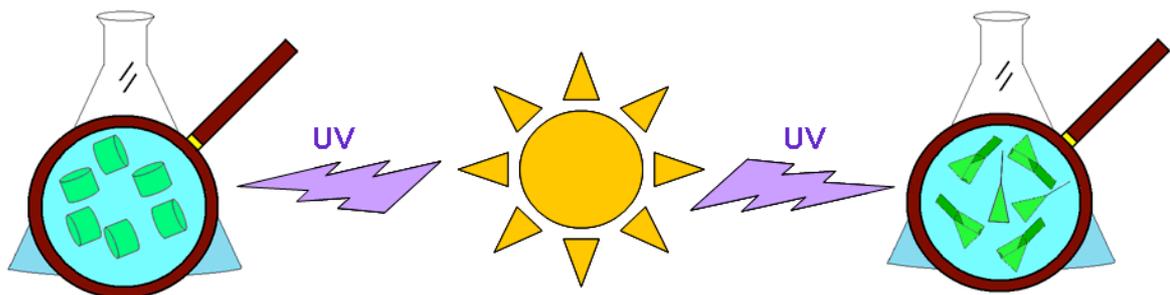


Seminario de
Licenciatura en Ciencias Biológicas

“Efectos de la radiación ultravioleta sobre la fotosíntesis y la incorporación de silicato en diatomeas”



Alumno: Marcos Lagunas

Director del Seminario: Dr. Walter Helbling

Profesor Asesor: Lic. César Arias

Año 2009

INDICE

AGRADECIMIENTOS.....	Página 03
INTRODUCCIÓN.....	Página 04
La radiación solar y ozono en la atmósfera.....	Página 04
El ozono.....	Página 04
El “agujero de ozono”.....	Página 04
Tendencia actual.....	Página 04
Calentamiento global.....	Página 04
Radiación y temperatura en los ecosistemas acuáticos.....	Página 04
Efectos de la RUV y la temperatura sobre el fitoplancton.....	Página 04
OBJETIVO.....	Página 20
MATERIALES Y METODOS.....	Página 21
Condiciones de cultivo.....	Página 21
Experimentación.....	Página 21
Análisis y mediciones.....	Página 21
Medición de radiación.....	Página 21
Determinación de parámetros fotosintéticos y curvas P vs E.....	Página 21
Análisis de clorofila-a y otros pigmentos fotosintéticos y compuestos que absorben RUV.....	Página 21
Conteos celulares / análisis de morfología.....	Página 21
Determinación de silicato.....	Página 21
Tratamiento de datos / estadística.....	Página 21
RESULTADOS.....	Página 28
Efectos de la RUV en el crecimiento.....	Página 28
Efectos de la RUV en la incorporación de silicato.....	Página 28
Efectos de la RUV en el rendimiento fotoquímico.....	Página 28
Compuestos que absorben RUV, carotenoides y biovolumen celular.....	Página 28
Efectos de la RUV solar natural en <i>A. glacialis</i> y <i>T. weisflogii</i>	Página 28
DISCUSION.....	Página 53
CONCLUSIONES.....	Página 56
BIBLIOGRAFIA.....	Página 58

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se debe fundamentalmente al apoyo que recibí de mis dos grandes familias: la primera me enseñó a vivir y cómo perseguir mis sueños; la segunda, aquella que tuve la suerte de conocer en la Estación de Fotobiología Playa Unión, me mostró un camino para recorrer en la vida.

A mis padres, ya que sin su amor incondicional nada hubiera sido posible. Gracias por darme ese empujoncito en los momentos de flaquezas. A mis hermanos, abuelos y tías por sus risas y constante presencia.

A Walter, por ser no solo un modelo de profesional sino también de persona; sin lugar a dudas, un segundo padre para mí. Gracias por tanta paciencia!

A Virginia, Rodrigo (G.), Klaudia, Rodrigo (H.), Valeria, César, por haberme dejado compartir parte de su tiempo junto a ustedes y por las innumerables veces que me prestaron su ayuda... ha sido un honor!

INTRODUCCION

El clima de la Tierra ha sido altamente variable durante la vida del planeta, atravesando eras de glaciación y períodos de calentamiento. Históricamente, algunos factores naturales como erupciones volcánicas, cambios en la órbita terrestre y la cantidad de energía liberada desde el Sol han afectado el clima de la Tierra (IPCC, 2007). Desde finales del siglo XVIII, sin embargo, las actividades humanas asociadas a la Revolución Industrial han cambiado la composición de la atmósfera causando un impacto importante sobre el clima de la Tierra y consecuentemente sobre los organismos que allí habitan. A estos cambios en el clima producidos por la actividad antrópica se los ha denominado colectivamente “cambio global”.

En la actualidad se registran cambios en los patrones meteorológicos de distintas regiones del planeta (IPCC, 2001), que dada su continuidad a lo largo del tiempo aportan significativamente al cambio global. Estas anomalías se evidencian en indicadores clave, tales como en el incremento del nivel del mar, el retroceso de las masas de hielo, el incremento de la concentración de gases de efecto invernadero, un aumento de la temperatura media global y la alteración de la composición de la atmósfera debida a la presencia de gases de origen antrópico (i.e., destrucción del ozono y un consecuente incremento de los niveles de radiación ultravioleta - RUV - que alcanza la superficie terrestre) (IPCC, 2001).

Lo detallado anteriormente, sin duda tiene importantes consecuencias para la biósfera. Teniendo en cuenta este contexto, en el presente trabajo de Tesis se evaluaron los conjuntos que la RUV y la temperatura podrían tener sobre un componente esencial de los ecosistemas acuáticos - el *fitoplancton*.

Consideraciones generales

La radiación solar y ozono en la atmósfera

La energía es transportada en el espacio como radiación electromagnética, la cual consiste de fotones o paquetes de energía que se mueven a la velocidad de la luz ($c = 2,99793 \times 10^8 \text{ m s}^{-1}$). Los fotones poseen un campo eléctrico y un campo magnético que oscilan sinusoidalmente en forma perpendicular entre ellos y con respecto a la trayectoria del fotón (formando las ondas electromagnéticas) (Figura 1).

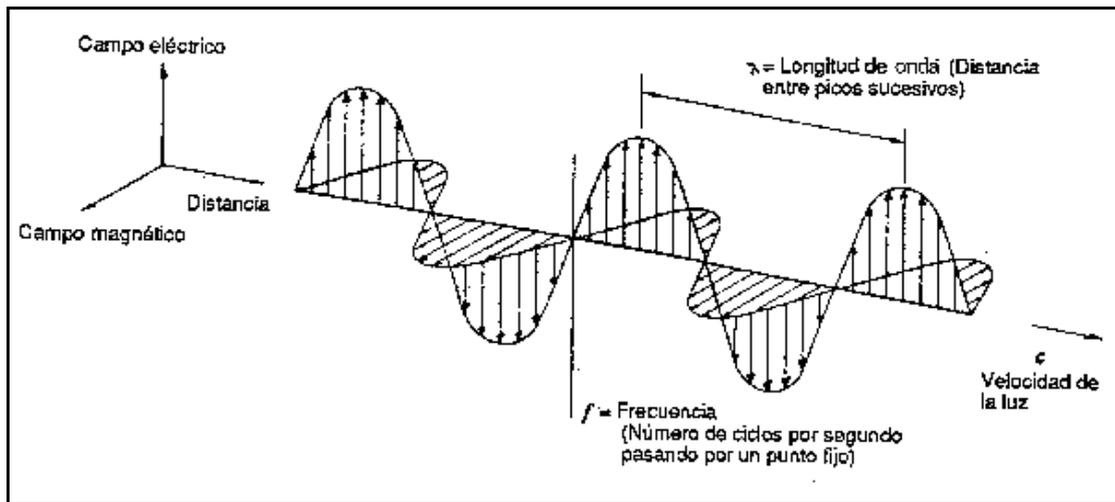


Figura 1: Una onda electromagnética. Los campos eléctrico y magnético oscilan perpendicularmente en forma sinusoidal. Se detallan la longitud de onda y la frecuencia.

La energía de un fotón (E) es directamente proporcional a su frecuencia (ν) e inversamente proporcional a su longitud de onda (λ) tal como se detalla a continuación:

$$E = h\nu = hc/\lambda \quad (\text{Ecuación 1})$$

Donde la constante de proporcionalidad (h) es la constante de Planck ($h = 6,626 \times 10^{-34} \text{ J s}$).

El espectro electromagnético (o rango posible de energías de radiación electromagnética) producido por el Sol en reacciones termonucleares es profundamente modificado al atravesar la atmósfera debido a la absorción y dispersión causada por varios gases y partículas, por lo que al momento de alcanzar la superficie de la Tierra, algunas las longitudes de onda más perjudiciales para la vida han sido filtradas (Madronich, 1993) (Figura 2).

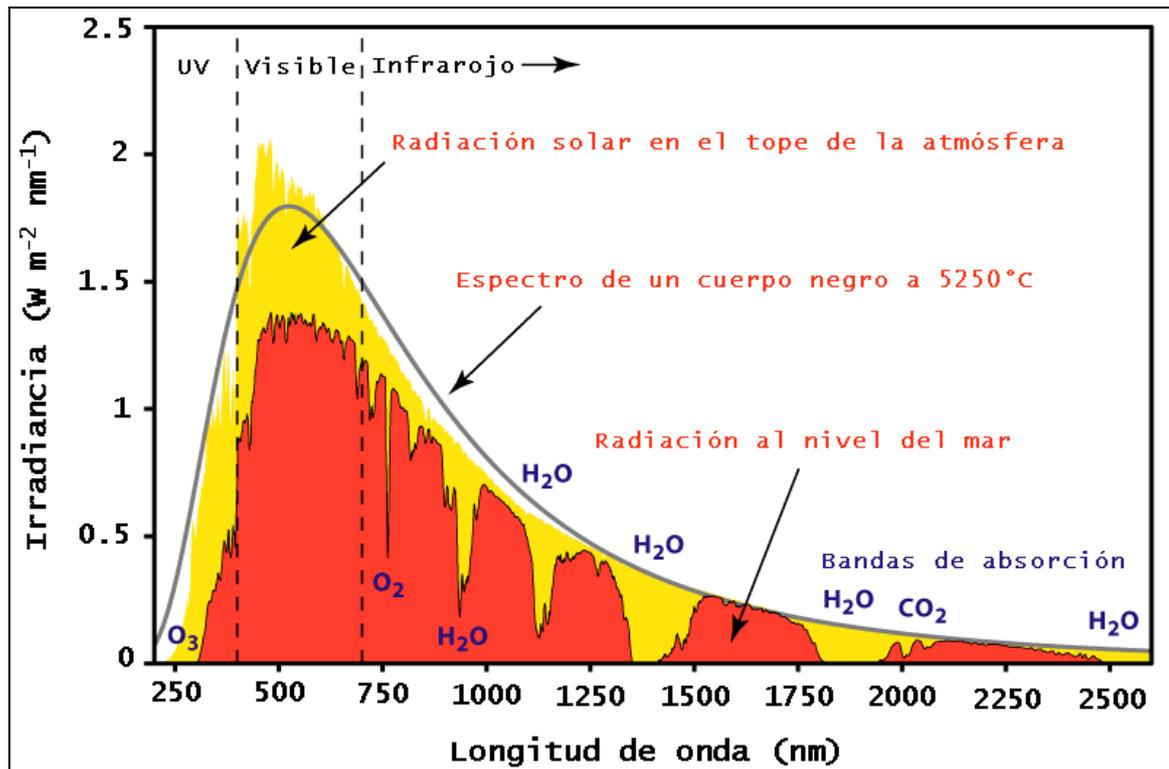


Figura 2: Espectros de radiación solar antes y después de atravesar la atmósfera. Se muestran las sustancias causantes de las bandas de absorción a distintos rangos de logitudes onda y el comportamiento de un cuerpo negro (Blumthaler & Webb, 2003).

Las longitudes de onda que llegan a la superficie terrestre abarcan un rango que oscila entre los 280 - 3000 nm, aunque los productores primarios emplean generalmente en la fotosíntesis aquella zona del espectro comprendida entre los 400 y 700 nm de longitud de onda (radiación disponible para la fotosíntesis, PAR por sus siglas en inglés). Las longitudes de onda entre los 280 y 400 nm comprenden la radiación ultravioleta (RUV), que representa la fracción más pequeña del espectro. La RUV ha sido arbitrariamente divididas en radiación ultravioleta B (RUV-B, 280 - 315 nm), radiación ultravioleta A (RUV-A, 315 - 400 nm) y radiación ultravioleta C ($\lambda < 280$ nm), aunque esta última no llega a la Tierra (ver Figura 3). Por lo tanto, y para los organismos, se considera a la RUV-B la más nociva desde el punto de vista biológico y la más activa fotoquímicamente.

➤ *El ozono*

El ozono es una molécula compuesta por tres átomos de oxígeno (O_3) y se forma por la reacción de un átomo de oxígeno (creado por la fotodisociación de O_2) y una molécula de O_2 . Cerca del 90% del ozono de la atmósfera está contenido en la estratósfera (la región ubicada entre los 10 - 50 km sobre la superficie terrestre), y las máximas concentraciones de este gas se han detectado entre los 15 y 30 km de altura.

Las concentraciones de este gas son muy bajas (unas pocas moléculas de O_3 por millón de moléculas de aire) pero son de vital importancia para la vida terrestre pues absorben la radiación ultravioleta. La RUV-C es totalmente absorbida cerca de los 35 km de altitud (principalmente por el O_2) (Figura 3) y la mayor parte de la RUV-A alcanza la superficie. El ozono absorbe gran parte de la RUV-B, pero una parte llega a la superficie.

El espesor de la capa de ozono se mide en Unidades Dobson (UD) e indican el espesor que tendrían todas las moléculas de este gas colocadas juntas en la superficie terrestre a temperatura y presión normal (PTN). Por ejemplo, si esta capa de ozono tuviera solo 3 mm de espesor, se obtendría un valor de 300 UD (aproximadamente el promedio global).

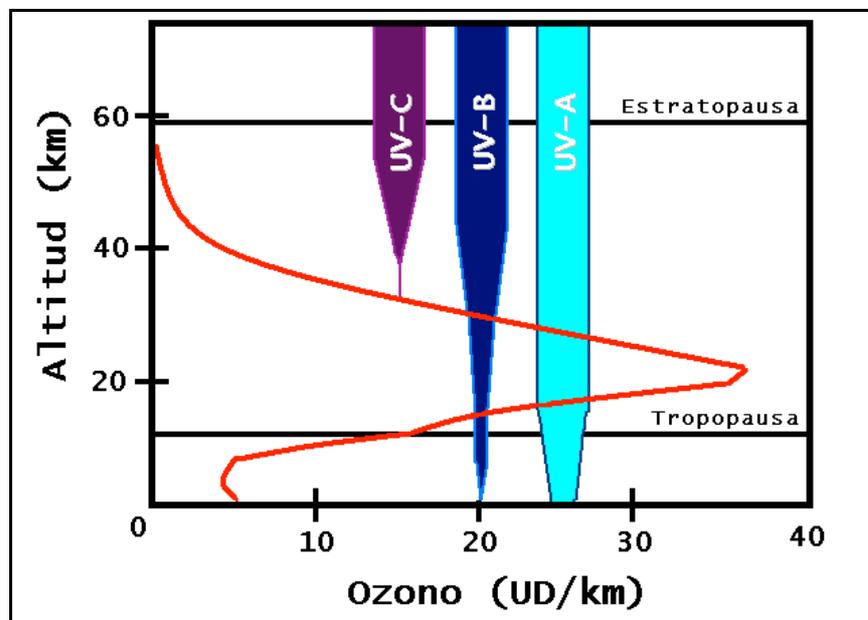
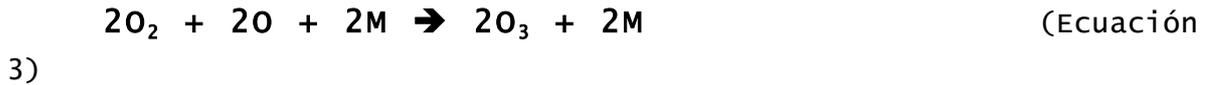
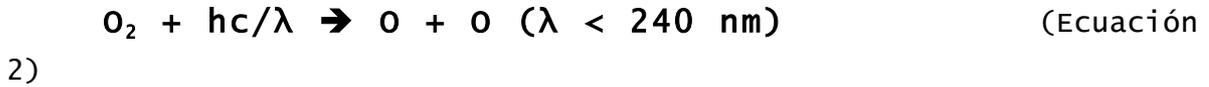


Figura 3: Perfil vertical típico del ozono en latitudes medias (NASA, http://www.ccpo.odu.edu/SEES/ozone/oz_class.htm).

El ozono se origina cuando la RUV de $\lambda < 240$ nm rompe una molécula de oxígeno en dos átomos de oxígeno en un proceso lento (ver Ecuación 2). Estos átomos son muy reactivos y reaccionan con otras moléculas de oxígeno para formar dos moléculas de ozono (ver Ecuación 3).



Donde M es otra molécula, generalmente de O_2 o N_2 , necesaria para el balance de energía.

El ozono y el oxígeno son continuamente interconvertidos cuando la RUV rompe las moléculas de ozono y los átomos de oxígeno reaccionan con otras moléculas de oxígeno en un proceso relativamente rápido (Ecuación 4). Este proceso convierte la energía de la RUV en energía térmica, calentando la estratósfera.



La molécula de ozono es también destruida cuando reacciona con una gran cantidad de agentes químicos en la estratósfera, como el cloruro, el nitrógeno, bromuro o hidrógeno.

Una reacción típica de este tipo es:



El cloruro que se encuentra en la atmósfera proviene de una familia de compuestos químicos altamente reactivos llamada clorofluorocarbonos (CFCs) que fue desarrollada en los 1920's con fines de refrigeración y propelentes de aerosoles. Cuando los CFCs son liberados en la atmósfera y alcanzan la estratósfera, la RUV rompe sus moléculas y libera átomos de cloro, que bajo condiciones apropiadas poseen el potencial de destruir grandes cantidades de ozono (ver Ecuación 6). Como consecuencia, se produce una marcada disminución en la concentración de ozono estratosférico ("agujero de ozono") y los niveles de RUV-B se incrementan (ver Figuras 4 y 5).

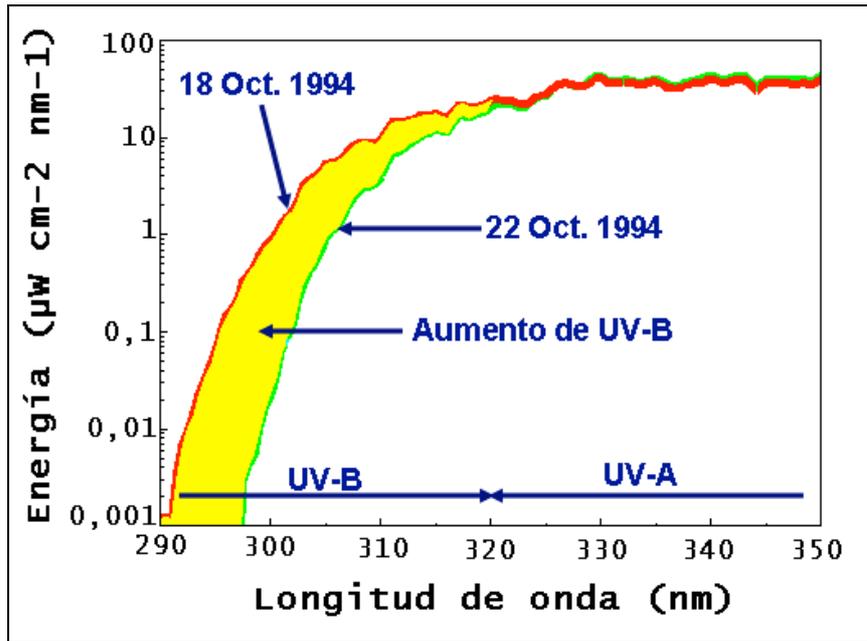


Figura 4: Incremento de la RUV-B en la superficie terrestre bajo condiciones de "agujero" de ozono durante el 22 de octubre de 1994. Datos obtenidos en Antártida, Base Palmer (USA) (Helbling, datos no publicados).

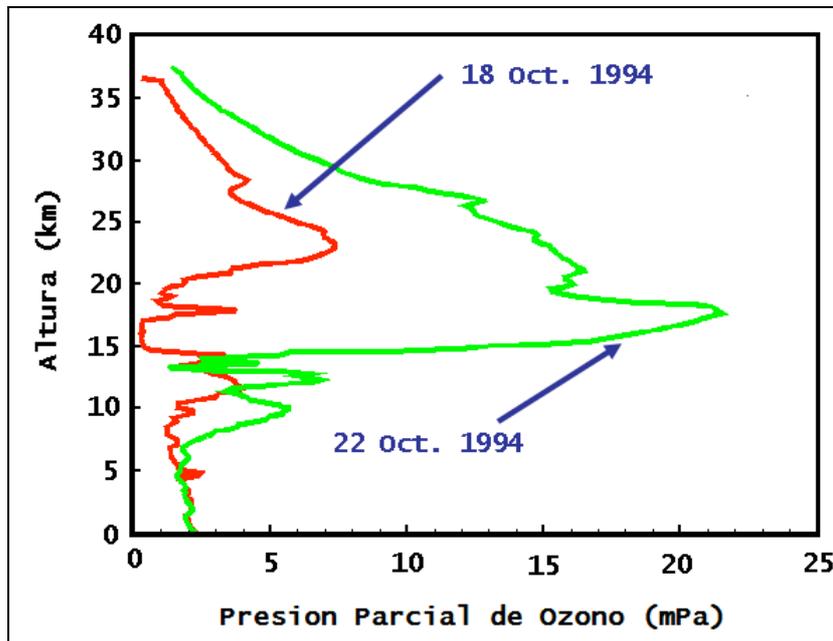


Figura 5: Perfil de ozono durante el 22 de octubre de 1994. Obsérvese el efecto que la disminución en la concentración de ozono produce en la cantidad de RUV-B que alcanza la superficie terrestre (en la Figura 4). Datos obtenidos en Antártida, Base Palmer (USA) (Helbling, datos no publicados).

