text{C}$ ) del mar MODIS de febrero de 2018. .... 14



## Resumen

Influencia de factores físico-químicos en la distribución vertical del pico-nanoplancton en la Zona de Mínimo Oxígeno (ZMO) del norte de Chile: La influencia relativa del bajo pH/bajo O<sub>2</sub>

Edson Alexis Junior Piscoya Campos

2022

Dr. Cristian Vargas, Profesor Guía

Dr. Peter von Dassow, Profesor Co-Guía

Las regiones oceánicas con bajos niveles de O<sub>2</sub> se están expandiendo rápidamente con importantes implicaciones para los organismos marinos y el funcionamiento de los ecosistemas. En consecuencia, se necesitan datos empíricos sobre la influencia relativa del O<sub>2</sub> y otras variables ambientales, como los nutrientes, la temperatura y el pH, en la distribución vertical del fitoplancton marino en las zonas de mínimo oxígeno (ZMO), especialmente si se tiene en cuenta el importante papel de los productores primarios en los ciclos biogeoquímicos globales. Aquí evaluamos la influencia relativa de los factores ambientales que podrían controlar la coexistencia y la distribución vertical del pico-nanoplancton asociado a la ZMO frente al norte de Chile. Considerando tanto enfoques de campo como experimentales, también exploramos el efecto combinado de las condiciones de bajo pH/bajo O<sub>2</sub> características de la ZMO superior sobre un nanoflagelado fototrófico (PNF) aislado de esta área de estudio. El trabajo de campo se realizó en el marco de una expedición a la ZMO frente al norte de Chile en febrero de 2018. Nuestros resultados mostraron que, en la capa superior de la ZMO, la abundancia de *Synechococcus* fue numéricamente sustancial (90 000 a 300 000 células mL<sup>-1</sup>) en todas las estaciones de muestreo. Los pico-nano eucariotas, incluyendo PNF, exhibieron abundancias que fluctuaron entre 5000 - 23000 células mL<sup>-1</sup> en la capa superior disminuyendo su abundancia al nivel de la oxiclina superior, mientras que *Prochlorococcus* solo mostró abundancias entre 2500 - 97000 células mL<sup>-1</sup> bajo la oxiclina y dentro de la capa con bajo niveles de O<sub>2</sub>. Los análisis estadísticos evidenciaron que el O<sub>2</sub>, la temperatura y los

parámetros químicos del sistema de carbonatos (pH y carbono inorgánico disuelto, CID) influyeron significativamente en la distribución vertical del pico-nanoplancton fototrófico.

Evaluamos experimentalmente el efecto combinado de las condiciones de bajo pH/bajo O<sub>2</sub> en una cepa del género haptófito *Imantonia sp.* En condiciones de control (pH= 8,1; O<sub>2</sub>= 287,5 μM, luz = 169,6 μEm<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>), la fluorescencia in vivo de *Imantonia sp.* aumentó más de cincuenta veces, induciendo condiciones de sobresaturación de O<sub>2</sub> (900 μM) y un pH alto (8,5), mientras que en un tratamiento experimental que imita las condiciones de la ZMO (pH = 7,5; O<sub>2</sub> = 55,6 μM; luz = 169,6 μEm<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>), tanto los valores de O<sub>2</sub> como de pH permanecieron constantes y la fluorescencia in vivo disminuyó drásticamente, lo que sugiere que *Imantonia sp.* no sobrevivió. Aunque es preliminar, nuestro estudio proporciona evidencia sobre el papel de las condiciones de bajo pH/bajo O<sub>2</sub> en la distribución vertical del nanofitoplancton, lo que merece un interés futuro a través de trabajos de campo y experimentos más amplios.

## Abstract

Physical-chemical factors influencing the vertical distribution of phototrophic pico-nanoplankton in the Oxygen Minimum Zone (OMZ) off Northern Chile: The relative influence of low pH/low O<sub>2</sub> conditions

Edson Alexis Junior Piscoya Campos

2022

Dr. Cristian Vargas, Thesis Advisor

Dr. Peter von Dassow, Thesis Co-Advisor

Oxygen-depleted oceanic regions are rapidly expanding with important implications for marine organisms and ecosystem functioning. In consequence, empirical data about the relative influence of oxygen, and other environmental variables, such as nutrients, temperature and pH on the vertical distribution of marine phytoplankton in Oxygen Minimum Zones (OMZs) are needed, especially considering the major role of primary producers on global biogeochemical cycles. Here, we evaluated the relative influence of environmental factors that might control the coexistence and vertical distribution of pico-nanoplankton associated with the OMZ off northern Chile. By considering both field and experimental approaches we also explore the combined effect of low pH/low O<sub>2</sub> conditions in the upper OMZ's oxycline on a phototrophic nanoflagellate (PNF) isolated from this study area. Field work was carried out in the framework of an expedition to the OMZ off northern Chile in February 2018. Our results showed that in the upper layer *Synechococcus*-like cells were numerically important (90 000 - 300 000 cell mL<sup>-1</sup>) at all sampling stations. Pico-nano Eukaryotes including PNF also recorded abundances between 5 000 - 23 000 cell mL<sup>-1</sup> in the upper layer decreasing in abundance down to the upper oxycline, while only *Prochlorococcus* showed high abundances (2 500 - 97 000 cell mL<sup>-1</sup>) under oxycline and within the oxygen-depleted layer. Statistical analyses indicated that oxygen, temperature, and carbonate chemistry parameters (pH and dissolved inorganic carbon, DIC) influenced significantly the vertical distribution of phototrophic pico-nanoplankton. Additionally, we experimentally-evaluated the combined

effect of low pH/low O<sub>2</sub> conditions on a nanophytoplankton species, the haptophyte *Imantonia sp.* Under control conditions (pH= 8.1; O<sub>2</sub>= 287.5 μM, light = 169.6 μEm<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>), *Imantonia sp.* *in vivo* fluorescence increased over fifty times six days after adding inoculum, inducing supersaturated O<sub>2</sub> conditions (900 μM) and an increasing pH (8.5), whereas upon an experimental treatment mimicking OMZ conditions (pH = 7.5; O<sub>2</sub> = 55.6 μM; light = 169.6 μEm<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>), both O<sub>2</sub> and pH values remained constant and *in vivo* fluorescence declined dramatically, suggesting that *Imantonia sp.* did not survive. Although preliminary, our study provides evidence about the role of low pH/low O<sub>2</sub> conditions on the vertical distribution of nanophytoplankton, which deserve future attention through both fieldwork and more extended experiments.

# 1 INTRODUCCIÓN

La composición de las comunidades fitoplanctónicas desempeñan un papel importante en la eficacia de la bomba biológica y la transferencia de energía a los niveles tróficos superiores la cual puede verse afectada significativamente por los cambios en las condiciones ambientales (Donahue et al., 2019). Las condiciones climáticas afectan al fitoplancton tanto directamente, a través de su fisiología, como indirectamente, modificando la estratificación de la columna de agua y la disponibilidad de recursos, principalmente nutrientes y luz, o intensificando el pastoreo de los heterótrofos. Dependiendo de la composición de la comunidad ante los factores de estrés añadidos generados por el cambio climático como el calentamiento global, la desoxigenación y la acidificación de los océanos, puede generar cambios específicos en la composición de la comunidad que podrían dar lugar a una mayor o menor eficiencia en la exportación de carbono de las aguas superficiales, afectando en última instancia a la bomba biológica (Feng et al., 2010; Hoppe et al., 2011).

## 1.1 Fitoplancton: definición, características e importancia

La denominación “fitoplancton” responde a una definición funcional, ya que agrupa a un conjunto de organismos autotróficos de origen polifilético. Son microorganismos adaptados a vivir parcial o continuamente en aguas abiertas, constituyen la parte fotoautótrofa del plancton y un importante productor primario de carbono orgánico en la zona epipelágica de los mares y de aguas continentales (Reynolds, 2018). Son la base de la red trófica del océano, obtiene energía a través de la fotosíntesis por lo que juega un rol clave en el ciclo del carbono representando aproximadamente el 50 % de la producción primaria mundial, fijando alrededor de 45 gigatoneladas (Gt) de carbono cada año, regulando así las concentraciones de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) en la atmosfera (Falkowski & Raven, 2007).

Con el fin de conocer el funcionamiento del fitoplancton, han surgido numerosas clasificaciones en base a distintos atributos tales como el tamaño, la morfología, los pigmentos, etc. El tamaño es una de las propiedades más utilizadas para la clasificación de los organismos. Sieburth et al. (1978) establecieron un sistema lógico, donde se divide al plancton en cuatro categorías: picoplancton (0,2 – 2 µm), nanoplancton (2 – 20 µm), microplancton (20

– 200  $\mu\text{m}$ ) y mesoplancton (200  $\mu\text{m}$  – 2 mm), las cuales han sido ampliamente adoptadas en la ecología del fitoplancton. Para fines de esta tesis nos centraremos en la descripción del picoplancton y nanoplancton.

El término picoplancton incluye un heterogéneo grupo de organismos que se caracterizan por presentar comportamiento fototótrofo, heterótrofo y potencialmente mixótrofos, dominan la biomasa fotosintética y la producción primaria en muchos ecosistemas marinos. Incluyen organismos pertenecientes tanto a los dominios Bacteria y Archaea (procariotas) como al dominio Eukarya (eucariotas) (Woese et al., 1990). El componente procariota del pico-fitoplancton está dominado por dos géneros, *Prochlorococcus* y *Synechococcus* suelen ser importantes contribuyentes a la abundancia del fitoplancton y a la producción fotosintética en la capa superior de las aguas costeras y oceánicas (Worden et al., 2004). Aunque la abundancia de las picoeucariotas puede ser menor que la de sus homólogos procariotas, su gran volumen celular contribuye en gran proporción a la biomasa del picoplancton en los ecosistemas marinos (Morán, 2007).

Entre los organismos pertenecientes al nanoplancton se encuentran flagelados (criptofitas, prasinofitas, crisofitas, coanoflagelados), ciliados, cocolitofóridos, dinoflagelados y diatomeas. Según su modo trófico se clasifican en autótrofos, heterótrofos y principalmente los flagelados, dinoflagelados y ciliados tienen capacidad de modificar su estrategia trófica a mixotrofia. En este grupo podemos encontrar algunos organismos que poseen estructuras de protección y otros una gran fragilidad de sus células, dentro de este último grupo se destacan los flagelados y ciliados que se encuentran en elevadas abundancias y tienen la capacidad de ingerir pequeñas partículas, incluyendo a gran parte del picoplancton lo que lo vuelve un eslabón sustancial en la estructura trófica microbiana y en el reciclaje de nutrientes de los sistemas acuáticos (Caron et al., 1991). La densidad de los flagelados fluctúa entre 100 y  $10^5$  células  $\text{mL}^{-1}$ , esta fluctuación dependerá del estado trófico, la profundidad y estacionalidad del cuerpo de agua (Cuevas et al., 2004).

Uno de los grupos principales que componen el nanoplancton son los Haptófitos, que constituyen una parte importante en la biomasa del nanoplancton, y por lo tanto son importantes agentes en el ciclo de la materia orgánica dentro de la red trófica microbiana oceánica (Jordan & Chamberlain, 1997). Los Haptófitos son importantes en el ciclo global del carbonato a través de la fotosíntesis y la calcificación. Se caracterizan por el haptonema, un

tercer apéndice utilizado para la fijación y la manipulación de alimentos, dos flagelos similares, dos cloroplastos de color marrón dorado y escamas corporales orgánicas que sirven para la identificación de las especies (Eikrem et al., 2017). Las especies presentes en esta división por lo general son biflagelados unicelulares y planctónicos, pero también existen formas palmeloides, coccoides, ameboides y coloniales (Hedges & Kumar, 2009; Sáez et al., 2004). Algunos Haptófitos tienen la capacidad de alimentarse del picoplancton, por ende estos ocupan los nichos ecológicos tanto de productores primarios como de herbívoros (Thomsen et al., 1994).

Debido a la importancia señalada del nanoplancton y su participación en la red trófica se eligió a un nanoflagelado fototrófico no calcificante perteneciente a la división Haptofita, *Imantonia sp.*, este género ha sido descrito y aislado en varias regiones oceánicas como en el Océano Ártico (Reynolds, 1974), Golfo de México y el sur de Tasmania (Lee Chang et al., 2016), en el Océano Pacífico Ecuatorial (Moon-van der Staay et al., 2000), frente Arica, Chile (Rii et al., 2016), en altas latitudes (Backe-Hansen & Thronsen, 2002), aguas templadas (Percopo et al., 2011) y otras más (Balzano et al., 2012; Simon et al., 1994; Vaultot et al., 2004). Es miembro perteneciente de una comunidad típica de la capa de mezcla sobre la ZMO; *Imantonia sp.* fue seleccionada por el lugar y profundidad de la cual fue aislada (ZMO del norte de Chile, 30 m), esta especie interactuaría con diferentes niveles de O<sub>2</sub> y pH presentes en estas zonas lo que permitiría cumplir con algunos de los objetivos planteados en esta tesis.

## 1.2 Rol y distribución del oxígeno en la columna de agua

La mayor parte de la vida en el océano abierto requiere oxígeno (O<sub>2</sub>) para respirar, incluso las plantas marinas y el fitoplancton, que producen O<sub>2</sub>, también lo respiran. El O<sub>2</sub> desempeña un papel fundamental en los ecosistemas marinos, controla la distribución espacial y temporal de casi todos los organismos marinos y a su vez regula los procesos metabólicos y biogeoquímicos. (Breitburg et al., 2018; Gilly et al., 2013; Levin, 2018; Long et al., 2016). El O<sub>2</sub> está directamente relacionado con el carbono a través de la fotosíntesis y la respiración, por lo que su distribución en el océano es un indicador del ritmo de producción, redistribución y descomposición de la materia orgánica en el océano (Keeling, 1988). En consecuencia, el O<sub>2</sub> disuelto es la propiedad más comúnmente medida del agua de mar que es sensible al ciclo

biológico y, por lo tanto, es el primer lugar para buscar cambios en la biogeoquímica del océano en un mundo que se calienta (Keeling et al., 2010).

La distribución del O<sub>2</sub> está relacionada con distintos procesos físicos y bioquímicos los cuales se dan a distintas escalas de variabilidad espacial y temporal, dentro de los procesos bioquímicos que modulan la distribución del O<sub>2</sub> se pueden mencionar a procesos biológicos que aportan O<sub>2</sub>, por ejemplo, la fotosíntesis (Gregg & Rousseaux, 2019) y procesos que remueven el O<sub>2</sub> como la respiración (Kämpf & Chapman, 2016; Maßmig et al., 2020). Los procesos físicos que regulan la concentración de O<sub>2</sub>, destaca la circulación profunda (Ito et al., 2017), esta circulación redistribuye las masas de agua en el océano lo que permite la ventilación de las aguas profundas e intermedias, otros procesos físicos a escalas espacio-temporales menores que modulan la distribución del O<sub>2</sub> son: la solubilidad del gas en el agua de mar, el intercambio gaseoso océano-atmosfera, cambios en la estratificación y en la mezcla de pequeña escala, el bombeo de Ekman, la surgencia, la advección por corrientes marinas regionales y procesos de sub y meso escala como remolinos oceánicos (Callbeck et al., 2018; Pizarro-Koch et al., 2019).

Debido a que el océano se está desoxigenando a causa del calentamiento global, hay zonas que se estarían intensificando, pero por sobre todo expandiéndose en términos de área y volumen (Stramma et al., 2009). Es por ello que Levin (2018) enfatiza en la necesidad de realizar estudios de alta resolución sobre la circulación y la biogeoquímica de las zonas de mínimo oxígeno (ZMOs), en particular dentro de las zonas subóxicas, lo que ayudaría a informar las tendencias y retroalimentaciones globales del O<sub>2</sub>.

### 1.3 Formación y distribución de las ZMOs

En algunas áreas del océano abierto, por debajo de la zona eufótica se generan zonas de baja concentración de O<sub>2</sub> presentes a profundidades medias en la columna de agua. En estas zonas, el O<sub>2</sub> desciende a valores muy bajos y luego vuelve a subir a medida que aumenta la profundidad; estas zonas se denominan zonas de mínimo oxígeno (ZMO) (Keeling et al., 2010; Paulmier & Ruiz-Pino, 2009b; Stramma et al., 2010), caracterizadas por una estructura vertical común, con la presencia de la oxiclina en el límite superior, donde se desarrolla un gradiente de O<sub>2</sub> fuerte; el núcleo, con una deficiencia de O<sub>2</sub> muy alta; y un gradiente bajo de



O<sub>2</sub>, siendo la capa límite inferior de la ZMO (Paulmier & Ruiz-Pino, 2009a). Según los diferentes rangos de concentración de O<sub>2</sub> en el océano se puede clasificar en: óxico (O<sub>2</sub> > 90 μM), disoxia (O<sub>2</sub> entre 20 – 90 μM), suboxia (O<sub>2</sub> < 20 μM) y anoxia definida con valores de O<sub>2</sub> < 1 μM. (Wright et al., 2012).

Las ZMOs presentan bajas concentraciones de O<sub>2</sub> < 20 μmol kg<sup>-1</sup> (suboxia) y son ricas en nutrientes, comúnmente se observan a profundidades intermedias que van de 100 a 1000 m (Kalvelage et al., 2011; Levin, 2018; Wright et al., 2012). Se presume que estas zonas han sido formadas por una combinación de alta demanda de O<sub>2</sub> durante la remineralización de la materia orgánica, una lenta ventilación de aguas más profundas en esta región y la introducción de masas de agua de bajas latitudes pobres en O<sub>2</sub> (Helly & Levin, 2004; Lavin et al., 2010; Ulloa et al., 2012). Estas zonas contribuyen de forma importante en los ciclos biogeoquímicos globales (Lam & Kuypers, 2011). Se les ha atribuido entre un 30 a un 50% de la pérdida de nitrógeno fijado en el mar, principalmente, a través de los procesos de desnitrificación y oxidación anaeróbica del amonio (i.e. Anammox), que ocurren en condiciones de suboxia y anoxia (Lam et al., 2009).

Las ZMOs permanentes presentan una superficie total de 30,4 millones de km<sup>2</sup> que es aproximadamente un 8% del área oceánica total con un volumen de 10,3 millones de km<sup>3</sup> en los núcleos de las ZMOs (Paulmier et al., 2011; Paulmier & Ruiz-Pino, 2009a). Existen cuatro ZMOs descritas a nivel mundial: la del Pacífico Sur Oriental y Nororiental tropical; el Mar Arábigo, y la que se encuentra en la Bahía de Bengala en el Océano Indico. Además, se han identificado otras tres, en el Pacífico Nororiental Subtropical caracterizada como una ZMO profunda, también como dos ZMO estacionales en el Mar del Oeste de Bering y el Golfo de Alaska (Figura 1.1) pero en la actualidad aún no existe un consenso sobre el umbral exacto de O<sub>2</sub> para definir las ZMOs.

La ZMO que se encuentra en el Pacífico Sur Oriental (PSO), frente a las costas de Perú y a la zona norte de Chile, está asociada al sistema de afloramiento de la corriente de Humbolt, (Fuenzalida et al., 2009; Schneider et al., 2007) que se extiende desde el sur de Chile (~42°S) hasta el Ecuador. Esta ZMO se caracteriza por ser más somera y estratificada, así como también más intensa en términos del contenido de O<sub>2</sub> (<1 μmol kg<sup>-1</sup>m<sup>-1</sup>), encontrando la capa superior de ésta ZMO desde los ~ 5 a 20 m de profundidad (Ganesh et al., 2014; Molina & Farias, 2009; Silva et al., 2009). La misma está asociada a un flujo continuo de O<sub>2</sub> desde la

capa óxica ( $O_2 > 200 \mu\text{mol kg}^{-1}$ ) hasta la capa subóxica ( $O_2 < 20 \mu\text{mol kg}^{-1}$ ) interceptando la capa eufótica inferior. El núcleo de la ZMO frente a las costas del norte de Chile (Arica-Iquique) presenta valores muy bajos de  $O_2$ , llegando incluso a condiciones de anoxia (Ulloa et al., 2012).

Fuenzalida et al. (2009) caracterizaron la extensión horizontal y vertical de la ZMO del PSO, registrando un área de  $9,82 \pm 3,60 \times 10^6 \text{ km}^2$  y un volumen de  $2,18 \pm 0,66 \times 10^6 \text{ km}^3$ , definiendo su límite superior a menos de 50 m de profundidad y el límite inferior aproximadamente a 1000 m y 500 m de profundidad frente a Perú y Chile, respectivamente. Estos autores señalan también que la extensión zonal de esta ZMO disminuye hacia latitudes medias extendiéndose ~3000 km hacia el oeste cerca de los  $15^\circ\text{S}$  y ~25 km a los  $30^\circ\text{S}$ .

La ZMO del PSO posee un rol fundamental en los ciclos biogeoquímicos del nitrógeno (N), carbono (C) y su impacto en los ecosistemas marino. La implicancia del  $O_2$  en el ciclo del N se ha evaluado a través del análisis de los procesos de desnitrificación, reacciones anammox (Anderson et al., 1982; Galán et al., 2009; Rich et al., 2020; Thamdrup et al., 2006) y pérdida de N hacia la atmósfera debido a la producción de  $N_2O$  por la nitrificación realizada por arqueas y bacterias (Arévalo-Martínez et al., 2015; Callbeck et al., 2017; Codispoti et al., 2001; Cornejo & Farías, 2012; Gruber & Galloway, 2008). En términos del ciclo del C, la remineralización de materia orgánica al interior de la ZMO del PSO se ha relacionado con un alto contenido de  $CO_2$  y aguas de bajo pH (pH ~7,5) (Melzner et al., 2013, 2020; Paulmier et al., 2011; Torres et al., 2011).

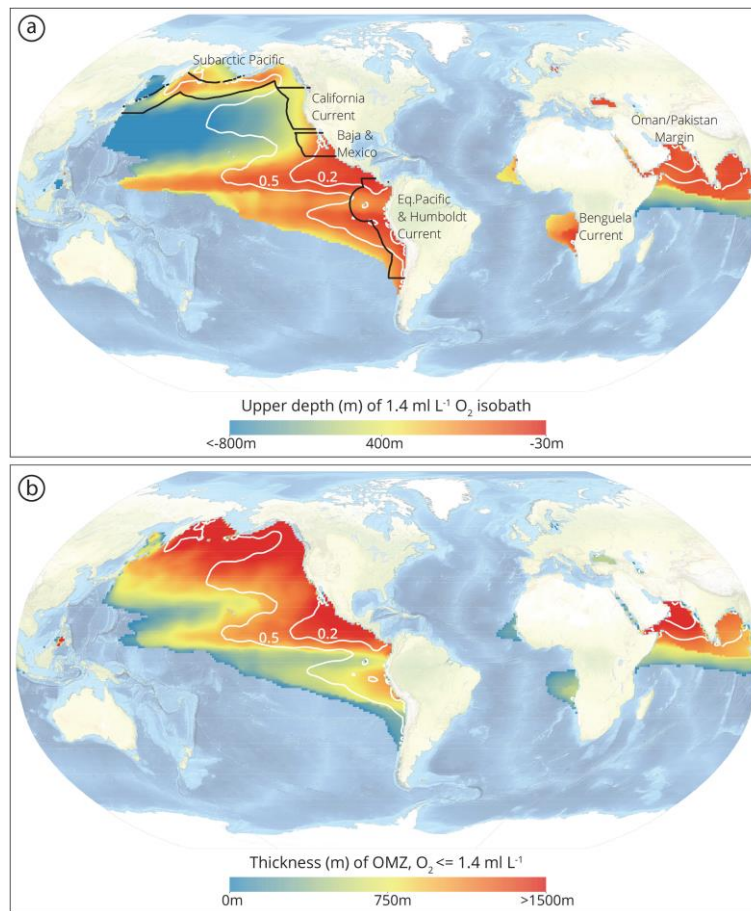


Figura 1.1 Principales Zonas de Mínimo Oxígeno (ZMO) en el mundo. Incluyendo (a) profundidad superior (m) de hipoxia de agua intermedia ( $O_2 < 1,4 \text{ ml L}^{-1}$ ) y (b) espesor (m) de la hipoxia del agua intermedia ( $O_2 < 1,4 \text{ ml L}^{-1}$ ). Extraído de Moffitt et al. (2015)

#### 1.4 El pH y la presión parcial del dióxido de carbono ( $pCO_2$ ) como factores de estrés

Los océanos absorben aproximadamente el  $\sim 25\%$  de las emisiones antropogénicas anuales de  $CO_2$ . Estas emisiones de  $CO_2$  liberado en la atmósfera se disuelve en el agua de mar y reacciona para formar ácido carbónico ( $H_2CO_3$ ), cuya disociación forma iones de hidrógeno y bicarbonato ( $H^+$  y  $HCO_3^-$ ), el aumento de las concentraciones de iones de hidrogeno provoca un cambio en la química del carbonato marino, fenómeno conocido como acidificación de los océanos (AO). Se espera que la AO influya en los procesos metabólicos

del fitoplancton, pero no está claro cómo la combinación de los cambios fisiológicos individuales altera la estructura de todas las comunidades fitoplanctónicas (Bach et al., 2017; Bach, 1979). Los cambios en el sistema de carbonatos marinos podrían alterar la sucesión del fitoplancton porque los grupos taxonómicos que conforman el patrón de sucesión son sensibles de manera diferente a los cambios en la química del carbonato.

Las bajas concentraciones de CO<sub>2</sub> en el agua de mar pueden limitar las actividades fotosintéticas de algunos grupos de fitoplancton marino debido a la baja afinidad de la enzima Ribulosa-1,5 bisfosfato carboxilasa/oxigenasa (Rubisco) por el CO<sub>2</sub> disuelto (Falkowski y Raven, 2007). Como consecuencia, el fitoplancton ha desarrollado mecanismos de concentración de carbono (MCC) para mejorar la disponibilidad de carbono, pero la eficacia de los MCC difiere entre grupos y taxones, en consecuencia, el aumento en las concentraciones de CO<sub>2</sub> con la AO puede tener efectos desproporcionados entre los distintos grupos/especies de fitoplancton (Feng et al., 2021; Li et al., 2019; Mackey et al., 2015).

Las especies de fitoplancton que se benefician de la fertilización por CO<sub>2</sub> pueden llegar a ser más dominantes en las comunidades futuras, mientras que las que no responden al aumento del CO<sub>2</sub> o incluso se ven afectadas negativamente por la disminución del pH podrían perder importancia o ser sustituidas por otras especies (Harvey et al., 2021; Rost et al., 2008). El aumento en la concentración de CO<sub>2</sub> también se ha relacionado con mayores niveles de producción primaria (Schippers et al., 2004), por ejemplo, el cocolitoforido marino *Emiliana huxleyi* respondió al aumento del CO<sub>2</sub> incrementando su volumen celular y la producción primaria (Iglesias Rodríguez et al., 2008); la cianobacteria *Trichodesmium* incrementó la fijación de CO<sub>2</sub> y la fijación de N<sub>2</sub> (Hutchins et al., 2007). Sin embargo, no todos los organismos responden de la misma manera, incluso dentro de la misma familia como *Synechococcus* y *Prochlorococcus*, el primero aumentó su tasa de crecimiento, la tasa fotosintética, el contenido de ficobilina y chl *a* cuando fue incubada en altos niveles de CO<sub>2</sub> y de temperatura (~ 4°C), por el contrario, *Prochlorococcus* solo mostró una respuesta mínima (Fu et al., 2007; Mou et al., 2017). Lomas et al. (2012) señala que es posible que la respuesta de las cianobacterias unicelulares a cambios en el pH y pCO<sub>2</sub> sea indirecta y esté controlada por la respuesta a otras variables, como los nutrientes.

La mayoría de los estudios en base a respuestas de organismos a la acidificación del océano han sido exposiciones cortas a niveles futuros de  $p\text{CO}_2$ ; algunos estudios han examinado si los organismos pueden adaptarse positiva o negativamente a la acidificación en base a sus respuestas plásticas (Stillman & Paganini, 2015). Por ejemplo, en los estudios de evolución experimental de organismos con tiempos de generación cortos (por ejemplo, el fitoplancton), cientos de generaciones de crecimiento en condiciones futuras han dado lugar a diferencias fijas en la expresión de genes relacionados con la regulación ácido-base. Sin embargo, los mecanismos bioquímicos de las respuestas adaptativas a la AO aún no se han caracterizado por completo, y es probable que sean más complejos que los simples cambios en la expresión de los genes o la modificación de las proteínas (Stillman & Paganini, 2015).

### 1.5 Estresores múltiples en los océanos: Calentamiento global, desoxigenación y acidificación de los océanos

El aumento de las temperaturas, la acidificación de los océanos (AO) y la desoxigenación provocarán cambios sustanciales en el entorno físico, químico y biológico, que afectaran a los ciclos biogeoquímicos y a los ecosistemas del océano de un modo que sólo estamos empezando a entender (Gruber, 2011).