➤ *El “agujero de ozono”*

En 1985 los científicos británicos Farman, Gardiner y Shanklin publicaron en la revista científica Nature (Farman et al. 1985) un artículo en el que mostraban que la concentración de ozono estaba decreciendo dramáticamente sobre Antártida durante la primavera austral. Si bien naturalmente ocurre un mínimo en la concentración de ozono durante la primavera austral, las cantidades medidas fueron mucho menores que las registradas anteriormente. Esto se debe a que es en esta estación cuando se presentan las condiciones apropiadas para que ocurra la reacción de destrucción de las moléculas de ozono: bajas temperaturas y formación del vórtice polar (definido por vientos circumpolares del oeste) que aísla la masa de aire de aquellas de latitudes medias. En la Figura 6 se muestran las concentraciones de ozono en dos décadas representativas del proceso de formación del “agujero de ozono”, y en la Figura 7 se presenta la evolución del área de estas masas de aire con baja concentración de ozono sobre la Antártida.

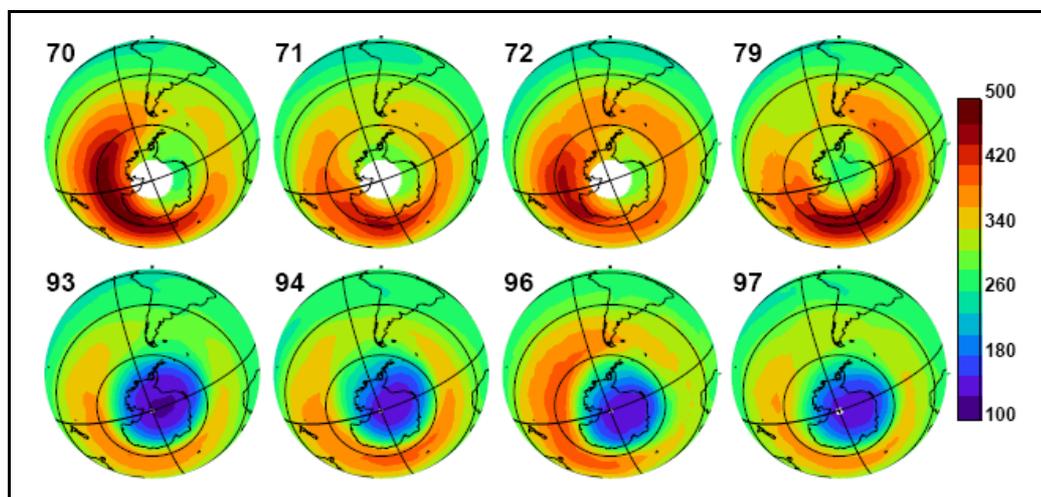


Figura 6: El “agujero de ozono” sobre la Antártida. La escala de color a la derecha de la figura indica la cantidad de ozono en Unidades Dobson. Los paneles superiores muestran la distribución de ozono en los 1970s, cuando las concentraciones de cloruro y bromuro eran más bajas que en la actualidad, En los paneles inferiores se muestran niveles de ozono más recientes (1990s), donde las concentraciones de ozono son menos de la mitad de lo que fue observado previamente (NASA, http://www.ccpo.odu.edu/SEES/ozone/oz_class.htm).

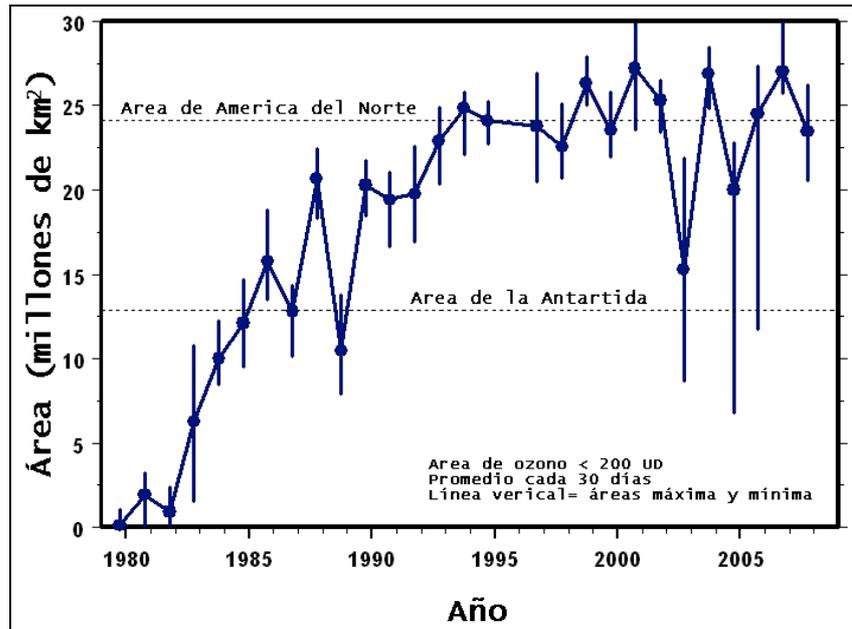


Figura 7: Evolución del área del agujero de ozono desde 1980. Puede observarse un incremento continuo hasta mediados de la década de los 1990s, cuando el área promedio se estabilizó cerca de los 25 millones de km² (NASA, http://jwocky.gsfc.nasa.gov/multi/oz_hole_area.gif).

Aunque el “agujero” de ozono se produce sobre Antártida, se han detectado concentraciones relativamente bajas de este gas (220-270 UD) sobre la Patagonia durante algunos días a principios de primavera, y que están asociadas al vórtice polar y al “agujero” de ozono (Helbling et al., 2005). Asimismo, se han detectado disminuciones anómalas en la concentración de ozono incluso sobre Brasil (30°S), y el origen de este fenómeno se encuentra en la introducción de masas de aire antártico sobre el continente sudamericano (Kirchhoff et al. 1996).

Tendencia actual

Gracias a la firma de tratados internacionales (Protocolo de Montreal en 1987, Tratado de Londres en 1990, Enmienda de Copenhage en 1992) la comunidad internacional acordó terminar la producción de CFCs en el año 1996. Desde entonces, los modelos actuales predicen que la concentración de cloruro en la atmósfera llegaría un valor similar al de 1975 para el año 2041 (Figura 8).

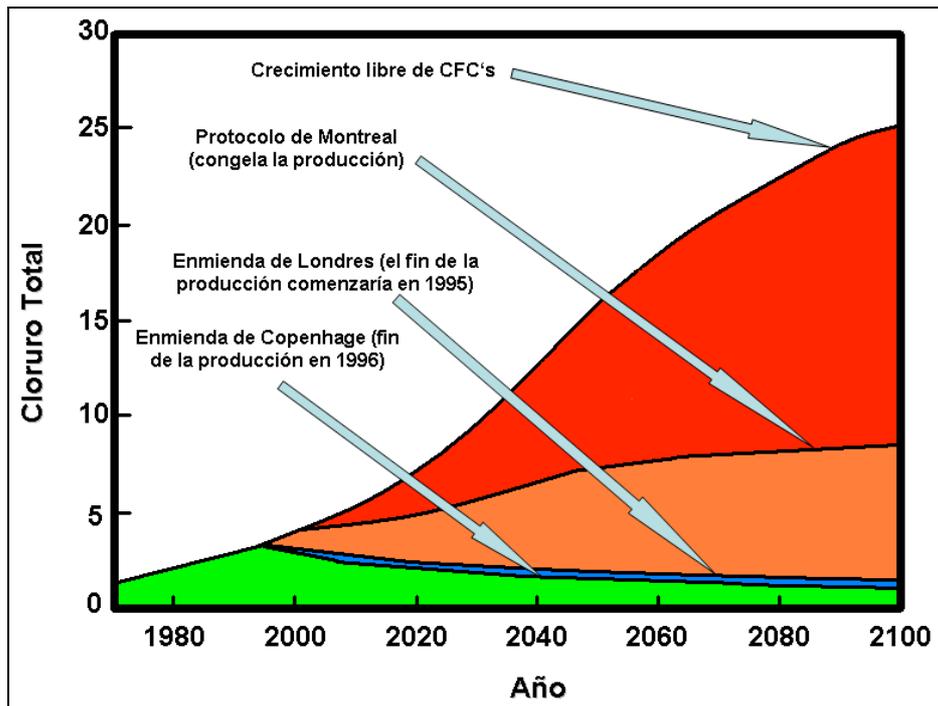


Figura 8: Proyecciones a largo plazo de la concentración de cloruro en la estratosfera basadas en cada uno de los acuerdos internacionales sobre CFC. Se alcanzarían valores iguales a los de 1975 en el año 2041 (NASA, http://www.ccpo.odu.edu/SEES/ozone/oz_class.htm).

Sin embargo, desde cerca de 1980 hasta mediados de los 1990s se ha observado una tendencia negativa en el ozono global, debido principalmente a un incremento en las emisiones de Cl y bromuro. Una reducción en las emisiones desde entonces sugiere que no se espera una recuperación sostenida hasta antes del final de esta década (IPCC, 2007).

Calentamiento global

Ciertos gases en la atmósfera se comportan como el vidrio en un invernadero, permitiendo entrar la radiación solar, pero impidiendo escapar el calor (radiación infrarroja). Estos gases absorben la radiación infrarroja emitida por la superficie terrestre cuando ésta se calienta al recibir la radiación solar, e impiden que el calor escape al espacio. Este fenómeno ocurre naturalmente y permite que el balance de calor entre aquello que ingresa y sale sea de +33 °C, resultando en una temperatura promedio de +15 °C sobre la superficie terrestre.

Los gases que contribuyen al efecto invernadero incluyen:

- Vapor de agua
- Dióxido de carbono (CO₂)

- Metano (CH₄)
- Oxidos de nitrógeno (NO_x)
- Clorofluorocarbonos (CFCs)

Todos ellos (excepto los compuestos de flúor) son naturales, pero a partir de la Revolución Industrial sus concentraciones se han incrementado debido principalmente al uso intensivo de combustibles fósiles en las actividades industriales y el transporte. De hecho, la concentración de CO₂ se incrementó cerca de un 36% en relación a los niveles de la era pre-industrial (de 280 ppm a 382 ppm en 2006) (<http://www.epa.gov/climatechange.htm>).

En 1958 Charles Keeling, de Scripps Institution of Oceanography, comenzó a evaluar el comportamiento anual de la concentración de CO₂ en la estación Mauna Loa, en Hawaii. Keeling observó un ciclo anual donde se evidenciaba una concentración mínima al final de la primavera (debida a la fijación por los productores primarios) y un máximo a mediados de otoño (causado por la respiración). Sin embargo, se pudo apreciar que a lo largo de los años la concentración de CO₂ se incrementaba dramáticamente (Figura 9).

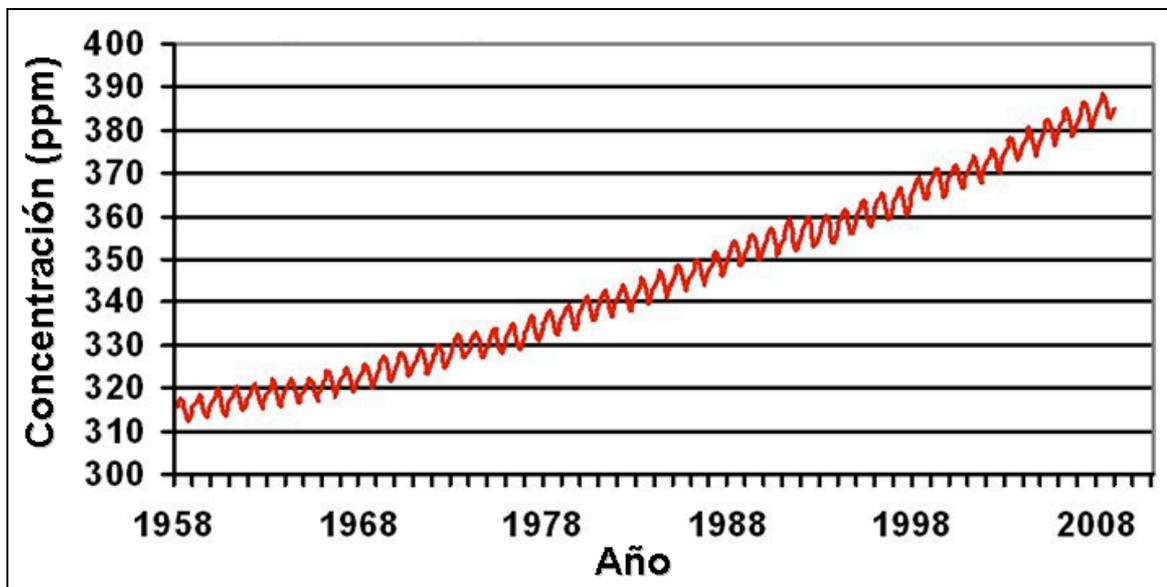


Figura 9: Concentración atmosférica de CO₂ en Mauna Loa, Hawaii. Fuente: Scripps Institution of Oceanography, USA (<http://scrippsco2.ucsd.edu>).

A este incremento de emisiones se suman otros procesos, tales como la deforestación, que han reducido la cantidad de dióxido de carbono retenida en forma de materia orgánica. En la Figura 10 se representan los flujos de carbono en condiciones naturales y aquellos debidos a las actividades antrópicas. El flujo de carbono entre la atmósfera y la tierra y los océanos está dominado por

procesos naturales, tales como la fotosíntesis. Mientras que los procesos naturales pueden absorber algo de los 6,2 miles de millones de toneladas métricas (7,2 menos 1 de sumideros) de emisiones antrópicas producidas anualmente, se estima que se agregan 4,1 miles de millones de toneladas por año a la atmósfera. Este balance positivo entre la emisión de gases de invernadero y la absorción resulta en un incremento continuo de la concentración atmosférica.

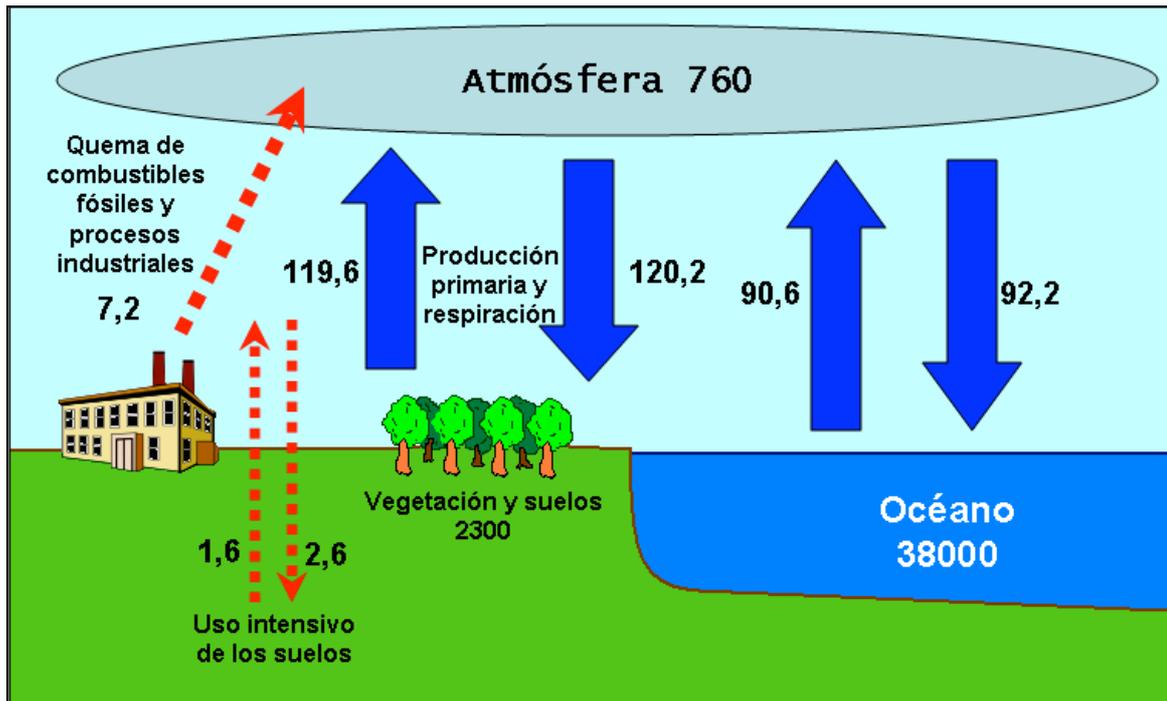


Figura 10: Ciclo del CO₂. Los valores están expresados en miles de millones de toneladas métricas. Las flechas azules indican los flujos naturales; las flechas rojas, el flujo de origen antrópico. Cada año son agregadas a la atmósfera ~ 4 millones de toneladas métricas (IPCC, 2007).

El incremento de la temperatura de la Tierra por estos fenómenos de origen antrópico dependerá de en cuánto se incremente la concentración de los gases de invernadero en la atmósfera. Si los niveles de dióxido de carbono se estabilizan en un valor igual al doble de la concentración pre-industrial, alrededor de 560 partes por millón, se estima que el calentamiento más probable de la temperatura media global sería de 3 °C, mientras que en latitudes medias ocurriría un incremento de entre 3 y 5 °C (IPCC, 2001).

Además de ser gases de invernadero, los CFCs destruyen además las moléculas de ozono. Así, el calentamiento global favorece la formación del "agujero" de ozono, ya que los gases invernadero

tienden a enfriar la estratósfera, donde se encuentra el ozono. Como las reacciones químicas que causan la destrucción del ozono ocurren más rápidamente en presencia de cristales de hielo, una atmósfera superior más fría incrementará la disminución de ozono y el consiguiente aumento de RUV-B.

Radiación y temperatura en los ecosistemas acuáticos

La penetración de la RUV en aguas naturales depende de la concentración y la calidad óptica de la materia orgánica disuelta (DOM), el fitoplancton, otras partículas en suspensión, y de las propiedades ópticas del agua pura. En la mayoría de los casos, el mejor predictor de la atenuación de la RUV es el material cromofórico disuelto (CDOM). Cuando la intensidad de la RUV (i.e., la irradiancia) bajo el agua es suficiente como para causar daño biológico, se observa entonces un rango de profundidades en la columna de agua que implican estrés (Hargreaves, 2003).

El cambio climático produce también efectos significativos en las condiciones de radiación a la cual están expuestos los organismos. Por un lado, está alterando el tiempo de cobertura por hielo tanto en sistemas de agua dulce como marinos, lo cual implicaría una mayor exposición a la RUV (Williamson & Zagarese 2003). Por otro lado, se ha encontrado en ciertos lagos canadienses una clara relación entre un aumento de la temperatura del aire y menores precipitaciones, con una menor concentración de CDOM, mayor transparencia del agua y un mayor calentamiento de las capas más profundas (Schindler et al. 1990). Asimismo, en los bosques boreales se ha registrado un aumento de 1,6°C entre 1970 y 1990, lo cual se relaciona claramente con un incremento en el fotoblanqueo ("bleaching") de la CDOM, la cual aumentaría la penetración de la RUV (Williamson & Zagarese, 2003). Sin embargo, debe tenerse en cuenta que si bien la temperatura y la RUV varían generalmente a lo largo de los mismos gradientes ambientales, existen cambios que no son paralelos en el tiempo y espacio: Por ejemplo, la RUV aumenta y la temperatura disminuye con la altitud.

En la mayoría de los ecosistemas acuáticos, el fitoplancton - el componente autótrofo de la comunidad planctónica - utiliza la radiación solar para incorporar CO₂ y así obtener compuestos orgánicos, los cuales sostienen todos los procesos vitales y están disponibles para los niveles tróficos superiores. El resultado global de este proceso de fotosíntesis puede expresarse como:



La conversión de energía electromagnética en energía química está mediada por los pigmentos fotosintéticos (clorofilas, carotenoides, xantofilas y ficobilinas), que poseen una estructura molecular que les permite absorber la radiación.

Las diatomeas (Figura 11) son generalmente el principal componente del fitoplancton en los ecosistemas marinos y constituyen una gran fuente de alimento para organismos pelágicos y bentónicos. Se ha estimado que contribuyen con cerca del 40% de la producción primaria de carbono en el mar (Nelson et al. 1995). Este grupo se caracteriza por poseer sus paredes celulares silicificadas formando una estructura llamada frústulo, la cual está compuesta de sílice amorfo hidratado ($[\text{Si}_n\text{O}_{2n-(nx/2)}(\text{OH})_{nx}]$, $x \leq 4$). Se ha sugerido que una posible función del sílice en los frústulos es la dispersión de la RUV-B, RUV-A y/o PAR (Shick & Dunlap, 2002). Sin embargo, la capacidad de dispersión del Si es menos importante que la del CaCO_3 presente en los cocolitos de los cocolitofóridos, pero aún sigue siendo mayor que la de las paredes de polisacáridos (Raven & Waite, 2003). En todo caso, la necesidad de formar un frústulo es absoluta en las diatomeas, causando que la disponibilidad de sílice sea un factor clave en la regulación del crecimiento de estos organismos en la naturaleza.

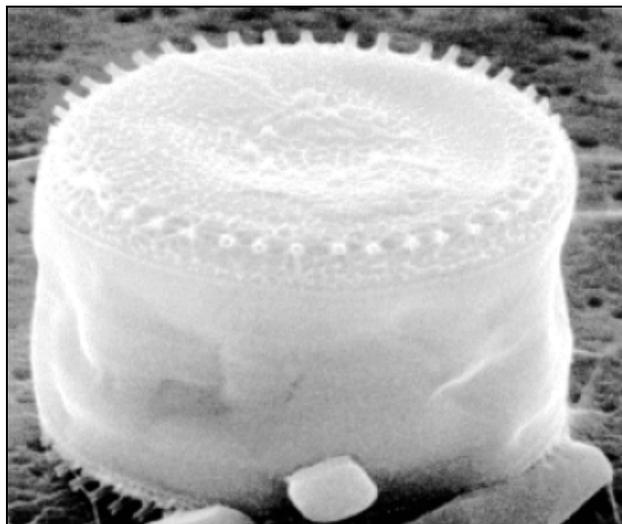


Figura 11: Imagen de una célula de *T. weissflogii* tomada con un microscopio electrónico de barrido.

En particular, las diatomeas dominan el ciclo del silicio en el océano (Figura 12): Cada átomo de silicio que es erosionado del

continente pasa un promedio de 40 veces por una diatomea antes de sedimentar en el lecho marino (Tréguer et al. 1995). El silicio es el segundo elemento más abundante de la corteza terrestre con un 25,7%, y sus óxidos conforman una gran variedad de minerales. Cuando estos minerales son erosionados, el material resultante es transportado por el agua y el viento hasta los océanos, donde son aprovechados por los organismos silicificados (i.e., diatomeas, silicoflagelados). Sin embargo, las diatomeas representan el factor más importante en la utilización biológica del sílice, produciendo sílice biogénico (ópalo).

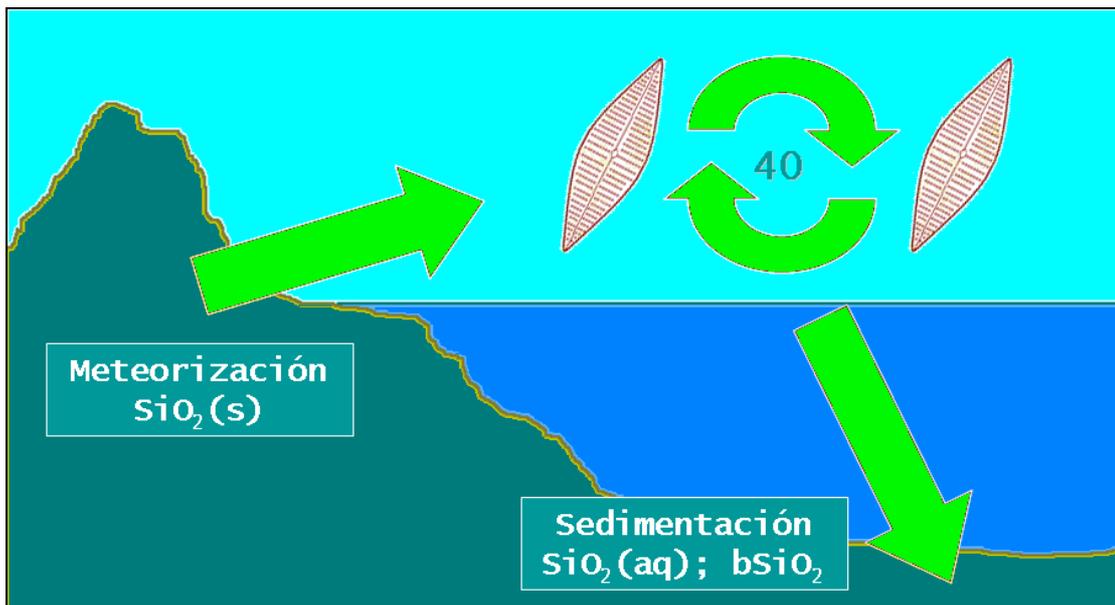


Figura 12: Representación del uso del silicio por diatomeas. $bSiO_2$ = sílice biogénico.

Efectos de la RUV y la temperatura sobre el fitoplancton

Es esperable que las variables asociadas al cambio global (i.e., radiación y temperatura), afecten en mayor o medida a los organismos acuáticos. Los aumentos de la RUV y de la temperatura – tal como podría ocurrir en un escenario de cambio global – han sido descritos como factores de estrés para el fitoplancton (Williamson & Zagarese, 2003). En particular, la RUV, incluso en sus niveles naturales, causa efectos negativos en los organismos fitoplanctónicos (Buma et al. 2003, Villafañe et al. 2003). La RUV, principalmente la RUV-B, afecta procesos celulares del fitoplancton tales como: fotosíntesis, síntesis de pigmentos celulares, crecimiento y división celular, funcionamiento de ácidos nucleicos,

transporte electrónico, síntesis de ATP, metabolismo del nitrógeno y fósforo, proteínas y membranas celulares, movimientos celulares, entre otros (Holm-Hansen et al. 1993, Buma et al. 2003, Villafañe et al. 2003). Por ejemplo, se ha observado que si bien la RUV-A y la RUV-B inhiben la fotosíntesis, la acumulación de dímeros de timina (una alteración de la molécula de ADN) está asociada a la exposición a la RUV-B y a la falta de mecanismos de fotoreparación (Buma et al. 2001). Sin embargo, el impacto global de la RUV también está condicionado por la respuesta celular (a la irradiancia¹ o a la dosis²). Si el fitoplancton responde a la irradiancia, se considera entonces que puede “reparar” el daño producido por la RUV. En cambio, si responde a la dosis, el daño es acumulativo y las células no pueden contrarrestar los efectos negativos de la radiación ((en este caso se dice que existe *reciprocidad*, y que cualquier combinación de energía y tiempo que tengan la misma dosis producirá el mismo impacto (Helbling & Villafañe, 2007)). Es importante considerar que uno de los mecanismos con los que el fitoplancton puede disminuir el daño producido por la RUV es a través de la síntesis de compuestos que absorben dichas longitudes de ondas (MAAs) (Korbee et al. 2006). En este sentido, se ha encontrado que las diatomeas céntricas poseen una mayor capacidad de síntesis de MAAs que las pennadas (Helbling et al. 1996); asimismo, una gran cantidad de dinoflagelados tienen la capacidad de generar estos compuestos (Banaszak, 2003). Por otra parte, los carotenoides, además de ser pigmentos accesorios a la clorofila se comportan como antioxidantes liposolubles ante un estrés lumínico (Laurion et al., 2002)), aunque esta respuesta no es generalizada: solo ha sido reportado para cianobacterias y clorófitas (Roy, 2000). Asimismo, se ha reportado una función parcialmente protectora ante un estrés lumínico de las xantofilas, tal como se ha observado en comunidades fitoplanctónicas de la Patagonia (Villafañe et al. 2008).

En cuanto a la temperatura, se ha determinado que ésta juega un rol fundamental en la dinámica del fitoplancton. En relación al calentamiento global, se han observado cambios en la fenología (adelantamientos o demoras en los eventos anuales del ciclo de vida de un organismo): Por ejemplo, en lagos de zonas templadas se ha observado un adelantamiento de cerca de un mes en las floraciones de diatomeas (Adrian et al. 2006). Por otra parte, las mayores

¹ **Irradiancia:** energía recibida en un segundo por unidad de área. Sus unidades son $W m^{-2}$

² **Dosis:** energía acumulada en un cierto período de tiempo por unidad de área. Sus unidades son $J m^{-2}$

temperaturas influyen en los mecanismos de absorción de nutrientes, afectando el contenido intracelular (Furnas, 1978). Por otra parte, se han encontrado distintas respuestas en el rendimiento fotosintético del fitoplancton a distintas temperaturas, tal como se ha visto en especies de fitoplancton antártico donde la fotosíntesis a 28°C alcanza valores cercanos al 3% de lo que ocurre normalmente a temperatura ambiente (Neori & Holm-Hansen 1982).

Al momento, existen relativamente pocos estudios destinados a evaluar la acción conjunta de estas dos variables asociadas al cambio climático - RUV y temperatura en organismos acuáticos autotróficos. En este sentido, es importante mencionar el trabajo de Lesser (1996), quien determinó concentraciones significativamente más altas de radicales libres en cultivos de algas simbióticas de corales cuando se exponían a temperaturas más elevadas en presencia de RUV. Por otra parte, en estudios realizados con dinoflagelados marinos, Helbling et al. (datos sin publicar) encontraron que las respuestas fotosintéticas a la RUV eran variables a distintas temperaturas. Estos estudios revelan la importancia de considerar conjuntamente la temperatura y la RUV cuando se trata de evaluar el posible impacto de un cambio global en organismos fitoplanctónicos.

OBJETIVO

El objetivo de este trabajo es determinar los efectos conjuntos de la RUV y de la temperatura en la fotosíntesis y en la incorporación de sílice en diatomeas. Para lograrlo se compararán las respuestas en dos especies: *Thalassiosira weissflogii* (Grunow) (céntrica) y *Asterionellopsis glacialis* (Cleve & Moller) (pennada).

En particular, las hipótesis de trabajo son las siguientes:

- 1) El crecimiento de las diatomeas será menor al estar expuestas a la RUV. Sin embargo, un aumento de temperatura resultará en un mayor crecimiento.
- 2) La incorporación de sílice será menor en diatomeas expuestas a la RUV que en aquellas que fueron expuestas solo a PAR.
- 3) La RUV provocará un daño reversible (i.e., dinámico) en el fotosistema de las diatomeas estudiadas.
- 4) Un aumento de temperatura resultará en un menor daño al fotosistema.

MATERIALES Y MÉTODOS

Condiciones de cultivo:

Se trabajó con dos especies de diatomeas, una céntrica - *Thalassiosira weissflogii* (Grunow) y una pennada - *Asterionellopsis glacialis* (Cleve & Moller), ambas provenientes del cepario de la EFPU. Los cultivos fueron mantenidos en recipientes de 250 ml con agua de mar autoclavada y enriquecida con nutrientes en la concentración del medio de cultivo f/2 (Guillard, 1975) (0,882 mM de nitrato, 0,036 mM de fosfato y 0,105 mM de silicato, respectivamente). Los cultivos se mantuvieron con un fotoperíodo de 12 horas de luz: 12 horas de oscuridad, y la iluminación fue provista con lámparas Philips daylight alcanzando una irradiancia de PAR de 1100 $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (236 W m^{-2}) Se mantuvo la temperatura a 18 °C o 23 °C (dependiendo del experimento a realizar) dentro de una cámara iluminada (Sanyo MLR 350), y cuando los cultivos se encontraban en la fase exponencial de crecimiento, se utilizaron para realizar experimentos tal como se describe a continuación.

➤ *Experimentación*

Para lograr los objetivos planteados se realizaron dos tipos de experimentos: En un tipo, los cultivos fueron expuestos a un régimen constante de radiación (utilizando iluminación artificial) bajo dos temperaturas; mientras que en el otro tipo, los cultivos se expusieron a radiación solar y temperatura ambiente.

a) Experimentos con iluminación artificial: Los cultivos (previamente aclimatados y creciendo a la temperatura de experimentación, 18 °C o 23 °C) se colocaron en recipientes de policarbonato de 4 L de capacidad transparentes a la RUV. Se implementaron tres tratamientos de radiación (cada tratamiento por triplicado): 1) **PAB** (PAR + RUV-A + RUV-B), recipientes sin cubrir, muestras expuestas a longitudes de onda entre 280-700 nm; 2) **PA** (PAR + RUV-A), recipientes cubiertos con un filtro PR (Montagefolie), muestras expuestas a longitudes de onda entre 315-700 nm, y; 3) **P** (PAR), recipientes cubiertos con filtro Ultraphan (UV Opak), muestras expuestas a longitudes de onda entre 400-700 nm. Las características de transmisión de los filtros y materiales utilizados se muestran en la Figura 13.

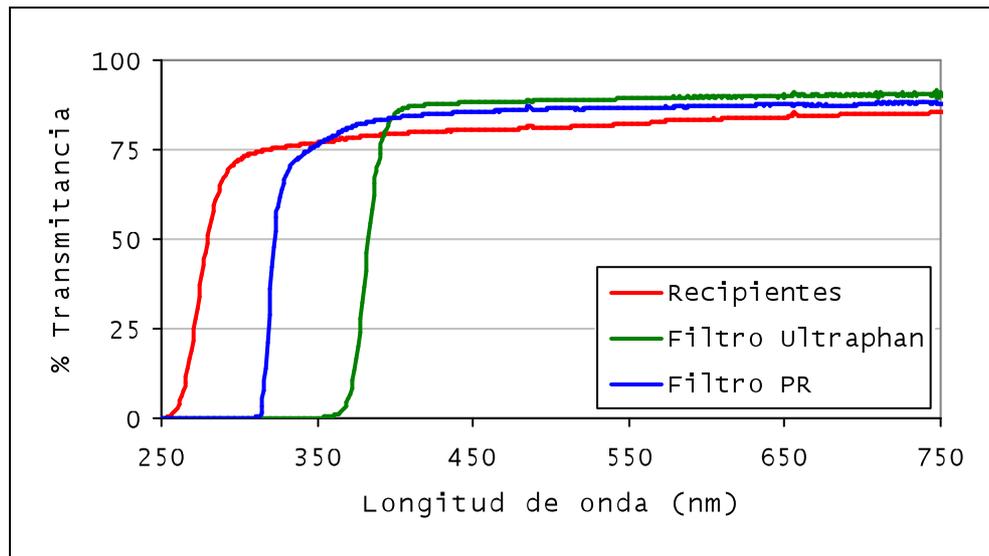


Figura 13: Características ópticas de los recipientes y filtros utilizados.

Los recipientes se colocaron en una cámara de cultivo (Sanyo MLR 350) provistas con tubos Philips daylight para PAR y Q-Panel UVA340 para RUV, bajo los siguientes niveles de radiación: 164, 42,8 y 0,7 W m^{-2} para PAR, RUV-A y RUV-B, respectivamente. Es de destacar que los niveles de RUV fueron similares a los registrados en un día de primavera en Playa Unión, Rawson, Chubut (Helbling et al. 2005). Se utilizó un fotoperíodo de 12 horas de iluminación: 12 horas de oscuridad. Dado que este experimento planteaba el efecto de diferentes temperaturas, se realizó en dos secuencias para cada especie: una realizada a 18 °C, y otra a 23 °C, cada una de seis días de duración.

Para la determinación de la concentración de clorofila-a, abundancia celular y silicatos en el medio se tomó una muestra diaria minutos antes de que comenzara el período de iluminación. El volumen para determinación de clorofila-a osciló entre 60 y 200 ml, dependiendo del estado del cultivo (a medida que aumenta la concentración cada vez se requiere menos volumen para lograr una buena lectura con los instrumentos de medición). Para el cálculo de la concentración celular, se tomaron 15 ml y para la determinación de silicatos, 20 ml.

Para las mediciones del rendimiento fotosintético (i.e., fluorescencia *in vivo*) se tomaron dos muestras diarias (una antes de que comenzara la fase de iluminación, y otra minutos antes de que finalizara). El volumen requerido fue de ~ 5 ml por muestreo y con un tiempo necesario para medir todas las muestras de entre 30 y 40 minutos.

b) Experimentos bajo radiación natural: Los cultivos se colocaron en recipientes de 4 L transparentes a la RUV. Se implementaron tres tratamientos de radiación (por triplicado), PAB, PA y P, tal como fuera realizado en los experimentos bajo iluminación artificial. Los recipientes se colocaron en un baño con agua circulante, la cual se mantuvo en $14^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$. Este experimento tuvo una duración de cinco días.

Al igual que en el experimento anterior, se tomaron diariamente muestras antes del inicio de la fase de iluminación para el análisis de clorofila-a, conteo de células y concentración de silicato. Sin embargo, para poder hacer un seguimiento diario del rendimiento fotosintético se tomaron muestras cada hora durante el período de iluminación solar natural (cada una de ~ 5 ml).

El experimento realizado con *T. weissflogii* se realizó entre los días 7 y 12 de mayo de 2009, y el de *A. glacialis* entre los días 14 y 19 de mayo de 2009.

Análisis y mediciones

Medición de radiación: La radiación solar incidente fue medida continuamente durante los días de los experimentos empleando un radiómetro de banda ancha ELDONET (Real Time Computers) que mide RUV-B (280-315 nm), RUV-A (315-400 nm) y PAR (400-700 nm) con una frecuencia de una medición por segundo y almacena automáticamente un valor medio por minuto. Por su parte, la radiación incidente en los experimentos realizados en la cámara de incubación fue medida con el mismo instrumental descrito anteriormente.

Determinación de parámetros fotosintéticos y curvas P vs E: Para tal fin se utilizó un fluorómetro de amplitud modulada de pulsos (water PAM, walz) con el que se midió:

La eficiencia fotoquímica del fotosistema II (PSII) (Y): Un parámetro que mide la proporción de la luz absorbida por la clorofila asociada con el PSII que es usada en la fotosíntesis.

La tasa de transporte electrónico (ETR): Un parámetro que se calcula en base al rendimiento (Y), y a la radiación absorbida.

Las **tasas de inhibición fotosintética** fueron calculadas como la pendiente de la recta que une los dos puntos consecutivos de rendimiento fotoquímico antes y después de cada período de iluminación de 12 horas. Por su parte, las **tasas de recuperación fotosintética** fueron calculadas como la pendiente de la recta que

une los valores de rendimiento fotoquímico medidos al inicio y al final del período de oscuridad.

Las curvas P vs E (Figura 14) representan una herramienta muy útil para determinar la fotoaclimatación de las células al momento de muestro. Para este trabajo se utilizó la tasa de transporte electrónico (ETR) obtenidas con el fluorómetro PAM como una aproximación de la producción primaria (Korbee et al. 2004). Las curvas se construyeron empleando un rango de irradiancias desde 0 hasta 1818 $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ provistas por el fluorómetro.

Los parámetros de las curvas P vs E fueron obtenidos usando el modelo de Eilers & Peeters (1988) y ajustando los datos por iteración de acuerdo a:

$$P = E \times (aE^2 + bE + c)^{-1}$$

(Ecuación 9)

donde P es la tasa de transporte electrónico, E es la irradiancia ($\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$) y a, b y c son los parámetros de ajuste. Con estos parámetros fue posible calcular la pendiente inicial ($\alpha = c^{-1}$), la tasa de máxima producción ($P_{\text{max}} = [b + 2(a \times c)^{1/2}]^{-1}$) y la intensidad óptima ($E_k = P_{\text{max}} / \alpha$).

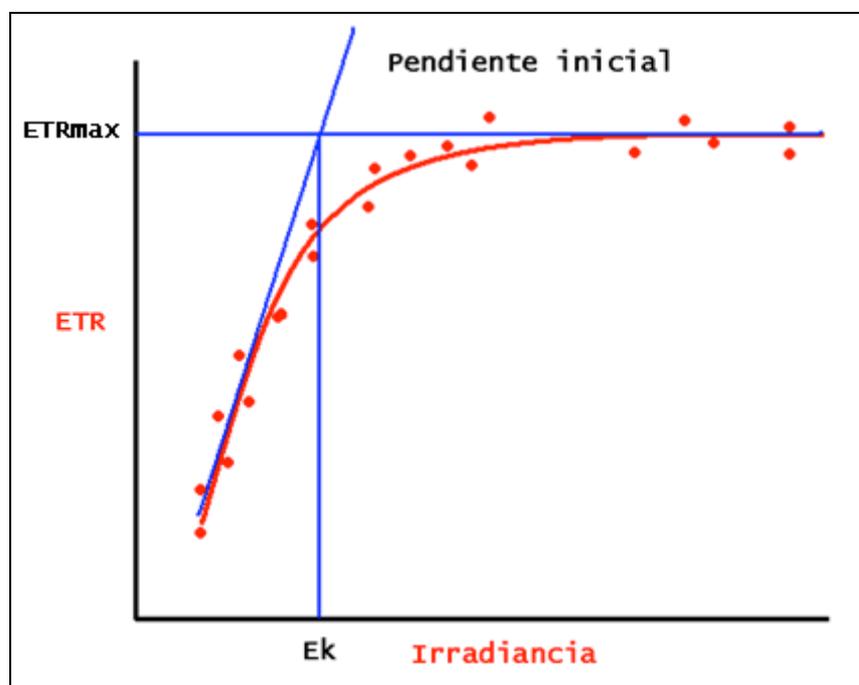


Figura 14: Curva P vs E típica, indicando los parámetros calculados.

Análisis de clorofila-a y otros pigmentos fotosintéticos y compuestos que absorben RUV: La

concentración de clorofila-a fue determinada espectrofotométricamente y fluorométricamente. Se filtraron entre 60 y 200 ml de muestra (dependiendo del estado del cultivo) en filtros Whatman GF/F (de 25 mm de diámetro), se los colocó en tubos Falcon de 15 ml de capacidad y se agregaron 5 ml de metanol absoluto. Los tubos fueron luego dispuestos en una gradilla dentro de un sonicador durante 20 minutos (para lisar las células y extraer completamente la clorofila) y una vez finalizado este proceso, se los dejó reposar durante 40 minutos dentro del sonicador, donde el agua circundante se hallaba a 20°C. Transcurrido este lapso de tiempo, se centrifugó a 1500 g durante 15 minutos; finalmente, la concentración de clorofila se obtuvo analizando la absorbancia del extracto de metanol a distintas longitudes de onda utilizando un espectrofotómetro de barrido (Hewlett Packard modelo 8453E) y utilizando la fórmula de Porra (2002).

Empleando los espectros de absorción se determinó la presencia de compuestos que absorben la RUV (Helbling et al. 1996) midiendo la altura de picos de absorbancia entre 320 y 340 nm. Asimismo, se determinó la concentración de carotenoides a partir de una lectura a 470 nm (Wellburn, 1994).

Por otra parte, este mismo extracto se utilizó para determinar la concentración de clorofila a por fluorimetría (Holm-Hansen et al. 1965), midiendo la fluorescencia del extracto antes y después de acidificar con HCl 1N. Para estas determinaciones se utilizó un fluorómetro (Turner Designs modelo TD 700).