El incremento en la temperatura del océano no solo afectará directamente a los organismos y a los ciclos biogeoquímicos, sino que también aumentará la estratificación de la parte superior de los océanos; además el calentamiento genera disminución de la solubilidad de los gases como el  $\text{O}_2$ , e incrementa la estratificación, la respiración y las reacciones bioquímicas presentes (Levin, 2018)), generando una pérdida de  $\text{O}_2$ , fenómeno conocido como “desoxigenación del océano” (Keeling et al., 2010), causando estrés a los organismos que dependan críticamente de niveles suficientes de  $\text{O}_2$ . El océano ha disminuido su concentración de  $\text{O}_2$  desde la era preindustrial en los primeros 500 m de la columna de agua esto conducirá a un posible debilitamiento de la circulación termohalina y por lo tanto de la convección, lo que producirá un mayor agotamiento de  $\text{O}_2$  en las profundidades del océano (Stramma et al., 2009).

El otro problema del cambio climático es la acidificación de los océanos la cual es consecuencia directa de la absorción de grandes cantidades de  $\text{CO}_2$  de origen antropogénico emitido a la atmósfera. El océano se ha encargado de eliminar alrededor del 30 % del total de

estas emisiones de CO<sub>2</sub>. Esta captación aumenta la concentración de CO<sub>2</sub> disuelto en el agua de mar lo que ha generado un descenso de 0,1 unidades de pH desde la época preindustrial. Como parte de estos escenarios de cambio climático, las ZMO también juegan un rol importante para comprender las respuestas fisiológicas que tendrán los organismos que son influenciados por estas aguas que presentan condiciones de bajo pH y bajo O<sub>2</sub>. Aunque las propiedades de las aguas de las ZMO resultan de los procesos de respiración que ocurren a profundidades intermedias, estas regiones siguen acumulando más CO<sub>2</sub> antropogénico (Stramma et al., 2010).

Químicamente, las ZMOs están asociadas con la acidificación (bajo pH ~ 7,5) y a condiciones reducidas que favorecen las especies químicas reducidas (Dore et al., 2009; Paulmier et al., 2006). Además, debido a la naturaleza no lineal del sistema de carbonato, la duplicación aproximada de *p*CO<sub>2</sub> en las aguas superficiales debido a la acidificación del océano afectará en gran medida a las ZMO, ya que aumentará el *p*CO<sub>2</sub> bajo anoxia. De hecho, Brewer & Peltzer, (2009) han estimado que un aumento de 300 ppm en CO<sub>2</sub> atmosférico podría implicar un aumento de *p*CO<sub>2</sub> de alrededor de 2500 µatm a 300-500 m en las regiones ZMO.

La reducción de la ventilación eleva aún más las concentraciones de CO<sub>2</sub> en profundidad, porque la disminución del O<sub>2</sub> va acompañado del CO<sub>2</sub> respiratorio equivalente; como resultado la acidificación de los océanos penetra más rápidamente en las profundidades inferiores. Por lo tanto, intrusiones verticales de aguas de la ZMO hacia la superficie, ya sea a través de “remolinos de mesoescala” o el mismo “proceso de surgencia costera”, podría exponer más frecuentemente a organismos fitoplanctónicos a condiciones de aguas más ácidas y pobres en O<sub>2</sub> (Pizarro et al., 2016).

Las ZMOs parecen estar expandiéndose debido al cambio climático y a la modificación humana de las zonas costeras (Gilly et al., 2013). Los datos de diferentes regiones muestran un sustancial desplazamiento de los límites superiores de la ZMO a lo largo de varios sistemas de corrientes limítrofes orientales, como el Pacífico subártico (Whitney et al., 2007), las regiones ecuatoriales orientales (Stramma et al., 2008) y el Océano Pacífico nororiental (Emerson et al., 2004), observándose incluso un solapamiento con la zona eufótica en la corriente del Perú oriental y el Océano Índico (Fuenzalida et al., 2009). Asociado con el solapamiento de la

ZMO, se observan condiciones de bajo pH/alto  $p\text{CO}_2$  en las aguas subsuperficiales, con valores que alcanzan hasta 1200-1500  $\mu\text{atm}$  (Vargas et al., 2021).

A pesar del efecto de la producción de  $\text{O}_2$  por fotosíntesis, es probable que las aguas más profundas de bajo pH/bajo  $\text{O}_2$  con luz disponible se amplíen a medida que las ZMOs se somericen (Gilly et al., 2013), y algunos procesos fototróficos también pueden verse afectados (por ejemplo, la competencia entre los grupos fototróficos tolerantes a bajo pH/ $\text{O}_2$  frente a los no tolerantes y el cambio de la estructura de la comunidad (Goericke et al., 2000). Desde esta perspectiva, aunque muchas especies se verán afectadas negativamente, otras podrían ampliar su área de distribución o explorar nuevos nichos; por lo tanto, comprender estos nichos y los microorganismos que los habitan es crucial a medida que las ZMOs se expanden progresivamente (Bertagnolli & Stewart, 2018; Gilly et al., 2013). Existen evidencias que sugiere que ciertos organismos fitoplanctónicos podrían contar con ciertos grados de plasticidad fisiológica (e.g. tamaño celular, concentración de clorofila, contenido de ácidos grasos, entre otros) para responder frente al efecto de diferentes estresores (Brennan & Collins, 2015; Collins et al., 2014).

Existe evidencia de que los pulsos de aguas de bajo pH/bajo  $\text{O}_2$  pueden introducirse en los 20 m superiores de profundidad en el norte de Chile (por ejemplo, Lagos et al., 2016). Estas intrusiones verticales episódicas de aguas procedentes de la ZMO causadas por remolinos intra-termoclina y/o procesos de afloramiento a lo largo de la costa (Auger et al., 2021) pueden exponer a los organismos planctónicos costeros con mayor frecuencia a las aguas anóxicas y corrosivas; por lo que las comunidades eucariotas que habitan en las capas óxicas (por ejemplo, diatomeas/flagelados) pueden estar expuestas temporalmente a estos estresores duales (bajo pH y bajo  $\text{O}_2$ ). En efecto, Herrera & Escribano, (2006) demostraron que la profundidad de la ZMO, así como la estratificación de la columna de agua, eran factores clave que regulaban la estructura de la comunidad fitoplanctónica y la distribución vertical de las comunidades fitoplanctónicas costeras del norte de Chile. Sin embargo, lo que determina la distribución vertical de las comunidades de fitoplancton en la oxiclina superior de las ZMOs sigue siendo una pregunta abierta.

Con los antecedentes expuestos surgen las siguientes preguntas:

Ante eventos de cambio climático existe la incertidumbre sobre como la somerización de las ZMO influye en la distribución del pico-nanoplancton, entonces:

- ¿Las condiciones físico-químicas presentes en la oxiclina superior de la ZMO regulan la distribución del pico-nanoplancton?

## 2 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

### 2.1 Hipótesis

H1: Variaciones de pH y O<sub>2</sub> modulan la distribución del pico-nanoplancton autótrofo

H2: Aguas de bajo pH/bajo O<sub>2</sub> típicas de ZMOs representan un estrés fisiológico en fitoplancton adaptado a aguas superficiales oxigenadas.

### 2.2 Objetivo principal

Aportar nuevas evidencias sobre los factores que determinan principalmente la coexistencia y distribución vertical del pico nanoplancton asociado a la ZMO frente al norte de Chile, explorando a través de enfoques de campo como experimentales enfocado en desentrañar como las condiciones de bajo pH/ bajo O<sub>2</sub> podrían afectar conjuntamente la distribución vertical de estos grupos planctónicos.

### 2.3 Objetivos específicos

Objetivo 1. Determinar qué factores físico - químicos están mejor correlacionados con la distribución vertical del pico - nanoplancton asociado a la ZMO del norte de Chile.



Objetivo 2. Desarrollar condiciones experimentales que permitan generar y replicar valores de bajo pH/bajo O<sub>2</sub>, imitando las condiciones presentes en la oxiclina superior de la región de la ZMO del norte de Chile.

Objetivo 3. Determinar experimentalmente la respuesta de *Imantonia sp.* a niveles de bajo pH/bajo O<sub>2</sub>.

### 3 MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 Área de estudio

Los datos de los perfiles hidrográficos, concentración de nutrientes, Clorofila *a* y sistema de carbonatos fueron obtenidos del crucero LowpHOX II, esta información se encuentra publicada en Vargas et al. (2021).

Las muestras fueron colectadas durante una expedición a la ZMO del norte de Chile en febrero del 2018 (Crucero LowpHOX II) a bordo del buque de investigación *Cabo de Hornos*. Este estudio considero tres estaciones de muestreo (T1, T3 y T5) a lo largo de un transecto costero frente a Iquique (20°S) (Figura 3.1). Los perfiles hidrográficos fueron registrados en estas tres estaciones de muestro usando un sistema SeaBird SBE-911 + CTD equipado con dos sensores de temperatura y conductividad, un sensor de oxígeno SBE 43, fluorómetro, sensor de irradiancia cuántica PAR (photosynthetically active radiation) así como también con 24 botellas Niskin de 10 L (General Oceanics, Miami, Florida, FL, USA). Los sensores de temperatura y conductividad se calibraron antes del crucero. Los datos brutos se procesaron siguiendo procedimientos recomendados por el fabricante y se promediaron en intervalo de un decibar (dbar).

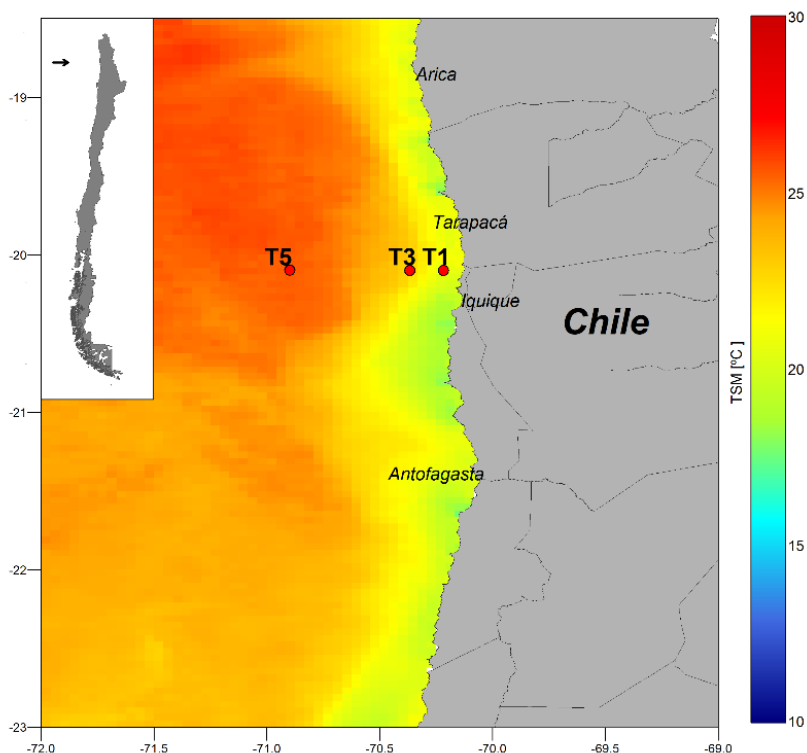


Figura 3.1 Área de estudio durante la expedición LowpHOX II incluyendo las tres estaciones de muestreo (T1, T3 y T5) frente al norte de Chile (20°S), imagen compuesta de la temperatura superficial (°C) del mar MODIS de febrero de 2018.

### 3.2 Análisis físico – químico

Las concentraciones de nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ), nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) y fosfato ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) fueron determinadas a través de muestras de agua de mar colectadas en frascos de polietileno de 15 mL y almacenadas a  $-20^\circ\text{C}$  hasta su posterior análisis. Los análisis fueron realizados utilizando el protocolo World Ocean Circulation Experiment (WOCE) mediante una técnica colorimétrica estándar de flujo segmentado Seal Auto Analyzer (Seal Analytical AA3, Wisconsin, WI, USA). Los límites de detección para  $\text{NO}_3^- + \text{NO}_2^-$  y fosfato ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) fueron  $0,05 \mu\text{M}$  y  $0,02 \mu\text{M}$ , respectivamente.

Las muestras de Clorofila *a* (Chl *a*) se obtuvieron filtrando 250 mL de agua de mar a través de filtros de fibra de vidrio GF/F, los cuales fueron almacenados a  $-20^{\circ}\text{C}$  y en oscuridad hasta su posterior análisis en el laboratorio. Cada una de las muestras fue analizada mediante un fluorómetro (Turner 10 AU Fluorometer), utilizando acetona (90%) para la extracción de los pigmentos de acuerdo con los procedimientos estándar (Parsons et al., 1984).

Las muestras\* para  $\text{pH}_T$  fueron colectadas en jeringas de 50 mL, y su contenido fue transferido inmediatamente a una cubeta termostatzada de 25 mL a  $25,0 \pm 0,1^{\circ}\text{C}$  para su estandarización. Las mediciones se hicieron, con un medidor de pH Metrohm con un electrodo de vidrio de doble unión Ag/AgCl (Metrohm model 6,0258,600) el cual, fue calibrado con una solución tampón Tris ( $\text{pH} = 8,089$ ) como material de referencia certificado (MRC, suministrado por Andrew Dickson, Scripps Institution of Oceanography, San Diego, USA) a  $25^{\circ}\text{C}$ , y reportado en escala total ( $\text{pH}_T$ ). Las muestras para alcalinidad total (AT) fueron envenenadas con 50  $\mu\text{L}$  de solución saturada de  $\text{HgCl}_2$ , almacenadas en frascos BOD de borosilicato de 300 mL con tapones de vidrio esmerilado ligeramente recubiertos con grasa Apiezaon L y mantenidas en la oscuridad a temperatura ambiente. La AT fue determinada utilizando un Titulador de Alcalinidad automatizado modelo AS-ALK2 Apollo SciTech basado en el método de celda abierta (A G Dickson et al., 2007). Todas las muestras fueron analizadas a  $25^{\circ}\text{C}$  ( $\pm 0,1^{\circ}\text{C}$ ) con regulación de temperatura mediante un baño termorregulado. La precisión analítica se controló con respecto a un material de referencia certificado (MRC, suministrado por Andrew Dickson, Scripps Institution of Oceanography, San Diego, USA) y la repetibilidad de la AT fue en promedio 2-3  $\mu\text{mol kg}^{-1}$ . Las muestras para carbono inorgánico disuelto (CID) fueron colectadas en botellas de vidrio Wheaton de 250 mL y preservadas con 50  $\mu\text{L}$  de solución saturada de  $\text{HgCl}_2$ . Inmediatamente después de abrir el frasco de la muestra, se extrajo un pequeño volumen (0,5 mL) con una jeringa digital, se acidificó con ácido fosfórico al 10% y posteriormente se midió el  $\text{CO}_2$  con un analizador de gases por infrarrojo no dispersivo LICOR 6262. Se utilizaron materiales de referencia de agua de mar certificado de A. Dickson para garantizar la calidad de la determinación del CID mediante la preparación de una curva de calibración que cubriera el rango de CID de 200 – 2000  $\mu\text{eq L}^{-1}$ , con una precisión media  $\approx 0.1\%$  (rango 0,05–0,5%). Los datos de temperatura, salinidad, AT y CID se utilizaron para calcular el  $\text{CO}_2$  acuoso ( $\text{CO}_2\text{-aq}$ ),  $p\text{CO}_2$  y el estado de saturación de la Calcita ( $\Omega_{\text{calcita}}$ ). Los análisis se realizaron utilizando el software  $\text{CO}_2\text{SYS}$

para MS Excel (Pierrot et al., 2006), ajustado con las constantes de solubilidad de Mehbach (Mehrbach et al., 1973) reajustadas por Dickson & Miller (Dickson & Millero, 1987). La constante de equilibrio  $\text{KHSO}_4$  determinada por Dickson (Dickson, 1990) se utilizó para todos los cálculos.

\*El análisis de las muestras físico – químicas fueron llevadas a cabo por la Ms. Lorena Arias.

### 3.3 Estimación de la abundancia celular

Para los análisis de comunidades fototróficas se consideró dos clases de tamaños diferentes (Johnson & Sieburth, 1979), el picoplancton que incluye células  $< 2 \mu\text{m}$  (e.g. cianobacterias) y el nanoplancton fototrófico con tamaños entre 2 -20  $\mu\text{m}$ .

#### 3.3.1 Análisis de Citometría de flujo

La abundancia de pico-nano eucariotas fotosintéticos (1-3  $\mu\text{m}$ ) y las, células tipo *Synechococcus* y *Prochlorococcus* en la columna de agua se determinó utilizando el citómetro de flujo InFlux (Becton Dickinson, antes Cytopeia). Los pico + nano eucariotas fotosintéticos se identificaron por su fluorescencia roja (692/40 nm) utilizando un láser azul de 488 nm, las células tipo *Synechococcus* se identificaron por su fluorescencia naranja (530/40 nm) utilizando un láser azul de 488 nm y un láser verde de 532 nm, las células de *Prochlorococcus* se identificaron por su fluorescencia roja (692/40 nm) utilizando una combinación de láseres azules de 457 y 488 nm. Pequeñas poblaciones de células fluorescentes anaranjadas por debajo de la oxiclina pueden corresponder a nuevos linajes de *Prochlorococcus* que fluorescen en el naranja, lo cuales pueden distinguirse por citometría de flujo (Ulloa et al., 2021), pero para simplificar en esta tesis se mantendrá la clasificación tradicional (Marie et al., 2005). Las células no pigmentadas se fijaron con glutaraldehído y se tiñeron con la tinción de ADN SYBR Green I, como se describe en (Marie et al., 1997). Estas células se diferenciaron por la dispersión de la luz (forward angle light scatter, FALS) y detectadas a 530/15 nm utilizando un láser de excitación de 488 nm.

La dispersión de la luz y la fluorescencia se normalizaron añadiendo microesferas fluorescentes Ultra Rainbow de 1  $\mu\text{m}$  de diámetro (Spherotech Inc.) a las muestras. Se corrieron 100  $\mu\text{L}$  para las células autofluorescentes y 75  $\mu\text{L}$  para las células no pigmentadas a un flujo medio de 20  $\mu\text{L min}^{-1}$  y se monitorizaron con un flujómetro líquido (Sensirion US). Los eventos se registraron con el programa Spigot (Cytopenia), y para el análisis de datos se utilizó el programa FlowJo v7,6,1 (Tree Star Inc).

### 3.3.2 Microscopía de Epifluorescencia

Se colectaron muestras de 50 mL de agua de mar para el recuento de nanoflagelados fototróficos (2 - 20  $\mu\text{m}$ ) y se conservaron en glutaraldehído (2,0% p/v en agua de mar pre - filtrada por 0,2  $\mu\text{m}$ ) hasta su análisis. Una vez en el laboratorio, los nanoflagelados se cuantificaron mediante la técnica de la proflavina (Haas, 1982). Para la estimación de la abundancia celular, se filtraron submuestras de 20 mL en un filtro de membrana de policarbonato de 0,8  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro, se tiñeron con proflavina (0,033% p/v en agua destilada) siguiendo a Haas (1982), y se fijaron con glutaraldehído (como en el caso anterior) para su posterior análisis. Los nanoflagelados se contaron con un microscopio invertido OLYMPUS IX-51 equipado con conjunto de filtros UV modelo UMWU2 (ancho de banda 330 a 385 nm) y FITC modelo U-MWB2 (ancho de banda 450 a 480 nm), y los nanoflagelados fototróficos (sigla en inglés PNF) se diferenciaron de los no pigmentados o de las formas heterotróficas (sigla en inglés HNF) por autofluorescencia.

\*Las muestras para la estimación de abundancia celular fueron analizadas por Rosario Diaz y Cristian Venegas.

### 3.4 Experimento de perturbación en condiciones de bajo pH/bajo $\text{O}_2$

Con el fin de explorar la respuesta biológica de una microalga autótrofa habitante de las condiciones de bajo pH/bajo  $\text{O}_2$  presentes en la oxiclina superior del Pacífico Sur - Oriental Tropical (PSOT) en el norte de Chile, realizamos una incubación de laboratorio de 6 días con la haptofita fototrófica *Imantonia sp*\*. (Cepa SEPA721, diámetro medio 3-4  $\mu\text{m}$ ), aislada de la

ZMO de PSOT a 30.483 °S, 72.52 °W, y a una profundidad media de 30 m (<http://sepa.bio.uc.cl/product.asp>).

El experimento se realizó utilizando un sistema semiautomático de microcosmo para la manipulación de la química de carbonatos y O<sub>2</sub> del agua de mar en la Estación de investigación de Biología Marina en Dichato, Chile central (36,5 °S). El diseño experimental consideró la recolección de 60 L de agua de mar superficial (salinidad media 34,6 ups) que fue pre-filtrada suavemente a través de un filtro de carbón activo y posteriormente filtrada a través de unidades de filtración de 1 µm y luego de 0,2 µm. Esta agua de mar se utilizó posteriormente para la preparación del medio de cultivo L1, subdividido en dos contenedores de 30 L (para condiciones control y experimentales). Uno de los contenedores con 30 L de medio L1 (Guillard & Hargraves, 1993) fue manipulado, para el tratamiento “experimental” (bajo pH/bajo O<sub>2</sub>) mediante burbujeo con una mezcla de gases CO<sub>2</sub> (0,14%), O<sub>2</sub> (2,5%), N<sub>2</sub> dando como resultado un pH<sub>T</sub> medio de 7,5 y O<sub>2</sub> de 55,67 ± 0,6 µmol L<sup>-1</sup>, imitando las condiciones de pH y O<sub>2</sub> de la oxiclina superior en la ZMO del norte de Chile (Vargas et al., 2021). Un segundo contenedor con 30 L de medio L1 fue manipulado para conseguir las condiciones del tratamiento “control”, mediante el burbujeo con aire libre de CO<sub>2</sub> (con filtro de cal sodada), resultando en condiciones de pH<sub>T</sub> = 8,0 y concentración de O<sub>2</sub> de 297,3 µmol L<sup>-1</sup> (saturación), imitando las condiciones de pH y O<sub>2</sub> en las aguas superficiales del océano.

El inóculo de *Imantonia sp.* se cultivó y aclimató en un medio L1 preparado con agua de mar natural filtrada (0,22 µm) y pasteurizada simulando la temperatura (15°C) y la intensidad de luz (170 µE m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) de las condiciones control y con un ciclo de luz/oscuridad de 12/12. La luz se midió con un sensor escalar de laboratorio de salida digital PAR (Photosynthetically Available Radiation; 400-700 nm) con un colector de 1,91 cm (3/4”) (Biospherical Instruments, San Diego, CA, USA). Las células se mantuvieron en un cultivo semicontinuo. Durante la aclimatación en niveles bajos de pCO<sub>2</sub>, los valores medios de pH oscilaron entre 8,0 y 8,1, y los niveles de O<sub>2</sub> estuvieron en saturación. Los cultivos se aclimataron a los respectivos valores de pH/pCO<sub>2</sub> y O<sub>2</sub> durante 10 generaciones.

Después de la aclimatación, las células de *Imantonia sp.* se inocularon en botellas de vidrio de borosilicato de 1100 mL esterilizadas en autoclave y llenas del medio L1 tanto para el tratamiento "control" como el "experimental". El montaje experimental incluyó 12 botellas réplicas para cada tratamiento "control" y "experimental" de pH/O<sub>2</sub> (24 frascos en total). Las

botellas se colocaron al azar en un sistema experimental con agua recirculante que se mantuvo a  $15 \pm 1$  °C, y un ciclo de luz/oscuridad de 12/12. La incubación experimental duró 6 días: En los días 1, 3 y 6, se seleccionaron al azar tres botellas de cada tratamiento para monitorizar los niveles de pH y O<sub>2</sub> y estimar la fluorescencia in vivo (unidades de fluorescencia relativa; UFR). Las muestras para las mediciones de pH se recogieron en jeringas de 50 mL, y los valores de pH de cada botella se determinaron como se ha mencionado anteriormente. Las muestras para el análisis CID se conservaron con 50 mL de una solución saturada de cloruro de mercurio (DOE, 1994). Inmediatamente después de abrir la botella de muestra, una jeringa digital extrajo una pequeña cantidad de muestra (0,5 ml), la acidificó con ácido fosfórico al 10% y posteriormente midió el CO<sub>2</sub> evolucionado con un analizador de gases infrarrojo no dispersivo AS-C3 Apollo SciTech, las muestras se recogieron al principio y al final del experimento. La concentración de O<sub>2</sub> disuelto se monitorizó utilizando un sensor óptico FireSting Pro. La fluorescencia se midió utilizando un fluorómetro/turbidímetro manual AquaFluor.

\*La cepa *Imantonia sp.* (SEPA 721) fue aislada por Adriana López Dos Santos y añadida a la colección SEPA, en cooperación con el Dr. Peter von Dassow.

### 3.5 Análisis Estadístico

La matriz de datos de abundancia resultante se transformó mediante el procedimiento  $\log(x+1)$  y se analizó con el software estadístico multivariado Primer V6. Se utilizó el análisis de cluster y el análisis de escalamiento multidimensional no paramétrico (NMDS) para visualizar los patrones de la comunidad de pico-nanoplancton y evaluar la similitud entre las muestras. El análisis de similitudes (ANOSIM) se utilizó para comprobar estadísticamente las diferencias significativas entre dos o más grupos de muestras. Los factores ambientales medidos incluyeron temperatura, salinidad, O<sub>2</sub>, Chl *a*, CID, AT, pH<sub>T</sub>, *p*CO<sub>2</sub>, concentración de nutrientes. Se utilizaron los dos primeros componentes principales para representar la variabilidad ambiental en el estudio. Posteriormente, se realizaron correlaciones de Spearman entre estos dos componentes principales y las medidas biológicas. Los datos experimentales se registraron utilizando tres réplicas ( $n = 3$ ) y los datos se expresaron como media  $\pm$  SD. Los datos se analizaron mediante ANOVA de dos vías y la prueba de comparación múltiple de Tukey. Los valores de  $p < 0,05$  se consideraron estadísticamente significativos.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Capítulo 1. “Influencia de factores físico - químicos en la distribución vertical del pico-nanoplancton en la Zona de Mínimo Oxígeno (ZMO) del norte de Chile: La influencia relativa del bajo pH/bajo O<sub>2</sub>”

Artículo científico enviado a la revista “Marine Environmental Research”

Autores: Edson Piscoya Campos, Peter von Dassow, Montserrat Aldunate y Cristian A. Vargas.

#### Resumen

Evaluamos la influencia relativa de los factores ambientales que podrían controlar la coexistencia y distribución vertical del pico-nanoplancton asociado a la ZMO frente al norte de Chile. Nuestros resultados mostraron que en la capa superior la abundancia de *Synechococcus* fue numéricamente importante en todas las estaciones de muestreo. Los pico-nano eucariotas y los nanoflagelados fototróficos (PNF) también mostraron altas abundancias en la capa superior disminuyendo su abundancia hasta la oxiclina superior, mientras que sólo *Prochlorococcus* mostró altas abundancias bajo la oxiclina y dentro de la capa con bajos niveles de O<sub>2</sub>. Los análisis estadísticos evidenciaron que el O<sub>2</sub>, la temperatura y los parámetros químicos del sistema de carbonatos (pH y carbono inorgánico disuelto, CID) influyeron significativamente en la distribución vertical del pico-nanoplancton fototrófico. Además, evaluamos experimentalmente el efecto combinado de las condiciones de bajo pH/bajo O<sub>2</sub> en una especie de nanoplancton, el haptófito *Imantonia sp.* En condiciones de control (pH= 8,1; O<sub>2</sub>= 287,5 µM, luz = 169,6 µEm<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>), la fluorescencia in vivo de *Imantonia sp.* aumentó más de cincuenta veces, induciendo condiciones de sobresaturación de O<sub>2</sub> (900 µM) y un pH alto (8,5), mientras que en un tratamiento experimental que imita las condiciones de la ZMO (pH = 7,5; O<sub>2</sub> = 55,6 µM; luz = 169,6 µEm<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>), la fluorescencia in vivo disminuyó drásticamente, lo que sugiere que *Imantonia sp.* no sobrevivió. Aunque son resultados preliminares, nuestro estudio aporta pruebas sobre el papel de las condiciones de bajo pH/bajo O<sub>2</sub> en la distribución



vertical del nanofitoplancton, que merecen atención en el futuro mediante trabajos de campo y experimentos de laboratorio de mayor duración.

---

**Fwd: Submission to Marine Environmental Research - manuscript number**

1 mensaje

**Cristian Vargas** <crvargas@udec.cl>

17 de enero de 2022, 13:24

Para: EDSON PISCOYA CAMPOS <edpiscoya20@gmail.com>

Cc: Montserrat Aldunate <montserrat.aldunate@imo-chile.cl>, Peter von Dassow <pvondassow@bio.puc.cl>

**De:** Marine Environmental Research <em@editorialmanager.com>

**Fecha:** 17 de enero de 2022, 12:56:05 CLST

**Para:** "C. Vargas" <crvargas@udec.cl>

**Asunto:** Submission to Marine Environmental Research - manuscript number

**Responder-Para:** Marine Environmental Research <support@elsevier.com>

\*This is an automated message.\*

Manuscript Number: MERE-D-22-00023

Physical-chemical factors influencing the vertical distribution of phototrophic pico-nanoplankton in the Oxygen Minimum Zone (OMZ) off Northern Chile: The relative influence of low pH/low O<sub>2</sub> conditions

Dear Dr. Vargas,

Your above referenced submission has been assigned a manuscript number: MERE-D-22-00023.