Conteos celulares / análisis de morfología: Se colectaron 15 ml muestra las cuales fueron fijadas con formalina (concentración final de 0,4% de formaldehído). Las muestras fueron analizadas con un microscopio invertido (Leica modelo DM IL) empleando una cámara Sedgwick Rafter de 1 ml de capacidad; el cálculo de abundancia celular se realizó utilizando la metodología descrita en Villafañe & Reid (1995).

Asimismo, se calculó el biovolumen celular como una manera de estimar la biomasa de las diatomeas. Éste fue calculado aproximando la forma de las células con figuras geométricas y promediando las medidas de 25 células (Hillebrand et al. 1999). En *T. weissflogii* el volumen (V) y el área (A) se calcularon aproximando a un cilindro (ver Figura 15) y empleando las siguientes ecuaciones:

$$V = \pi \times r^2 \times h = \pi/4 \times d^2 \times h \quad (\text{Ecuación 10})$$

$$A = (2 \times \pi \times r^2) + (2 \times \pi \times r \times h) = \pi \times d \times (d/2 + h)$$

(Ecuación 11)

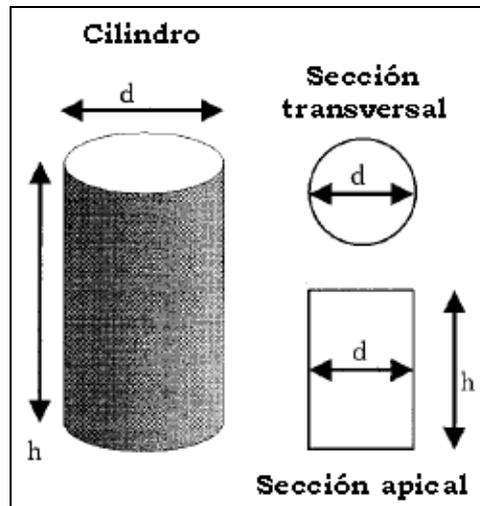


Figura 15: Forma geométrica utilizada para calcular el volumen celular de *T. weisflogii*.

En *A. glacialis* no fue posible calcular el área o volumen ya que su pequeño tamaño no permitió realizar mediciones efectivas.

Determinación de silicato: La determinación de silicatos se realizó de acuerdo a la metodología descrita en Strickland & Parsons (1972), utilizando un espectrofómeto de barrido (Hewlett Packard modelo 8453). Con este método, el silicato reactivo reacciona con molibdato de amonio formando un complejo amarillo. No sólo se forma silicomolibdato, sino también fosfomolibdato y arsenomolibdato. Por ello se agrega una solución de metol-sulfito de sodio que reduce estos compuestos y ácido oxálico que destruye los compuestos de Ar y P. El compuesto final se mide a una $\lambda = 810$ nm (Figura 16).

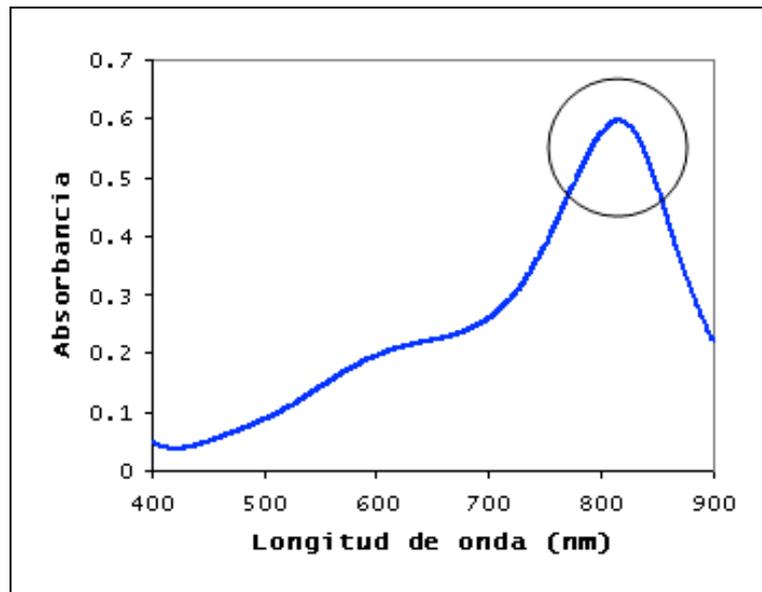


Figura 16: Pico de absorbancia a 810 nm utilizado para determinar la concentración de silicatos en el medio.

La desaparición de silicatos en el medio se utilizó luego para estimar la incorporación de este nutriente por las células.

Tratamiento de datos / estadística: Para los cálculos de rendimiento fotosintético se hicieron 6 mediciones de cada réplica por muestreo. Se obtuvo un valor medio para cada réplica por tiempo de muestreo y con los 3 valores medios de las réplicas se calculó la media y el desvío estándar para cada tratamiento. Para los cálculos de inhibición fotosintética, tasas de inhibición y de recuperación, y teniendo en cuenta los valores medios de rendimiento de cada réplica, se calcularon los valores de cada variable para cada una de ellas para cada tiempo, y se los promedió en cada tratamiento. En cuanto a los compuestos que absorben RUV, carotenoides, parámetros de las curvas P vs E, silicatos, concentración de células y biovolumen, se obtuvo un valor para cada una de las réplicas y se los promedió para cada tratamiento, calculando además el desvío estándar. En cuanto a la clorofila-a, la cual fue estimada utilizando dos métodos distintos, primero se hizo un promedio entre las tres réplicas de cada tratamiento por cada tiempo para cada método. Al no existir diferencias significativas entre las mediciones realizadas con los dos métodos se calculó el valor medio entre ambas estimaciones.

En todos los casos se presentan los datos como media y desviación estándar, excepto en el caso de la clorofila-a que se muestra como media y rango medio. Dado que los datos no cumplían con una distribución normal (se realizó el test Shapiro-wilk para probarlo), se hizo un análisis de la varianza de dos vías diseñado para datos ordenados en rangos (la extensión Scheirer-Ray-Hare del

test Kruskal-Wallis) para comparar los efectos de la temperatura en los 3 tratamientos de radiación y así determinar diferencias significativas entre ellos, con un nivel de confianza del 95% (Sokal & Rohlf, XXXX).

RESULTADOS

Los resultados se presentan en el siguiente orden: Primero, se muestran los efectos de la RUV en el crecimiento de los cultivos de diatomeas; luego, las respuestas referentes a la utilización de silicato y los efectos observados en el rendimiento fotoquímico (i.e., daño en el fotosistema), y cómo éstos se ven influenciados por la temperatura. Después, se muestran los cambios observados en la concentración de compuestos que absorben RUV y de pigmentos accesorios (i.e., carotenoides) al inicio y al final de la fase exponencial de crecimiento, así como del biovolumen celular. Finalmente se muestran los resultados de los experimentos realizados bajo radiación solar natural en los cultivos de las dos diatomeas utilizadas.

Efectos de la RUV en el crecimiento

Para una mayor claridad, en todas las figuras que muestren variables en función del tiempo de exposición se mostrarán dos zonas coloreadas (i.e., clara y gris). Asimismo, cuando en el texto se haga referencia al crecimiento exponencial, en el tratamiento PAR corresponderá sólo a datos dentro de la zona clara.

Los cultivos de las dos especies expuestos solamente a PAR (tratamiento P) crecieron exponencialmente hasta las 72 horas (zona clara en la Figura 17). A partir de allí, la concentración de clorofila-a se mantuvo más o menos constante, llegando a una meseta (zona gris en la Figura. 17). Los cultivos expuestos a la RUV

(tratamientos PAB y PA) crecieron exponencialmente por más tiempo, aunque el final de la fase exponencial varió entre especies y temperatura.

Para *A. glacialis*, la concentración de clorofila-a en el tratamiento PAB fue siempre significativamente menor ($p < 0,05$) que en los otros tratamientos para las dos temperaturas utilizadas (Figura 17 A y B). Sin embargo, a 23 °C no hubo diferencias significativas entre los tratamientos PA y P, mientras que estos dos sí las presentaron a 18 °C. En el caso de *T. weissflogii* (Figura 17 C y D), y durante el crecimiento exponencial, se observaron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los tres tratamientos a ambas temperaturas. A 23 °C, la concentración de clorofila-a en el tratamiento PAB disminuyó en forma continua.

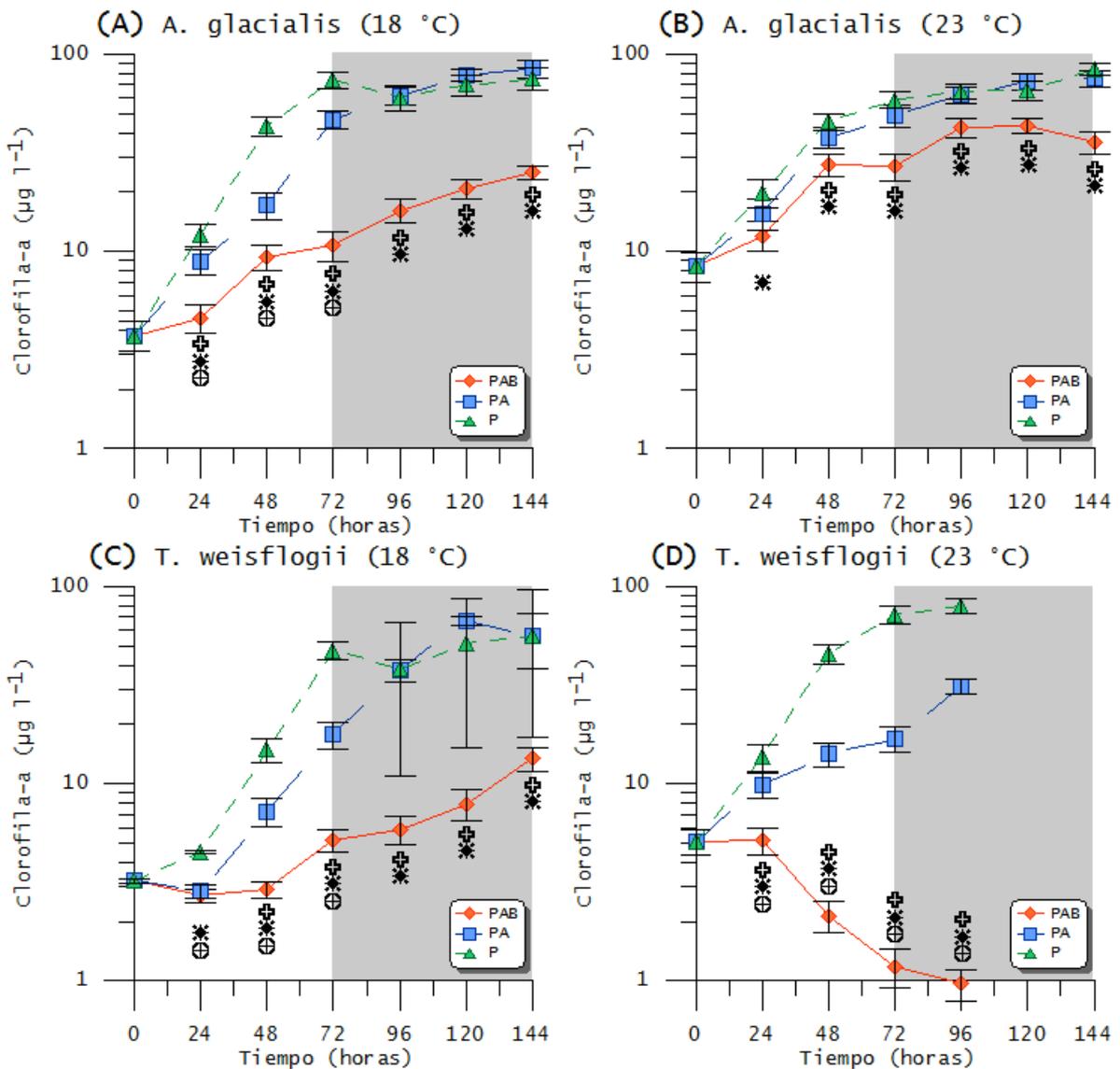


Figura 17: Evolución de la concentración de clorofila-a a lo largo del tiempo para los cultivos de *A. glacialis* (A y B) y de *T. weisflogii* (C y D) a 18 °C y 23 °C. Los símbolos ⊕, * y ⊕ indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los tratamientos PAB y PA, PAB y P, y PA y P respectivamente.

Durante todo el experimento los cultivos expuestos solo a PAR (tratamiento P) mostraron un incremento en la abundancia celular significativamente mayor ($p < 0,05$) al de los cultivos bajo el tratamiento PAB (Figura 18). En *A. glacialis* el aumento de 5 °C derivó en un crecimiento exponencial más corto (Figura 18 A y B), y en *T. weisflogii* en diferencias significativas ($p < 0,05$) durante todo el experimento entre los tratamientos PA y P (Figura 18 C y D).

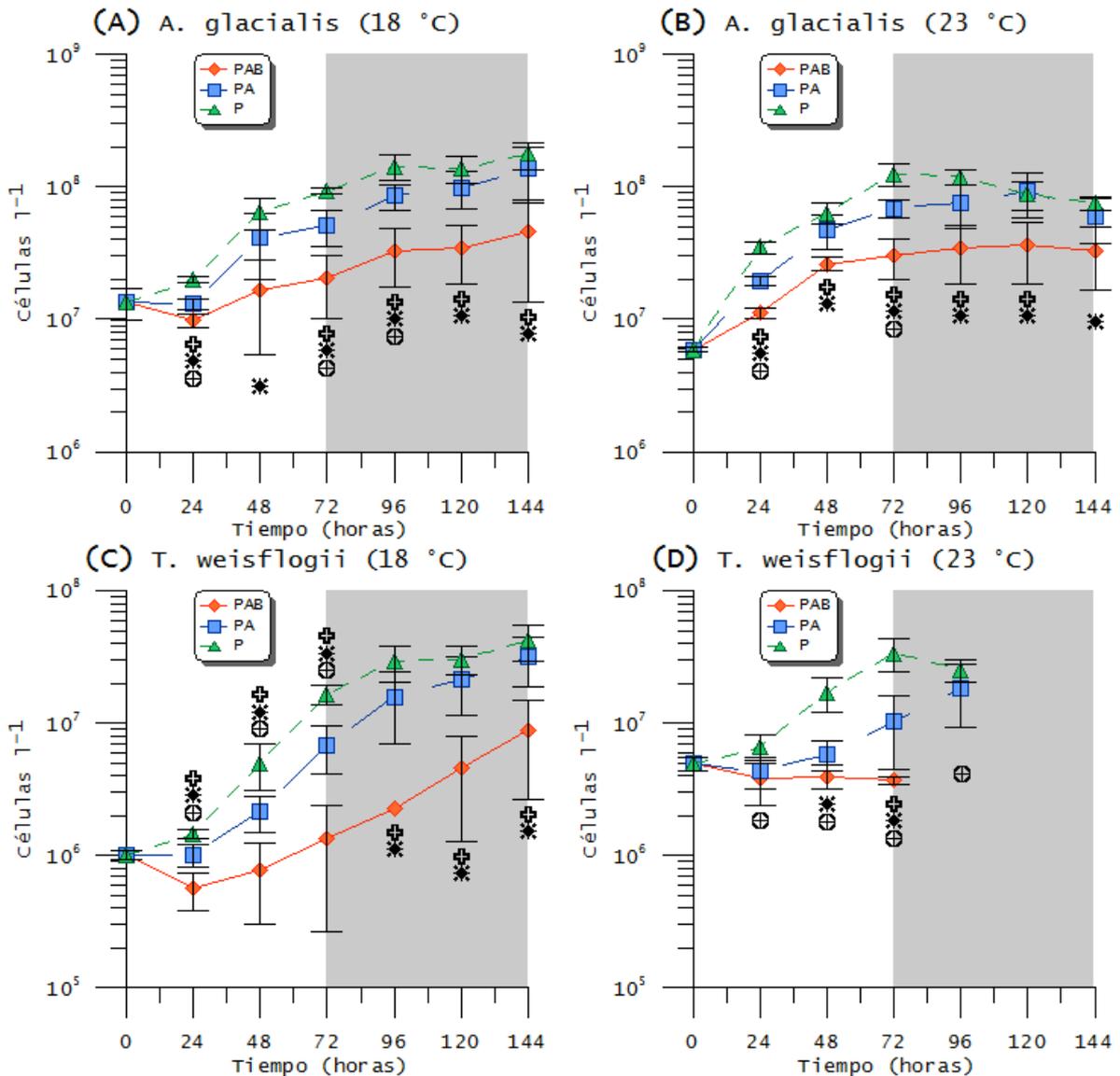


Figura 18: Evolución de la abundancia celular a lo largo del tiempo para los cultivos de *A. glacialis* (A y B) y de *T. weissflogii* (C y D) expuestos a distintas temperaturas y tratamientos de radiación. La zona en gris indica el inicio de una meseta en las curvas de crecimiento. Los símbolos ⊕, ✱ y ⊕ indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los tratamientos PAB y PA, PAB y P, y PA y P, respectivamente.

Las tasas de crecimiento exponencial para ambas especies se muestran en la Figura 19. Éstas fueron calculadas en base a la clorofila-a (Figura 19 A y C) y a la abundancia celular (Figura 19 B y D). Puede observarse que las tasas de crecimiento de los cultivos bajo el tratamiento PAB fueron siempre significativamente menores ($p < 0,05$) que aquellas bajo los tratamientos PA y P en ambas especies (exceptuando el caso de la abundancia de *T. weissflogii* a 18 °C, Figura 19 D). En *A. glacialis*, las tasas de

crecimiento basadas en la abundancia celular fueron significativamente mayores ($p < 0,05$) a 23 °C que a 18 °C (Figura 19 B), aunque no se encontraron diferencias significativas en las tasas de incremento de la clorofila-a (Figura 19 A). En *T. weissflogii* solo pudieron observarse diferencias significativas ($p < 0,05$) entre temperaturas en las tasas de crecimiento basadas en la abundancia celular en los cultivos expuestos a PAR (Figura 19 D). No hubo diferencias significativas ($p > 0,05$) en aquellas basadas en la clorofila-a para cultivos bajo el tratamiento P, aunque si las hubo para los tratamientos PAB y PA (Figura 19 C). Se destacan las tasas negativas de los cultivos de *T. weissflogii* a 23 °C ($-0,91 \text{ d}^{-1}$ para clorofila-a y $-0,14 \text{ d}^{-1}$ para la abundancia celular) (Figura 19 C y D, respectivamente), indicando el decaimiento del cultivo con el tiempo.

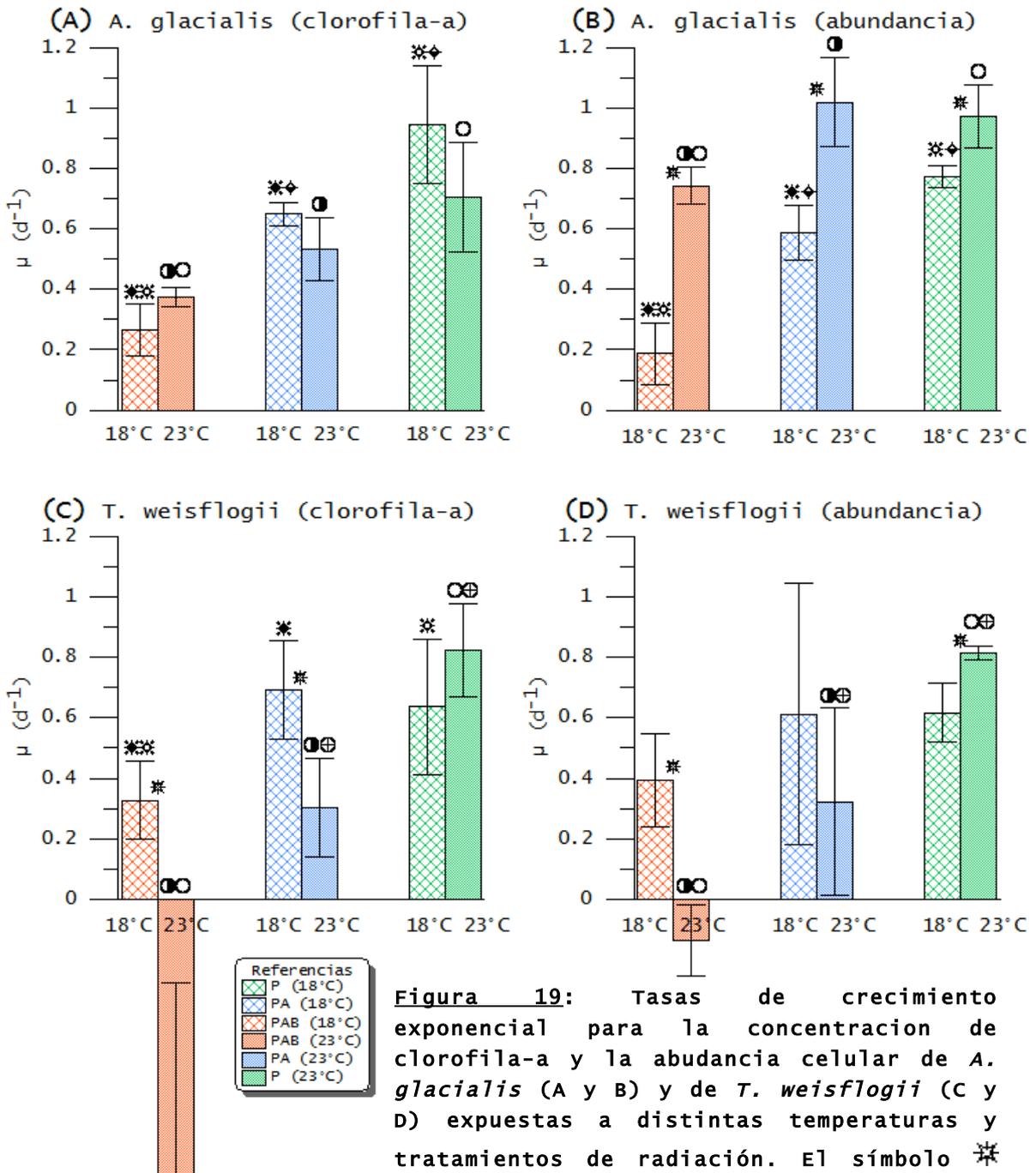


Figura 19: Tasas de crecimiento exponencial para la concentración de clorofila-a y la abundancia celular de *A. glacialis* (A y B) y de *T. weisflogii* (C y D) expuestas a distintas temperaturas y tratamientos de radiación. El símbolo * indica diferencias significativas ($p < 0,05$) entre tasas del mismo tratamiento de radiación a distintas temperaturas. Los símbolos *, * y * indican diferencias significativas ($p < 0,05$) a 18 °C entre los tratamientos PAB y PA, PAB y P, y PA y P, respectivamente. Los símbolos ⊙, ⊛ y ⊕ indican diferencias significativas ($p < 0,05$) a 23 °C entre los tratamientos PAB y

Efectos de la RUV en la incorporación de silicato

La concentración de silicato en los cultivos expuestos solo a PAR fue significativamente menor ($p < 0,05$) que en los expuestos bajo otros tratamientos (Figura 20). En *A. glacialis* (Figura 20 A y B) las diferencias entre los tratamientos PA y P fueron significativas ($p < 0,05$) durante la fase exponencial, pero sólo hasta alcanzar la meseta en el crecimiento. *T. weisflogii* a 18 °C (Figura 20 C) mostró la mayor disminución en la concentración de este nutriente en todos los tratamientos. Debe considerarse que mientras a 18 °C las diferencias entre tratamientos fueron aproximadamente las mismas, a 23 °C las especies se comportaron en forma distinta: En *A. glacialis* (Figura 20 B) la concentración de silicato de los tratamientos PA y P fue más similar entre sí, mientras que en *T. weisflogii* (Figura 20 D) lo fue más en los tratamientos PAB y PA.

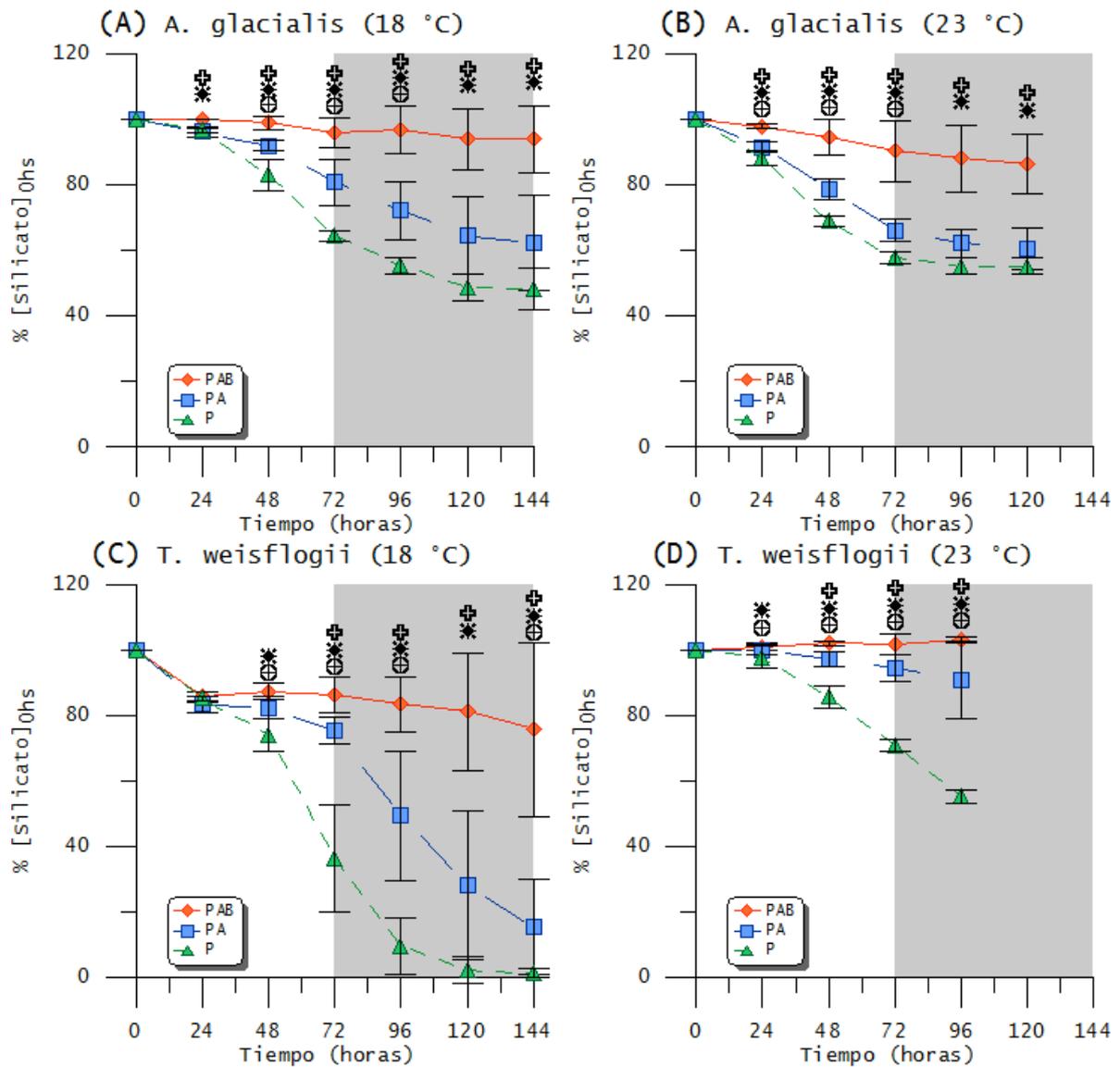


Figura 20: Evolución de la concentración de silicato (expresada como porcentaje de la concentración inicial) a lo largo del tiempo para los cultivos de *A. glacialis* (A y B) y de *T. weisflogii* (C y D) expuestos a distintas temperaturas / tratamientos de radiación. La zona en gris indica el comienzo de la meseta en las curvas de crecimiento. Los símbolos ⊕, * y ⊕ indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los tratamientos PAB y PA, PAB y P, y PA y P, respectivamente.

Las tasas de disminución de la concentración de silicato – que indican el consumo de este nutriente por parte de los organismos (nótese que al ser calculadas como la diferencia en la concentración de sílice durante cada día resultan negativas) se muestran en la Figura 21. Las tasas de *A. glacialis* (Figura 21 A) no presentaron diferencias significativas ($p > 0,05$) entre ambas temperaturas, mientras que en *T. weisflogii* (Figura 21 B) a 18 °C fueron significativamente mayores ($p < 0,05$) que a 23 °C.

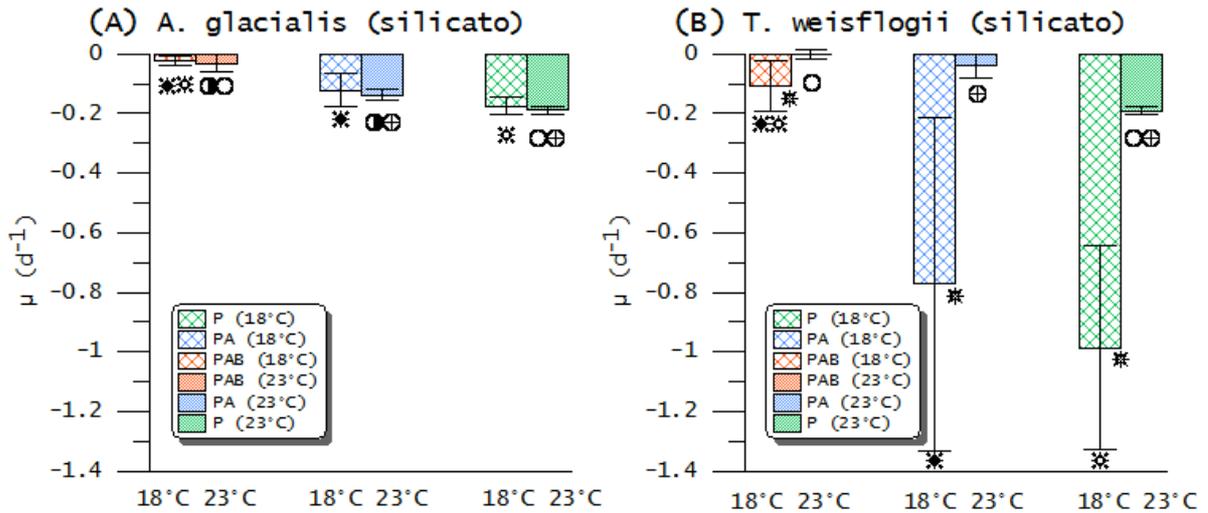


Figura 21: Tasas de consumo de silicato de *A. glacialis* (A) y de *T. weisflogii* (B) expuestas a distintas temperaturas / tratamientos de radiación. El símbolo * indica diferencias significativas ($p < 0,05$) entre tasas del mismo tratamiento a distintas temperaturas. Los símbolos **, * y ⊕ indican diferencias significativas ($p < 0,05$) a 18 °C entre los tratamientos PAB y PA, PAB y P, y PA y P respectivamente. Los símbolos ●, ○ y ⊕ indican diferencias significativas ($p < 0,05$) a 23 °C entre los tratamientos PAB y PA, PAB y P, y PA y P respectivamente.

Efectos de la RUV en el rendimiento fotoquímico

El rendimiento fotoquímico de los cultivos de ambas especies (Figura 22) mostró un patrón diario de comportamiento, con un valor significativamente menor observado al final de la fase de iluminación y uno significativamente mayor al final de la fase en oscuridad, a excepción de las primeras 24 horas en *A. glacialis* (Figura 22 A, B). En *A. glacialis* (Figura 22 A, B) el rendimiento fotoquímico de los cultivos correspondientes al tratamiento PAB fue significativamente menor ($p < 0,05$) al de los tratamientos PA y P durante la fase exponencial, y mayor que éstos a partir de la meseta (nótese que no hay necesariamente una coincidencia en las zonas clara y oscura de los graficos). Los cultivos bajo el tratamiento PAB de *T. weissflogii* a 18 °C (Figura 22 C) mostraron valores significativamente menores ($p < 0,05$) a los otros tratamientos durante el crecimiento exponencial, pero a partir de las 84 horas los cultivos del tratamiento P fueron los que mostraron los valores más bajos. A 23 °C (Figura 22 D) el rendimiento fotoquímico de los cultivos expuestos solo a PAR fue significativamente mayor ($p < 0,05$) que en los expuestos a RUV-A + PAR. No se cuentan con datos para el tratamiento PAB pues fue imposible medir la fluorescencia de la clorofila-a dada la baja concentración de este pigmento (ver Figura 17 D).

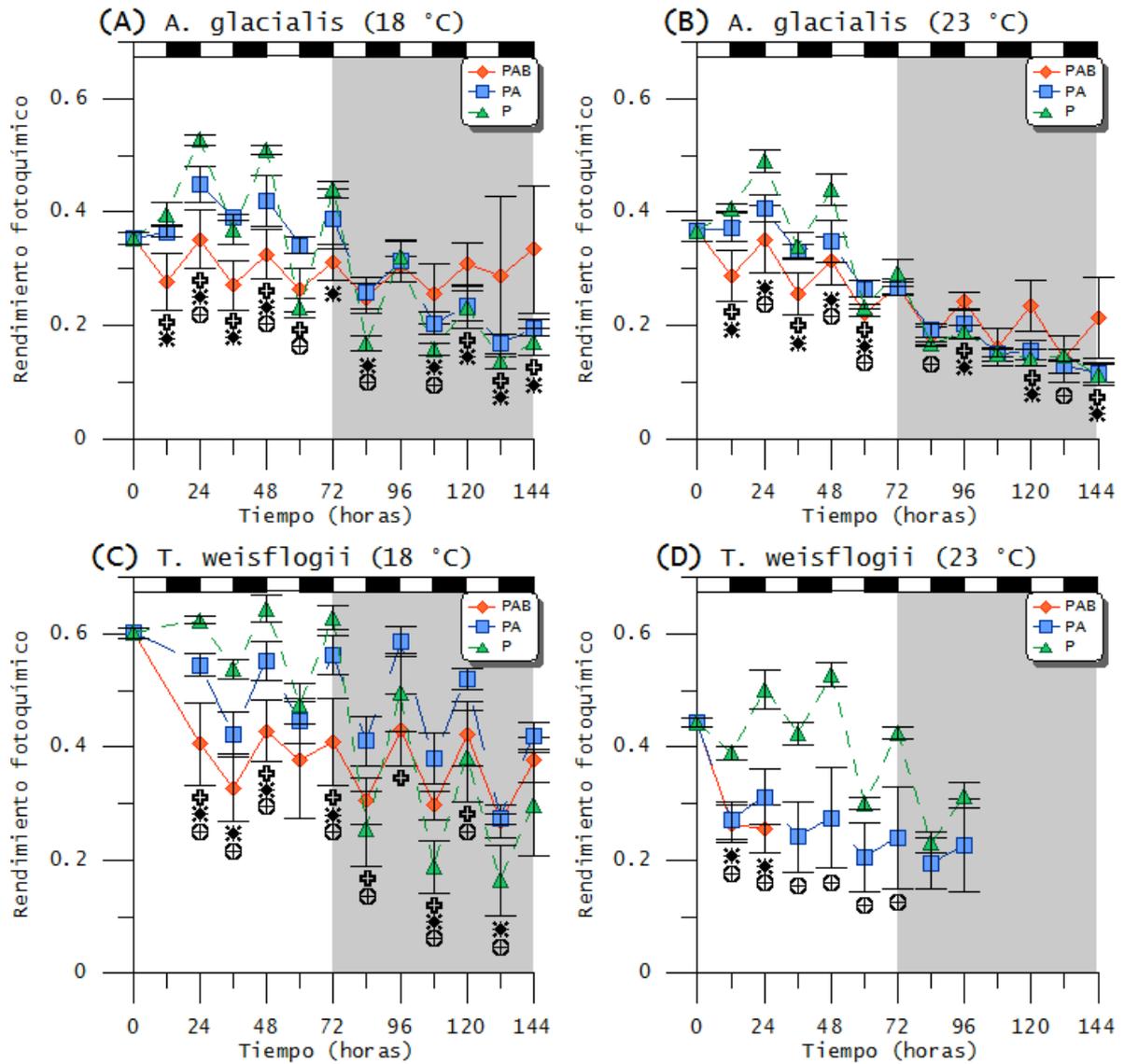


Figura 22: Rendimiento fotoquímico de los cultivos de *A. glacialis* (A y B) y de *T. weissflogii* (C y D) a distintas temperaturas / tratamientos de radiación. En la parte superior de cada panel los sectores negros indican la fase oscura y los blancos la fase de iluminación. La zona en gris indica la llegada a una meseta en las curvas de crecimiento. Los símbolos ⊕, * y ⊗ indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los tratamientos PAB y PA, PAB y P, y PA y P, respectivamente.

En las Figuras 23 y 24 se muestran las tasas de inhibición y de recuperación del rendimiento fotoquímico de los cultivos de *A. glacialis* y de *T. weisflogii* para los tratamientos PAB (paneles A y B), PA (paneles C y D) y P (paneles E y F).

En *A. glacialis* las tasas de inhibición en el tratamiento PAB (Figura 23 A) fueron siempre cercanas a -0,005 y no hubo diferencias significativas ($p > 0,05$) entre 18 y 23 °C, al igual que en los tratamientos PA (Figura 23 C); en los cultivos de *A. glacialis* expuestos solo a PAR (Figura 23 E) hubo diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las tasas de ambas temperaturas desde 12 horas antes de la llegada a la meseta de crecimiento y hasta el fin de los experimentos, siendo las tasas correspondientes a 23 °C menores que las obtenidas a 18 °C. En *T. weisflogii* no fue posible calcular las tasas para el tratamiento PAB (Figura 23 B) por falta de datos para los cultivos que crecieron a 23 °C; por su parte, los cultivos del tratamiento PA (Figura 23 D) exhibieron tasas significativamente mayores ($p < 0,05$) a 18 °C entre el primer y el segundo día, y entre el tercer y el cuarto día; finalmente, para el tratamiento P (Figura 23 F) solo se hallaron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre el tercer y el cuarto día de experimentación.

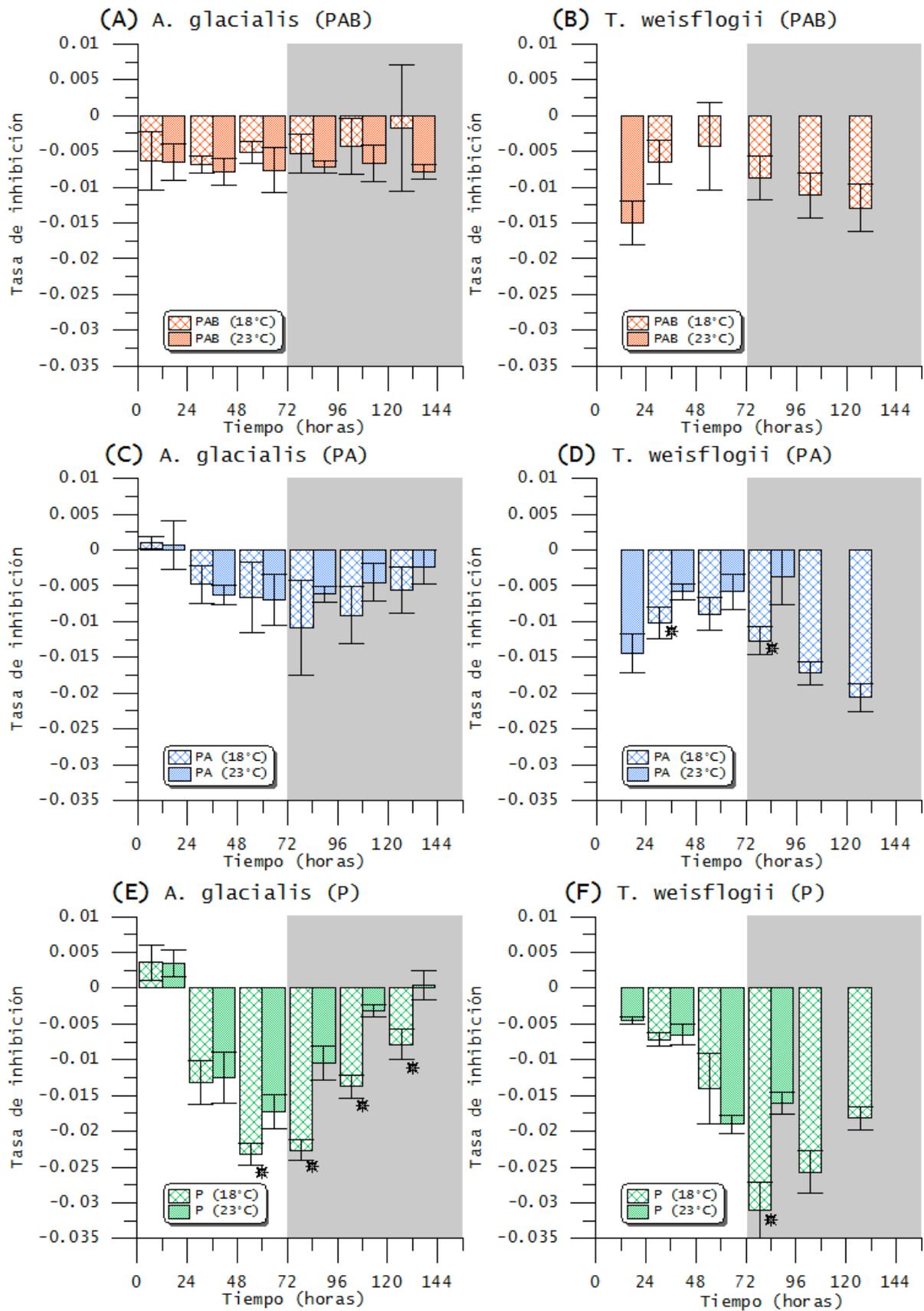


Figura 23: Tasas de inhibición fotosintética de *A. glacialis* (A, C y E) y de *T. weissflogii* (B, D y F) a distintas temperaturas / tratamientos de radiación. El símbolo * indica diferencias significativas ($p < 0,05$)

entre tasas correspondientes a cultivos que crecieron en distintas temperaturas.

Con respecto a las tasas de recuperación (Figura 24) los cultivos del tratamiento PAB de *A. glacialis* (Figura 24 A) mostraron valores cercanos a 0,005, sin diferencias significativas entre ambas temperaturas. Para los cultivos del tratamiento PA (Figura 24 C) solo hubo diferencias significativas entre las tasas calculadas a las 24 horas; para el tratamiento P, las tasas de recuperación fueron significativamente mayores ($p < 0,05$) a 23 °C a las 24 y 72 horas de exposición, y significativamente menores ($p < 0,05$) a partir de las 96 horas (Figura 24 E). En *T. weisflogii*, las tasas correspondientes al tratamiento PAB a 18 °C (Figura 24 B) fueron cercanas a 0,01 (el mismo valor absoluto que las tasas de inhibición); para el tratamiento PA (Figura 24 D) aquellas obtenidas a 18 °C fueron significativamente mayores ($p < 0,05$) que a 23 °C entre las 48 y las 96 horas. Finalmente, para el tratamiento P, la recuperación a 18 °C (Figura 24 F) fue significativamente mayor ($p < 0,05$) que a 23 °C a las 72 y 96 horas de experimentación.