To track the status of your manuscript, please log in as an author at <https://www.editorialmanager.com/mere/>, and navigate to the "Submissions Being Processed" folder.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,  
Marine Environmental Research

More information and support

You will find information relevant for you as an author on Elsevier's Author Hub: <https://www.elsevier.com/authors>

**Physical-chemical factors influencing the vertical distribution of phototrophic pico-nanoplankton in the Oxygen Minimum Zone (OMZ) off Northern Chile: The relative influence of low pH/low O<sub>2</sub> conditions**

Edson Piscoya<sup>a,b,c</sup>, Peter von Dassow<sup>b,d,e</sup>, Montserrat Aldunate<sup>b,c</sup> & Cristian A. Vargas<sup>b,c,f,\*</sup>

<sup>a</sup>Graduate Program in Oceanography, Department of Oceanography, Universidad de Concepción, Casilla 160-C, Concepcion, Chile.

<sup>b</sup>Millennium Institute of Oceanography (IMO), Concepción, Chile

<sup>c</sup>Coastal Ecosystems & Global Environmental Change Lab (ECCALab), Department of Aquatic Systems, Faculty of Environmental Sciences, Universidad de Concepción, Concepcion, Chile

<sup>d</sup>Department of Ecology, P. Universidad Católica de Chile, Alameda 340, Santiago, Chile

<sup>e</sup>Research Fellow, Stazione Zoologica Anton Dohrn Napoli, Naples, Italy

<sup>f</sup>Coastal Socio-ecological Millennium Institute (SECOS), P. Universidad Católica de Chile, Chile

\*Corresponding author: [crvargas@udec.cl](mailto:crvargas@udec.cl)

**Abstract.** We evaluated the relative influence of environmental factors that might control the coexistence and vertical distribution of pico-nanoplankton associated with the OMZ off northern Chile. Our results showed that in the upper layer *Synechococcus*-like cells were numerically important at all sampling stations. Pico-nano eukaryotes and phototrophic nanoflagellates (PNF) also showed high abundances in the upper layer decreasing in abundance down to the upper oxycline, while only *Prochlorococcus* showed high abundances under oxycline and within the oxygen-depleted layer. Statistical analyses evidenced that oxygen, temperature, and carbonate chemistry parameters (pH and dissolved inorganic carbon, DIC) influenced significantly the vertical distribution of phototrophic pico-nanoplankton. Additionally, we experimentally-evaluated the combined effect of low pH/low O<sub>2</sub> conditions on a nanophytoplankton species, the haptophyte *Imantonia sp.* Under control conditions (pH= 8.1; O<sub>2</sub>= 287.5 μM, light = 169.6 μEm<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>), *Imantonia sp. in vivo* fluorescence increased over fifty times, inducing supersaturated O<sub>2</sub> conditions (900 μM) and an increasing pH (8.5), whereas upon an experimental treatment mimicking OMZ conditions (pH = 7.5; O<sub>2</sub> = 55.6 μM; light = 169.6 μEm<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>), *in vivo* fluorescence declined dramatically, suggesting that *Imantonia sp.* did not survive. Although preliminary, our study provides evidence about the role of low pH/low O<sub>2</sub> conditions on the vertical distribution of nanophytoplankton, which deserve future attention through both field work and more extended experimental experiences.

Keywords: Pico-nanoplankton, OMZ, microcosm, *Imantonia sp.*, ocean acidification, deoxygenation.

## 1. Introduction

In oceanic environments, dissolved oxygen (O<sub>2</sub>) plays a major role shaping, structuring, and defining the spatial and temporal distribution of marine organisms (Gilly et al., 2013), and regulates metabolic and biogeochemical processes (Long et al., 2016). Some regions of the open ocean present a combination of high O<sub>2</sub> consumption by remineralization of organic matter and a weak oceanic ventilation (Karstensen et al., 2008; Levin, 2003), allowing the formation of steady-state O<sub>2</sub> deficient intermediate layers, a.k.a. Oxygen Minimum Zones (Stramma et al., 2010; Wyrki, 1962). OMZs are characterized by presenting conditions where the O<sub>2</sub> concentration can fall to values below 22- $\mu\text{mol kg}^{-1}$  and these areas are commonly observed at intermediate depths ranging from 100 – 1000 m (Levin, 2018). From microbes to marine mammals, either directly or indirectly, the O<sub>2</sub> concentration plays a major role in the spatial and temporal distribution of marine life, structuring the different marine ecosystems (Díaz & Rosenberg, 2008; Gilly et al., 2013). Indeed, OMZs represent an important physical-chemical boundary for the vertical distribution of many marine species (Levin, 2003). However, some marine organisms, such as crustaceans, cephalopods, and fishes, have evolved biochemical, physiological and behavioral adaptations to tolerate low O<sub>2</sub> conditions (Childress & Seibel, 1998; Tobler, 2015). Components of microbial communities in many OMZs use alternative electron acceptors rather than O<sub>2</sub> for respiration (Bertagnolli & Stewart, 2018; Lam & Kuypers, 2011; Ulloa et al., 2012), so OMZs have been considered as analogues of the primitive anoxic ocean in which life was widely thought to have appeared (Canfield, 2014; Paulmier & Ruiz-Pino, 2009).

OMZs appear to be expanding and shoaling due to global change and human modification of coastal zones (Gilly et al., 2013). Data from different regions shows a substantial shoaling of the upper OMZ boundaries along several eastern boundary-current systems such as the Subarctic Pacific (Whitney et al., 2007), eastern equatorial regions (Stramma et al., 2008) and northeast Pacific Ocean (Emerson et al., 2004), and even overlapping with the euphotic zone in the eastern Peru Current and Indian Ocean (Fuenzalida et al., 2009). Associated with the OMZ shoaling, low pH/high  $p\text{CO}_2$  conditions are observed in sub-surface waters, with values reaching up to 1200-1500  $\mu\text{atm}$  (Vargas et al., 2021). Despite the effect of O<sub>2</sub> production by photosynthesis, deeper low pH/low-O<sub>2</sub> waters with available light will likely expand as OMZs shoal (Gilly et al., 2013), and some phototrophic

processes may also be affected (e.g. competition between low pH/O<sub>2</sub>-tolerant vs. non-tolerant phototrophic groups and changing community structure; (Goericke et al., 2000)). From this perspective, although many species will be negatively affected, others could expand their range or explore new niches; therefore, understanding these niches and the microorganisms that inhabit them is crucial as OMZs are expanding progressively (Bertagnolli & Stewart, 2018; Gilly et al., 2013).

One of the geographic areas of the world's ocean most sensitive to such drivers is the OMZs at the eastern tropical south Pacific (ETSP) off Northern Chile and Peru. This OMZ is also one of the shallowest OMZs in the world (Paulmier & Ruiz-Pino, 2009), as well as exhibiting a permanent anoxic core with O<sub>2</sub> concentration < 2 nM O<sub>2</sub> off the coast of northern Chile (Revsbech et al. 2009; Paulmier et al., 2011; Ulloa et al., 2012; Ulloa & Pantoja, 2009). The diversity of protists and eukaryotic cells > 1.6 μm peaks in the Chl-*a* maximum, but declines by only ca. 50% in the OMZ, implying a relatively high diversity in low pH/low O<sub>2</sub> waters (Parris et al. 2014). Moreover, in some occasions a secondary-Chl maximum develops in low pH/low O<sub>2</sub> waters and is dominated by novel lineages of the autotrophic cyanobacteria *Prochlorococcus* (Lavin et al., 2010; Ulloa et al., 2021), while phototrophic picoeukaryotes appear to be excluded, suggesting some phytoplankton may not tolerate low O<sub>2</sub> (Aldunate et al., 2020).

Additionally, there is some evidence that pulses of low pH/low O<sub>2</sub> waters can intrude in the upper 20 m depths in northern Chile (e.g. Lagos et al., 2016). These episodic vertical intrusions of OMZ waters caused by intra-thermocline eddies and/or upwelling processes along the coast (Auger et al., 2021) may expose coastal planktonic organisms more frequently to anoxic and corrosive waters; so eukaryotic communities inhabiting oxic layers (e.g. diatoms/flagellates) can be temporarily exposed to these dual stressors (low pH and low O<sub>2</sub>). Indeed, Herrera & Escribano (2006) demonstrated that the OMZ depth, as well as water column stratification were key factors regulating the phytoplankton community structure and vertical distribution of coastal phytoplankton communities off northern Chile. Nevertheless, what determines the vertical distribution of phytoplankton communities in the upper oxycline of OMZs regions remains as an open question.

The present study investigates the possible role of O<sub>2</sub> and pCO<sub>2</sub>/pH gradients in determining the coexistence and vertical distribution of pico- and nanoplankton associated with OMZs, exploring both through field and experimental approaches. Our field campaigns were complemented with a laboratory experiment mimicking the low pH/low O<sub>2</sub> condition present at the upper oxycline in the OMZ region of the ETSP off northern Chile, aiming to evaluate how such conditions can impact an isolated strain of the phototrophic nanoflagellates community, the haptophyte *Imantonia sp.* isolated from the upper oxycline of this ETSP region.

## **2. Methods**

### **2.1. Study area**

Samples were collected during an expedition to the ETSP off northern Chile during February 2018 (cruise LowpHOX 2) onboard the R/V *Cabo de Hornos*. The study considered three sampling stations (T1, T3 and T5) along an inshore-offshore transect off Iquique (20°S) (Fig 1). Hydrographic profiles were recorded in these three sampling stations by using a SeaBird SBE-911 + CTD system equipped with two temperature and conductivity sensor, a SBE 43 oxygen sensor, fluorometer, and a quantum irradiance PAR (photosynthetically active radiation) sensor (Biospherical Instruments Inc.) as well as 24 – 10 L Niskin Bottles (General Oceanics, Miami, Florida, FL, USA). Temperature and conductivity sensors were pre-cruise calibrated. The raw data were processed following the recommended procedures provided by the manufacturer and were averaged into one dbar bins.

### **2.2. Physical-Chemical Analyses**

Nitrate (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>), Nitrite (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>), and phosphate (PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>) concentrations were determined from seawater samples collected in 15 mL polyethylene flasks and stored at -20 °C until further analysis. Analyses were conducted using the World Ocean Circulation Experiment (WOCE) protocol by using a standard colorimetric technique in a segmented flow Seal Auto Analyzer (Seal Analytical AA3, Wisconsin, WI, USA). Analytical detection limits to NO<sub>3</sub><sup>-</sup> + NO<sub>2</sub><sup>-</sup> and PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> were 0.05 μM and 0.02 μM, respectively.

Seawater samples (250 mL) for analyses of Chlorophyll-*a* were collected, immediately filtered on board through GF/F glass fiber filters (total Chl *a* concentration), and then, stored at -20°C in the dark until further analysis in the laboratory by fluorometry, using acetone (90%) for the pigment extraction (Turner 10 AU Fluorometer) according to standard procedures (Parsons et al., 1984).

Samples for pH<sub>T</sub> were collected in 50 mL syringes and immediately transferred to a 25 mL thermostatted cell at 25.0 ± 0.1 °C for standardization, with a pH meter Metrohm using a glass combined double junction Ag/AgCl electrode (Metrohm model 6.0258.600), which was calibrated with 8.089 Tris buffer solution as a certified reference material (CRM, supplied by Andrew Dickson, Scripps Institution of Oceanography, San Diego, USA) at 25 °C, and reported on the total scale (pH<sub>T</sub>). Samples for total alkalinity (TA) were poisoned with 50 µL of saturated HgCl<sub>2</sub> solution and stored in 300 mL borosilicate BOD bottles with ground-glass stoppers lightly coated with Apiezon L grease and kept in darkness at room temperature. A<sub>T</sub> was determined using an automated Alkalinity Titrator Model AS-ALK2 Apollo SciTech based on the open-cell titration method (Dickson et al., 2007). All samples were analyzed at 25 °C (± 0.1 °C) with temperature regulation using a water-bath. Analytical accuracy was controlled against a certified reference material (CRM, supplied by Andrew Dickson, Scripps Institution of Oceanography, San Diego, USA) and the TA repeatability averaged 2-3 µmol kg<sup>-1</sup>. DIC samples were collected in 250 mL Wheaton® glass bottles and preserved with 50 µL saturated HgCl<sub>2</sub> solution. Immediately after opening the sample bottle, a digital syringe withdrew a small volume (0.5 mL), acidified it with 10% phosphoric acid and subsequently measured the evolved CO<sub>2</sub> with a LICOR 6262 non-dispersive infrared gas analyzer. Certified seawater reference materials from A. Dickson were used to ensure the quality of DIC determination by preparing a calibration curve covering the range of DIC from 200–2000 µeq L<sup>-1</sup>, with a resulting precision averaging ≈ 0.1% (range 0.05–0.5%). Temperature, salinity, A<sub>T</sub>, and DIC data were used to calculate aqueous CO<sub>2</sub> (CO<sub>2</sub>-aq), *p*CO<sub>2</sub>, and Calcite Saturation State ( $\Omega_{\text{calcite}}$ ) Analyses were performed using CO<sub>2</sub>SYS software for MS Excel (Pierrot et al., 2006), set with Mehrbach solubility constants (Mehrbach et al., 1973) refitted by Dickson & Miller (Dickson & Millero, 1987). The KHSO<sub>4</sub> equilibrium constant determined by Dickson (Dickson, 1990) was used for all calculations.

## 2.3. Cell Abundance Estimates

### 2.3.1. Flow cytometric analysis

In our study, the analysis of phototrophic communities considered two different size classes (Sieburth et al., 1978), picoplankton ( $< 2 \mu\text{m}$ ), including Cyanobacteria, and within this group, the abundance and vertical distribution of both *Synechococcus*-like cells (orange fluorescent cells) and *Prochlorococcus* analyzed by flow cytometry, and phototrophic nanoplankton from 2 to 20  $\mu\text{m}$  analyzed by epifluorescence microscopy. In addition, the whole pico + nano-eukaryotes community was also analyzed by flow cytometry.

The abundances of photosynthetic pico-nano eukaryotes (1 – 3  $\mu\text{m}$ ), *Synechococcus*-like and *Prochlorococcus* cells in the water column were determined using a high-performance InFlux flow cytometer (Becton Dickinson, formerly Cytopeia). Photosynthetic pico-nano eukaryotes were identified by their red fluorescence (692/40 nm) using 488 nm blue laser, *Synechococcus*-like cells were identified based on their orange fluorescence (530/40 nm) using 488 nm blue and 532 nm green lasers, and *Prochlorococcus* cells were identified based on their red fluorescence (692/40 nm) using a combination of 457 and 488 nm blue lasers. Small populations of orange fluorescent cells below the oxycline can correspond to novel orange fluorescent *Prochlorococcus* lineages which cannot be distinguished by flow cytometry (Ulloa et al. 2021), but for simplicity the traditional flow cytometric identifications (Marie et al. 2005) are maintained here. Non-Pigmented cells were fixed with glutaraldehyde and stained with the DNA dye SYBR Green I, as described in Marie et al. (1997). These cells were differentiated by light scatter (forward angle light scatter, FALS) and detected at 530/15 nm using a 488-nm excitation laser.

Each cytometer run was calibrated with 1  $\mu\text{m}$  diameter fluorescent Ultra Rainbow beads (Spherotech Inc.). 100  $\mu\text{L}$  for autofluorescent cells and 75  $\mu\text{L}$  for non-pigmented cells were run at an average flow rate of 20  $\mu\text{L min}^{-1}$  and monitored with a liquid flowmeter (Sensirion US). The events were recorded with Spigot software (Cytopeia), and FlowJo software v7.6.1 (Tree Star Inc.) was used for data analysis.



### 2.3.2. Epifluorescence Microscopy

Samples for counting phototrophic nanoflagellates (2 – 20  $\mu\text{m}$ ) were collected (50 mL) and preserved in glutaraldehyde (2.0% w/v in 0.2  $\mu\text{m}$  prefiltered seawater) until analysis. Once at the laboratory, nanoflagellates were quantified by the proflavine technique (Haas 1982). For cell abundance estimates, 20 mL subsamples were filtered on a 0.8  $\mu\text{m}$  polycarbonate membrane filter, stained with proflavine (0.033% w/v in distilled water) following Haas (1982), and fixed with glutaraldehyde (as above) for subsequent analysis. Nanoflagellates were counted with an inverted microscope OLYMPUS IX-51 equipped with UV model UMWU2 (width band pass 330 to 385 nm) and FITC model U-MWB2 (width band pass 450 to 480 nm) filter sets, and phototrophic nanoflagellates (PNF) were differentiated from those non-pigmented or heterotrophic forms (HNF) by autofluorescence.

### 2.4. Short-term perturbation experiment upon low pH/low O<sub>2</sub> conditions

In order to explore the biological response of an autotrophic microalgae inhabitant of the upper oxycline conditions at the ETSP off northern Chile to low pH/low O<sub>2</sub> conditions, we conducted a 6-day laboratory incubation with the phototrophic haptophyte *Imantonia sp.* (Strain SEPA721, mean diameter 3–4  $\mu\text{m}$ ), isolated from the OMZ of the ETSP at 30.483 °S, 72.52 °W, and a mean depth of 30 m <http://sepa.bio.uc.cl/product.asp>).

The experiment was carried out using a semi-automatic microcosm system for seawater carbonate chemistry and oxygen manipulation at the Marine Biology Research Station at Dichato, Central Chile (36.5 °S). The experimental design considered the collection of 60 L of surface seawater (mean salinity 34.6 psu), which was gently pre-filtered through an active carbon filter and subsequently filtered through 1  $\mu\text{m}$  and then, through 0.2  $\mu\text{m}$  filter devices. This seawater was subsequently used for the preparation of culture medium L1, subdivided in two 30-L containers (i.e., control and experimental conditions). The 30-L containers with L1 medium (Guillard & Hargraves, 1993), for the ‘experimental’ treatment (low pH/low O<sub>2</sub>) was manipulated by bubbling with a mix of O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>, and N<sub>2</sub> ( ) gasses resulting in a mean pH<sub>T</sub> of 7.5 and dissolved O<sub>2</sub> at  $55.67 \pm 0.6 \mu\text{mol L}^{-1}$ , mimicking both the pH and O<sub>2</sub> conditions at the upper oxycline at the OMZ off northern Chile (Vargas et al., 2021). A second container with 30-L of L1 medium for the ‘control’ treatment was bubbling with a mix of free-

CO<sub>2</sub> air (with soda lime filters), resulting on a conditions of seawater pH<sub>T</sub> = 8.0 and O<sub>2</sub> concentration of 297.3 μmol L<sup>-1</sup> (saturation), mimicking the pH and O<sub>2</sub> conditions in ocean surface waters.

The inoculum of *Imantonia sp.* was grown and acclimated in a L1 medium prepared with filtered (0.22 μm) and pasteurized natural seawater simulating the temperature (15°C) and light intensity (170 μE m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) of control conditions and with a 12/12 light/dark cycle. Light was measured with a digital output laboratory scalar PAR (Photosynthetically Available Radiation; 400-700 nm) sensor with a 1.91 cm (3/4") collector (Biospherical Instruments, San Diego, CA, USA). Cells were maintained using a semi-continuous culture. During the acclimation under low pCO<sub>2</sub> levels, mean pH values ranged between 8.0 and 8.1 and oxygen levels on saturation. Cultures were acclimated to the respective pH/ pCO<sub>2</sub> and oxygen values for 10 generations.

After acclimatization, *Imantonia sp.* cells were inoculated in autoclaved 1100 mL borosilicate glass bottles filled with the respective 'control' and 'experimental' L1 medium for each pH/O<sub>2</sub> treatment. The experimental setup included 12 replicate bottles for each 'control' and 'experimental' pH/O<sub>2</sub> treatment (24 bottles in total). Bottles were positioned randomly in a large experimental system with recirculated seawater kept at 15 ± 1 °C, and a 12/12 light/dark cycle. The experimental incubation lasted 6 days: On days 1, 3, and 6, three bottles were randomly selected from each treatment for monitoring the pH and O<sub>2</sub> levels and estimates of *in vivo* fluorescence (relative fluorescence units; RFU). Samples for pH measurements were collected in 50 mL syringes, and pH values for each bottle were determined as previously mentioned. Samples for DIC analysis were preserved with 50 mL of a saturated solution of mercuric chloride (DOE, 1994). Immediately after opening the sample bottle, a digital syringe withdrew a small amount of sample (0.5 ml), acidified it with 10% phosphoric acid and subsequently measured the evolved CO<sub>2</sub> with a AS-C3 Apollo SciTech non-dispersive infrared gas analyzer, the samples were collected at the beginning and end of the experiment. Dissolved oxygen concentration was monitored by using an optical sensor FireSting Pro. Fluorescence was measured by using a handheld fluorometer/turbidimeter *AquaFluor*.

## 2.5. Statistical analyses

The resulting abundance data matrix was transformed using the log (x+1) procedure and analyzed with the multivariate statistical software Primer V6. Cluster analysis and nonparametric multidimensional scaling analysis (NMDS) were used to visualize the picoplankton community patterns and assess the similarity among samples. Analysis of similarities (ANOSIM) was used to statistically test for significant differences between two or more groups of samples. The measured environmental factors included temperature, salinity, O<sub>2</sub>, Chl *a*, DIC, TA, pH<sub>T</sub>, pCO<sub>2</sub>, nutrient concentration. We used the first two principal components to represent environmental variability in the study. Subsequently, Spearman correlations between these two principal components and biological measurements. The experimental data were recorded using three replicates (n = 3) and data were expressed as mean ± SD. Data were analyzed using two-way ANOVA and Tukey's multiple comparison test. *p* values < 0.05 were considered as statistically significant.

## 3. Results

### 3.1. Physical-chemical conditions in the water column

Water-column vertical profiles for temperature, salinity, dissolved oxygen, nutrients, and the carbonate system are shown in Fig. 2. The vertical profiles showed higher thermal and haline stratification of the water column in the open ocean stations (T3 and T5) compared to the coastal station (T1). Water-column temperature ranged from 7.8 to 24.6 °C and salinity between 34.6 and 35.3 psu with a clear thermocline and halocline at station T5 between 15 and 25 m depth. A cluster analysis separated the water column in two different environments, one located between the surface and 50 m deep, and then a large group of stations and depth layers below 50 m deep (below the upper oxycline) (Fig. 3). Surface dissolved oxygen ranged from 92.09 up to 286.08 μmol kg<sup>-1</sup>, with an upper oxycline at 25 m deep, where O<sub>2</sub> concentrations declined to below 5 μmol.kg<sup>-1</sup> at a mean depth of 50 m deep offshore (T3 and T5= 0.36 and 2.35 μmol kg<sup>-1</sup>), and at around 25 m deep inshore (T1= 0.47 μmol kg<sup>-1</sup>). PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> and NO<sub>3</sub><sup>-</sup> concentration ranged from 0.90 - 3.08 μmol kg<sup>-1</sup>, and 0.002 - 38.639 μmol kg<sup>-1</sup>, respectively, with similar vertical distributions among stations. The nitracline, defined as the first depth where the NO<sub>3</sub><sup>-</sup> concentration exceeded 0.5 μmol L<sup>-1</sup>, was located at 25 m deep at T3 and T5.

Then,  $\text{NO}_3^-$  maximum concentration was observed at 500 m deep (Fig. 2b). On the other hand,  $\text{NO}_2^-$  concentrations ( $> 0.5 \mu\text{mol kg}^{-1}$ ) peaked below the oxycline, supporting the presence of a core of anoxic waters between 100 and 250.

Analysis of the carbonate system in the water column (Fig. 2c) showed that surface  $\text{pH}_T$  ranged from 7.836 to 8.098, with the lowest surface  $\text{pH}_T$  associated with the coastal station T1. Consequently, the highest DIC concentration and  $p\text{CO}_2$  was observed in this coastal station ( $2184.5 \mu\text{mol kg}^{-1}$  and  $699.49 \mu\text{atm}$ , respectively). A large vertical heterogeneity in carbonate system parameters was observed in all three stations. Nevertheless, in all cases pH was low ( $\leq 7.9$ ), while DIC and  $p\text{CO}_2$  were high ( $> 2100 \mu\text{mol kg}^{-1}$  and  $> 600 \mu\text{atm}$ ) below the oxycline. The highest  $p\text{CO}_2$  ( $1146.26 \mu\text{atm}$ ) and DIC values ( $2250.7 \mu\text{mol kg}^{-1}$ ) were seen at the coastal site T1 at around 100 m deep (Table 1).

### 3.2. Phytoplankton composition and distribution

Chlorophyll ranged from  $0.03 - 11.73 \mu\text{g. L}^{-1}$ , and Chl *a* maximum were observed at 10 m deep in station T1, and at 25 m in both stations T3 and T5 (Fig. 4a). Within the cyanobacteria community, *Synechococcus*-like cells showed the highest abundance at the upper 25 m deep, and with maximum abundance at station T3 ( $315\,660 \text{ cell. mL}^{-1}$ ). In contrast, *Prochlorococcus* showed a vertical distribution associated with deeper waters, with an abundance peak at 50 m deep, especially at station T5 ( $97\,600 \text{ cell. mL}^{-1}$ ) (Fig. 4b). Pico-nano eukaryotes represented 4.7% of the total abundance of all phytoplankton groups, with highest abundance at surface waters of stations T1 and T3 ( $8\,389 - 21\,585 \text{ cells. mL}^{-1}$ , respectively), and a subsurface peak at 25 m depth at station T5 ( $25\,000 \text{ cells. mL}^{-1}$ ). Phototrophic nanoflagellates (PNF) were restricted to the oxygenated surface waters, with the highest abundance at station T1 ( $3\,671 \text{ cell. mL}^{-1}$ ), which was decreasing from the coast to offshore waters (T5; Fig.4c). The difference in cell abundance between pico+nano eukaryote analyzed by flow cytometry and the PNF abundance estimated by epifluorescence microscopy also suggests that pico-eukaryotes were more abundant than nano-eukaryotes in the upper 25 m depth layer. Non-pigmented cells were excluded from the analysis.

NMDS (stress: 0.03) analysis based on abundance patterns suggested the presence of two levels separated by the oxycline; this grouping was supported by cluster analysis (Supplementary Figure 1). Analysis of similarity (ANOSIM) test grouping samples from all

stations and separating them by oxycline revealed significant differences between samples above and below the oxycline, although with some overlap (R: 0.22;  $p$  value: 0.044). On the other hand, when samples were separated by station, ANOSIM also showed significant differences (R: 0.758,  $p$  value: 0.001).

### **3.3. Physical-chemical forcing and phytoplankton community properties**

#### **3.3.1. Relationships between phytoplankton and environmental factors**

The PCA performed on our environmental dataset yielded two principal components that jointly explained 73.3% of the total variance (Table 2). The first principal component (PC1) explained 57.4 % of the total environmental variability, which, given the non-significant differences among sampling stations, can be allocated to variability throughout the water column. PC1 accounted mostly for variability induced mostly by temperature, O<sub>2</sub> and carbonate chemistry (DIC, TA, pH) (Weights > 0.3, Table 2). PC1 was characterized by large positive coefficients assigned to temperature, oxygen and pH evidently associated with upper warm, well-oxygenated, and high pH waters. The second principal component accounted for 15.9% of total vertical distribution variability, and mostly associated to a balance between salinity, pH and nutrient conditions, with a large, positive coefficient assigned to pH and NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, and large negative coefficients assigned to salinity,  $p$ CO<sub>2</sub> and NO<sub>2</sub><sup>-</sup>. The results for this component also reflect the conditions for the upper layers, characterized by lower salinity,  $p$ CO<sub>2</sub> and NO<sub>2</sub><sup>-</sup>. PCA scores corresponding to PC1 and PC2 produced an ordination of environmental data that separated environmental variables according with conditions throughout the water column, such as pH<sub>T</sub> and O<sub>2</sub> variability reflecting oxycline conditions (PC1), and  $p$ CO<sub>2</sub>, and NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, reflecting environmental conditions at the core of the OMZ (PC2).

Since there were no significant differences among sampling stations, Spearman correlation analyses between water column variability (PC1 and PC2) and phototrophic picoplankton groups were conducted for the whole dataset (Table 3). Significant positive correlations were found between PC1 and almost all studied groups, with the exception of *Prochlorococcus*. The strong positive correlation evidenced the importance of vertical variability in temperature, pH, and O<sub>2</sub> on the vertical distribution of pico-nano eukaryotes and *Synechococcus*-like cells. The higher positive correlation was found for pico-nano eukaryotes

and *Synechococcus*-like cells ( $r = > 0.8$ ), than for larger phototrophic nanoflagellates (PNF) ( $r = > 0.6$ ). On the contrary, non-significant correlations were found between PC2 and any of the studied groups (Table 3).

### 3.3.2. Response of an autotrophic nanoflagellates to low pH/low O<sub>2</sub> conditions

The manipulation of the oxygen levels and carbonate chemistry in our microcosm was successful, as we were able to mimic the O<sub>2</sub> and pH/pCO<sub>2</sub> conditions occurring at the upper oxycline of the Oxygen Minimum Zone off northern Chile (see Vargas et al., 2021). The ‘control’ condition (high O<sub>2</sub>/high pH), representing the condition in the surface layer, and the ‘experimental’ conditions (low O<sub>2</sub>/low pH) were statistically different (one-way ANOVA  $p > 0.05$ ). O<sub>2</sub> concentrations and pH values rose with growth of *Imantonia sp.* in all control treatment bottles. O<sub>2</sub> rose to 878.7  $\mu\text{mol L}^{-1}$  ( $\pm 64.7$ ) and pH rose above 8.5 ( $\pm 0.051$ ) suggesting the influence of biological activity/photosynthesis in the ‘control’ treatment. Indeed, upon ‘control’ conditions the studied strain showed a significant increase in fluorescence values (RFU =  $26.02 \pm 0.83$ ) to 50 times more than the fluorescence at T<sub>0</sub> (RFU =  $0.48 \pm 0.01$ ). In contrast, in the ‘experimental’ condition of low O<sub>2</sub>/low pH, *Imantonia sp.* did not grow and fluorescence was maintained at extremely low levels during the whole 144 hours of incubation, which also suggests that *Imantonia sp.* was not able to survive and photosynthesize at low O<sub>2</sub>/low pH conditions (Fig.6).

## 4. Discussion

Phytoplankton communities respond to a large number of biological, physical and chemical factors that can vary both with time and space (Herrera & Escibano, 2006). We present here an assessment of phototrophic pico-nanoplankton groups at vertical and horizontal scales along a 500-m deep transect in the OMZ off northern Chile. Similar to those found by other authors (Aldunate et al., 2018; De la Iglesia et al., 2020; Morales et al., 1996), we have identified some key physical-chemical variables which were significantly correlated with the vertical distribution and abundance of pico-nanoplankton associated with the upper layers of this area. Moreover, some of those variables have been identified as those more affected by anthropogenic climate change, specifically deoxygenation and ocean acidification

(Caldeira & Wickett 2003; Keeling et al., 2010). Thus, changes in the structure of the phytoplankton community, added to the variability of physical-chemical factors, are factors that could be influenced by climate change, knowledge of which is key to understanding how marine environments will be altered. Indeed, the characterization of environmental conditions and carbonate chemistry in OMZs and the vertical distribution of photosynthetic prokaryotes and eukaryotes are essential for predicting the potential impact of OMZ expansion on ocean productivity and the carbon pump (Weber & Bianchi 2020).

The coastal zone of northern Chile is characterized by the presence of a shallow OMZ (Escribano et al., 2004, Morales et al., 1999), which has been identified previously at depths ranging from 50 to 300 m (Ulloa et al., 2001). Previous studies in this area have already shown the accumulation of nitrite ( $>0.5 \mu\text{mol kg}^{-1}$ ) in oxygen-free waters between 200 and 300 m depth along the coast (ca. 20–26 °S) (Canfield et al. 2010; Thamdrup et al., 2012), and recently this anoxic core has been characterized by low pH and high  $p\text{CO}_2$  conditions ( $\text{pH} < 7.5$  and  $p\text{CO}_2 > 1200 \mu\text{atm}$ ), which places this OMZ region as one of the most oxygen-deficient and acidic systems worldwide (Vargas et al., 2021). The upper boundary of the oxycline is characterized by having less than 4%  $\text{O}_2$  relative to the surface, as well as being close to the sea surface (5-200 m), so it can intercept the euphotic layer between 60 and 120 m (Paulmier et al., 2006), with implications for primary producers in the euphotic zone.

In our results, surface oxygen fluctuated between  $200 \mu\text{mol kg}^{-1}$  decreasing to less than  $5 \mu\text{mol kg}^{-1}$  through the OMZ core. The oxycline was found between 25 - 50 m, being shallower in the coastal station and deepening in the more oceanic stations. Our results based on a clustering analysis are in agreement with previous expeditions, such as those results described by Ganesh et al. (2014) and Molina & Farías (2009); where they observe that the vertical distribution of phytoplanktonic groups is closely related to the oxycline.

#### **4.1. Relationships Between Environmental Variables and pico-nanoplankton vertical distribution**

In most marine environments, prokaryotes are the basis of the food web, and specifically in OMZs, they support primary productivity both in oxic and anoxic waters (Long et al., 2021). In low oxygen waters we can find different photosynthetic prokaryotes with their

maximum representatives in the picoplanktonic fraction, *Synechococcus* and *Prochlorococcus* (Gérikas Ribeiro et al., 2016; Linacre et al., 2015; Partensky et al., 1999; Partensky & Vaultot, 1999). In our study, the abundances of *Synechococcus*-like cells and *Prochlorococcus* were in the mean range reported for our study area (Medina et al., 2017; Stuart et al., 2004; Ulloa et al., 2021) and other OMZ regions worldwide (Bouman et al., 2006; Buitenhuis et al., 2012; Zwirgmaier et al., 2007). Based on our results we have found that *Synechococcus*-like cells were distributed mostly in surface waters down to the upper oxycline at 50 m depth, and then its abundance decreased dramatically at depths greater than 100 m. *Synechococcus*-like cells were more abundant in our oceanic stations, a characteristic spatial distribution previously reported for this group (Lavin et al., 2010; Pajares et al., 2020; Ahlgren et al., 2006), with high abundances in oxic surface water and lower abundance in areas of low PAR radiation and low pH/low O<sub>2</sub> conditions. This vertical distribution pattern may be explained by the higher light requirements for growth of *Synechococcus* compared to *Prochlorococcus* (Scanlan & West, 2002).

Novel *Prochlorococcus* lineages adapted to low oxygen, low light and high nutrient conditions have been found in the poorly illuminated waters of OMZs (Ulloa et al., 2021), and in our study it was the only group that evidenced a predominance in deeper waters. Moreover, *Prochlorococcus* was also more abundant in the most oceanic stations, where it is worth noting that in station T5 they were recorded from 2 to 100 m, presenting a vertical distribution very different from the other stations. This likely relates to an increase in the abundance of high light lineages of *Prochlorococcus* in surface waters with distance from the coast (Moore et al., 1998), while *Prochlorococcus* is often excluded from coastal surface waters (e.g. Collado et al., 2011).

While the prokaryotic component of picoplankton is dominated by *Prochlorococcus* and *Synechococcus*, the eukaryotic fraction is much more diverse and can represent a larger fraction of the biomass (Vaultot et al., 2008). Our results show the distribution of picoeukaryote ranging from 1 - 3 µm, reached maximum values in the well-oxygenated photic layer (24 400 cell mL<sup>-1</sup>), then decreasing by around ~90 % in the oxycline (290 cell mL<sup>-1</sup>), until disappearing in the OMZ core. According to Parris et al. (2014) the picoeukaryote fraction (0.2 - 1.6 µm) recorded for ETSP is more diverse in the OMZ core, but that diversity was due to non-photosynthetic lineages such as Syndiniales and Radiolaria.



In the water column of the OMZ off northern Chile, vertical physical-chemical gradients were observed, which allowed a differentiation of phytoplanktonic groups along the water column. The distribution of *Synechococcus*-like cells, PNF and picoeukaryote was associated with changes in O<sub>2</sub>, temperature and carbonate system (pH<sub>T</sub>, DIC, TA) and to a lesser extent with salinity, which can suggest that these are important environmental factors controlling the vertical distribution of pico-nanoplankton in this region of the OMZ. In this respect, both temperature and oxygen have been previously described as major drivers of vertical distribution of the picoeukaryote community in the OMZ off central Chile (De la Iglesia et al., 2020), and some studies have highlighted the role of salinity as major driver of spatial and vertical distribution of phytoplankton (e.g. Santander et al., 2003, off Iquique, 20°S). Other relevant factors that could change the structure of the nanoplankton in the same geographic area have been pointed out by Herrera & Escribano (2006). These authors found that the abundance and species composition of phytoplankton was strongly correlated with the depth of the upper boundary layer of the OMZ, which is a main characteristic of the OMZ of northern Chile, as well as the temperature and stratification of the water column. Indeed, well stratified waters are usually considered as a detrimental condition for diatoms, but favorable for swimming small flagellates (Fenchel & Finlay, 2008). Thus, several environmental variables might interact with O<sub>2</sub> and pH in affecting phytoplankton in OMZs.

Some PNFs are characterized by a mixotrophic behavior, and therefore they can also be important bacterivores in food webs. Some field studies have found that in marine and freshwater ecosystems PNF outnumber heterotrophic nanoflagellates (HNF) or non-pigmented cells, and short-term experiments using fluorescently labeled bacteria (FLB) have even demonstrated a greater grazing impact on the bacterial community than HNF (Tsai et al., 2011). PNF, and especially those with a mixotrophic behavior, can also survive in different environments by resorting to bacterivory in conditions of low light, dissolved nutrient concentration and photosynthesis when prey concentration is low (Unrein et al., 2007). Moreover, some PNF can be important grazers of *Synechococcus* in marine environments (Safi et al., 1999; Tsai et al., 2007). However, Cuevas and Morales (2006) observed that PNF decreased faster than HNFs in the oxycline. Additionally, Tsai et al. (2021) reported results from incubation experiments showing that the grazing rates of nanoflagellates on *Synechococcus* were significantly lower in enriched treatments and that nanoflagellates did not

increase their grazing rate due to higher abundance and growth rates of *Synechococcus*. Thus, there is likely to be vertical variability in the types of protistan grazer as well as their impacts, which may differentially affect pico-phytoeukaryotes, *Synechococcus*, and *Prochlorococcus*. Likewise, changes in OMZ depth may allow vertical changes in species habitat (Ulloa et al., 2001). These factors could result in a variable top down control of vertical changes in phytoplankton community composition.

Alternatively, upwelling from the OMZ to the photic zone at the coast may affect the chemical environment (redox conditions) in which nutrients are recycled and utilized by phytoplankton species. In the coastal upwelling zone of northern Chile, oxygen-poor waters favor the denitrification process and thus the presence of ammonium rather than nitrate, whereas well-oxygenated conditions may favor nitrification and thus the predominance of oxidized forms of nitrogen (nitrate and nitrite) (Escribano et al., 2004; Medina Faull et al., 2020). It has been suggested that different forms of nitrogen may induce changes in species composition due to specific requirements (Chisholm, 1992). Therefore, the OMZ depth may also affect the phototrophic pico-nanoplankton community indirectly by modifying the nutrient field.

#### **4.2. Can low pH/low O<sub>2</sub> conditions directly influence the vertical distribution of phytoplankton?**

There have been few studies investigating the interaction between low oxygen concentration and other stressors associated with global ocean changes focusing on primary producers. Gao et al. (2019) conducted a review on the poor documentation of deoxygenation in primary producers where he points out what the effects could be and notes that theoretically high CO<sub>2</sub> levels and decreased O<sub>2</sub> concentration could selectively enhance carboxylation versus oxygenation catalyzed by ribulos-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase and thus benefit autotrophs. These authors also mention that from all the oxygen-consuming reactions, only the Mehler reaction and glycolate oxidase present in algae and cyanobacteria have a high enough K<sub>O,5</sub> O<sub>2</sub> to be affected by oxygen concentrations near the air equilibrium. Other previous experiments exposing non-calcifying phytoplankton to low pH conditions have evidenced contrasting results (Hinga, 2002; Berge et al., 2010). Nevertheless, some studies have evidenced that low pH conditions ( $\geq 7.7$ ) can impair dramatically the growth rates, fatty

acid composition, cellular abundance, lipid concentration and chlorophyll content mainly of different phytoplankton (Jacob et al., 2017; Wang et al., 2017). Some of the variability among experimental results suggest unresolved species- or population-specific responses, or could be related to methods for manipulating pH and the carbonate system in the laboratory (Berge et al., 2010). With respect to this last concern, in our study, by bubbling a mix of O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>, and N<sub>2</sub> gasses, we reduced the O<sub>2</sub> concentration, leading to an increase in DIC, while alkalinity is kept constant and pH decreases, accurately mimicking OMZ conditions.

The results of this proof-of-concept experiment indicated a strong negative impact of low pH/low O<sub>2</sub> conditions on the phototrophic haptophyte *Imantonia sp.*, a strain which was isolated from surface waters overlying the Northern Chilean OMZ waters. This strain did not survive and photosynthesize under such conditions. These results demonstrate that further such experiments could be fruitful for understanding the impact of low pH/low O<sub>2</sub> conditions on phytoplankton.

## **5. Conclusions**

The observed relationship of phototrophic pico-nanoplankton assemblages with temperature, oxygen and carbonate chemistry (pH and DIC), provided new insights about the role of some previously identified relevant environmental factors affecting vertical distribution of phototrophic pico-nanoplankton (e.g. light and nutrients), but also suggesting that low pH/low O<sub>2</sub> conditions may also differentially impact the vertical distribution of phytoplankton. Considering the challenge imposed by current deoxygenation and ocean acidification, this possibility, which was supported by a proof-of-concept incubation experiment with a representative of local phytoplankton communities above the oxycline, deserves future attention through both field work and specific experiments mimicking the pH and O<sub>2</sub> conditions in the upper OMZ region to which these populations can be exposed.

## **Funding**

The present study was funded by the following research projects: ANID-Chile FONDECYT Grant 1170065 (CARbon Cycling and Physiological Traits in Phytoplankton Functional Groups under low pH/low OXYgen conditions, CARpHOX), ANID—Chile National Competition for ship time (AUB 150006/12806 and AUB 170002), the Millennium Science Initiative Programs — Millennium Institute of Oceanography (IMO) ICN12\_019 and Coastal Socio-Ecological Millennium Institute (SECOS) ICN2019\_015, and FONDECYT Grant 1210171.

## **Author statement**

Edson Piscoya: Investigation, Formal analysis, Writing – Original Draft, Visualization, Review & Editing.

Peter von Dassow: Conceptualization, Investigation, Writing – Review & Editing.

Montserrat Aldunate: Investigation, Writing – Review & Editing.

Cristian A. Vargas: Conceptualization, Investigation, Writing – Review & Editing, Corresponding author.

## **Data availability**

The datasets generated during and/or analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

## **Declaration of competing interest**

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

### **Acknowledgements**

This study was supported by ANID-Chile FONDECYT Grant 1170065 (CARbon Cycling and Physiological Traits in Phytoplankton Functional Groups under low pH/low OXYgen conditions, CARpHOX) and by ANID—Chile National Competition for ship time (AUB 150006/12806 and AUB 170002). The Agencia Nacional de Investigación y Desarrollo (ANID)—Millennium Science Initiative Program—Millennium Institute of Oceanography (IMO) ICN12\_019 also supported a significant part of this work. Additional support from the *Coastal Socio-Ecological Millennium Institute (SECOS)* ICN2019\_015 funded by the Millennium Scientific Initiative (ANID) is also acknowledged. EP was funded by a IMO scholarship and additionally with fellowship from the Escuela de Graduados, Universidad de Concepción, during his MSci studies. The FONDECYT Grant 1210171 also funded CAV during the last stage of this study.

## References

- Ahlgren, N. A., & Rocap, G. (2006). Culture isolation and culture-independent clone libraries reveal new marine *Synechococcus* ecotypes with distinctive light and N physiologies. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(11), 7193–7204. <https://doi.org/10.1128/AEM.00358-06>
- Aldunate, M., De la Iglesia, R., Bertagnolli, A. D., & Ulloa, O. (2018). Oxygen modulates bacterial community composition in the coastal upwelling waters off central Chile. *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography*, 156, 68–79. <https://doi.org/10.1016/j.dsr2.2018.02.001>
- Aldunate, M., Henríquez-Castillo, C., Ji, Q., Lueders-Dumont, J., Mulholland, M. R., Ward, B. B., Dassow, P., & Ulloa, O. (2020). Nitrogen assimilation in picocyanobacteria inhabiting the oxygen-deficient waters of the eastern tropical North and South Pacific. *Limnology and Oceanography*, 65(2), 437–453. <https://doi.org/10.1002/lno.11315>
- Auger, P. A., Bento, J. P., Hormazabal, S., Morales, C. E., & Bustamante, A. (2021). Mesoscale Variability in the Boundaries of the Oxygen Minimum Zone in the Eastern South Pacific: Influence of Intrathermocline Eddies. *Journal of Geophysical Research: Oceans*, 126(2), 1–21. <https://doi.org/10.1029/2019JC015272>
- Berge, T., Daugbjerg, N., Balling Andersen, B., & Hansen, P. (2010). Effect of lowered pH on marine phytoplankton growth rates. *Marine Ecology Progress Series*, 416(June 2014), 79–91. <https://doi.org/10.3354/meps08780>
- Bertagnolli, A. D., & Stewart, F. J. (2018). Microbial niches in marine oxygen minimum zones. *Nature Reviews Microbiology*, 16(12), 723–729. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0087-z>
- Bouman, H. A., Ulloa, O., Scanlan, D. J., Zwirgmaier, K., Li, W. K. W., Platt, T., Stuart, V., Barlow, R., Leth, O., Clementson, L., Lutz, V., Fukasawa, M., Watanabe, S., & Sathyendranath, S. (2006). Oceanographic basis of the global surface distribution of *Prochlorococcus* ecotypes. *Science*, 312(5775), 918–921. <https://doi.org/10.1126/science.1122692>
- Buitenhuis, E. T., Li, W. K. W., Vaultot, D., Lomas, M. W., Landry, M. R., Partensky, F., Karl, D. M., Ulloa, O., Campbell, L., Jacquet, S., Lantoine, F., Chavez, F., MacIas, D., Gosselin, M., & McManus, G. B. (2012). Picophytoplankton biomass distribution in the global ocean. *Earth System Science Data*, 4(1), 37–46. <https://doi.org/10.5194/essd-4-37-2012>
- Caldeira, K., & Wickett, M. E. (2003). Anthropogenic carbon and ocean pH. *Nature*, 425(6956), 365–365. <https://doi.org/10.1038/425365a>
- Canfield, D. E. (2017). *Oxygen* (Vol. 1). Princeton University Press. <https://doi.org/10.23943/princeton/9780691145020.001.0001>
- Childress, J. J., & Seibel, B. A. (1998). Life at stable low oxygen levels: adaptations of animals to oceanic oxygen minimum layers. *Journal of Experimental Biology*, 201(8), 1223–1232. <https://doi.org/10.1242/jeb.201.8.1223>
- Chisholm, S. W. (1992). Phytoplankton Size. In *Primary Productivity and Biogeochemical Cycles in the Sea* (Vol. 02139, Issue 1974, pp. 213–237). Springer US. [https://doi.org/10.1007/978-1-4899-0762-2\\_12](https://doi.org/10.1007/978-1-4899-0762-2_12)
- Collado-Fabrizi, S., Vaultot, D., & Ulloa, O. (2011). Structure and seasonal dynamics of the eukaryotic picophytoplankton community in a wind-driven coastal upwelling ecosystem. *Limnology and Oceanography*, 56(6), 2334–2346.

<https://doi.org/10.4319/lo.2011.56.6.2334>

- De la Iglesia, R., Echenique-Subiabre, I., Rodríguez-Marconi, S., Espinoza, J. P., von Dassow, P., Ulloa, O., & Trefault, N. (2020). Distinct oxygen environments shape picoeukaryote assemblages thriving oxygen minimum zone waters off central Chile. *Journal of Plankton Research*, 42(5), 514–529. <https://doi.org/10.1093/plankt/fbaa036>
- Díaz, R. J. & Rosenber, R. (2008). Spreading dead zones and consequences for marine ecosystems. *Science*, 321 (5891), 926–929. <http://doi.org/10.1126/science.1156401>
- Dickson, A.G., & Millero, F. J. (1987). A comparison of the equilibrium constants for the dissociation of carbonic acid in seawater media. *Deep Sea Research Part A. Oceanographic Research Papers*, 34(10), 1733–1743. [https://doi.org/10.1016/0198-0149\(87\)90021-5](https://doi.org/10.1016/0198-0149(87)90021-5)
- Dickson, Andrew G. (1990). Standard potential of the reaction: , and and the standard acidity constant of the ion HSO<sub>4</sub><sup>–</sup> in synthetic sea water from 273.15 to 318.15 K. *The Journal of Chemical Thermodynamics*, 22(2), 113–127. [https://doi.org/10.1016/0021-9614\(90\)90074-Z](https://doi.org/10.1016/0021-9614(90)90074-Z)
- Emerson, S., Watanabe, Y. W., Ono, T., & Mecking, S. (2004). Temporal Trends in Apparent Oxygen Utilization in the Upper Pycnocline of the North Pacific: 1980–2000. *Journal of Oceanography*, 60(1), 139–147. <https://doi.org/10.1023/B:JOCE.0000038323.62130.a0>
- Escribano, R., Rosales, S. A., & Blanco, J. L. (2004). Understanding upwelling circulation off Antofagasta (northern Chile): A three-dimensional numerical-modeling approach. *Continental Shelf Research*, 24(1), 37–53. <https://doi.org/10.1016/j.csr.2003.09.005>
- Fenchel, T., & Finlay, B. (2008). Oxygen and the Spatial Structure of Microbial Communities. *Biological Reviews*, 83(4), 553–569. <https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.2008.00054.x>
- Fuenzalida, R., Schneider, W., Garcés-Vargas, J., Bravo, L., & Lange, C. (2009). Vertical and horizontal extension of the oxygen minimum zone in the eastern South Pacific Ocean. *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography*, 56(16), 992–1003. <https://doi.org/10.1016/j.dsr2.2008.11.001>
- Ganesh, S., Parris, D. J., DeLong, E. F., & Stewart, F. J. (2014). Metagenomic analysis of size-fractionated picoplankton in a marine oxygen minimum zone. *The ISME Journal*, 8(1), 187–211. <https://doi.org/10.1038/ismej.2013.144>
- Gao, K., Beardall, J., Häder, D.-P., Hall-Spencer, J. M., Gao, G., & Hutchins, D. A. (2019). Effects of Ocean Acidification on Marine Photosynthetic Organisms Under the Concurrent Influences of Warming, UV Radiation, and Deoxygenation. *Frontiers in Marine Science*, 6(JUN), 1–18. <https://doi.org/10.3389/fmars.2019.00322>
- Gérikas Ribeiro, C., Lopes dos Santos, A., Marie, D., Helena Pellizari, V., Pereira Brandini, F., & Vaulot, D. (2016). Pico and nanoplankton abundance and carbon stocks along the Brazilian Bight. *PeerJ*, 4(11), e2587. <https://doi.org/10.7717/peerj.2587>
- Gilly, W. F., Beman, J. M., Litvin, S. Y., & Robison, B. H. (2013). Oceanographic and Biological Effects of Shoaling of the Oxygen Minimum Zone. *Annual Review of Marine Science*, 5(1), 393–420. <https://doi.org/10.1146/annurev-marine-120710-100849>
- Goericke, R., Olson, R., & Shalapyonok, A. (2000). A novel niche for Prochlorococcus sp. in low-light suboxic environments in the Arabian Sea and the Eastern Tropical North Pacific. *Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers*, 47(7), 1183–1205. [https://doi.org/10.1016/S0967-0637\(99\)00108-9](https://doi.org/10.1016/S0967-0637(99)00108-9)
- Haas, L.W., 1982. Improved epifluorescence microscopy for observing planktonic microorganisms. *Ann. Inst. Oceanogr.*, Paris 58, 261–266.

- Herrera, L., & Escribano, R. (2006). Factors structuring the phytoplankton community in the upwelling site off El Loa River in northern Chile. *Journal of Marine Systems*, 61(1–2), 13–38. <https://doi.org/10.1016/j.jmarsys.2005.11.010>
- Hinga, K. (2002). Effects of pH on coastal marine phytoplankton. *Marine Ecology Progress Series*, 238, 281–300. <https://doi.org/10.3354/meps238281>
- Jacob, B. G., Dassow, P. V. O. N., Salisbury, J. E., Navarro, J. M., & Vargas, C. A. (2017). Impact of low pH/high  $p\text{CO}_2$  on the physiological response and fatty acid content in diatom *Skeletonema pseudocostatum*. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 97(2), 225–233. <https://doi.org/10.1017/S0025315416001570>
- Johnson, P. W., & Sieburth, J. M. (1979). Chroococcoid cyanobacteria in the sea: A ubiquitous and diverse phototrophic biomass1. *Limnology and Oceanography*, 24(5), 928–935. <https://doi.org/10.4319/lo.1979.24.5.0928>
- Karstensen, J., Stramma, L., & Visbeck, M. (2008). Oxygen minimum zones in the eastern tropical Atlantic and Pacific oceans. *Progress in Oceanography*, 77(4), 331–350. <https://doi.org/10.1016/j.pocean.2007.05.009>
- Keeling, R. F., Körtzinger, A., & Gruber, N. (2010). Ocean Deoxygenation in a Warming World. *Annual Review of Marine Science*, 2(1), 199–229. <https://doi.org/10.1146/annurev.marine.010908.163855>
- Lagos, N., Benítez, S., Duarte, C., Lardies, M., Broitman, B., Tapia, C., Tapia, P., Widdicombe, S., & Vargas, C. (2016). Effects of temperature and ocean acidification on shell characteristics of *Argopecten purpuratus*: implications for scallop aquaculture in an upwelling-influenced area. *Aquaculture Environment Interactions*, 8 (Ippc 2014), 357–370. <https://doi.org/10.3354/aei00183>
- Lam, P., & Kuypers, M. M. M. (2011). Microbial nitrogen cycling processes in oxygen minimum zones. *Annual Review of Marine Science*, 3, 317–345. <https://doi.org/10.1146/annurev-marine-120709-142814>
- Lavin, P., González, B., Santibáñez, J. F., Scanlan, D. J., & Ulloa, O. (2010). Novel lineages of *Prochlorococcus* thrive within the oxygen minimum zone of the eastern tropical South Pacific. *Environmental Microbiology Reports*, 2(6), 728–738. <https://doi.org/10.1111/j.1758-2229.2010.00167.x>
- Levin, L. A. (2003). Oxygen minimum benthos: Adaptation and community response to hypoxia. In *Oceanography and Marine Biology, An Annual Review, Volume 41* (pp. 9–9). CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9780203180570-3>
- Levin, L. A. (2018). Manifestation, Drivers, and Emergence of Open Ocean Deoxygenation. *Annual Review of Marine Science*, 10(1), 229–260. <https://doi.org/10.1146/annurev-marine-121916-063359>
- Linacre, L., Lara-Lara, R., Camacho-Ibar, V., Herguera, J. C., Bazán-Guzmán, C., & Ferreira-Bartrina, V. (2015). Distribution pattern of picoplankton carbon biomass linked to mesoscale dynamics in the southern Gulf of Mexico during winter conditions. *Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers*, 106, 55–67. <https://doi.org/10.1016/j.dsr.2015.09.009>
- Long, A. M., Jurgensen, S. K., Petchel, A. R., Savoie, E. R., & Brum, J. R. (2021). Microbial Ecology of Oxygen Minimum Zones Amidst Ocean Deoxygenation. *Frontiers in Microbiology*, 12(October), 1–18. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.748961>
- Long, M. C., Deutsch, C., & Ito, T. (2016). Finding forced trends in oceanic oxygen. *Global Biogeochemical Cycles*, 30(2), 381–397. <https://doi.org/10.1002/2015GB005310>



- Mackey, K. R. M., Paytan, A., Caldeira, K., Grossman, A. R., Moran, D., Mcilvin, M., & Saito, M. A. (2013). Effect of temperature on photosynthesis and growth in marine *Synechococcus* spp. *Plant Physiology*, 163(2), 815–829. <https://doi.org/10.1104/pp.113.221937>
- Marie, D., Simon, N., & Vaultot, D. (2005). Phytoplankton cell counting by flow cytometry. In: Andersen RA (ed) *Algal culturing techniques*. Elsevier, Amsterdam, pp 253–267. <https://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.624.8423&rep=rep1&type=pdf>
- Medina Faull, L., Mara, P., Taylor, G. T., & Edgcomb, V. P. (2020). Imprint of Trace Dissolved Oxygen on Prokaryoplankton Community Structure in an Oxygen Minimum Zone. *Frontiers in Marine Science*, 7(May), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fmars.2020.00360>
- Mehrbach, C., Culbertson, C. H., Hawley, J. E., & Pytkowicz, R. M. (1973). Measurement of the apparent dissociation constants of carbonic acid in seawater at atmospheric pressure. *Limnology and Oceanography*, 18(6), 897–907. <https://doi.org/10.4319/lo.1973.18.6.0897>
- Molina, V., & Farías, L. (2009). Aerobic ammonium oxidation in the oxycline and oxygen minimum zone of the eastern tropical South Pacific off northern Chile (~20°S). *Deep-Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography*, 56(16), 1032–1041. <https://doi.org/10.1016/j.dsr2.2008.09.006>
- Moore, L. R., Rocap, G., & Chisholm, S. W. (1998). Physiology and molecular phylogeny of coexisting *Prochlorococcus* ecotypes. *Nature*, 393(6684), 464–467. <https://doi.org/10.1038/30965>
- Morales, C. E., Blanco, J. L., Braun, M., Reyes, H., & Silva, N. (1996). Chlorophyll-a distribution and associated oceanographic conditions in the upwelling region off northern Chile during the winter and spring 1993. *Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers*, 43(3), 267–289. [https://doi.org/10.1016/0967-0637\(96\)00015-5](https://doi.org/10.1016/0967-0637(96)00015-5)
- Morales, C. E., Hormazábal, S. E., & Blanco, J. (1999). Interannual variability in the mesoscale distribution of the depth of the upper boundary of the oxygen minimum layer off northern Chile (18–24S): Implications for the pelagic system and biogeochemical cycling. *Journal of Marine Research*, 57(6), 909–932. <https://doi.org/10.1357/002224099321514097>
- Pajares, S., Varona-Cordero, F., & Hernández-Becerril, D. U. (2020). Spatial Distribution Patterns of Bacterioplankton in the Oxygen Minimum Zone of the Tropical Mexican Pacific. *Microbial Ecology*, 80(3), 519–536. <https://doi.org/10.1007/s00248-020-01508-7>
- Parris, D. J., Ganesh, S., Edgcomb, V. P., DeLong, E. F., & Stewart, F. J. (2014). Microbial eukaryote diversity in the marine oxygen minimum zone off northern Chile. *Frontiers in Microbiology*, 5(OCT). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00543>
- Parsons, T. R., Maita, Y., & Lalli, C. M. (1984). Fluorometric Determination of Chlorophylls. In *A Manual of Chemical & Biological Methods for Seawater Analysis* (pp. 107–109). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-030287-4.50034-7>
- Partensky, F., Hess, W. R., & Vaultot, D. (1999). Prochlorococcus, a Marine Photosynthetic Prokaryote of Global Significance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 63(1), 106–127. <https://doi.org/10.1128/MMBR.63.1.106-127.1999>
- Partensky, Frédéric, & Vaultot, D. (1999). Cyanobacterial photosynthetic apparatus: an overview. *Marine Cyanobacteria*, 19(19), 457–475.