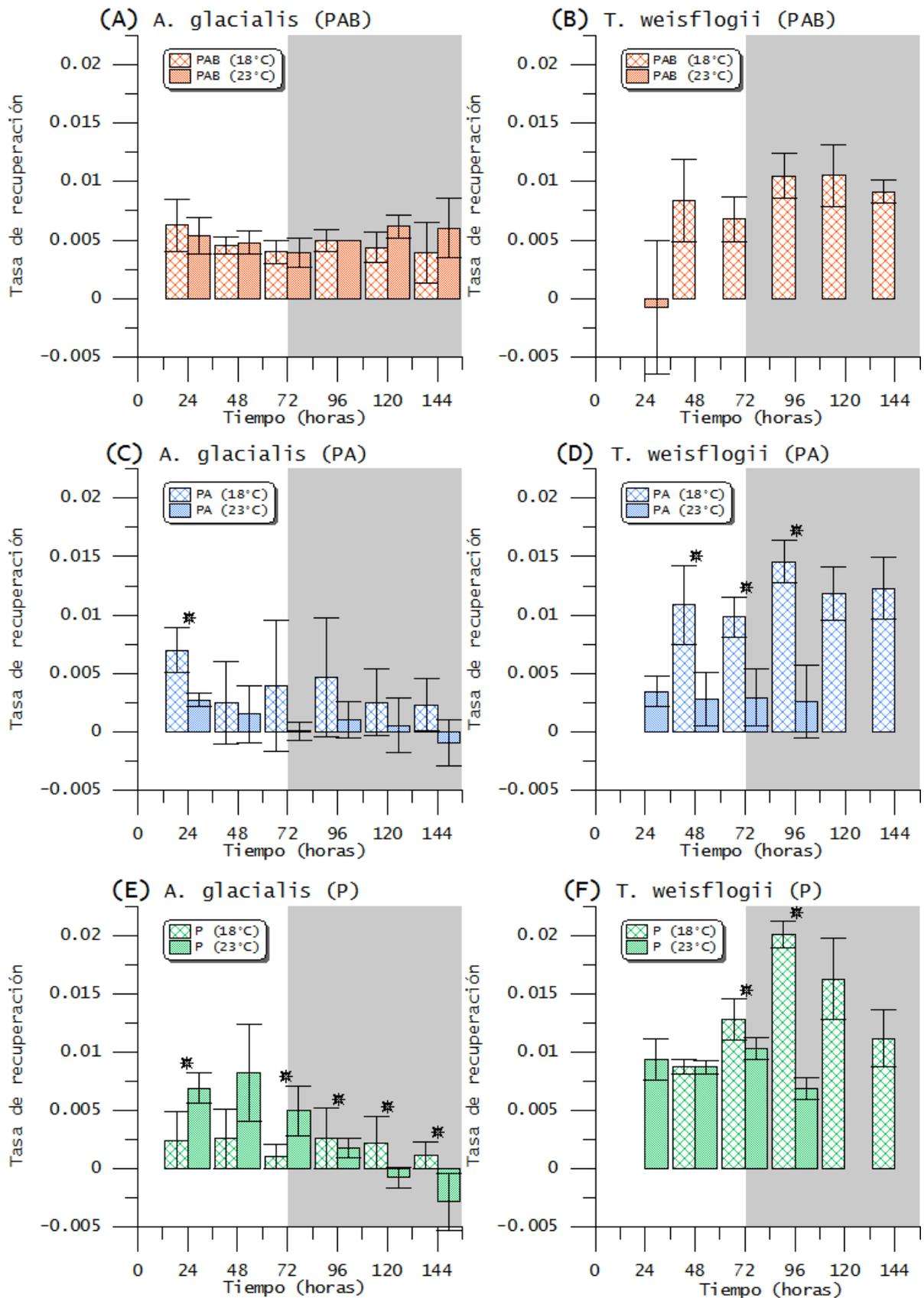


Figura 24: Tasas de recuperación fotosintética de *A. glacialis* (A, C y E) y de *T. weisflogii* (B, D y F) a distintas temperaturas / tratamientos de radiación. El símbolo * indica diferencias

significativas ($p < 0,05$) entre tasas correspondientes a cultivos que crecieron en distintas temperaturas.

Con respecto a las tasas máximas de transporte electrónico (Figura 25), y exceptuando a *T. weisflogii* incubada a 23 °C (Figura 25 D), en general se observaron diferencias significativas una vez finalizada la fase exponencial de crecimiento. Hacia el final del período de iluminación, las tasas en el tratamiento PAB de *A. glacialis* fueron significativamente mayores que las de los tratamientos PA y P en ambas temperaturas ($p < 0,05$) (Figura 25 A, B). En *T. weisflogii*, se apreciaron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los tratamientos PA y P a partir de las 72 horas, y bajo el tratamiento PAB no fue en general diferente del resto de tratamientos (Figura 25 C y D).

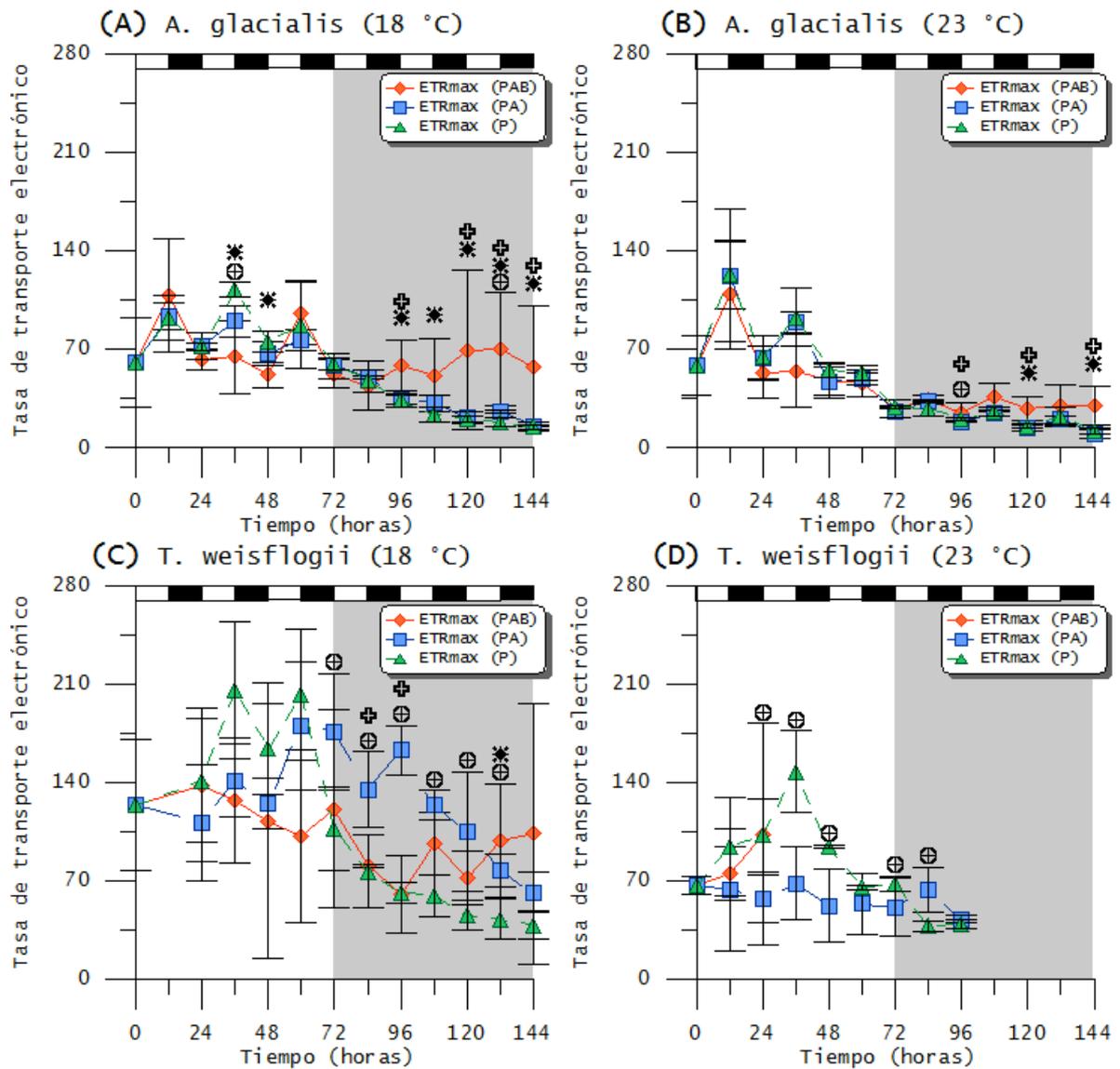


Figura 25: Tasas máximas de transporte electrónico (ETR_{max}) para los cultivos de *A. glacialis* (A y B) y de *T. weissflogii* (C y D) expuestos a distintas temperaturas / tratamientos de radiación. Los sectores negros en la parte superior de cada panel indican la fase oscura y los blancos la fase de iluminación. La zona en gris indica la meseta en las curvas de crecimiento. Los símbolos \oplus , $*$ y \oplus indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los tratamientos PAB y PA, PAB y P, y PA y P, respectivamente.

Compuestos que absorben RUV, carotenoides y biovolumen celular

En los cultivos de *A. glacialis* la presencia de compuestos que absorben RUV fue significativamente mayor ($p < 0,05$) a 18 °C que a 23 °C para todos los tratamientos (Figura 26 A). Por su parte, los cultivos expuestos a RUV + PAR de *T. weisflogii* mostraron una concentración de compuestos que absorben RUV a 18 °C cercana al 450% de la inicial, y este valor fue significativamente mayor ($p < 0,05$) que los correspondientes a los otros tratamientos; los que recibieron solo PAR mostraron una concentración significativamente mayor ($p < 0,05$) a 18 °C en comparación de 25 °C (Figura 26 B).

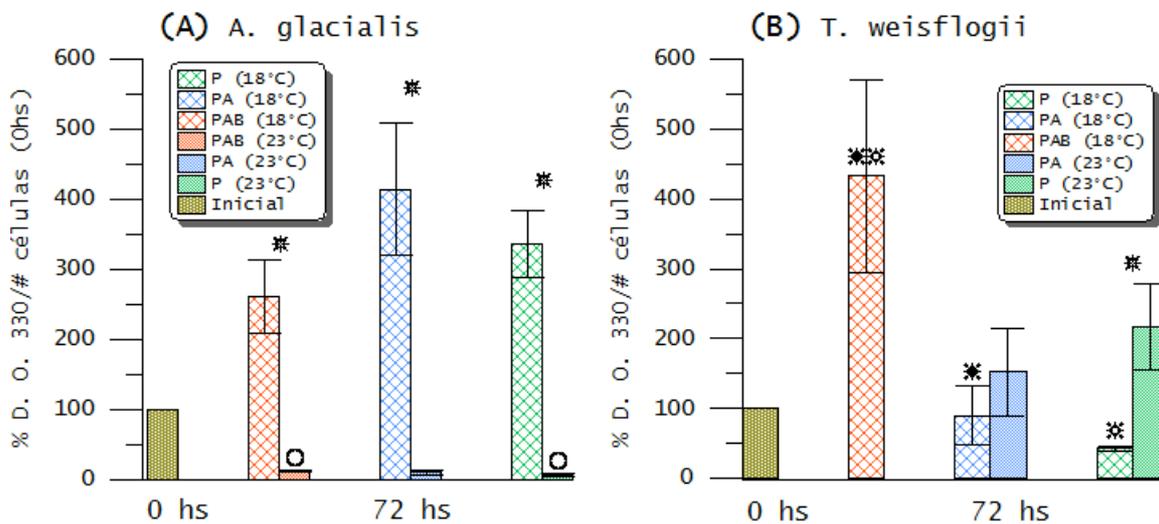


Figura 26: Estimación de la presencia de compuestos que absorben RUV en cultivos de *A. glacialis* (A) y de *T. weisflogii* (B) expuestos a distintas temperaturas / tratamientos de radiación; los datos se expresan como porcentaje respecto del tiempo inicial. El símbolo * indica diferencias significativas ($p < 0,05$) entre temperaturas. Los símbolos **, *** y ◆ indican diferencias significativas ($p < 0,05$) a 18 °C entre los tratamientos PAB y PA, PAB y P, y PA y P, respectivamente. Los símbolos ●, ○ y ⊕ indican diferencias significativas ($p < 0,05$) a 23 °C entre los tratamientos PAB y PA, PAB y P, y PA y P, respectivamente.

Los cultivos de *A. glacialis* mostraron una concentración de carotenoides (Figura 27 A) significativamente mayor ($p < 0,05$) a 18 °C que a 23 °C, cercanas al 300% respecto del valor inicial. En *T. weisflogii* (Figura 27 B) la concentración de carotenoides fue significativamente mayor ($p < 0,05$) solo en los cultivos expuestos al tratamiento P a 23 °C a comparación de aquel expuesto a 18 °C.

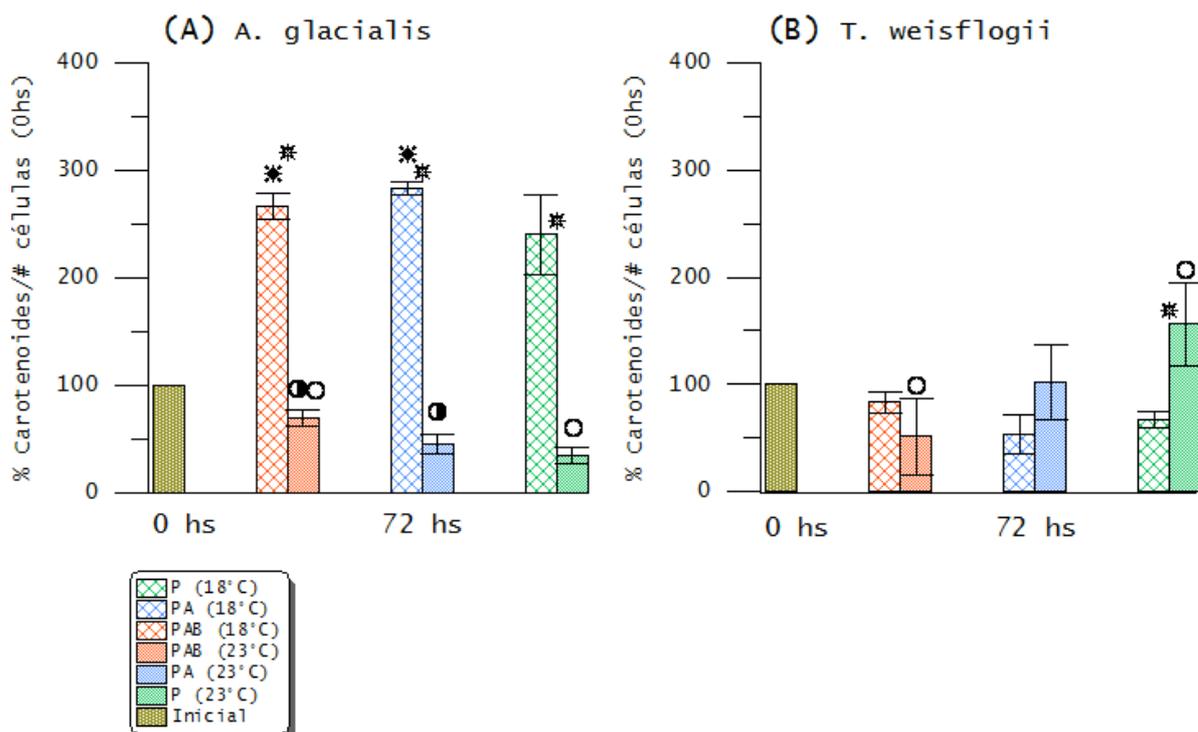


Figura 27: Concentración de carotenoides estandarizada por la abundancia celular de *A. glacialis* (A) y de *T. weisflogii* (B) expuestos a distintas temperaturas / tratamientos de radiación; los datos se expresan como porcentaje respecto del valor inicial. El símbolo * indica diferencias significativas ($p < 0,05$) entre temperaturas. Los símbolos *, * y ⊕ indican diferencias significativas ($p < 0,05$) a 18 °C entre los tratamientos PAB y PA, PAB y P, y PA y P, respectivamente. Los símbolos ⊕, ⊕ y ⊕ indican diferencias significativas ($p < 0,05$) a 23 °C entre los tratamientos PAB y PA, PAB y P, y PA y P, respectivamente.

El biovolumen de las células de *T. weisflogii* (Figura 28) no mostró diferencias significativas entre los cultivos bajo el tratamiento PAB, pero sí entre los cultivos del tratamiento PA (donde el biovolumen de los células que crecieron a 18 °C fue significativamente mayor ($p < 0,05$) que a 23°C) y entre los cultivos expuestos solo a PAR (donde los cultivos crecidos a 23 °C mostraron valores significativamente mayores ($p < 0,05$) que los que crecieron a 18 °C).

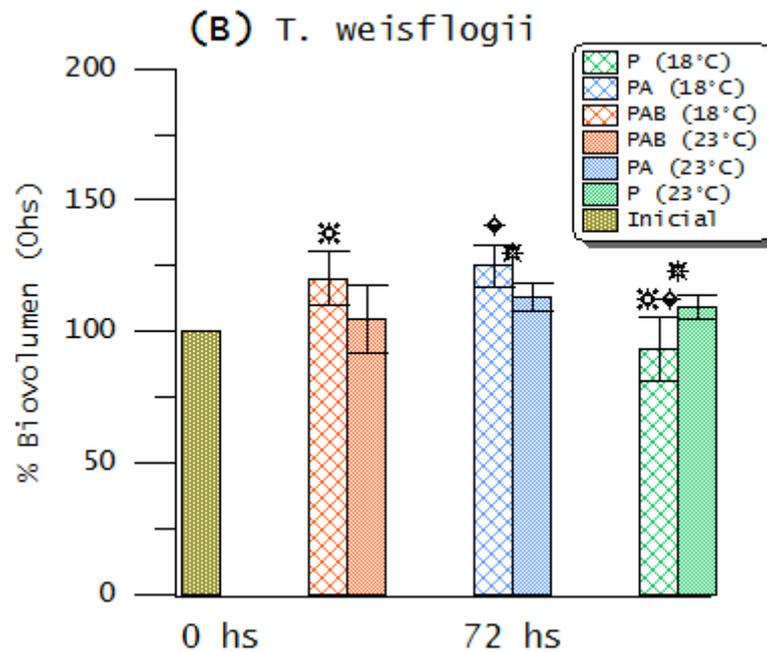


Figura 28: Biovolumen de células de *T. weisflogii* expuestas a distintas temperaturas / tratamientos de radiación, los datos se expresan como porcentaje respecto del valor inicial. El símbolo * indica diferencias significativas ($p < 0,05$) en el mismo tratamiento a distintas temperaturas. Los símbolos *, * y ♦ indican diferencias significativas ($p < 0,05$) a 18 °C entre los tratamientos PAB y PA, PAB y P, y PA y P, respectivamente.

Efectos de la RUV solar natural en *A. glacialis* y *T. weisflogii*

En el experimento desarrollado con *A. glacialis* la nubosidad causó una alta variabilidad en los niveles de radiación medidos durante todos los días, exceptuando el cuarto, que fue totalmente despejado (Figura 29 A). Como es de esperar, durante cada máximo de radiación registrado se observó un mínimo en el rendimiento fotoquímico (Figura 29 B).

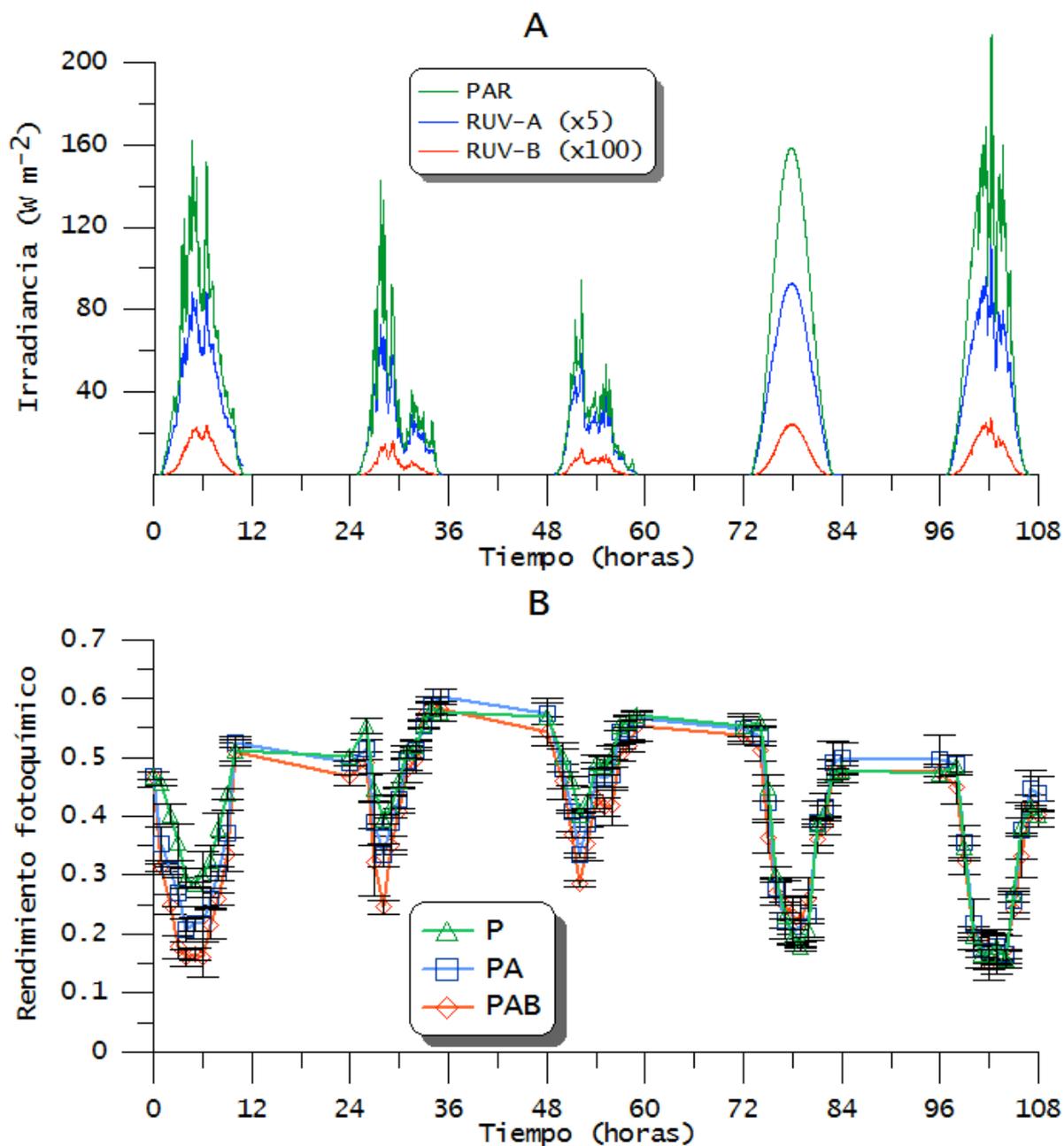


Figura 29: Niveles de radiación para cada banda del espectro (A) y el rendimiento fotoquímico correspondiente (B) de los cultivos de *A. glacialis* expuestos a radiación solar natural. Los valores de RUV-A y RUV-B fueron multiplicados por distintos factores para hacerlos visibles en la escala empleada.