<http://cat.inist.fr/?aModele=afficheN&cpsidt=1218663>

- Paulmier, A., Ruiz-Pino, D., & Garçon, V. (2011). CO<sub>2</sub> maximum in the oxygen minimum zone (OMZ). *Biogeosciences*, 8(2), 239–252. <https://doi.org/10.5194/bg-8-239-2011>
- Paulmier, A., Ruiz-Pino, D., Garçon, V., & Farías, L. (2006). Maintaining the Eastern South Pacific Oxygen Minimum Zone (OMZ) off Chile. *Geophysical Research Letters*, 33(20), L20601. <https://doi.org/10.1029/2006GL026801>
- Pierrot D.E., Lewis E. and Wallace D.W.R. (2006). MS Excel program developed for CO<sub>2</sub> system calculations. Carbon Dioxide Information Analysis Center, Oak Ridge National Laboratory, U.S. Department of Energy. Available at <http://cdiac.ornl.gov/ftp/co2sys>
- Revsbech, N.P., Larsen, L.H., Gundersen, J., Dalsgaard, T., Ulloa, O. and Thamdrup, B. (2009). Determination of ultra-low oxygen concentration in oxygen minimum zones by the STOX sensor. *Limnology and Oceanography: Methods* 7: 371- 381. <http://doi.org/10.4319/lom.2009.7.371>
- Safi, K., & Hall, J. (1999). Mixotrophic and heterotrophic nanoflagellate grazing in the convergence zone east of New Zealand. *Aquatic Microbial Ecology*, 20(1), 83–93. <https://doi.org/10.3354/ame020083>
- Santander, E., Herrera, L., & Merino, C. (2003). Fluctuación diaria del fitoplancton en la capa superficial del océano durante la primavera de 1997 en el norte de Chile (20°18'S): II. Composición específica y abundancia celular. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 38(1), 13–25.
- Scanlan, D. (2002). Molecular ecology of the marine cyanobacterial genera *Prochlorococcus* and *Synechococcus*. *FEMS Microbiology Ecology*, 40(1), 1–12. [https://doi.org/10.1016/S0168-6496\(01\)00217-3](https://doi.org/10.1016/S0168-6496(01)00217-3)
- Sieburth, J.M., Smetacek, V., Lenz, J., (1978). Pelagic ecosystem structure: heterotrophic compartments of the plankton and their relationship to plankton size fractions. *Limnology and Oceanography*. 23, 1256–1263. <https://doi.org/10.4319/lo.1978.23.6.1256>
- Stramma, L., Johnson, G. C., Sprintall, J., & Mohrholz, V. (2008). Expanding Oxygen-Minimum Zones in the Tropical Oceans. *Science*, 320(5876), 655–658. <https://doi.org/10.1126/science.1153847>
- Stramma, L., Schmidtko, S., Levin, L. A., & Johnson, G. C. (2010). Ocean oxygen minima expansions and their biological impacts. *Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers*, 57(4), 587–595. <https://doi.org/10.1016/j.dsr.2010.01.005>
- Thamdrup, B., Dalsgaard, T., & Revsbech, N. P. (2012). Widespread functional anoxia in the oxygen minimum zone of the Eastern South Pacific. *Deep-Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers*, 65, 36–45. <https://doi.org/10.1016/j.dsr.2012.03.001>
- Tobler, M. (2015). Extremophile Fishes. In R. Riesch, M. Tobler, & M. Plath (Eds.), *Extremophile Fishes*. Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-13362-1>
- Tsai, A.-Y., & Mukhanov, V. (2021). Response of Growth and Grazing Rate of Nanoflagellates on *Synechococcus* spp. to Experimental Nutrient Enrichment. *Water*, 13(19), 2686. <https://doi.org/10.3390/w13192686>
- Tsai, A. Y., Chiang, K. P., Chan, Y. F., Lin, Y. C., & Chang, J. (2007). Pigmented nanoflagellates in the coastal western subtropical Pacific are important grazers on *Synechococcus* populations. *Journal of Plankton Research*, 29(1), 71–77. <https://doi.org/10.1093/plankt/fbl058>
- Tsai, A. Y., Gong, G. C., Sanders, R. W., Chen, W. H., Chao, C. F., & Chiang, K. P. (2011).

- Importance of bacterivory by pigmented and heterotrophic nanoflagellates during the warm season in a subtropical western Pacific coastal ecosystem. *Aquatic Microbial Ecology*, 63(1), 9–18. <https://doi.org/10.3354/ame01470>
- Ulloa, O., Escribano, R., Hormazabal, S., Quiñones, R. A., González, R. R., & Ramos, M. (2001). Evolution and biological effects of the 1997-98 El Niño in the upwelling ecosystem off northern Chile. *Geophysical Research Letters*, 28(8), 1591–1594. <https://doi.org/10.1029/2000GL011548>
- Ulloa, O., & Pantoja, S. (2009). The oxygen minimum zone of the eastern South Pacific. *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography*, 56(16), 987–991. <https://doi.org/10.1016/j.dsr2.2008.12.004>
- Wang, B., Chen, J., Jin, H., Li, H., Huang, D., & Cai, W. (2017). Diatom bloom-derived bottom water hypoxia off the Changjiang estuary, with and without typhoon influence. *Limnology and Oceanography*, 62(4), 1552–1569. <https://doi.org/10.1002/lno.10517>
- Weber, T., & Bianchi, D. (2020). Efficient Particle Transfer to Depth in Oxygen Minimum Zones of the Pacific and Indian Oceans. *Frontiers in Earth Science* 8, 1–11. <https://doi.org/10.3389/feart.2020.00376>
- Whitney, F. A., Freeland, H. J., & Robert, M. (2007). Persistently declining oxygen levels in the interior waters of the eastern subarctic Pacific. *Progress in Oceanography*, 75(2), 179–199. <https://doi.org/10.1016/j.pocean.2007.08.007>
- Worden, A. Z., Nolan, J. K., & Palenik, B. (2004). Assessing the dynamics and ecology of marine picophytoplankton: The importance of the eukaryotic component. *Limnology and Oceanography*, 49(1), 168–179. <https://doi.org/10.4319/lo.2004.49.1.0168>
- Wyrski, K. (1962). The oxygen minima in relation to ocean circulation. *Deep-Sea Research and Oceanographic Abstracts*, 9(1–2), 11–23. [https://doi.org/10.1016/0011-7471\(62\)90243-7](https://doi.org/10.1016/0011-7471(62)90243-7)
- Zwirgmaier, K., Jardillier, L., Ostrowski, M., Mazard, S., Garczarek, L., Vaultot, D., Not, F., Massana, R., Ulloa, O., & Scanlan, D. J. (2007). Global phylogeography of marine *Synechococcus* and *Prochlorococcus* reveals a distinct partitioning of lineages among oceanic biomes. *Environmental Microbiology*, 10(1), 070928214009001 <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2007.01440.x>

## Figures captions

**Fig. 1.** Study area during the LowpHOX II expedition including the three sampling stations (T1, T3, and T5) off northern Chile (20°S) and 2-9 February 2018 composite MODIS sea surface temperature image; units are in °C.

**Fig. 2.** Cluster analysis for the different sampling stations (T1, T3 and T5) and depth levels according to physical and chemical variables.

**Fig. 3.** Characterization of the environmental variables during the LowpHOX II expedition: (A) Dissolved oxygen, temperature, salinity; (B) Nitrate, nitrite, and phosphate (C)  $pH_T$ ,  $pCO_2$  and alkalinity of the water column of the T5, T3 and T1 station.

**Fig. 4.** Chlorophyll concentration and cell abundance (cell.  $mL^{-1}$ ) for the different pico-autotrophic groups considered in our study (A) Chl *a*; (B) Cyanobacteria, *Synechococcus*-like cells, *Prochlorococcus*; (C) Pico + Nano Eukaryota and phototrophic nanoflagellates (PNF, 2 - 20  $\mu m$ ).

**Fig. 5.** PCA-based ordination of environmental data from stations T1, T3 and T5. Axes correspond to the first two components, which together explain 73.3 % of total variance.

**Fig. 6.** Characterization of basic environmental variables during a short-term perturbation experiment with the haptophyte, *Imantonia sp.* upon low pH/low  $O_2$  conditions: (A)  $pH_T$ , (B) dissolved oxygen,  $O_2$ , (C) fluorescence (RFU).

**Table 1: Means ( $\pm$  standard error) of physical-chemical parameter.**

Variables	Mean	0 - 50 m		>50 m			
		Min	Max	Mean	Min	Max	Mean
Temperature ( $^{\circ}$ C)	14.82 $\pm$ 4.50	12.88	24.55	16.85 $\pm$ 4.12	7.83	12.96	11.03 $\pm$ 2.10
Salinity (psu)	34.84 $\pm$ 0.17	34.79	35.28	34.89 $\pm$ 0.17	34.56	34.87	34.76 $\pm$ 0.13
Oxygen ( $\mu$ mol L $^{-1}$ )	74.76 $\pm$ 104.04	0.362	286.088	113.31 $\pm$ 111.92	0.352	13.481	3.16 $\pm$ 5.01
Chl <i>a</i> ( $\mu$ g L $^{-1}$ )	2.18 $\pm$ 3.42	0.13	11.73	3.23 $\pm$ 3.88	0.03	0.85	0.22 $\pm$ 0.28
DIC ( $\mu$ mol kg $^{-1}$ )	2154.40 $\pm$ 55.71	2025.7	2188.9	2136.19 $\pm$ 53.65	2103.2	2250.7	2188.21 $\pm$ 44.92
TA ( $\mu$ mol kg $^{-1}$ )	2308.68 $\pm$ 18.64	2281.3	2355.3	2314.72 $\pm$ 20.64	2288.3	2303	2297.47
pH <sub>T</sub>	7.875 $\pm$ 0.115	7.773	8.099	7.906 $\pm$ 0.101	7.628	8.029	7.817 $\pm$ 0.123
<i>p</i> CO <sub>2</sub> ( $\mu$ atm)	641.95 $\pm$ 185.54	348.732	800.319	595.73 $\pm$ 142.95	404.193	1146.256	727.78 $\pm$ 234.36
PO <sub>4</sub> ( $\mu$ mol kg $^{-1}$ )	2.27 $\pm$ 0.81	0.902	3.045	1.96 $\pm$ 0.86	2.709	3.078	2.85 $\pm$ 0.13
NO <sub>3</sub> ( $\mu$ mol kg $^{-1}$ )	11.53 $\pm$ 12.10	0.003	24.259	6.73 $\pm$ 8.97	6.939	38.640	20.44 $\pm$ 12.67
NO <sub>2</sub> ( $\mu$ mol kg $^{-1}$ )	1.86 $\pm$ 2.69	0	5.80	0.63 $\pm$ 1.58	0	6.814	4.16 $\pm$ 2.90

**Table 2: Principal component analysis (PCA) performed on environmental data collected at all sampling locations. Columns show the weights assigned to originally measured variables. Weights > 0.3 are shown in boldface**

Physical-chemical variable	PC1	PC2
Temperature (°C)	<b>0.349</b>	-0.234
Salinity (psu)	0.246	<b>-0.492</b>
Oxygen ( $\mu\text{mol kg}^{-1}$ )	<b>0.347</b>	0.035
Chl <i>a</i> ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	0.081	0.205
DIC ( $\mu\text{mol kg}^{-1}$ )	<b>-0.348</b>	-0.214
TA ( $\mu\text{mol kg}^{-1}$ )	<b>0.318</b>	-0.265
pH <sub>T</sub>	<b>0.32</b>	<b>0.31</b>
<i>p</i> CO <sub>2</sub> ( $\mu\text{atm}$ )	-0.289	<b>-0.379</b>
PO <sub>4</sub> ( $\mu\text{mol kg}^{-1}$ )	<b>-0.349</b>	0.032
NO <sub>3</sub> ( $\mu\text{mol kg}^{-1}$ )	-0.252	<b>0.337</b>
NO <sub>2</sub> ( $\mu\text{mol kg}^{-1}$ )	-0.188	<b>-0.433</b>
<b>% Total variance</b>	<b>57.4</b>	<b>15.9</b>

**Table 3: Spearman correlation analysis (SPC) between reported principal components and the phytoplankton community. Correlations that were significant at  $\alpha = 0.01$  are in boldface.**

	PC1	PC2
<i>Synechococcus</i> - like cells	<b>0.846</b>	0.046
<i>Prochlorococcus</i>	0.302	-0.164
Pico + Nano Eukaryota (1-3 $\mu\text{m}$ )	<b>0.818</b>	0.040
PNF	<b>0.698</b>	0.121

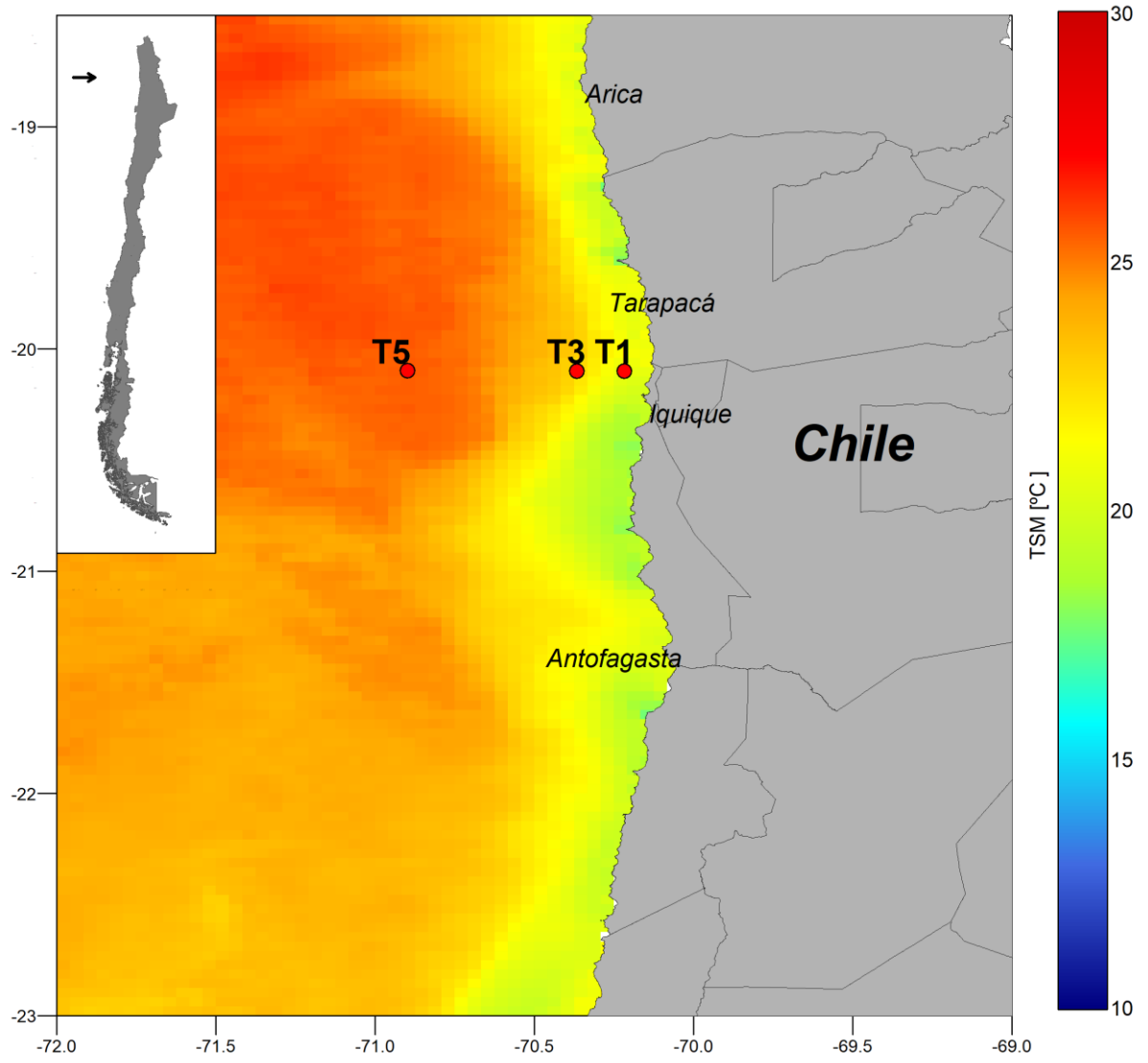
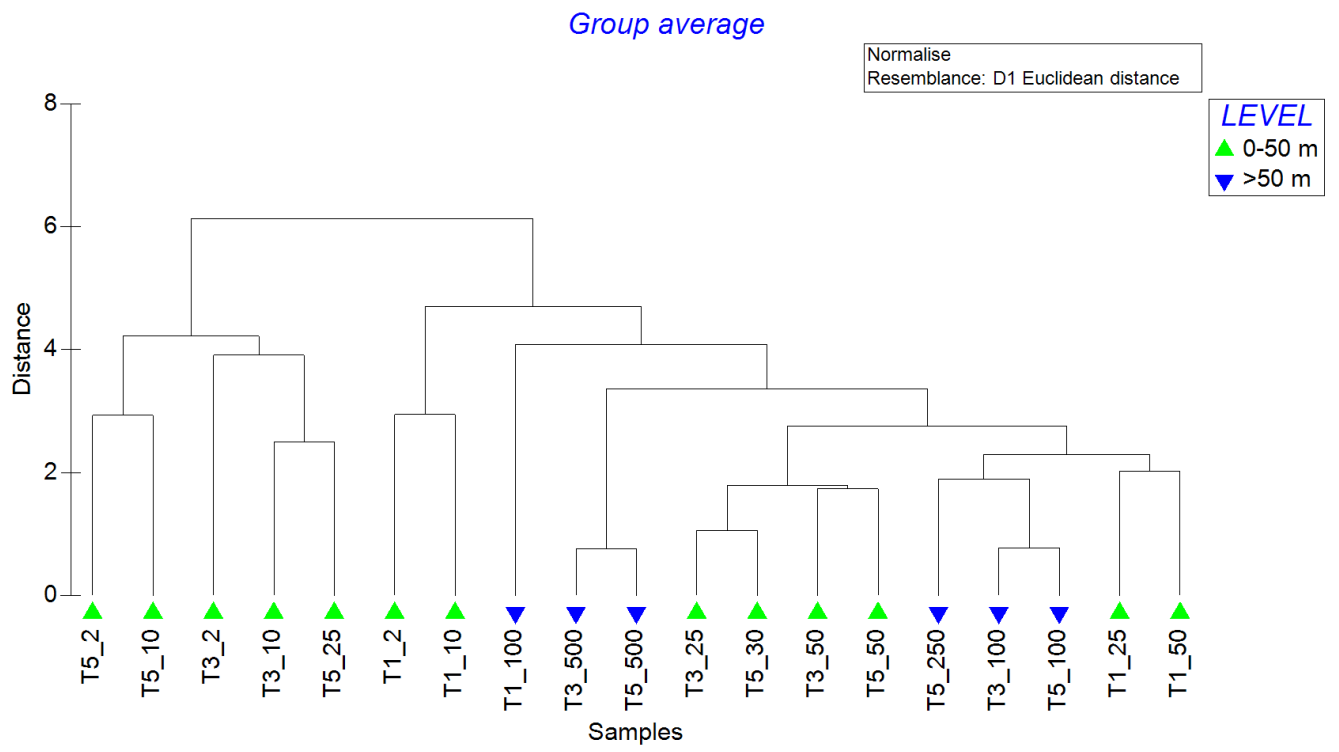


Figure 1





*Figure 2*

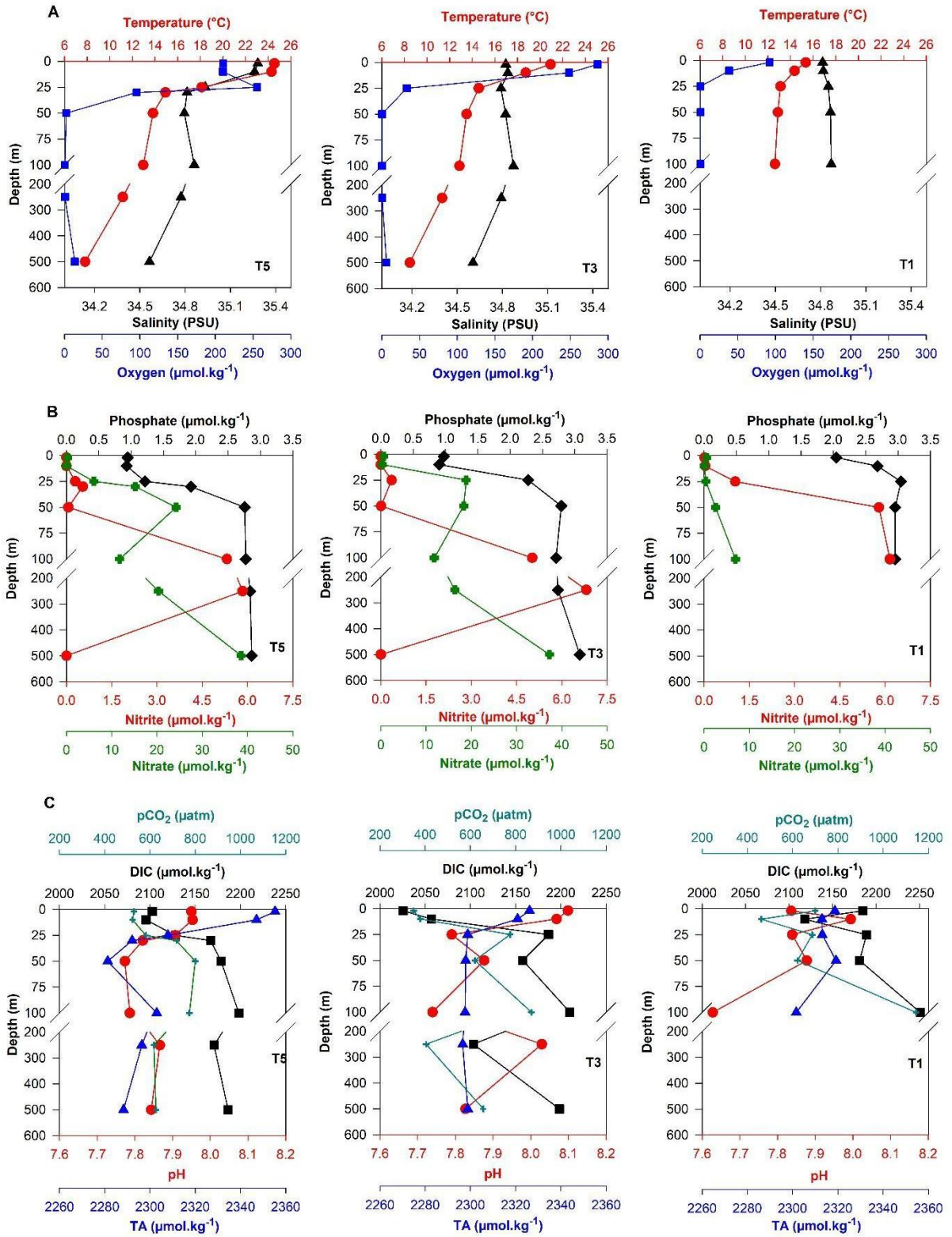


Figure 3 54

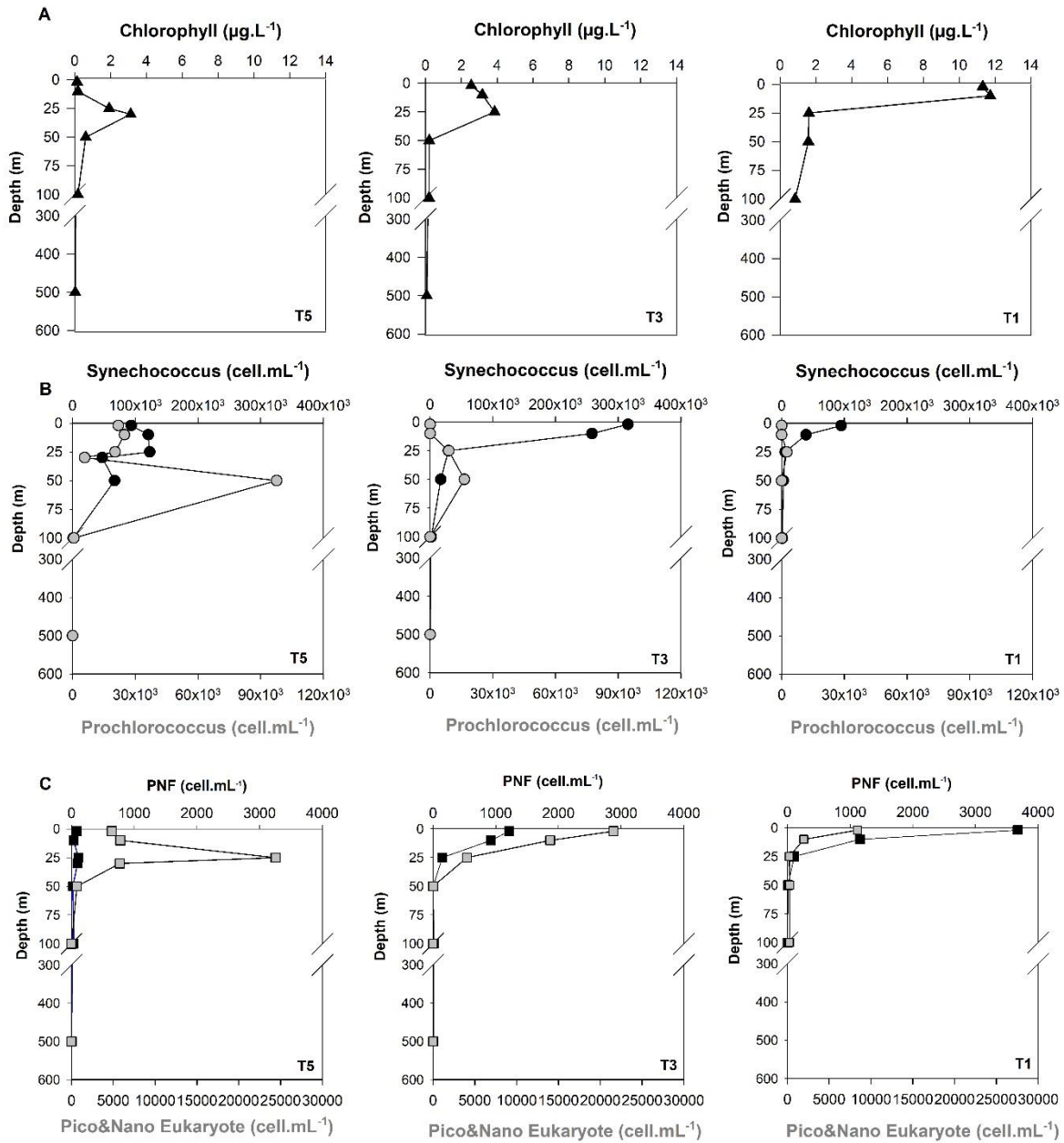


Figure 4

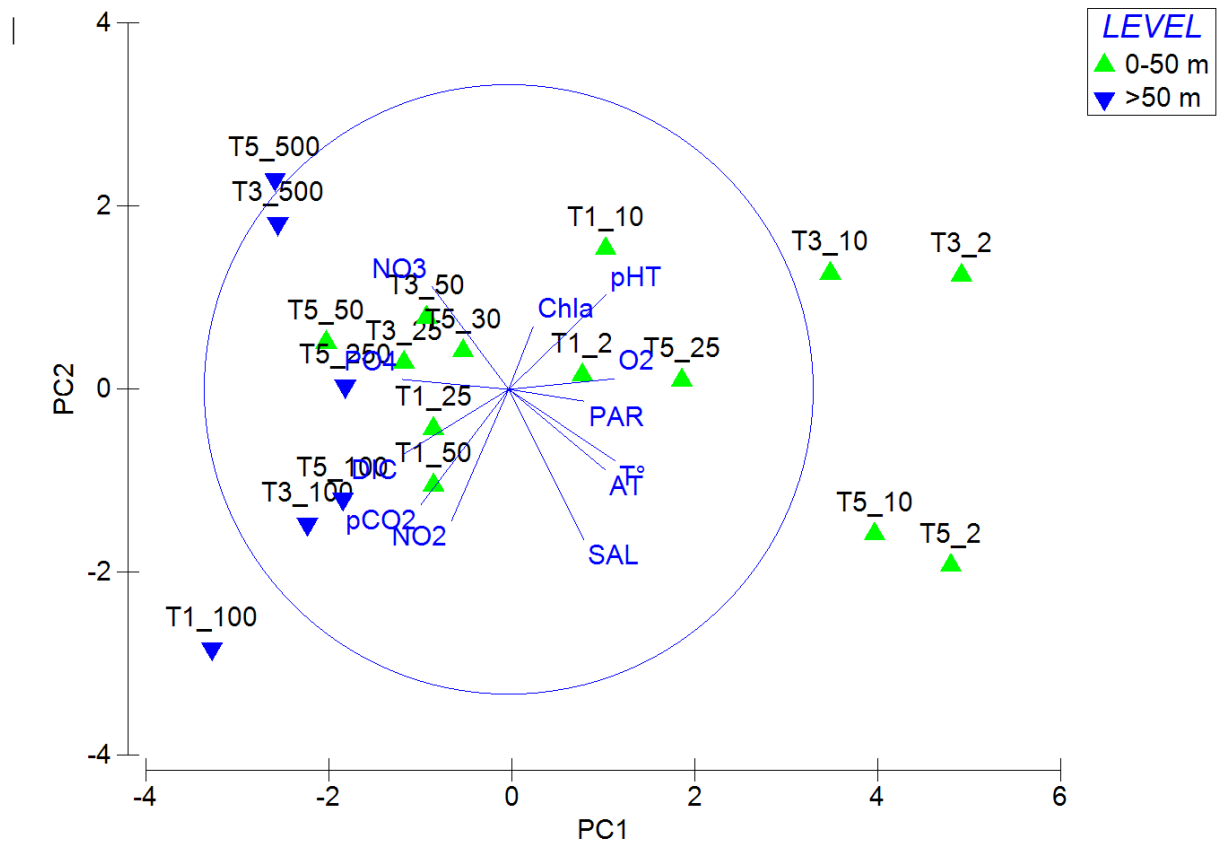


Figure 5

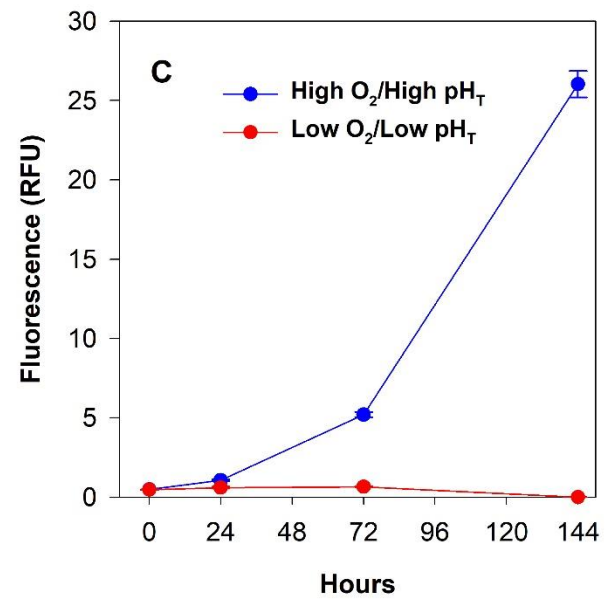
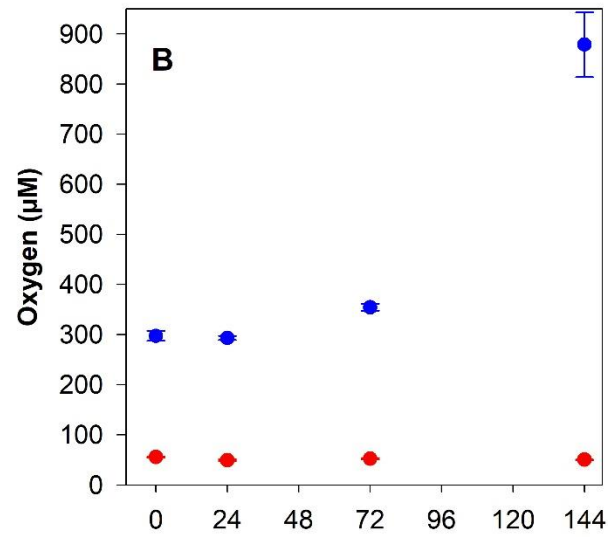
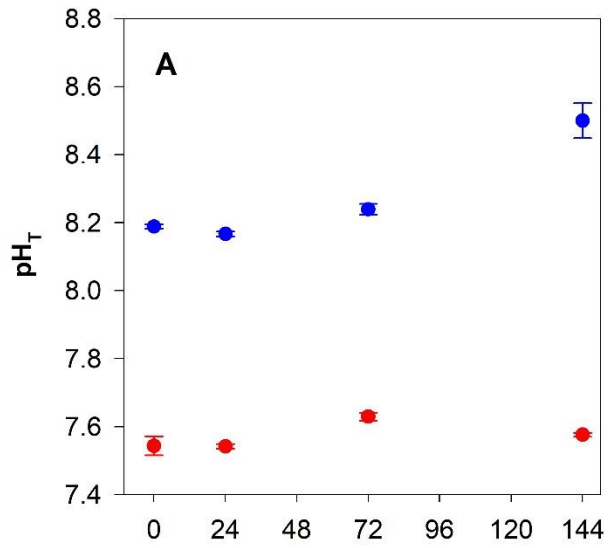
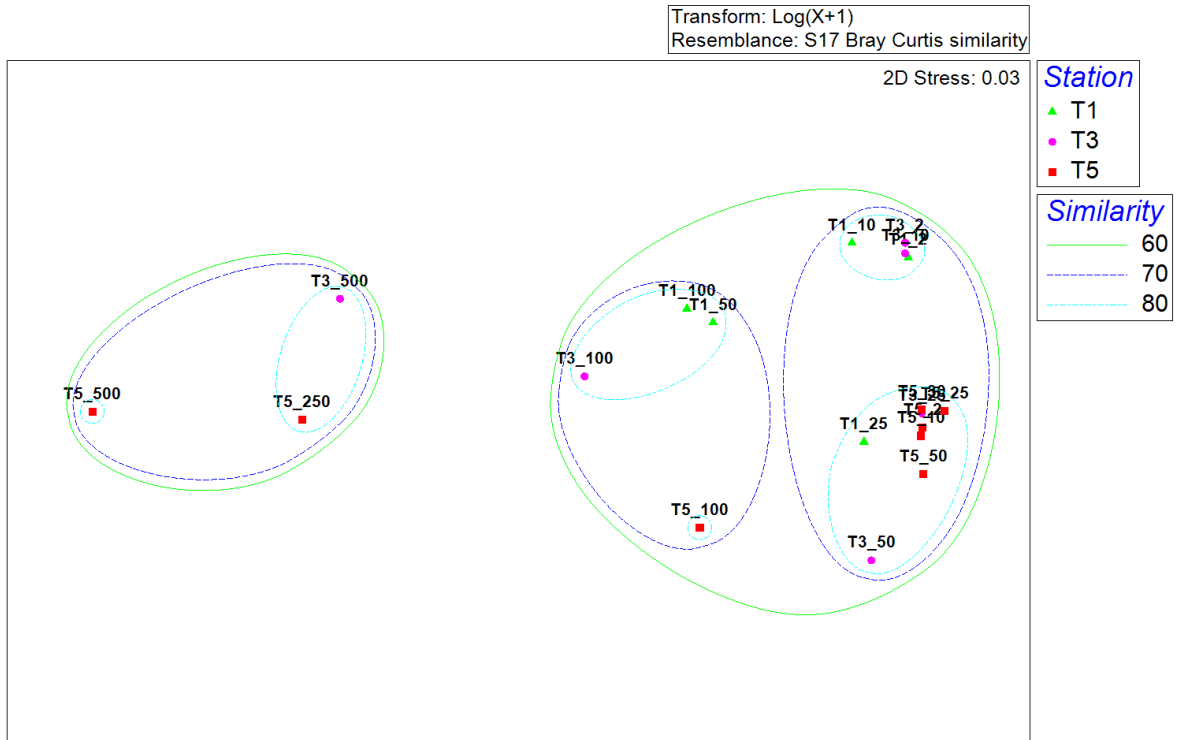


Figure 6

## Supplementary material



*Suppl. Figure*

## 5 DISCUSIÓN

La dinámica del fitoplancton está controlada por una serie de factores ambientales, como las fluctuaciones anuales de temperatura, estratificación de la columna de agua, disponibilidad de luz, nutrientes y el pastoreo, muchos de los cuales sufren actualmente perturbaciones sustanciales debido al cambio climático global antropogénico, la mayoría de estos factores interactúan de forma aditiva o sinérgica. (Winder & Sommer, 2012).

En esta tesis presentamos una evaluación del pico-nanoplancton fototrófico a escala vertical y horizontal a lo largo de un transecto de 500 m de profundidad en la ZMO del norte de Chile. Al igual que resultados encontrados por otros autores (Aldunate et al., 2018; De la Iglesia et al., 2020; Morales et al., 1996), hemos identificado algunas variables físico-químicas clave que están significativamente correlacionadas con la distribución vertical y la abundancia del pico-nanoplancton asociado con las capas superiores de esta zona. La distribución de *Synechococcus*, PNF y piceocariotas se asoció con cambios en el O<sub>2</sub>, la temperatura y el sistema de carbonatos (pH<sub>T</sub>, CID, AT) y en menor medida con la salinidad, lo que puede sugerir que estos son importantes factores ambientales que controlan la distribución vertical del pico-nanoplancton en esta región de la ZMO. En este sentido, tanto la temperatura como el O<sub>2</sub> han sido descritos previamente como los principales impulsores de la distribución vertical de la comunidad de piceocariotas en la ZMO de Chile central (De la Iglesia et al., 2020), y algunos estudios han destacado el papel de la salinidad como principal impulsor de la distribución espacial y vertical del fitoplancton (por ejemplo, Santander et al., 2003, frente a Iquique, 20°S).

Los efectos del cambio climático con mayor significancia sobre la composición de especies de fitoplancton se producirán a través de cambios en los patrones de estratificación térmica (Rodríguez et al., 2001), la mezcla vertical es una de las variables que condiciona el crecimiento del fitoplancton, debido a que los procesos de mezcla suelen ir acompañados de cambios en la disponibilidad de luz y nutrientes. Otro impacto directo que tiene la intensidad o duración de la estratificación térmica es en la difusión turbulenta y la sedimentación de las células del fitoplancton, los cuales son mecanismos que causan el desplazamiento vertical de

células no móviles (Huisman et al., 2006; Livingstone, 2003). Por lo tanto, la estratificación térmica y la mezcla vertical tienen una influencia inmediata en las velocidades de hundimiento del fitoplancton, que aumentan de forma no lineal con el tamaño (Smayda, 1969), lo que da a las especies más pequeñas y flotantes una ventaja en un entorno en el que la turbulencia no está presente para re-suspender todas las especies planctónicas (Findlay et al., 2001; Huisman et al., 2004; Strecker et al., 2004).

En la mayoría de los ambientes marinos, los procariotas son la base de la red trófica, soportan la productividad primaria tanto en aguas óxicas como anóxicas (Long et al., 2021). Las picocianobacterias son un grupo muy abundante de microorganismo importantes por representar aproximadamente un 25% de la productividad primaria marina (Flombaum et al., 2013). En aguas de bajo O<sub>2</sub> podemos encontrar diferentes procariotas fotosintéticos con sus máximos representantes en la fracción picoplanctónica, *Synechococcus* y *Prochlorococcus* (Gérikas Ribeiro et al., 2016; Linacre et al., 2010; Partensky et al., 1999). En nuestro estudio, las abundancias *Synechococcus* y *Prochlorococcus* estaban en el rango medio reportado para nuestra área de estudio (Medina et al., 2017; Stuart et al., 2004; Ulloa et al., 2021) y otras regiones de ZMO en todo el mundo (Bouman et al., 2006; Buitenhuis et al., 2012; Zwirgmaier et al., 2007). En base a nuestros resultados hemos encontrado que las abundancias de *Synechococcus* se distribuyeron mayormente en las aguas superficiales hasta la oxiclina superior a 50 m de profundidad, y luego su abundancia disminuyó drásticamente a profundidades mayores de 100 m. *Synechococcus* fue más abundante en estaciones oceánicas (T3 y T5), una distribución espacial característica reportada previamente para este grupo (Ahlgren & Rocap, 2006; Lavin et al., 2010; Pajares et al., 2020), con altas abundancias en aguas superficiales óxicas y menor abundancia en zonas de baja radiación PAR y condiciones de bajo pH/bajo O<sub>2</sub>. Este patrón de distribución vertical puede explicarse por los mayores requerimientos de luz para el crecimiento de *Synechococcus* en comparación con *Prochlorococcus* (Scanlan, 2002).

Se han encontrado nuevos linajes de *Prochlorococcus* adaptados a condiciones de poco O<sub>2</sub>, poca luz y altos nutrientes en las aguas poco iluminadas de las ZMO (Ulloa et al., 2021), y en nuestro estudio fue el único grupo que evidenció un predominio en aguas más profundas,



aparentemente este patrón es una característica persistente de este ambiente particular como se muestra en algunos estudios previos de estas ZMOs (Astorga-Eló et al., 2015; Lavin et al., 2010). Además, *Prochlorococcus* fue más abundante en la estación más oceánica (T5), donde cabe destacar que en esta estación se registraron desde los 2 m hasta los 100 m, presentando una distribución vertical muy diferente al resto de estaciones. Esto se relaciona probablemente con un aumento de la abundancia de los linajes de alta luminosidad de *Prochlorococcus* en las aguas superficiales distantes a la costa (Moore et al., 1998), mientras que *Prochlorococcus* suele estar excluido de las aguas superficiales costeras (por ejemplo, Collado-Fabbri et al., 2011).

Mientras que el componente procarionta del picoplancton está dominado por *Prochlorococcus* y *Synechococcus*, la fracción eucariota es mucho más diversa y puede representar una mayor fracción de la biomasa (Vaulot et al., 2008). El componente eucarionte presenta una gran diversidad filogenética, lo que hace posible que este grupo tenga una plasticidad funcional que les permite vivir ampliamente distribuidos en el océano, tanto en mar abierto (Díez et al., 2001), sistemas costeros (Worden, 2006), a lo largo de la columna de agua (Not et al., 2007), desde altas latitudes (López-García et al., 2001) hasta aguas ecuatoriales (Moon-van der Staay et al., 2001) y ambientes que se consideran extremos, como en la cuenca del Cariaco (Stoeck et al., 2003) en donde se ha encontrado una significativa diversidad eucarionte en zonas anóxicas, también en fluido hidrotermales (López-García et al., 2007) y algunos fiordos anóxicos (Zuendorf et al., 2006).

Nuestros resultados muestran que la distribución de pico-nanoeucariotas que va de 1 a 3  $\mu\text{m}$ , alcanzó valores máximos en la capa fótica bien oxigenada (24 400 células  $\text{mL}^{-1}$ ), para luego disminuir en alrededor de ~90 % en la oxiclina (290 células  $\text{mL}^{-1}$ ), hasta desaparecer en el núcleo de la ZMO. Según Parris et al. (2014) la fracción de picoeucariotas (0,2 - 1,6  $\mu\text{m}$ ) registrada para la ETSP es más diversa en el núcleo de la ZMO, pero esa diversidad se debió a linajes no fotosintéticos como Syndiniales y Radiolaria.

Algunos PNF se caracterizan por un comportamiento mixotrófico, por lo que también pueden ser importantes bacterívoros en las redes alimentarias. Algunos estudios de campo han constatado que en los ecosistemas marinos y de agua dulce los PNF superan en número a los

nanoflagelados heterótrofos (sigla en inglés HNF) o a las células no pigmentadas, y los experimentos a corto plazo con bacterias marcadas con fluorescencia (FLB) han demostrado incluso un mayor impacto de pastoreo en la comunidad bacteriana que los FNP (A. Y. Tsai et al., 2011). Los PNF, y especialmente las que tienen un comportamiento mixotrófico, también pueden sobrevivir en diferentes entornos recurriendo a la bacterivoría en condiciones de poca luz, concentración de nutrientes disueltos y fotosíntesis cuando la concentración de presas es baja (Unrein et al., 2007). Además, algunos PNF pueden ser importantes en el pastoreo de *Synechococcus* en ambientes marinos (Safi & Hall, 1999; A. Y. Tsai et al., 2007). Sin embargo, Cuevas & Morales (2006) observaron que los PNF disminuían más rápidamente que los HNF en la oxiclina. Además, Tsai & Mukhanov (2021) informaron resultados de experimentos de incubación que mostraban que las tasas de pastoreo de los nanoflagelados sobre *Synechococcus* eran significativamente menores en los tratamientos enriquecidos y que los nanoflagelados no aumentaban su tasa de pastoreo debido a la mayor abundancia y tasas de crecimiento de *Synechococcus*. Por lo tanto, es probable que exista una variabilidad vertical en los tipos de pastores protistas, así como en sus impactos, que pueden afectar de forma diferencial a los procariotas fotosintéticos, *Synechococcus* y *Prochlorococcus*. Asimismo, los cambios en la profundidad de la ZMO pueden permitir cambios verticales en el hábitat de las especies (Ulloa et al., 2001). Estos factores podrían dar lugar a un control descendente variable de los cambios verticales en la composición de la comunidad fitoplanctónica.

Otros factores relevantes que podrían cambiar la estructura del nanoplancton en la misma área geográfica han sido señalados por Herrera & Escribano (2006). Estos autores encontraron que la abundancia y composición de especies del fitoplancton estaba fuertemente correlacionada con la profundidad de la capa límite superior de la ZMO, que es una característica principal de la ZMO del norte de Chile, así como con la temperatura y estratificación de la columna de agua. De hecho, las aguas bien estratificadas suelen considerarse una condición perjudicial para las diatomeas, pero favorable para los pequeños flagelados nadadores (Fenchel & Finlay, 2008). Así, varias variables ambientales podrían interactuar con el O<sub>2</sub> y el pH para afectar al fitoplancton en las ZMO.

Alternativamente, el afloramiento de la ZMO a la zona fótica de la costa puede afectar al entorno químico (condiciones redox) en el que los nutrientes son reciclados y utilizados por las especies de fitoplancton. En la zona de afloramiento costero del norte de Chile, las aguas pobres en O<sub>2</sub> favorecen el proceso de desnitrificación y, por tanto, la presencia de amonio en lugar de nitrato, mientras que las condiciones bien oxigenadas pueden favorecer la nitrificación y, por tanto, el predominio de las formas oxidadas de nitrógeno (nitrato y nitrito) (Escribano et al., 2004; Medina Faull et al., 2020). Se ha sugerido que las diferentes formas de nitrógeno pueden inducir cambios en la composición de las especies debido a requerimientos específicos (Chisholm, 1992) Por lo tanto, la profundidad de la ZMO también puede afectar a la comunidad de pico-nanoplancton fototrófico indirectamente al modificar los nutrientes.

La caracterización de las condiciones ambientales y la química de los carbonatos en las ZMO y la distribución vertical de procariontas y eucariontas fotosintéticos son esenciales para predecir el impacto potencial de la expansión de las ZMO sobre la productividad oceánica y la bomba de carbono (Weber & Bianchi, 2020). Además, algunas de esas variables han sido identificadas como las más afectadas por el cambio climático antropogénico, concretamente la desoxigenación y la acidificación del océano (Caldeira & Wickett, 2003; Keeling et al., 2010). Estudios anteriores en esta zona ya han demostrado la acumulación de nitrito (>0,5 μmol kg<sup>-1</sup>) en aguas libres de O<sub>2</sub> entre 200 y 300 m de profundidad a lo largo de la costa (ca. 20-26 °S) (Canfield et al., 2010; Thamdrup et al., 2012), y recientemente este núcleo anóxico se ha caracterizado por condiciones de bajo pH y alto pCO<sub>2</sub> (pH < 7,5 y pCO<sub>2</sub> > 1200 μatm), lo que sitúa a esta región de la ZMO como uno de los sistemas más deficientes en O<sub>2</sub> y ácidos del mundo (Vargas et al., 2021).

Aunque la acidificación de los océanos puede tener efectos directos sobre los herbívoros, también induce cambios en el valor nutricional del fitoplancton que pueden transmitirse a la red trófica (Raven & Beardall, 2021). Finkel et al. (2010) sugiere que el aumento del CO<sub>2</sub> y el calentamiento con una mayor estratificación favorecerán a las células de fitoplancton más pequeñas. Hornick et al. (2017) demostró que la acidificación de los océanos altera las interacciones entre bacterias y fitoplancton cuando los nutrientes son limitantes. Aunque los cambios en la composición de la población son predecibles sobre la base de las

características de adquisición de CID de los organismos implicados (Tortell et al., 2002), hay excepciones como los estudios sobre el fitoplancton de agua dulce de (Verschoor et al., (2013) y Ji et al. (2017) en los que se demostró que la competencia por recursos como la luz favorecía a las cianobacterias frente a las clorófitas bajo CO<sub>2</sub> elevado. Meakin & Wyman (2011) examinó el efecto de la acidificación de los océanos en dos picoeucariotas planctónicas marinos, uno relacionado con *Micromonas* y el otro con *Bathycoccus*, en mesocosmos. *Bathycoccus* dominó el mesocosmos de CO<sub>2</sub> ambiental, y el número de células por volumen cambió poco con el aumento de CO<sub>2</sub>, por el contrario, el alga *Micromonas* mostró un aumento de 20 veces en el número de células por volumen en el aumento de CO<sub>2</sub> en relación con el tratamiento de CO<sub>2</sub> ambiental. Por lo tanto según Osma et al. (2020) no existe un consenso claro sobre qué grupos de fitoplancton se verán beneficiados en un ambiente con alto pCO<sub>2</sub>.

### **¿Las condiciones de bajo pH/bajo O<sub>2</sub> influyen en el fitoplancton?**

Existen pocos estudios que investiguen la interacción entre la baja concentración de O<sub>2</sub> y otros factores de estrés asociados a los cambios oceánicos globales centrados en la fotosíntesis del fitoplancton, los principales productores primarios y motores de la red trófica marina. Gao et al. (2019) realizó una revisión sobre la escasa documentación de la desoxigenación en los productores primarios en la que señala cuáles podrían ser los efectos y apunta que, teóricamente, los altos niveles de CO<sub>2</sub> y la disminución de la concentración de O<sub>2</sub> podrían potenciar selectivamente la carboxilación frente a la oxigenación catalizada por la ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa/oxigenasa y, por tanto, beneficiar a los autótrofos. Estos autores también mencionan que de todas las reacciones que consumen O<sub>2</sub>, sólo la reacción de Mehler y la glicolato oxidasa presentes en algas y cianobacterias tienen un K<sub>O</sub>,5 O<sub>2</sub> lo suficientemente alto como para verse afectadas por concentraciones de O<sub>2</sub> cercanas al equilibrio del aire. Otros experimentos anteriores que exponen al fitoplancton no calcificante a condiciones de pH bajo han evidenciado resultados contrastados (Berge et al., 2010; Hinga, 2002). No obstante, algunos estudios han evidenciado que las condiciones de pH bajo ( $\geq 7,7$ ) pueden perjudicar drásticamente las tasas de crecimiento, la composición de ácidos grasos, la

abundancia celular, la concentración de lípidos y el contenido de clorofila principalmente de diferentes tipos de fitoplancton (Jacob et al., 2017; Wang et al., 2017). Parte de la variabilidad entre los resultados experimentales sugiere respuestas específicas de las especies o de las poblaciones no resueltas, o podría estar relacionada con los métodos de manipulación del pH y del sistema de carbonatos en el laboratorio (Berge et al., 2010). Con respecto a esta última preocupación, en nuestro estudio, al burbujear una mezcla de gases de O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> y N<sub>2</sub>, redujimos la concentración de O<sub>2</sub>, lo que llevó a un aumento del CID, mientras que la alcalinidad se mantiene constante y el pH disminuye, imitando con precisión las condiciones de la ZMO.

Sun et al. (2022) exploró la relación entre el O<sub>2</sub> y la fotosíntesis in situ, los datos mostraron una correlación significativa entre una mayor eficiencia entre el uso de la luz fotosintética y un menor nivel de O<sub>2</sub> lo que sugería que el O<sub>2</sub> podría ser uno de los factores clave que influyen en la fotosíntesis y la producción primaria in situ, algo que rara vez se había considerado. Por ello realizaron un experimento en un mesocosmos al aire libre para comprobar la respuesta de un conjunto de fitoplancton costero natural a diferentes concentraciones de O<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub>, elegidos para imitar los efectos de la hipoxia y el alto CO<sub>2</sub> asociado al cambio climático. Los resultados arrojaron tasas fotosintéticas neta y brutas más altas en los sistemas con bajo nivel de O<sub>2</sub>, tanto en niveles de CO<sub>2</sub> ambiental como en los elevados, que en los niveles de O<sub>2</sub> ambiental, alcanzando máximos de Chl *a* al tercer día de haber iniciado el experimento. La comunidad fitoplanctónica al inicio del experimento estuvo dominada por diatomeas, criptófitas y prasinofitas, pero luego pasó a tener mayores proporciones de dinoflagelados y de las picocianobacterias *Synechococcus* cuando se agotaron los nutrientes, la misma tendencia se registró en el tratamiento de bajos nivel de O<sub>2</sub> y alto CO<sub>2</sub>, así como también en el tratamiento de bajo O<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub> ambiental.

La enzima central de la fotosíntesis, ribulosa-1,5-bifosfato carboxilasa/oxigenasa (Rubisco), posee actividades de carboxilación y oxigenación para fijar el CO<sub>2</sub> y consumir el O<sub>2</sub>, respectivamente, que actúan de forma competitiva entre sí, siendo la reacción de oxigenasa la que conduce a la fotorrespiración y a la pérdida de CO<sub>2</sub>. La expansión de las aguas hipóxicas puede, por lo tanto, alterar la dirección catalítica de la enzima al disminuir la

relación entre el O<sub>2</sub> y el CO<sub>2</sub>, favoreciendo la actividad carboxilasa y promoviendo la fotosíntesis. Con base en estos resultados realizaron cultivo en laboratorio para investigar el rendimiento fotosintético, la tasa de crecimiento y la eficiencia de los mecanismos de concentración de CO<sub>2</sub> (MCC) en la diatomea *Thalassiosira weissflogii* la cual presenta una distribución mundial, las incubaciones se realizaron con cuatro combinaciones de O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>. Los resultados de las incubaciones (bajo O<sub>2</sub>: ~ 58 μM; bajo pH<sub>T</sub>: 7.66 ± 0.01; T°: 20°C; Luz: 200 μmol fotones m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>; ciclo 12:12 luz: oscuridad) reafirmaron los datos obtenidos anteriormente, donde la reducción de los niveles de O<sub>2</sub> estimuló la tasa de crecimiento, mejoró el rendimiento fotosintético, pero redujo las tasas de respiración mitocondrial, así como la fotorrespiración asociada a la actividad de la Rubisco oxigenasa. Demostrando que los productores primarios se beneficiarían de concentraciones de O<sub>2</sub> reducidas. Incluso en condiciones de CO<sub>2</sub> elevado, la fotosíntesis potenciada por el O<sub>2</sub> puede acelerar potencialmente la "reoxigenación" en aguas iluminadas y, por tanto, puede aliviar los impactos de la disminución de O<sub>2</sub> en los animales. Los tratamientos realizados en el experimento con la diatomea requirieron dilución de las concentraciones celulares cada 24 horas junto con una agitación suave cada 2 horas para evitar la sedimentación, esto no se realizó en el experimento con *Imantonia sp.*

Los resultados del experimento con *Imantonia sp.* fueron opuestos a lo descrito anteriormente debido a que indicaron un fuerte impacto negativo de las condiciones de bajo pH/bajo O<sub>2</sub> en el Haptofito fototrófico *Imantonia sp.*, una cepa que fue aislada de las aguas superficiales que recubren las aguas de la ZMO del norte de Chile. Esta cepa no sobrevivió ni realizó la fotosíntesis en tales condiciones. Estos resultados demuestran que otros experimentos de este tipo podrían ser fructíferos para entender el impacto de las condiciones de bajo pH/bajo O<sub>2</sub> en el fitoplancton.