Durante el experimento realizado con cultivos de *T. weisflogii* fue posible observar nuevamente la variabilidad causada por la nubosidad en todos los días, exceptuando el quinto (Figura 30 A). Además, el día más nublado presentó el menor descenso en el rendimiento fotoquímico en los tres tratamientos (Figura 30 B).

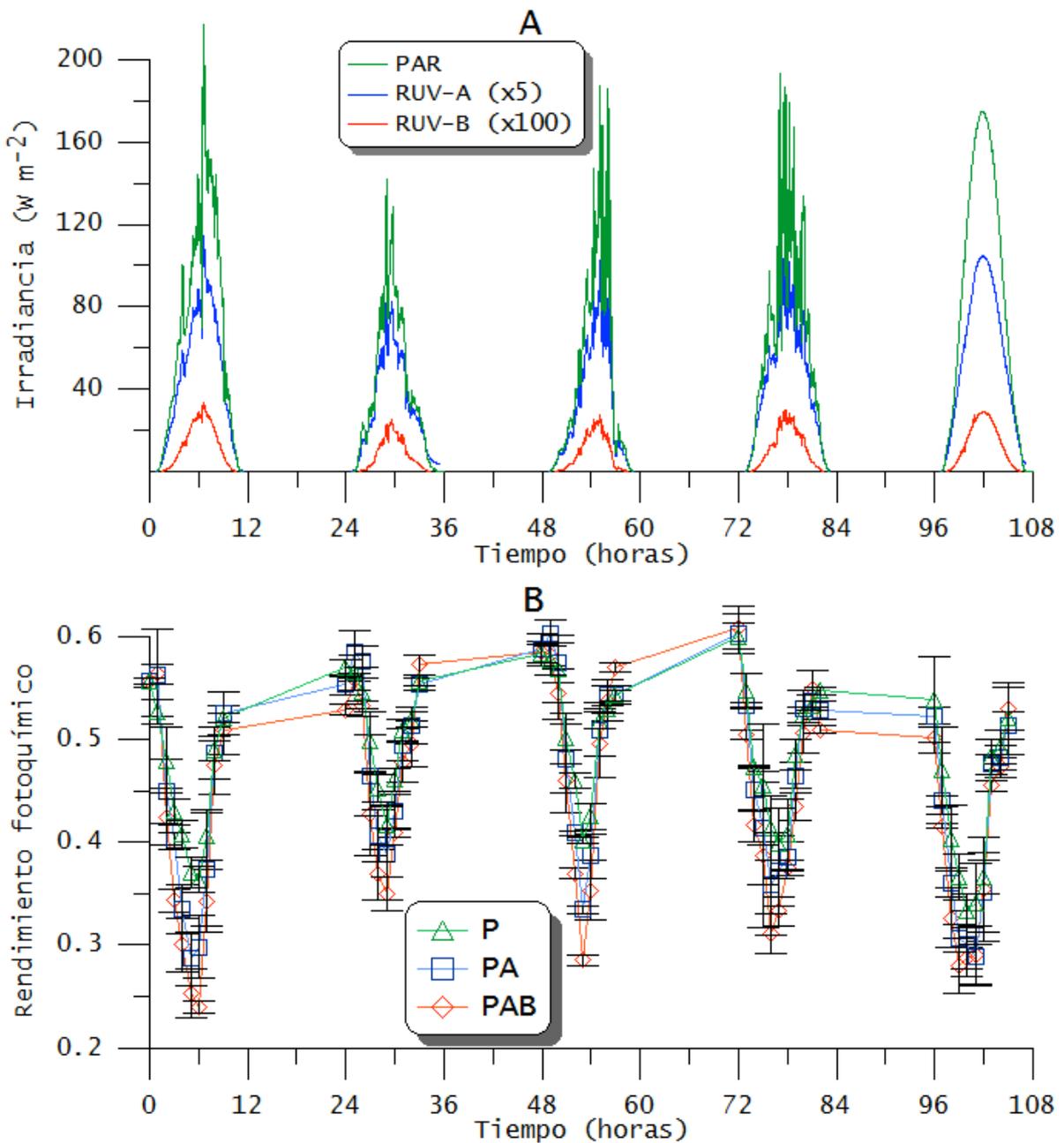


Figura 30: Niveles de radiación para cada banda del espectro (A) y el rendimiento fotoquímico correspondiente (B) de los cultivos de *T. weissflogii* expuestos a radiación solar natural. Los valores de RUV-A y RUV-B fueron multiplicados por distintos factores para hacerlos visibles en la escala empleada,

En general, los cultivos de *A. glacialis* y *T. weissflogii* no mostraron diferencias significativas entre los tres tratamientos de radiación en el crecimiento determinado tanto a través de la concentración de clorofila-a como por la abundancia celular (Figura 31).

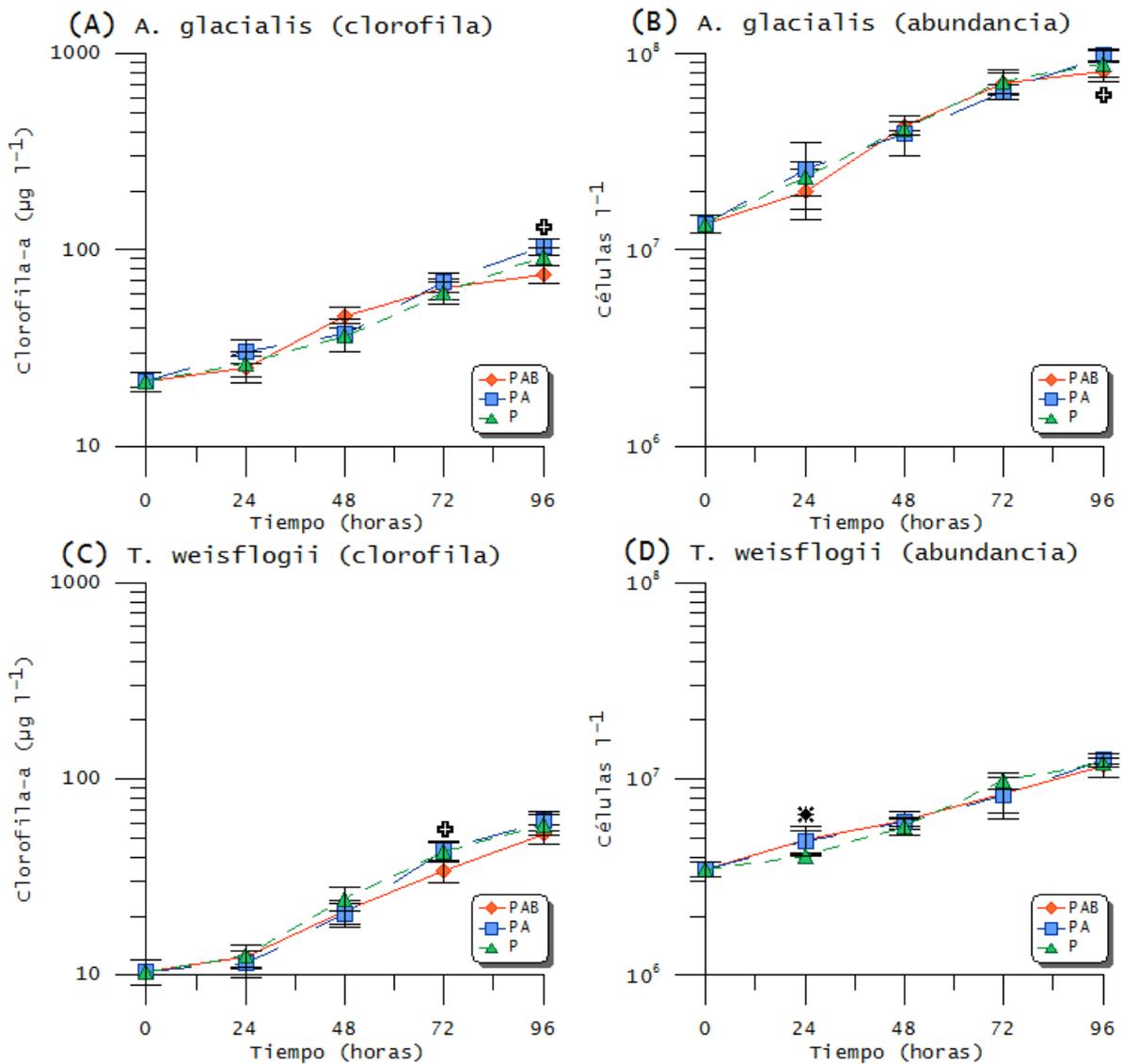


Figura 31: Evolución de la concentración de clorofila-a y de la abundancia celular para cultivos de *A. glacialis* (A y B) y de *T. weissflogii* (C y D). Los símbolos \oplus , \ast y \otimes indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los tratamientos PAB y PA, PAB y P, y PA y P, respectivamente.

La concentración de silicato en los cultivos de *A. glacialis* (Figura 32 A) que recibieron solo PAR fue significativamente mayor ($p < 0,05$) que la de aquellos que recibieron PAR + RUV a partir de las 48 horas de exposición. A partir de las 72 horas, la concentración de este nutriente en los cultivos expuestos solo a PAR fue significativamente menor ($p < 0,05$) que la de los cultivos expuestos a RUV-A + PAR. En *T. weissflogii* (Figura 32 B) no hubo diferencias significativas entre los cultivos de los tres tratamientos.

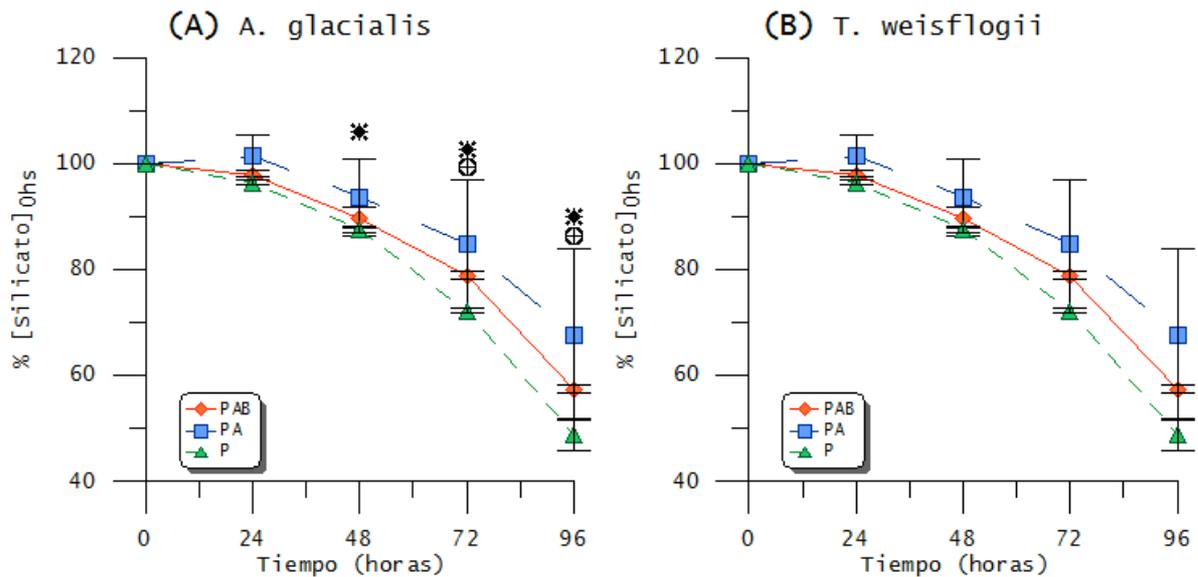


Figura 32: Evolución de la concentración de silicato a lo largo del tiempo para los cultivos de *A. glacialis* (A) y de *T. weissflogii* (B). Los símbolos ⊕, * y ⊕ indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los tratamientos PAB y PA, PAB y P, y PA y P, respectivamente.

En ambas especies no hubo diferencias significativas entre las tasas de crecimiento de la clorofila-a ni de la abundancia celular en todos los tratamientos de radiación (Figura 33 A, B, C, D). En cambio, los cultivos de *A. glacialis* expuestos solo a PAR mostraron tasas de consumo de silicato significativamente mayores ($p < 0,05$) que aquellos que recibieron RUV-B y RUV-A (Figura. 33 E). Por su parte, las tasas de consumo de silicato de los cultivos de *T. weissflogii* no presentaron diferencias significativas entre tratamientos (Figura 33 F).

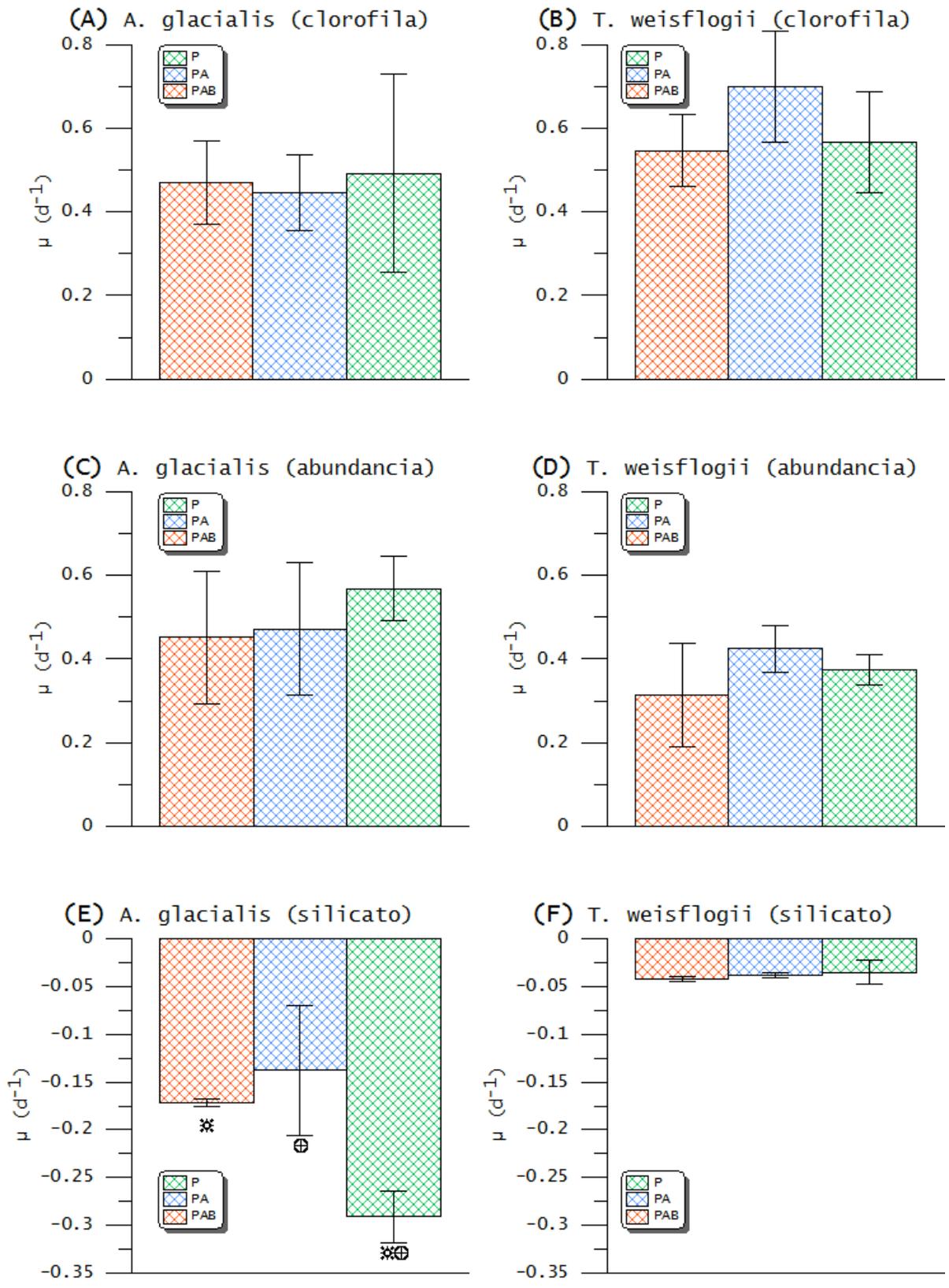


Figura 33: Tasas de crecimiento exponencial basados en clorofila-a (A y B), de abundancia celular (C y D) y de consumo de silicato (E y F) para las dos especies de diatomeas utilizadas. Los símbolos *, * y ⊕ indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los tratamientos PAB y PA, PAB y P y PA y P respectivamente.

En cuanto a la presencia de compuestos que absorben RUV, no hubo diferencias significativas en la proporción de estos compuestos en los cultivos de *A. glacialis* expuestos a distintos tratamientos de radiación (Figura 34 A). Por su parte, ésta fue significativamente mayor ($p < 0,05$) en los cultivos de *T. weisflogii* que recibieron RUV-A + PAR (tratamiento PA) que en los expuestos bajo el tratamiento PAB ($p < 0,05$) (Figura 34 B).

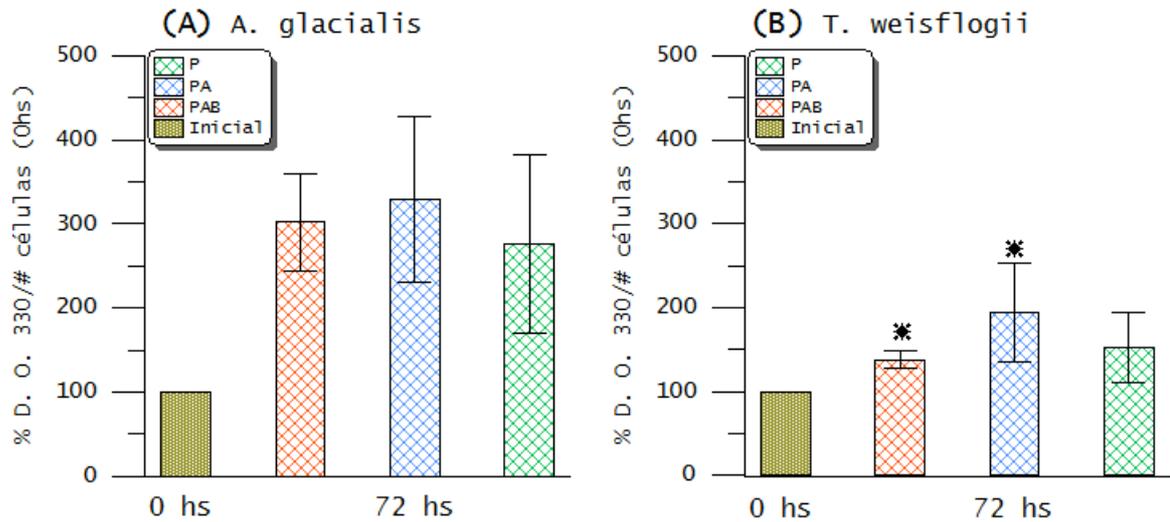


Figura 34: Estimación de la presencia de compuestos que absorben RUV en cultivos de *A. glacialis* (A) y de *T. weisflogii* (B). Los símbolos *, * y ⊕ indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los tratamientos PAB y PA, PAB y P, y PA y P, respectivamente.

En ambas especies, la concentración de carotenoides (Figura 35) fue significativamente menor ($p < 0,05$) a las 72 horas respecto de las registradas al inicio de cada experimento. Al igual que los compuestos que absorben RUV, solo se hallaron diferencias significativas entre los cultivos de *T. weisflogii* bajo los tratamientos PAB y PA (Figura 35 B).