## 6 CONCLUSIONES

1. Los factores físico-químicos que mejor se asociaron con la distribución del pico-nanoplancton fototrófico fueron la temperatura, O<sub>2</sub>, y el sistema de carbonatos (pH, CID).
2. Los factores físico-químicos mejor correlacionado sugieren que las condiciones de bajo pH/bajo O<sub>2</sub> también pueden tener un impacto diferencial en la distribución vertical del fitoplancton.
3. El efecto combinado de bajo pH/bajo O<sub>2</sub>, impidió la supervivencia de *Imantonia sp.* que es un organismo que habita en la capa de mezcla de sobre la ZMO, en experimento de corta duración (6 días).
4. Teniendo en cuenta el reto impuesto por la actual desoxigenación y la acidificación de los océanos, esta posibilidad, que fue apoyada por un experimento de incubación de prueba de concepto con un representante de las comunidades locales de fitoplancton por encima de la oxiclina, merece una atención futura tanto a través del trabajo de campo como de experimentos específicos que imiten las condiciones de pH y O<sub>2</sub> en la región superior de la ZMO a las que pueden estar expuestas estas poblaciones.

## 7 REFERENCIAS

- Ahlgren, N. A., & Rocap, G. (2006). Culture isolation and culture-independent clone libraries reveal new marine *Synechococcus* ecotypes with distinctive light and N physiologies. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(11), 7193–7204. <https://doi.org/10.1128/AEM.00358-06>
- Aldunate, M., De la Iglesia, R., Bertagnolli, A. D., & Ulloa, O. (2018). Oxygen modulates bacterial community composition in the coastal upwelling waters off central Chile. *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography*, 156(February), 68–79. <https://doi.org/10.1016/j.dsr2.2018.02.001>
- Allen, A. P., Gillooly, J. F., & Brown, J. H. (2005). Linking the global carbon cycle to individual metabolism. *Functional Ecology*, 19(2), 202–213. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2435.2005.00952.x>
- Anderson, J. J., Okubo, A., Robbins, A. S., & Richards, F. A. (1982). A model for nitrate distributions in oceanic oxygen minimum zones. *Deep Sea Research Part A. Oceanographic Research Papers*, 29(9), 1113–1140. [https://doi.org/10.1016/0198-0149\(82\)90031-0](https://doi.org/10.1016/0198-0149(82)90031-0)
- Arévalo-Martínez, D. L., Kock, A., Löscher, C. R., Schmitz, R. A., & Bange, H. W. (2015). Massive nitrous oxide emissions from the tropical South Pacific Ocean. *Nature Geoscience*, 8(7), 530–533. <https://doi.org/10.1038/ngeo2469>
- Astorga-Eló, M., Ramírez-Flandes, S., DeLong, E. F., & Ulloa, O. (2015). Genomic potential for nitrogen assimilation in uncultivated members of *Prochlorococcus* from an anoxic marine zone. *The ISME Journal*, 9(5), 1264–1267. <https://doi.org/10.1038/ismej.2015.21>
- Auger, P. A., Bento, J. P., Hormazabal, S., Morales, C. E., & Bustamante, A. (2021). Mesoscale Variability in the Boundaries of the Oxygen Minimum Zone in the Eastern South Pacific: Influence of Intrathermocline Eddies. *Journal of Geophysical Research: Oceans*, 126(2), 1–21. <https://doi.org/10.1029/2019JC015272>
- Bach, L. T., Alvarez-Fernandez, S., Hornick, T., Stuhr, A., & Riebesell, U. (2017). Simulated ocean acidification reveals winners and losers in coastal phytoplankton. *PLoS ONE*,



12(11), 1–22. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0188198>

- Bach, W. (1979). Impact of increasing atmospheric CO<sub>2</sub> concentrations on global climate: Potential consequences and corrective measures. *Environment International*, 2(4–6), 215–228. [https://doi.org/10.1016/0160-4120\(79\)90004-7](https://doi.org/10.1016/0160-4120(79)90004-7)
- Backe-Hansen, P., & Thronsen, J. (2002). Occurrence of pico- and smaller nanoplanktonic flagellates in the inner Oslofjord, eastern Norway, during the breeding season of the blue mussel (*Mytilus edulis* L.). *Sarsia*, 87(1), 65–74. <https://doi.org/10.1080/003648202753631749>
- Balzano, S., Gourvil, P., Siano, R., Chanoine, M., Marie, D., Lessard, S., Sarno, D., & Vaultot, D. (2012). Diversity of cultured photosynthetic flagellates in the northeast Pacific and Arctic Oceans in summer. *Biogeosciences*, 9(11), 4553–4571. <https://doi.org/10.5194/bg-9-4553-2012>
- Berge, T., Daugbjerg, N., Balling Andersen, B., & Hansen, P. (2010). Effect of lowered pH on marine phytoplankton growth rates. *Marine Ecology Progress Series*, 416(June 2014), 79–91. <https://doi.org/10.3354/meps08780>
- Bertagnolli, A. D., & Stewart, F. J. (2018). Microbial niches in marine oxygen minimum zones. *Nature Reviews Microbiology*, 16(12), 723–729. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0087-z>
- Bouman, H. A., Ulloa, O., Scanlan, D. J., Zwirgmaier, K., Li, W. K. W., Platt, T., Stuart, V., Barlow, R., Leth, O., Clementson, L., Lutz, V., Fukasawa, M., Watanabe, S., & Sathyendranath, S. (2006). Oceanographic Basis of the Global Surface Distribution of Prochlorococcus Ecotypes. *Science*, 312(5775), 918–921. <https://doi.org/10.1126/science.1122692>
- Breitburg, D., Levin, L. A., Oschlies, A., Grégoire, M., Chavez, F. P., Conley, D. J., Garçon, V., Gilbert, D., Gutiérrez, D., Isensee, K., Jacinto, G. S., Limburg, K. E., Montes, I., Naqvi, S. W. A., Pitcher, G. C., Rabalais, N. N., Roman, M. R., Rose, K. A., Seibel, B. A., ... Zhang, J. (2018). Declining oxygen in the global ocean and coastal waters. *Science*, 359(6371), eaam7240. <https://doi.org/10.1126/science.aam7240>
- Brennan, G., & Collins, S. (2015). Growth responses of a green alga to multiple environmental

- drivers. *Nature Climate Change*, 5(9), 892–897. <https://doi.org/10.1038/nclimate2682>
- Brewer, P. G., & Peltzer, E. T. (2009). Limits to marine life. *Science*, 324(5925), 347–348. <https://doi.org/10.1126/science.1170756>
- Buitenhuis, E. T., Li, W. K. W., Vaultot, D., Lomas, M. W., Landry, M. R., Partensky, F., Karl, D. M., Ulloa, O., Campbell, L., Jacquet, S., Lantoine, F., Chavez, F., Macias, D., Gosselin, M., & McManus, G. B. (2012). Picophytoplankton biomass distribution in the global ocean. *Earth System Science Data*, 4(1), 37–46. <https://doi.org/10.5194/essd-4-37-2012>
- Caldeira, K., & Wickett, M. E. (2003). Anthropogenic carbon and ocean pH. *Nature*, 425(6956), 365–365. <https://doi.org/10.1038/425365a>
- Callbeck, C. M., Lavik, G., Stramma, L., Kuypers, M. M. M., & Bristow, L. A. (2017). Enhanced Nitrogen Loss by Eddy-Induced Vertical Transport in the Offshore Peruvian Oxygen Minimum Zone. *PLOS ONE*, 12(1), e0170059. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0170059>
- Callbeck, C. M., Lavik, G., Ferdelman, T. G., Fuchs, B., Gruber-Vodicka, H. R., Hach, P. F., Littmann, S., Schoffelen, N. J., Kalvelage, T., Thomsen, S., Schunck, H., Löscher, C. R., Schmitz, R. A., & Kuypers, M. M. M. (2018). Oxygen minimum zone cryptic sulfur cycling sustained by offshore transport of key sulfur oxidizing bacteria. *Nature Communications*, 9(1), 1729. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-04041-x>
- Canfield, D. E., Stewart, F. J., Thamdrup, B., De Brabandere, L., Dalsgaard, T., Delong, E. F., Revsbech, N. P., & Ulloa, O. (2010). A Cryptic Sulfur Cycle in Oxygen-Minimum-Zone Waters off the Chilean Coast. *Science*, 330(6009), 1375–1378. <https://doi.org/10.1126/science.1196889>
- Caron, D., Lim, E., Miceli, G., Waterbury, J., & Valois, F. (1991). Grazing and utilization of chroococcoid cyanobacteria and heterotrophic bacteria by protozoa in laboratory cultures and a coastal plankton community. *Marine Ecology Progress Series*, 76(3), 205–217. <https://doi.org/10.3354/meps076205>
- Chisholm, S. W. (1992). Phytoplankton Size. In *Primary Productivity and Biogeochemical Cycles in the Sea* (Vol. 02139, Issue 1974, pp. 213–237). Springer US.

[https://doi.org/10.1007/978-1-4899-0762-2\\_12](https://doi.org/10.1007/978-1-4899-0762-2_12)

- Codispoti, L. A., Brandes, J. A., Christensen, J. P., Devol, A. H., Naqvi, S. W. A., Paerl, H. W., & Yoshinari, T. (2001). The oceanic fixed nitrogen and nitrous oxide budgets: Moving targets as we enter the anthropocene? *Scientia Marina*, 65(S2), 85–105. <https://doi.org/10.3989/scimar.2001.65s285>
- Collado-Fabbri, S., Vaultot, D., & Ulloa, O. (2011). Structure and seasonal dynamics of the eukaryotic picophytoplankton community in a wind-driven coastal upwelling ecosystem. *Limnology and Oceanography*, 56(6), 2334–2346. <https://doi.org/10.4319/lo.2011.56.6.2334>
- Collins, S., Rost, B., & Rynearson, T. A. (2014). Evolutionary potential of marine phytoplankton under ocean acidification. *Evolutionary Applications*, 7(1), 140–155. <https://doi.org/10.1111/eva.12120>
- Cornejo, M., & Farías, L. (2012). Meridional variability of the vertical structure and air–sea fluxes of N<sub>2</sub>O off central Chile (30–40°S). *Progress in Oceanography*, 92–95, 33–42. <https://doi.org/10.1016/j.pocean.2011.07.016>
- Cuevas, L. A., Daneri, G., Jacob, B., & Montero, P. (2004). Microbial abundance and activity in the seasonal upwelling area off Concepción (~36°S), central Chile: a comparison of upwelling and non-upwelling conditions. *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography*, 51(20–21), 2427–2440. <https://doi.org/10.1016/j.dsr2.2004.07.026>
- Cuevas, L. A., & Morales, C. E. (2006). Nanoheterotroph grazing on bacteria and cyanobacteria in oxic and suboxic waters in coastal upwelling areas off northern Chile. *Journal of Plankton Research*, 28(4), 385–397. <https://doi.org/10.1093/plankt/fbi124>
- De la Iglesia, R., Echenique-Subiabre, I., Rodríguez-Marconi, S., Espinoza, J. P., von Dassow, P., Ulloa, O., & Trefault, N. (2020). Distinct oxygen environments shape picoeukaryote assemblages thriving oxygen minimum zone waters off central Chile. *Journal of Plankton Research*, 42(5), 514–529. <https://doi.org/10.1093/plankt/fbaa036>
- Dickson, A.G., & Millero, F. J. (1987). A comparison of the equilibrium constants for the dissociation of carbonic acid in seawater media. *Deep Sea Research Part A. Oceanographic Research Papers*, 34(10), 1733–1743. <https://doi.org/10.1016/0198->

0149(87)90021-5

- Dickson, A G, Sabine, C. L., & Christian, J. R. (2007). Guide to Best Practices for Ocean CO<sub>2</sub> measurements. PICES Special Publication. In *Guide to Best Practices for Ocean CO<sub>2</sub> measurements. PICES Special Publication* (Vol. 3, Issue 8).
- Dickson, Andrew G. (1990). Standard potential of the reaction: , and and the standard acidity constant of the ion HSO<sub>4</sub><sup>-</sup> in synthetic sea water from 273.15 to 318.15 K. *The Journal of Chemical Thermodynamics*, 22(2), 113–127. [https://doi.org/10.1016/0021-9614\(90\)90074-Z](https://doi.org/10.1016/0021-9614(90)90074-Z)
- Díez, B., Pedrós-Alió, C., & Massana, R. (2001). Study of Genetic Diversity of Eukaryotic Picoplankton in Different Oceanic Regions by Small-Subunit rRNA Gene Cloning and Sequencing. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(7), 2932–2941. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.7.2932-2941.2001>
- Donahue, K., Klaas, C., Dillingham, P. W., & Hoffmann, L. J. (2019). Combined effects of ocean acidification and increased light intensity on natural phytoplankton communities from two Southern Ocean water masses. *Journal of Plankton Research*, 41(1), 30–45. <https://doi.org/10.1093/plankt/fby048>
- Dore, J. E., Lukas, R., Sadler, D. W., Church, M. J., & Karl, D. M. (2009). Physical and biogeochemical modulation of ocean acidification in the central North Pacific. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(30), 12235–12240. <https://doi.org/10.1073/pnas.0906044106>
- Eikrem, W., Medlin, L. K., Henderiks, J., Rokitta, S., Rost, B., Probert, I., & Throndsen, J. (2017). Handbook of the Protists. In J. M. Archibald, A. G. B. Simpson, C. H. Slamovits, L. Margulis, M. Melkonian, D. J. Chapman, & J. O. Corliss (Eds.), *Handbook of the Protists*. Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-32669-6>
- Emerson, S., Watanabe, Y. W., Ono, T., & Mecking, S. (2004). Temporal trends in apparent oxygen utilization in the upper pycnocline of the North Pacific: 1980-2000. *Journal of Oceanography*, 60(1), 139–147. <https://doi.org/10.1023/B:JOCE.0000038323.62130.a0>
- Escribano, R., Daneri, G., Farías, L., Gallardo, V. A., González, H. E., Gutiérrez, D., Lange, C. B., Morales, C. E., Pizarro, O., Ulloa, O., & Braun, M. (2004). Biological and

- chemical consequences of the 1997–1998 El Niño in the Chilean coastal upwelling system: a synthesis. *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography*, 51(20–21), 2389–2411. <https://doi.org/10.1016/j.dsr2.2004.08.011>
- Falkowski, P. G., & Raven, J. A. (2007). *Aquatic Photosynthesis* (Issue June). Princeton University Press. <https://doi.org/10.1515/9781400849727>
- Fenchel, T., & Finlay, B. (2008). Oxygen and the Spatial Structure of Microbial Communities. *Biological Reviews*, 83(4), 553–569. <https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.2008.00054.x>
- Feng, Y., Hare, C. E., Rose, J. M., Handy, S. M., DiTullio, G. R., Lee, P. A., Smith, W. O., Peloquin, J., Tozzi, S., Sun, J., Zhang, Y., Dunbar, R. B., Long, M. C., Sohst, B., Lohan, M., & Hutchins, D. A. (2010). Interactive effects of iron, irradiance and CO<sub>2</sub> on Ross Sea phytoplankton. *Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers*, 57(3), 368–383. <https://doi.org/10.1016/j.dsr.2009.10.013>
- Feng, Y., Chai, F., Wells, M. L., Liao, Y., Li, P., Cai, T., Zhao, T., Fu, F., & Hutchins, D. A. (2021). The Combined Effects of Increased pCO<sub>2</sub> and Warming on a Coastal Phytoplankton Assemblage: From Species Composition to Sinking Rate. *Frontiers in Marine Science*, 8(March), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fmars.2021.622319>
- Findlay, D. L., Kasian, S. E. M., Stainton, M. P., Beaty, K., & Lyng, M. (2001). Climatic influences on algal populations of boreal forest lakes in the Experimental Lakes Area. *Limnology and Oceanography*, 46(7), 1784–1793. <https://doi.org/10.4319/lo.2001.46.7.1784>
- Finkel, Z. V., Beardall, J., Flynn, K. J., Quigg, A., Rees, T. A. V., & Raven, J. A. (2010). Phytoplankton in a changing world: Cell size and elemental stoichiometry. *Journal of Plankton Research*, 32(1), 119–137. <https://doi.org/10.1093/plankt/fbp098>
- Flombaum, P., Gallegos, J. L., Gordillo, R. A., Rincón, J., Zabala, L. L., Jiao, N., Karl, D. M., Li, W. K. W., Lomas, M. W., Veneziano, D., Vera, C. S., Vrugt, J. A., & Martiny, A. C. (2013). Present and future global distributions of the marine Cyanobacteria Prochlorococcus and Synechococcus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(24), 9824–9829. <https://doi.org/10.1073/pnas.1307701110>

- Fu, F.-X., Warner, M. E., Zhang, Y., Feng, Y., & Hutchins, D. A. (2007). Effects of increased temperature and CO<sub>2</sub> on photosynthesis, growth, and elemental ratios in marine *synechococcus* and *Prochlorococcus*(Cyanobacteria). *Journal of Phycology*, 43(3), 485–496. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2007.00355.x>.
- Fuenzalida, R., Schneider, W., Garcés-Vargas, J., Bravo, L., & Lange, C. (2009). Vertical and horizontal extension of the oxygen minimum zone in the eastern South Pacific Ocean. *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography*, 56(16), 992–1003. <https://doi.org/10.1016/j.dsr2.2008.11.001>
- Galán, A., Molina, V., Thamdrup, B., Woebken, D., Lavik, G., Kuypers, M. M. M., & Ulloa, O. (2009). Anammox bacteria and the anaerobic oxidation of ammonium in the oxygen minimum zone off northern Chile. *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography*, 56(16), 1021–1031. <https://doi.org/10.1016/j.dsr2.2008.09.016>
- Ganesh, S., Parris, D. J., DeLong, E. F., & Stewart, F. J. (2014). Metagenomic analysis of size-fractionated picoplankton in a marine oxygen minimum zone. *The ISME Journal*, 8(1), 187–211. <https://doi.org/10.1038/ismej.2013.144>.
- Gao, K., Beardall, J., Häder, D.-P., Hall-Spencer, J. M., Gao, G., & Hutchins, D. A. (2019). Effects of Ocean Acidification on Marine Photosynthetic Organisms Under the Concurrent Influences of Warming, UV Radiation, and Deoxygenation. *Frontiers in Marine Science*, 6(JUN), 1–18. <https://doi.org/10.3389/fmars.2019.00322>
- Gérikas Ribeiro, C., Lopes dos Santos, A., Marie, D., Helena Pellizari, V., Pereira Brandini, F., & Vaultot, D. (2016). Pico and nanoplankton abundance and carbon stocks along the Brazilian Bight. *PeerJ*, 4(11), e2587. <https://doi.org/10.7717/peerj.2587>
- Gilly, W. F., Beman, J. M., Litvin, S. Y., & Robison, B. H. (2013). Oceanographic and Biological Effects of Shoaling of the Oxygen Minimum Zone. *Annual Review of Marine Science*, 5(1), 393–420. <https://doi.org/10.1146/annurev-marine-120710-100849>
- Goericke, R., Olson, R. ., & Shalapyonok, A. (2000). A novel niche for *Prochlorococcus* sp. in low-light suboxic environments in the Arabian Sea and the Eastern Tropical North Pacific. *Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers*, 47(7), 1183–1205. [https://doi.org/10.1016/S0967-0637\(99\)00108-9](https://doi.org/10.1016/S0967-0637(99)00108-9)

- Gregg, W. W., & Rousseaux, C. S. (2019). Global ocean primary production trends in the modern ocean color satellite record (1998–2015). *Environmental Research Letters*, *14*(12), 124011. <https://doi.org/10.1088/1748-9326/ab4667>
- Gruber, N. (2011). Warming up, turning sour, losing breath: ocean biogeochemistry under global change. *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, *369*(1943), 1980–1996. <https://doi.org/10.1098/rsta.2011.0003>
- Gruber, N., & Galloway, J. N. (2008). An Earth-system perspective of the global nitrogen cycle. *Nature*, *451*(7176), 293–296. <https://doi.org/10.1038/nature06592>
- Harvey, B. P., Kon, K., Agostini, S., Wada, S., & Hall-Spencer, J. M. (2021). Ocean acidification locks algal communities in a species-poor early successional stage. *Global Change Biology*, *27*(10), 2174–2187. <https://doi.org/10.1111/gcb.15455>
- Hedges, S. B., Kumar, S. (2009). Discovering the timetree of life. Pp. 3-18 in *The Timetree of Life*, S. B. Hedges and S. Kumar, Eds. (Oxford University Press, New York, 2009).
- Helly, J. J., & Levin, L. A. (2004). Global distribution of naturally occurring marine hypoxia on continental margins. *Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers*, *51*(9), 1159–1168. <https://doi.org/10.1016/j.dsr.2004.03.009>
- Herrera, L., & Escribano, R. (2006). Factors structuring the phytoplankton community in the upwelling site off El Loa River in northern Chile. *Journal of Marine Systems*, *61*(1–2), 13–38. <https://doi.org/10.1016/j.jmarsys.2005.11.010>
- Hinga, K. (2002). Effects of pH on coastal marine phytoplankton. *Marine Ecology Progress Series*, *238*, 281–300. <https://doi.org/10.3354/meps238281>
- Hoppe, C. J. M., Langer, G., & Rost, B. (2011). *Emiliana huxleyi* shows identical responses to elevated pCO<sub>2</sub> in TA and DIC manipulations. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, *406*(1–2), 54–62. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2011.06.008>
- Hornick, T., Bach, L. T., Crawford, K. J., Spilling, K., Achterberg, E. P., Woodhouse, J. N., Schulz, K. G., Brussaard, C. P. D., Riebesell, U., & Grossart, H.-P. (2017). Ocean acidification impacts bacteria–phytoplankton coupling at low-nutrient conditions. *Biogeosciences*, *14*(1), 1–15. <https://doi.org/10.5194/bg-14-1-2017>

- Hutchins, D. A., Fu, F.-X., Zhang, Y., Warner, M. E., Feng, Y., Portune, K., Mulholland, M. R. (2007). CO<sub>2</sub> control of *Trichodesmium* N<sub>2</sub> fixation, photosynthesis, growth rates, and elemental ratios: Implications for past, present, and future ocean biogeochemistry. *Limnology and Oceanography*, 52(4), 1293–1304. doi:10.4319/lo.2007.52.4.1293
- Huisman, J., Pham Thi, N. N., Karl, D. M., & Sommeijer, B. (2006). Reduced mixing generates oscillations and chaos in the oceanic deep chlorophyll maximum. *Nature*, 439(7074), 322–325. <https://doi.org/10.1038/nature04245>
- Huisman, J., Sharples, J., Stroom, J. M., Visser, P. M., Kardinaal, W. E. A., Verspagen, J. M. H., & Sommeijer, B. (2004). Changes in turbulent mixing shift competition for light between phytoplankton species. *Ecology*, 85(11), 2960–2970. <https://doi.org/10.1890/03-0763>
- Iglesias-Rodriguez, M. D., Halloran, P. R., Rickaby, R. E. M., Hall, I. R., Colmenero-Hidalgo, E., Gittins, J. R., Green, D. R. H., Tyrrell, T., Gibbs, S. J., von Dassow, P., Rehm, E., Armbrust, E. V., & Boessenkool, K. P. (2008). Phytoplankton Calcification in a High-CO<sub>2</sub> World. *Science*, 320(5874), 336–340. <https://doi.org/10.1126/science.1154122>
- Ito, T., Minobe, S., Long, M. C., & Deutsch, C. (2017). Upper ocean O<sub>2</sub> trends: 1958–2015. *Geophysical Research Letters*, 44(9), 4214–4223. <https://doi.org/10.1002/2017GL073613>
- Jacob, B. G., Dassow, P. V. O. N., Salisbury, J. E., Navarro, J. M., & Vargas, C. A. (2017). Impact of low pH/high pCO<sub>2</sub> on the physiological response and fatty acid content in diatom *Skeletonema pseudocostatum*. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 97(2), 225–233. <https://doi.org/10.1017/S0025315416001570>
- Ji, X., Verspagen, J. M. H., Stomp, M., & Huisman, J. (2017). Competition between cyanobacteria and green algae at low versus elevated CO<sub>2</sub>: who will win, and why? *Journal of Experimental Botany*, 68(14), 3815–3828. <https://doi.org/10.1093/jxb/erx027>
- Johnson, P. W., & Sieburth, J. M. (1979). Chroococcoid cyanobacteria in the sea: A ubiquitous and diverse phototrophic biomass. *Limnology and Oceanography*, 24(5), 928–935. <https://doi.org/10.4319/lo.1979.24.5.0928>
- Jordan, R. W., & Chamberlain, A. H. L. (1997). Biodiversity among haptophyte algae. *Biodiversity and Conservation*, 6(1), 131–152. <https://doi.org/10.1023/A:1018383817777>



- Kalvelage, T., Jensen, M. M., Contreras, S., Revsbech, N. P., Lam, P., Günter, M., LaRoche, J., Lavik, G., & Kuypers, M. M. M. (2011). Oxygen Sensitivity of Anammox and Coupled N-Cycle Processes in Oxygen Minimum Zones. *PLoS ONE*, 6(12), e29299. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0029299>
- Kämpf, J., & Chapman, P. (2016). Upwelling Systems of the World. In *Upwelling Systems of the World: A Scientific Journey to the Most Productive Marine Ecosystems* (Issue 1987). Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-42524-5>
- Karstensen, J., Stramma, L., & Visbeck, M. (2008). Oxygen minimum zones in the eastern tropical Atlantic and Pacific oceans. *Progress in Oceanography*, 77(4), 331–350. <https://doi.org/10.1016/j.pocean.2007.05.009>
- Keeling RF. (1988). Development of an interferometric oxygen analyzer for precise measurement of the atmospheric O<sub>2</sub> mole fraction. PhD thesis. Cambridge: Harvard University. 178 pp.
- Keeling, R. F., Körtzinger, A., & Gruber, N. (2010). Ocean Deoxygenation in a Warming World. *Annual Review of Marine Science*, 2(1), 199–229. <https://doi.org/10.1146/annurev.marine.010908.163855>
- Lagos, N., Benítez, S., Duarte, C., Lardies, M., Broitman, B., Tapia, C., Tapia, P., Widdicombe, S., & Vargas, C. (2016). Effects of temperature and ocean acidification on shell characteristics of *Argopecten purpuratus*: implications for scallop aquaculture in an upwelling-influenced area. *Aquaculture Environment Interactions*, 8(Ipcc 2014), 357–370. <https://doi.org/10.3354/aei00183>
- Lam, P., & Kuypers, M. M. M. (2011). Microbial nitrogen cycling processes in oxygen minimum zones. *Annual Review of Marine Science*, 3, 317–345. <https://doi.org/10.1146/annurev-marine-120709-142814>
- Lam, P., Lavik, G., Jensen, M. M., Van Vossenberg, J. De, Schmid, M., Woebken, D., Gutiérrez, D., Amann, R., Jetten, M. S. M., & Kuypers, M. M. M. (2009). Revising the nitrogen cycle in the Peruvian oxygen minimum zone. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(12), 4752–4757. <https://doi.org/10.1073/pnas.0812444106>

- Lavin, P., González, B., Santibáñez, J. F., Scanlan, D. J., & Ulloa, O. (2010). Novel lineages of *Prochlorococcus* thrive within the oxygen minimum zone of the eastern tropical South Pacific. *Environmental Microbiology Reports*, 2(6), 728–738. <https://doi.org/10.1111/j.1758-2229.2010.00167.x>
- Lee Chang, K. J., Dunstan, G. A., Mansour, M. P., Jameson, I. D., & Nichols, P. D. (2016). A novel series of C18–C22 trans  $\omega$ 3 PUFA from Northern and Southern Hemisphere strains of the marine haptophyte *Imantonia rotunda*. *Journal of Applied Phycology*, 28(6), 3363–3370. <https://doi.org/10.1007/s10811-016-0906-4>
- Levin, L. (2002). Deep-Ocean Life Where Oxygen Is Scarce. *American Scientist*, 90(5), 436. <https://doi.org/10.1511/2002.33.756>
- Levin, L. A. (2018). Manifestation, Drivers, and Emergence of Open Ocean Deoxygenation. *Annual Review of Marine Science*, 10(1), 229–260. <https://doi.org/10.1146/annurev-marine-121916-063359>
- Lewandowska, A., & Sommer, U. (2010). Climate change and the spring bloom: a mesocosm study on the influence of light and temperature on phytoplankton and mesozooplankton. *Marine Ecology Progress Series*, 405(August 2014), 101–111. <https://doi.org/10.3354/meps08520>
- Linacre, L. P., Landry, M. R., Lara-Lara, J. R., Hernandez-Ayon, J. M., & Bazan-Guzman, C. (2010). Picoplankton dynamics during contrasting seasonal oceanographic conditions at a coastal upwelling station off Northern Baja California, Mexico. *Journal of Plankton Research*, 32(4), 539–557. <https://doi.org/10.1093/plankt/fbp148>
- Livingstone, D. M. (2003). Impact of Secular Climate Change on the Thermal Structure of a Large Temperate Central European Lake. *Climatic Change*, 57(1/2), 205–225. <https://doi.org/10.1023/A:1022119503144>
- Lomas, M. W., Hopkinson, B. M., Losh, J. L., Ryan, D. E., Shi, D. L., Xu, Y., et al. (2012). Effect of ocean acidification on cyanobacteria in the subtropical North Atlantic. *Aquat. Microb. Ecol.* 66, 211–222. doi: 10.3354/ame01576
- Long, A. M., Jurgensen, S. K., Petchel, A. R., Savoie, E. R., & Brum, J. R. (2021). Microbial Ecology of Oxygen Minimum Zones Amidst Ocean Deoxygenation. *Frontiers in*

- Microbiology*, 12(October), 1–18. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.748961>
- Long, M. C., Deutsch, C., & Ito, T. (2016). Finding forced trends in oceanic oxygen. *Global Biogeochemical Cycles*, 30(2), 381–397. <https://doi.org/10.1002/2015GB005310>
- López-García, P., Rodríguez-Valera, F., Pedrós-Alió, C., & Moreira, D. (2001). Unexpected diversity of small eukaryotes in deep-sea Antarctic plankton. *Nature*, 409(6820), 603–607. <https://doi.org/10.1038/35054537>
- López-García, P., Vereshchaka, A., & Moreira, D. (2007). Eukaryotic diversity associated with carbonates and fluid-seawater interface in Lost City hydrothermal field. *Environmental Microbiology*, 9(2), 546–554. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2006.01158.x>
- Mackey, K., Morris, J. J., Morel, F., & Kranz, S. (2015). Response of Photosynthesis to Ocean Acidification. *Oceanography*, 25(2), 74–91. <https://doi.org/10.5670/oceanog.2015.33>
- Marie, D., Partensky, F., Jacquet, S., & Vaultot, D. (1997). Enumeration and Cell Cycle Analysis of Natural Populations of Marine Picoplankton by Flow Cytometry Using the Nucleic Acid Stain SYBR Green I. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(1), 186–193. <https://doi.org/10.1128/aem.63.1.186-193.1997>
- Marie, D., Pierre, U., Curie, M., Simon, N., & Vaultot, D. (2005). *Algae Culturing Techniques Chapter 17: Phytoplankton Cell Counting by Flow Cytometry*. 1–15.
- Maßmig, M., Lüdke, J., Krahnemann, G., & Engel, A. (2020). Bacterial degradation activity in the eastern tropical South Pacific oxygen minimum zone. *Biogeosciences*, 17(1), 215–230. <https://doi.org/10.5194/bg-17-215-2020>
- Meakin, N. G., & Wyman, M. (2011). Rapid shifts in picoeukaryote community structure in response to ocean acidification. *The ISME Journal*, 5(9), 1397–1405. <https://doi.org/10.1038/ismej.2011.18>
- Medina Faull, L., Mara, P., Taylor, G. T., & Edgcomb, V. P. (2020). Imprint of Trace Dissolved Oxygen on Prokaryoplankton Community Structure in an Oxygen Minimum Zone. *Frontiers in Marine Science*, 7(May), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fmars.2020.00360>
- Medina, L. E., Taylor, C. D., Pachiadaki, M. G., Henríquez-Castillo, C., Ulloa, O., &

- Edgcomb, V. P. (2017). A Review of Protist Grazing Below the Photic Zone Emphasizing Studies of Oxygen-Depleted Water Columns and Recent Applications of In situ Approaches. *Frontiers in Marine Science*, 4(APR). <https://doi.org/10.3389/fmars.2017.00105>
- Mehrbach, C., Culbertson, C. H., Hawley, J. E., & Pytkowicz, R. M. (1973). Measurement of the apparent dissociation constants of carbonic acid in seawater at atmospheric pressure. *Limnology and Oceanography*, 18(6), 897–907. <https://doi.org/10.4319/lo.1973.18.6.0897>
- Melzner, F., Mark, F. C., Seibel, B. A., & Tomanek, L. (2020). Ocean Acidification and Coastal Marine Invertebrates: Tracking CO<sub>2</sub> Effects from Seawater to the Cell. *Annual Review of Marine Science*, 12(1), 499–523. <https://doi.org/10.1146/annurev-marine-010419-010658>
- Melzner, F., Thomsen, J., Koeve, W., Oeschlies, A., Gutowska, M. A., Bange, H. W., Hansen, H. P., & Körtzinger, A. (2013). Future ocean acidification will be amplified by hypoxia in coastal habitats. *Marine Biology*, 160(8), 1875–1888. <https://doi.org/10.1007/s00227-012-1954-1>
- Moffitt, S. E., Moffitt, R. A., Sauthoff, W., Davis, C. V., Hewett, K., & Hill, T. M. (2015). Paleooceanographic insights on recent oxygen minimum zone expansion: Lessons for modern oceanography. *PLoS ONE*, 10(1), 1–39. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0115246>
- Moon-van der Staay, S. Y., De Wachter, R., & Vaultot, D. (2001). Oceanic 18S rDNA sequences from picoplankton reveal unsuspected eukaryotic diversity. *Nature*, 409(6820), 607–610. <https://doi.org/10.1038/35054541>
- Molina, V., & Farías, L. (2009). Aerobic ammonium oxidation in the oxycline and oxygen minimum zone of the eastern tropical South Pacific off northern Chile (~20°S). *Deep-Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography*, 56(16), 1032–1041. <https://doi.org/10.1016/j.dsr2.2008.09.006>
- Moon-van der Staay, S. Y., van der Staay, G. W. M., Guillou, L., Vaultot, D., Claustre, H., & Medlin, L. K. (2000). Abundance and diversity of prymnesiophytes in the picoplankton

- community from the equatorial Pacific Ocean inferred from 18S rDNA sequences. *Limnology and Oceanography*, 45(1), 98–109. <https://doi.org/10.4319/lo.2000.45.1.0098>
- Moore, L. R., Rocap, G., & Chisholm, S. W. (1998). Physiology and molecular phylogeny of coexisting *Prochlorococcus* ecotypes. *Nature*, 393(6684), 464–467. <https://doi.org/10.1038/30965>
- Morales, C. E., Blanco, J. L., Braun, M., Reyes, H., & Silva, N. (1996). Chlorophyll-a distribution and associated oceanographic conditions in the upwelling region off northern Chile during the winter and spring 1993. *Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers*, 43(3), 267–289. [https://doi.org/10.1016/0967-0637\(96\)00015-5](https://doi.org/10.1016/0967-0637(96)00015-5)
- Morán, X. (2007). Annual cycle of picophytoplankton photosynthesis and growth rates in a temperate coastal ecosystem: a major contribution to carbon fluxes. *Aquatic Microbial Ecology*, 49(3), 267–279. <https://doi.org/10.3354/ame01151>
- Mou, S., Zhang, Y., Li, G., Li, H., Liang, Y., Tang, L., Jiao, N. (2017). Effects of elevated CO<sub>2</sub> and nitrogen supply on the growth and photosynthetic physiology of a marine cyanobacterium, *Synechococcus* sp. PCC7002. *Journal of Applied Phycology*, 29(4), 1755–1763. doi:10.1007/s10811-017-1089-3
- Not, F., Gausling, R., Azam, F., Heidelberg, J. F., & Worden, A. Z. (2007). Vertical distribution of picoeukaryotic diversity in the Sargasso Sea. *Environmental Microbiology*, 9(5), 1233–1252. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2007.01247.x>
- Osma, N., Latorre-Melín, L., Jacob, B., Contreras, P. Y., von Dassow, P., & Vargas, C. A. (2020). Response of Phytoplankton Assemblages From Naturally Acidic Coastal Ecosystems to Elevated pCO<sub>2</sub>. *Frontiers in Marine Science*, 7(May), 1–21. <https://doi.org/10.3389/fmars.2020.00323>
- Padilla-Gamiño, J. L., & Carpenter, R. C. (2007). Seasonal acclimatization of *Asparagopsis taxiformis* (Rhodophyta) from different biogeographic regions. *Limnology and Oceanography*, 52(2), 833–842. <https://doi.org/10.4319/lo.2007.52.2.0833>
- Pajares, S., Varona-Cordero, F., & Hernández-Becerril, D. U. (2020). Spatial Distribution Patterns of Bacterioplankton in the Oxygen Minimum Zone of the Tropical Mexican Pacific. *Microbial Ecology*, 80(3), 519–536. <https://doi.org/10.1007/s00248-020-01508-7>

- Parris, D. J., Ganesh, S., Edgcomb, V. P., DeLong, E. F., & Stewart, F. J. (2014). Microbial eukaryote diversity in the marine oxygen minimum zone off northern Chile. *Frontiers in Microbiology*, 5(OCT). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00543>
- Parsons, T. R., Maita, Y., & Lalli, C. M. (1984). Fluorometric Determination of Chlorophylls. In *A Manual of Chemical & Biological Methods for Seawater Analysis* (pp. 107–109). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-030287-4.50034-7>
- Partensky, F., Hess, W. R., & Vaultot, D. (1999). Prochlorococcus , a Marine Photosynthetic Prokaryote of Global Significance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 63(1), 106–127. <https://doi.org/10.1128/MMBR.63.1.106-127.1999>
- Paulmier, A., & Ruiz-Pino, D. (2009a). Oxygen minimum zones (OMZs) in the modern ocean. *Progress in Oceanography*, 80(3–4), 113–128. <https://doi.org/10.1016/j.pocean.2008.08.001>
- Paulmier, A., & Ruiz-Pino, D. (2009b). Oxygen minimum zones (OMZs) in the modern ocean. *Progress in Oceanography*, 80(3–4), 113–128. <https://doi.org/10.1016/j.pocean.2008.08.001>
- Paulmier, A., Ruiz-Pino, D., & Garçon, V. (2011). CO<sub>2</sub> maximum in the oxygen minimum zone (OMZ). *Biogeosciences*, 8(2), 239–252. <https://doi.org/10.5194/bg-8-239-2011>
- Paulmier, A., Ruiz-Pino, D., Garçon, V., & Farías, L. (2006). Maintaining of the Eastern South Pacific Oxygen Minimum Zone (OMZ) off Chile. *Geophysical Research Letters*, 33(20), L20601. <https://doi.org/10.1029/2006GL026801>
- Pizarro, O., Ramírez, N., Castillo, M. I., Cifuentes, U., Rojas, W., & Pizarro-Koch, M. (2016). Underwater Glider Observations in the Oxygen Minimum Zone off Central Chile. *Bulletin of the American Meteorological Society*, 97(10), 1783–1789. <https://doi.org/10.1175/BAMS-D-14-00040.1>
- Pizarro-Koch, M., Pizarro, O., Dewitte, B., Montes, I., Ramos, M., Paulmier, A., & Garçon, V. (2019). Seasonal Variability of the Southern Tip of the Oxygen Minimum Zone in the Eastern South Pacific (30°-38°S): A Modeling Study. *Journal of Geophysical Research: Oceans*, 124(12), 8574–8604. <https://doi.org/10.1029/2019JC015201>
- Raven, J. A., & Beardall, J. (2021). Influence of global environmental Change on plankton.

- Journal of Plankton Research*, 43(6), 779–800. <https://doi.org/10.1093/plankt/fbab075>
- Reynolds, N. (1974). *Imantonia rotunda* gen. et sp. nov., a new member of the Haptophyceae. *British Phycological Journal*, 9(4), 429–434. <https://doi.org/10.1080/00071617400650501>
- Reynolds, C. S. (2018). Phytoplankton. In *The Ecology of Phytoplankton* (pp. 1–37). Cambridge University Press. <https://doi.org/10.1017/CBO9780511542145.002>
- Rich, J. J., Arevalo, P., Chang, B. X., Devol, A. H., & Ward, B. B. (2020). Anaerobic ammonium oxidation (anammox) and denitrification in Peru margin sediments. *Journal of Marine Systems*, 207(October 2017), 103122. <https://doi.org/10.1016/j.jmarsys.2018.09.007>
- Rii, Y. M., Duhamel, S., Bidigare, R. R., Karl, D. M., Repeta, D. J., & Church, M. J. (2016). Diversity and productivity of photosynthetic picoeukaryotes in biogeochemically distinct regions of the South East Pacific Ocean. *Limnology and Oceanography*, 61(3), 806–824. <https://doi.org/10.1002/lno.10255>
- Rodríguez, J., Tintoré, J., Allen, J. T., Blanco, J. M., Gomis, D., Reul, A., Ruiz, J., Rodríguez, V., Echevarría, F., & Jiménez-Gómez, F. (2001). Mesoscale vertical motion and the size structure of phytoplankton in the ocean. *Nature*, 410(6826), 360–363. <https://doi.org/10.1038/35066560>
- Rost, B., Zondervan, I., & Wolf-Gladrow, D. (2008). Sensitivity of phytoplankton to future changes in ocean carbonate chemistry: current knowledge, contradictions and research directions. *Marine Ecology Progress Series*, 373, 227–237. <https://doi.org/10.3354/meps07776>
- Sáez, A. G., Probert, I., Young, J. R., Edvardsen, B., Eikrem, W., & Medlin, L. K. (2004). A review of the phylogeny of the Haptophyta. In *Coccolithophores* (pp. 251–269). Springer Berlin Heidelberg. [https://doi.org/10.1007/978-3-662-06278-4\\_10](https://doi.org/10.1007/978-3-662-06278-4_10).
- Safi, K., & Hall, J. (1999). Mixotrophic and heterotrophic nanoflagellate grazing in the convergence zone east of New Zealand. *Aquatic Microbial Ecology*, 20(1), 83–93. <https://doi.org/10.3354/ame020083>.
- Santander, E., Herrera, L., & Merino, C. (2003). Fluctuación diaria del fitoplancton en la capa

- superficial del océano durante la primavera de 1997 en el norte de Chile (20°18'S): II. Composición específica y abundancia celular. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 38(1), 13–25.
- Scanlan, D. (2002). Molecular ecology of the marine cyanobacterial genera *Prochlorococcus* and *Synechococcus*. *FEMS Microbiology Ecology*, 40(1), 1–12. [https://doi.org/10.1016/S0168-6496\(01\)00217-3](https://doi.org/10.1016/S0168-6496(01)00217-3)
- Schippers, P., Lurling, M., & Scheffer, M. (2004). Increase of atmospheric CO<sub>2</sub> promotes phytoplankton productivity. *Ecology Letters*, 7(6), 446–451. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2004.00597.x>
- Schunck, H., Lavik, G., Desai, D. K., Großkopf, T., Kalvelage, T., Löscher, C. R., Paulmier, A., Contreras, S., Siegel, H., Holtappels, M., Rosenstiel, P., Schilhabel, M. B., Graco, M., Schmitz, R. A., Kuypers, M. M. M., & LaRoche, J. (2013). Giant Hydrogen Sulfide Plume in the Oxygen Minimum Zone off Peru Supports Chemolithoautotrophy. *PLoS ONE*, 8(8), e68661. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0068661>
- Sieburth, J. M., Smetacek, V., & Lenz, J. (1978). Pelagic ecosystem structure: Heterotrophic compartments of the plankton and their relationship to plankton size fractions 1. *Limnology and Oceanography*, 23(6), 1256–1263. <https://doi.org/10.4319/lo.1978.23.6.1256>
- Silva, N., Rojas, N., & Fedele, A. (2009). Water masses in the Humboldt Current System: Properties, distribution, and the nitrate deficit as a chemical water mass tracer for Equatorial Subsurface Water off Chile. *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography*, 56(16), 1004–1020. <https://doi.org/10.1016/j.dsr2.2008.12.013>
- Simon, N., Barlow, R. G., Marie, D., Partensky, F., & Vaulot, D. (1994). Characterization of oceanic photosynthetic picoeukaryotes by flow cytometry. *Journal of Phycology*, 30(6), 922–935. <https://doi.org/10.1111/j.0022-3646.1994.00922.x>
- Stillman, J. H., & Paganini, A. W. (2015). Biochemical adaptation to ocean acidification. *Journal of Experimental Biology*, 218(12), 1946–1955. <https://doi.org/10.1242/jeb.115584>
- Stoeck, T., Taylor, G. T., & Epstein, S. S. (2003). Novel Eukaryotes from the Permanently



- Anoxic Cariaco Basin (Caribbean Sea). *Applied and Environmental Microbiology*, 69(9), 5656–5663. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.9.5656-5663.2003>
- Stramma, L., Johnson, G. C., Sprintall, J., & Mohrholz, V. (2008). Expanding Oxygen-Minimum Zones in the Tropical Oceans. *Science*, 320(5876), 655–658. <https://doi.org/10.1126/science.1153847>
- Stramma, L., Prince, E. D., Schmidtko, S., Luo, J., Hoolihan, J. P., Visbeck, M., Wallace, D. W. R., Brandt, P., & Körtzinger, A. (2012). Expansion of oxygen minimum zones may reduce available habitat for tropical pelagic fishes. *Nature Climate Change*, 2(1), 33–37. <https://doi.org/10.1038/nclimate1304>
- Stramma, L., Schmidtko, S., Levin, L. A., & Johnson, G. C. (2010). Ocean oxygen minima expansions and their biological impacts. *Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers*, 57(4), 587–595. <https://doi.org/10.1016/j.dsr.2010.01.005>
- Stramma, L., Visbeck, M., Brandt, P., Tanhua, T., & Wallace, D. (2009). Deoxygenation in the oxygen minimum zone of the eastern tropical North Atlantic. *Geophysical Research Letters*, 36(20), 1–5. <https://doi.org/10.1029/2009GL039593>
- Strecker, A. L., Cobb, T. P., & Vinebrooke, R. D. (2004). Effects of experimental greenhouse warming on phytoplankton and zooplankton communities in fishless alpine ponds. *Limnology and Oceanography*, 49(4), 1182–1190. <https://doi.org/10.4319/lo.2004.49.4.1182>
- Strub, P. T., Mesías, M. J., Montecino, V., Rutllant, J., & Salinas, S. (1998). Coastal ocean circulation off western South America coastal segment. In *The Sea* (Vol. 11, pp. 273–313).
- Stuart, V., Ullloa, O., Alarcón, G., Sathyendranath, S., Major, H., Head, E. J. H., & Platt, T. (2004). Bio-optical characteristics of phytoplankton populations in the upwelling system off the coast of Chile. *Revista Chilena de Historia Natural*, 77(1), 87–105. <https://doi.org/10.4067/S0716-078X2004000100008>
- Sun, J.-Z., Wang, T., Huang, R., Yi, X., Zhang, D., Beardall, J., Hutchins, D. A., Liu, X., Wang, X., Deng, Z., Li, G., Gao, G., & Gao, K. (2022). Enhancement of diatom growth and phytoplankton productivity with reduced O<sub>2</sub> availability is moderated by rising CO<sub>2</sub>.

*Communications Biology*, 5(1), 54. <https://doi.org/10.1038/s42003-022-03006-7>

- Thamdrup, B., Dalsgaard, T., Jensen, M. M., Ulloa, O., Farías, L., & Escribano, R. (2006). Anaerobic ammonium oxidation in the oxygen-deficient waters off northern Chile. *Limnology and Oceanography*, 51(5), 2145–2156. <https://doi.org/10.4319/lo.2006.51.5.2145>
- Thamdrup, B., Dalsgaard, T., & Revsbech, N. P. (2012). Widespread functional anoxia in the oxygen minimum zone of the Eastern South Pacific. *Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers*, 65, 36–45. <https://doi.org/10.1016/j.dsr.2012.03.001>
- Thiel, M., Macaya, E., Acuña, E., Arntz, W., Bastias, H., Brokordt, K., Camus, P., Castilla, J., Castro, L., Cortés, M., Dumont, C., Escribano, R., Fernandez, M., Gajardo, J., Gaymer, C., Gomez, I., González, A., González, H., Haye, P., ... Vega, A. (2007). The Humboldt Current System of Northern and Central Chile. In *Oceanography and Marine Biology* (Vol. 45, pp. 195–344). <https://doi.org/10.1201/9781420050943.ch6>
- Thomsen, H. A., Buck, K. R., & Chavez, F. P. (1994). Haptophytes as components of marine phytoplankton. In *The Haptophyte Algae: Vol. No. 51* (pp. 187–208).
- Thyssen, M., Ferreyra, G., Moreau, S., Schloss, I., Denis, M., & Demers, S. (2011). The combined effect of ultraviolet B radiation and temperature increase on phytoplankton dynamics and cell cycle using pulse shape recording flow cytometry. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 406(1–2), 95–107. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2011.06.015>
- Torres, R., Pantoja, S., Harada, N., González, H. E., Daneri, G., Frangopulos, M., Rutilant, J. A., Duarte, C. M., Rúa-Halpern, S., Mayol, E., & Fukasawa, M. (2011). Air-sea CO<sub>2</sub> fluxes along the coast of Chile: From CO<sub>2</sub> outgassing in central northern upwelling waters to CO<sub>2</sub> uptake in southern Patagonian fjords. *Journal of Geophysical Research*, 116(C9), C09006. <https://doi.org/10.1029/2010JC006344>
- Tortell, P., DiTullio, G., Sigman, D., & Morel, F. (2002). CO<sub>2</sub> effects on taxonomic composition and nutrient utilization in an Equatorial Pacific phytoplankton assemblage. *Marine Ecology Progress Series*, 236, 37–43. <https://doi.org/10.3354/meps236037>
- Tsai, A.-Y., & Mukhanov, V. (2021). Response of Growth and Grazing Rate of

- Nanoflagellates on *Synechococcus* spp. to Experimental Nutrient Enrichment. *Water*, 13(19), 2686. <https://doi.org/10.3390/w13192686>
- Tsai, A. Y., Chiang, K. P., Chan, Y. F., Lin, Y. C., & Chang, J. (2007). Pigmented nanoflagellates in the coastal western subtropical Pacific are important grazers on *Synechococcus* populations. *Journal of Plankton Research*, 29(1), 71–77. <https://doi.org/10.1093/plankt/fbl058>
- Tsai, A. Y., Gong, G. C., Sanders, R. W., Chen, W. H., Chao, C. F., & Chiang, K. P. (2011). Importance of bacterivory by pigmented and heterotrophic nanoflagellates during the warm season in a subtropical western Pacific coastal ecosystem. *Aquatic Microbial Ecology*, 63(1), 9–18. <https://doi.org/10.3354/ame01470>
- Ulloa, O., Canfield, D. E., DeLong, E. F., Letelier, R. M., & Stewart, F. J. (2012). Microbial oceanography of anoxic oxygen minimum zones. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(40), 15996–16003. <https://doi.org/10.1073/pnas.1205009109>
- Ulloa, O., Escribano, R., Hormazabal, S., Quiñones, R. A., González, R. R., & Ramos, M. (2001). Evolution and biological effects of the 1997-98 El Niño in the upwelling ecosystem off northern Chile. *Geophysical Research Letters*, 28(8), 1591–1594. <https://doi.org/10.1029/2000GL011548>
- Ulloa, O., Henríquez-Castillo, C., Ramírez-Flandes, S., Plominsky, A. M., Murillo, A. A., Morgan-Lang, C., Hallam, S. J., & Stepanauskas, R. (2021). The cyanobacterium *Prochlorococcus* has divergent light-harvesting antennae and may have evolved in a low-oxygen ocean. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 118(11), e2025638118. <https://doi.org/10.1073/pnas.2025638118>
- Unrein, F., Massana, R., Alonso-Sáez, L., & Gasol, J. M. (2007). Significant year-round effect of small mixotrophic flagellates on bacterioplankton in an oligotrophic coastal system. *Limnology and Oceanography*, 52(1), 456–469. <https://doi.org/10.4319/lo.2007.52.1.0456>
- Vargas, C. A., Cantarero, S. I., Sepúlveda, J., Galán, A., De Pol-Holz, R., Walker, B., Schneider, W., Farías, L., D’Ottone, M. C., Walker, J., Xu, X., & Salisbury, J. (2021). A source of isotopically light organic carbon in a low-pH anoxic marine zone. *Nature*

- Communications*, 12(1), 1604. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-21871-4>
- Vargas, C. A., Lagos, N. A., Lardies, M. A., Duarte, C., Manríquez, P. H., Aguilera, V. M., Broitman, B., Widdicombe, S., & Dupont, S. (2017). Species-specific responses to ocean acidification should account for local adaptation and adaptive plasticity. *Nature Ecology & Evolution*, 1(4), 0084. <https://doi.org/10.1038/s41559-017-0084>
- Vaulot, D., Eikrem, W., Viprey, M., & Moreau, H. (2008). The diversity of small eukaryotic phytoplankton ( $\leq 3 \mu\text{m}$ ) in marine ecosystems. *FEMS Microbiology Reviews*, 32(5), 795–820. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2008.00121.x>
- Vaulot, D., Gall, F., Le Marie, D., Guillou, L., & Partensky, F. (2004). The Roscoff Culture Collection (RCC): a collection dedicated to marine picoplankton. *Nova Hedwigia*, 79(1–2), 49–70. <https://doi.org/10.1127/0029-5035/2004/0079-0049>
- Verschoor, A. M., Van Dijk, M. A., Huisman, J., & Van Donk, E. (2013). Elevated CO<sub>2</sub> concentrations affect the elemental stoichiometry and species composition of an experimental phytoplankton community. *Freshwater Biology*, 58(3), 597–611. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2427.2012.02833.x>
- Wang, B., Chen, J., Jin, H., Li, H., Huang, D., & Cai, W. (2017). Diatom bloom-derived bottom water hypoxia off the Changjiang estuary, with and without typhoon influence. *Limnology and Oceanography*, 62(4), 1552–1569. <https://doi.org/10.1002/lno.10517>
- Weber, T., & Bianchi, D. (2020). Efficient Particle Transfer to Depth in Oxygen Minimum Zones of the Pacific and Indian Oceans. *Frontiers in Earth Science*, 8(September), 1–11. <https://doi.org/10.3389/feart.2020.00376>
- Whitney, F. A., Freeland, H. J., & Robert, M. (2007). Persistently declining oxygen levels in the interior waters of the eastern subarctic Pacific. *Progress in Oceanography*, 75(2), 179–199. <https://doi.org/10.1016/j.pocean.2007.08.007>
- Winder, M., & Sommer, U. (2012). Phytoplankton response to a changing climate. *Hydrobiologia*, 698(1), 5–16. <https://doi.org/10.1007/s10750-012-1149-2>
- Woese, C. R., Kandler, O., & Wheelis, M. L. (1990). Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87(12), 4576–4579. <https://doi.org/10.1073/pnas.87.12.4576>

- Worden, A. (2006). Picoeukaryote diversity in coastal waters of the Pacific Ocean. *Aquatic Microbial Ecology*, 43(2), 165–175. <https://doi.org/10.3354/ame043165>
- Worden, A.Z., Nolan, J.K. and Palenik, B. (2004). Assessing the Dynamics and Ecology of Marine Picophytoplankton: The Importance of the Eukaryotic Component. *Limnology and Oceanography*, 49, 168-179. <http://dx.doi.org/10.4319/lo.2004.49.1.0168>.
- Wright, J. J., Konwar, K. M., & Hallam, S. J. (2012). Microbial ecology of expanding oxygen minimum zones. *Nature Reviews Microbiology*, 10(6), 381–394. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2778>
- Zuendorf, A., Bunge, J., Behnke, A., Barger, K. J. A., & Stoeck, T. (2006). Diversity estimates of microeukaryotes below the chemocline of the anoxic Mariager Fjord, Denmark. *FEMS Microbiology Ecology*, 58(3), 476–491. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2006.00171.x>
- Zwirgmaier, K., Jardillier, L., Ostrowski, M., Mazard, S., Garczarek, L., Vault, D., Not, F., Massana, R., Ulloa, O., & Scanlan, D. J. (2007). Global phylogeography of marine *Synechococcus* and *Prochlorococcus* reveals a distinct partitioning of lineages among oceanic biomes. *Environmental Microbiology*, 10(1), 070928214009001-???. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2007.01440.x>