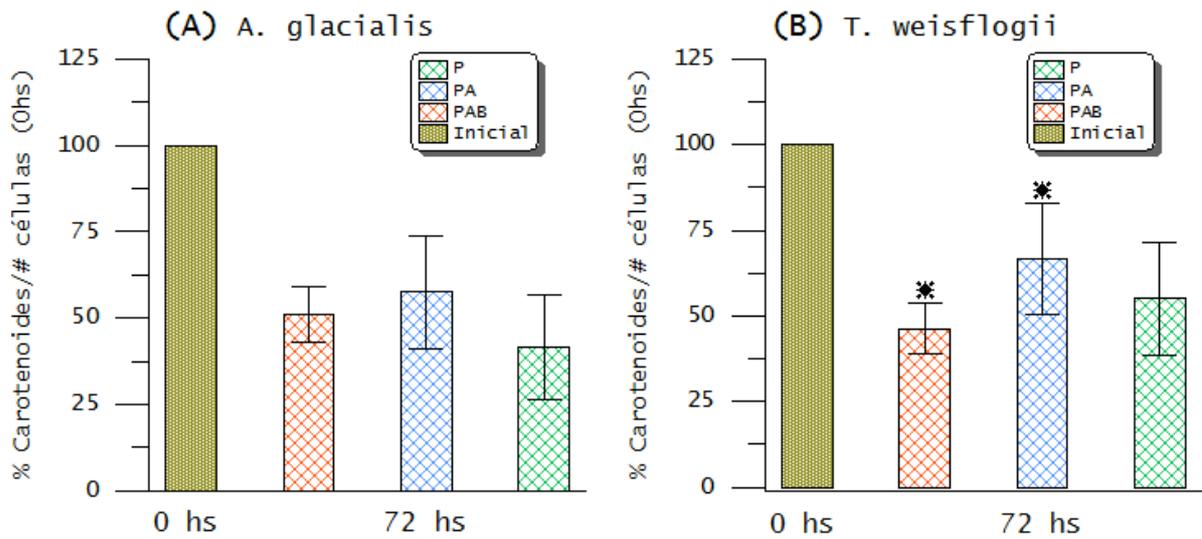


Figura 35 Concentración de carotenoides estandarizada por la abundancia celular de *A. glacialis* (A) y de *T. weissflogii* (B). Los símbolos *, * y ⊕ indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los tratamientos PAB y PA, PAB y P, y PA y P, respectivamente.

En cuanto al biovolumen de *T. weissflogii*, no presentó diferencias significativas entre tratamientos (datos no mostrados).

DISCUSIÓN

Las consecuencias que las actividades del hombre poseen sobre el medio ambiente han comenzado a ser estudiadas en profundidad durante las últimas tres décadas. Desde el descubrimiento en 1985 del “agujero de ozono”, se han llevado a cabo innumerables estudios para dilucidar cuál sería el efecto de una disminución aún más pronunciada de la concentración de ozono estratosférico. Los principales afectados por un incremento de la RUV serán sin duda los productores primarios de todos los ecosistemas, pues son ellos quienes poseen una maquinaria especializada en el aprovechamiento de la energía de la radiación electromagnética y su conversión en energía química. Sin embargo, y para lograr una evaluación más precisa del impacto de la RUV, deben considerarse en conjunto con otros factores abióticos, especialmente junto a un incremento de la temperatura causado por el calentamiento global.

Teniendo en cuenta estas consideraciones, en este trabajo se han desarrollado experimentos con radiación artificial para evaluar los efectos que un incremento en la temperatura causaría en la forma en que las diatomeas utilizadas responden a la RUV en un escenario de cambio global. Entre las variables observadas, tales como la concentración de clorofila-a y la abundancia celular, se observó que si bien en ambas especies los valores determinados fueron siempre menores en los cultivos que recibieron RUV-B bajo las dos temperaturas utilizadas (i.e., 18 y 23 °C), el incremento de 5 °C causó respuestas diferentes entre *A. glacialis* y *T. weissflogii*. En *A. glacialis*, el crecimiento bajo PAR no presentó diferencias significativas con respecto de aquel bajo PAR + RUV-A, aún durante la fase exponencial (cuando a 18 °C estas diferencias si existieron). Por su parte, y para *A. glacialis*, las tasas de crecimiento basadas en la abundancia celular fueron significativamente mayores a 23 °C que 18 °C. Es decir, se advierte que la temperatura aceleró el crecimiento y atenuó la inhibición por RUV-A. En *T. weissflogii*, por el contrario, las diferencias entre ambos tratamientos (i.e., PA y P) fueron siempre significativas (cuando a 18 °C solo hubo diferencias durante la fase exponencial de crecimiento). En esta especie, además, el aumento de la temperatura causó que los cultivos expuestos a RUV-B + RUV-A + PAR dejaran de ser viables y disminuyeran su abundancia. En este sentido, Buma et al. (1996) encontraron que las causas en la disminución de la abundancia celular podrían deberse a un retraso en la mitosis (causado por daño en el ADN) y/o a la cada

vez mayor proporción de células no viables que la RUV genera en los cultivos de diatomeas.

En general, se considera a la RUV-B un inhibidor de los procesos de absorción de nutrientes (especialmente compuestos nitrogenados), mientras que la RUV-A estimula o no ejerce cambios significativos en estos procesos (Villafañe et al. 2003). Así, el comportamiento observado en el crecimiento se vio reflejado en la utilización de silicato: en *A. glacialis* en los tratamientos PA y P fue más similar entre sí (significativamente más baja que la correspondiente al tratamiento PAB) y en *T. weissflogii* en los tratamientos PAB y PA fue más parecida (significativamente más alta que la del tratamiento P). Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre las tasas de utilización de silicato en *A. glacialis* entre las dos temperaturas - se esperaría que al crecer más rápido a 23 °C también consuman más de este nutriente, pero esto no ocurrió. Incluso el tratamiento P de *T. weissflogii* mostró menores tasas de consumo a 23 °C, cuando las tasas de crecimiento fueron significativamente mayores a esta temperatura.

Uno de los efectos mejor documentados de la RUV es la disminución en las tasas de fotosíntesis (Villafañe et al. 2003). El daño de tipo crónico se debe a la degradación de las proteínas D1 del fotosistema II, mientras que el dinámico es un proceso de protección por el cual las células disipan el exceso de energía como calor (Osmond, 1994). Con respecto al rendimiento fotoquímico, *A. glacialis* mostró un comportamiento similar en los tratamientos que recibieron RUV-B y/o RUV-A para las dos temperaturas utilizadas, indicando que la temperatura no afectó la forma en que esta especie se comporta ante la RUV. En *T. weissflogii*, por el contrario, el aumento de la temperatura causó una fuerte inhibición por RUV-A. Esto se ve reflejado en las tasas de inhibición y recuperación del rendimiento fotoquímico: En *A. glacialis* no hubo diferencias significativas entre temperaturas en la inhibición y en la recuperación bajo RUV-B y/o RUV-A. Sin embargo, en los cultivos que recibieron solo PAR las tasas de inhibición a 23 °C fueron significativamente menores que a 18 °C, indicando que la temperatura jugó un rol atenuante de los efectos que la PAR posee en esta especie. En *T. weissflogii* no fue posible confirmar esta tendencia ya que no se cuentan con datos de inhibición a 23 °C después del crecimiento exponencial (zona gris) para los cultivos que recibieron sólo PAR.

Es destacable que las respuestas que el fitoplancton elabora ante las situaciones de estrés se encuadran dentro de cuatro tipos

básicos: Evitar el estrés (i.e., apartándose), reducirlo (mediante algún mecanismo fisiológico o de comportamiento), reparar el daño producido (i.e., fotorreparación del ADN) y aclimatarse, fisiológicamente o genéticamente en un período de tiempo más largo. La reducción de la RUV efectiva que entra en la célula puede lograrse sintetizando compuestos intra o extracelulares (i.e., compuestos que absorben RUV, MAAs) que pueden absorber las longitudes de onda perjudiciales (Roy, 2000). En este sentido, a pesar del mejor desempeño de *A. glacialis* a 23 °C, la concentración de compuestos que absorben RUV fue significativamente mayor a 18 °C que a 23 °C para los tres tratamientos. Esto podría indicar dos cosas: o bien se estimula la producción de estos compuestos por la RUV cuando ésta constituye un mayor factor de estrés (a 18 °C), o bien una mayor temperatura inhibe la producción de estos compuestos y las células recurren a un mecanismo más eficiente para hacer frente a la RUV. *T. weisflogii* también mostró valores significativamente mayores a 18 °C que a 23 °C para el tratamiento PAB, y el incremento observado fue mayor que el registrado para *A. glacialis*, lo cual está de acuerdo con lo hallado por Helbling et al. (1996), que encontraron que las diatomeas céntricas poseen una mayor facilidad para sintetizar estos compuestos.

Por su parte, la concentración de carotenoides fue sustancialmente mayor en *A. glacialis* a 18 °C que a 23 °C, indicando que tal vez éste sea un mecanismo de disipación de energía estimulado por la RUV (aunque no intervenga en la absorción de estas longitudes de onda). Debe resaltarse que los carotenoides han sido descritos como mecanismos de aclimatación ante un estrés lumínico en organismos fitoplanctónicos (Roy, 2000).

Finalmente, con respecto a los efectos de la radiación solar natural, debe considerarse que los experimentos fueron realizados a finales del otoño, en días con alta nubosidad. Esto explicaría por qué no se hallaron diferencias tan marcadas en el crecimiento y en el consumo de silicato entre los cultivos expuestos a los distintos tratamientos, a diferencia de lo sucedido con radiación artificial. El rendimiento fotoquímico de los cultivos sufrió una inhibición hacia el mediodía en todos los casos y una recuperación total cuando el sol se había ocultado - indicando otra vez un daño dinámico, coincidiendo con los máximos niveles de radiación registrados. Al contemplar los efectos de la RUV natural, sólo *T. weisflogii* mostró mayores concentraciones de compuestos que absorben RUV y carotenoides en los cultivos del tratamiento PA, a diferencia de lo ocurrido con RUV artificial.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este trabajo revisten una gran importancia, ya que ayudan a comprender qué es lo que sucedería en un escenario en el que los niveles de RUV se incrementaran junto a la temperatura. Para ello se plantearon cuatro hipótesis de trabajo:

La primer hipótesis planteaba que el crecimiento sería menor en los cultivos expuestos a la RUV y que un aumento de la temperatura resultaría en un mayor crecimiento. Pudo observarse que efectivamente los cultivos que no recibieron RUV experimentaron las mayores concentraciones de clorofila-a y de células, al menos durante la fase exponencial de crecimiento. Los cultivos expuestos a la RUV-B mostraron tasas de crecimiento significativamente menores e incluso negativas en el caso de *T. weissflogii*. Sin embargo, al considerar las tasas de crecimiento exponencial se observó que en *A. glacialis* las tasas fueron mayores a 23 °C que a 18 °C, pero en *T. weissflogii* no siempre las tasas mayores se registraron a mayores temperaturas. De esta forma, la primer hipótesis fue corroborada solo para *A. glacialis*, indicando de esta manera la existencia de *especificidad* en los efectos de este factor de estrés en el crecimiento.

Con respecto a la utilización de silicato, la hipótesis relacionada establecía que el consumo de silice sería menor en diatomeas expuestas a la RUV que en aquellas que fueron expuestas solo a PAR. La concentración de silicato en los cultivos del tratamiento PAB fue siempre más elevada que en el resto (evidenciando una menor utilización de este nutriente). Es por ello que la segunda hipótesis planteada en este trabajo pudo corroborarse.

La tercer hipótesis establecía que la RUV generaría un daño dinámico en las diatomeas, lo que efectivamente sucedió para las dos especies estudiadas. El rendimiento fotoquímico de los cultivos expuestos a PAR + RUV exhibió oscilaciones alrededor de valores constantes, y alcanzando valores similares luego de la recuperación durante la fase oscura. Además, las tasas de inhibición (al menos para los cultivos correspondientes al tratamiento PAB) mostraron valores cercanos, pero de signo contrario a las tasas de recuperación.

La cuarta hipótesis expresaba que un aumento en la temperatura disminuiría el daño en el fotosistema (ya que los procesos metabólicos generalmente se ven favorecidos con un incremento de la temperatura). Observando las tasas de inhibición

fotosintética, siempre que hubo diferencias significativas las tasas de inhibición a 18 °C fueron mayores que 23 °C. Sin embargo, las tasas de recuperación también fueron mayores a 18 °C (excepto durante la fase exponencial de los cultivos de *A. glacialis* expuestos solo a PAR), lo cual indica que se recuperaron aproximadamente en la misma proporción con la que se inhibieron, mas allá de la temperatura a la cual crecieron y de la especie de la cual se trataba. Por lo tanto, esta hipótesis fue corroborada solo en el caso de *A. glacialis*.

En conclusión, esta tesis ha permitido detallar algunas de las respuestas ante la RUV y temperatura de dos especies de diatomeas, lo que permite anticipar con cierto grado de certeza la adaptación de estos organismos de una gran importancia ecológica ante un incremento en los factores de estrés estudiados.

BIBLIOGRAFIA

- Adrian, R., S. Wilhelm & D. Gerten (2006). Life-history traits of lake plankton species may govern their phenological response to climate warming. *Global Change Biology* 12, pp. 652-661
- Banaszak, A. T. (2003). Photoprotective physiological and biochemical responses of aquatic organisms. En: Helbling, E. W. & Zagarese, H. E. (eds.): UV effects in aquatic organisms and ecosystems. *Comprehensive Series in Photochemical and Photobiological Sciences*. The Royal Society of Chemistry. Cambridge, U. K. pp. 329-356
- Blumthaler, M., A. R. Webb (2003). *UVR climatology*. En: Helbling, E. W. & Zagarese, H. E. (eds.): UV effects in aquatic organisms and ecosystems. *Comprehensive Series in Photochemical and Photobiological Sciences*. The Royal Society of Chemistry. Cambridge, U. K. pp. 21-58
- Buma, A. G. J., H. J. Zemmeling, K. Sjollema & W. W. C. Gieskes (1996). UVB radiation modifies protein and photosynthetic pigment content, volume and ultrastructure of marine diatoms. *Marine Ecology Progress Series* 142, pp. 47-54
- Buma, A. G. J., E. W. Helbling, M. K. de Boer & V. E. Villafañe (2001). Patterns of DNA damage and photoinhibition in temperate South-Atlantic picophytoplankton exposed to solar ultraviolet radiation. *Journal of Photochemistry and Photobiology* 62, pp. 9-18
- Buma, A. G. J., P. Boelen & W. H. Jeffrey (2003). UVR-induced DNA damage in aquatic organisms. En: Helbling, E. W. & H. E. Zagarese (eds.): *UV effects in aquatic organisms and ecosystems*. *Comprehensive Series in Photochemical and Photobiological Sciences*. The Royal Society of Chemistry. Cambridge, U. K. pp. 291-327
- Eilers, P. H. C. & J. C. H. Peeters (1988). A model for the relationship between light intensity and the rate of photosynthesis in phytoplankton. *Ecological Modeling* 42, pp. 199-215
- Environmental Protection Agency (EPA), USA. <http://www.epa.gov/climatechange.htm/>
- Farman, J. C., B. G. Gardiner & J. D. Shanklin (1985). Large losses of total ozone in Antarctica reveal seasonal ClOx/NOx interaction. *Nature* 315, pp. 207-210
- Furnas, M. (1978). Influence of temperature and cell size on the division rate and chemical content of the diatom

- Chaetoceros curvisetum* Cleve. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 34, pp. 97-109
- Guillard, R. R. L. (1975). Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. En: Smith, W. I. & Chanley, M. H. (eds.): *Culture of marine invertebrate animals*. Plenum Press. New York, pp. 29-60
 - Hargreaves B. R. (2003). Water column optics and penetration of UVR. En: Helbling, E. W. & H. E. Zagarese (eds.): *UV effects in aquatic organisms and ecosystems*. Comprehensive Series in Photochemical and Photobiological Sciences. The Royal Society of Chemistry. Cambridge, U. K. pp. 59-105
 - Helbling, E. W., B. E. Chalker, W. C. Dunlap, O. Holm-Hansen & V. E. Villafañe (1996). Photoacclimation of antarctic marine diatoms to solar ultraviolet radiation. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 204, pp. 85-101
 - Helbling, E. W., E. S. Barbieri, M. A. Marcoval, R. J. Gonçalves & V. E. Villafañe (2005). Impact of solar ultraviolet radiation on marine phytoplankton of Patagonia, Argentina. *Photochemistry and Photobiology* 81: 807-818
 - Helbling, E. W. & V. E. Villafañe (2007). Phytoplankton and Primary Production. En: Safran, P. (ed.) Theme 5.5. *Fisheries & Aquaculture*. *Encyclopedia of Life Support Systems* (EOLSS). Desarrollado bajo el auspicio de la UNESCO. EOLSS Publishers, Oxford, UK, pp. 206-226
 - Hillebrand, H., C. D. Dürselen, D. Kirschtel, U. Pollinger & T. Zohary (1999). Biovolume calculation for pelagic and benthic microalgae. *Journal of Phycology* 35, pp. 403-424
 - Holm-Hansen, O., C. J. Lorenzen, R. W. Holmes & J. D. H. Strickland (1965). Fluorometric determination of chlorophyll. *Journal Du Conseil pour l'Exploration de la Mer* 30 (1), pp. 3-15
 - Holm-Hansen, O., D. Lubin & E. W. Helbling (1993). Ultraviolet radiation and its effects on organisms in aquatic environments. En: Young, A. R., L. O. Björn, J. Moan y W. Nultsch (eds.): *Environmental UV Photobiology*. Plenum Press. New York, USA. pp. 379-425.
 - Kirchhoff, V. W. J. H., N. J. Schuch, D. K. Pinheiro, & J. Harris (1996). Evidence for an ozone hole perturbation at 30° south. *Atmospheric Environment* 30 (9): 1481-1488.
 - Korbee, N., R. T. Abdala Díaz, F. L. Figueroa & E. W. Helbling (2004). Ammonium and UV radiation stimulate the accumulation of mycosporine like amino acids in *Porphyra*

- columbina* (Rhodophyta) from Patagonia, Argentina. *Journal of Phycology* 40: 248-259.
- Korbee, N., F. Figueroa & J. Aguilera (2006). Acumulación de aminoácidos tipo micoporina (MAAs): biosíntesis, fotocontrol y funciones ecofisiológicas. *Revista Chilena de Historia Natural* 79, pp. 119-132
 - Laurion, I., A. Lami & R. Sommaruga (2002). Distribution of mycoposrine-like amino acids and photoprotective carotenoids among freshwater phytoplankton assemblages. *Aquatic Microbial Ecology* 26, pp. 283-294
 - Lesser, M. P. (1996). Elevated temperatures and ultraviolet radiation cause oxidative stress and inhibit photosynthesis in symbiotic dinoflagellates. *Limnology and Oceanography* 41, pp. 271-283
 - Madronich, S. (1993). The atmosphere and UV-B radiation at ground level. En: Young, A. R., L. O. Björn, J. Moan y W. Nultsch (eds.): *Environmental UV Photobiology*. Plenum Press. New York, USA. pp. 1-39
 - National Agency of Space and Aeronautics (NASA), USA. Stratospheric Ozone. http://www.ccpo.odu.edu/SEES/ozone/oz_class.htm/
 - National Agency of Space and Aeronautics (NASA), USA. http://jwocky.gsfc.nasa.gov/multi/oz_hole_area.gif/
 - Nelson, D. M., P. J. Tréguer, M. A. Brzezinski, A. Leynaert & B. Quéguiner (1995). Production and dissolution of biogenic silica in the ocean: Revised global estimates, comparison with regional data and relationship to biogenic sedimentation. *Global Biogeochemical Cycles* 9, pp. 359-372
 - Neori, A. & O. Holm-Hansen (1982). Effect of temperature on rate of photosynthesis in Antarctic phytoplankton. *Polar Biology* 1, pp. 33-38
 - Osmond, C. B. (1994). What is photoinhibition? Some insights from comparisons of shade and sun plants. En: Baker, N. R. & J. R. Bowyer (eds.): *Photoinhibition of photosynthesis, from molecular mechanisms to the field*. Oxford, U. K. Bios Scientific Publications, pp. 1-24
 - Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC) (2001). Contribution of Working Group I to the Third Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Houghton, J. T., Y. Ding, D.J. Griggs, M. Noguer, P.J. van der Linden, X. Da, K. Maskell, C.A. Johnson. (eds.). Cambridge University Press, Cambridge, U. K., 996 pp.

http://www.ipcc.ch//publications_and_data/publications_and_data_reports.htm/

- Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC) (2007). Contribution of Working Group I to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Solomon, S., D. Qin, M. Manning, Z. Chen, M. Marquis, K.B. Averyt, M. Tignor and H.L. Miller (eds.). Cambridge University Press, Cambridge, U. K. and New York, NY, USA, 996 pp.
http://www.ipcc.ch//publications_and_data/publications_and_data_reports.htm/
- Porra, R. J. (2002). The chequered history of the development and use of simultaneous equations for the accurate determination of chlorophylls *a* and *b*. *Photosynthesis Research* 73, pp. 149-156
- Raven, J. A. & A. M. Waite (2003). The evolution of silicification in diatoms: Inescapable sinking and sinking as escape? *New Phytologist* 162, pp. 45-61
- Roy, S. (2000). Strategies for the minimization of UV-induced damage. En: De Mora, S J., S. Demers & M. Vernet (eds.): *The effects of UV radiation in the marine environment*. Cambridge University Press. Cambridge, U. K. pp. 177-205
- Schindler, D. W., K. G. Beaty, E. J. Fee, D. R. Cruikshank, E. R. DeBruyn, D. L. Findlay, G. A. Linsey, J. A. Shearer, M. P. Stainton & M. A. Turner (1990). Effects of climatic warming on Lakes of the Central Boreal Forest. *Science* 250 (4983) pp. 967-970
- Scripps CO₂ Program. Scripps Institution of Oceanography. <http://scrippsc02.ucsd.edu/>
- Shick, J. M. & W. C. Dunlap (2002). Mycosporine-like amino acids and related gadusols: Biosynthesis, accumulation, and UV-protective functions in aquatic organisms. *Annual Review of Physiology* 64, pp. 223-262
- Sokal, R. R. & F. J. Rohlf (XXXX). *Biometry: The principles and practice of statistics in biological research*. Third edition. W. H. Freeman and Company, New York, pp. 887
- Strickland, J. D. H. & T. R. Parsons (1972). *A Practical Handbook of Seawater Analysis*. Bulletin of Fisheries Research Board of Canada, Ottawa
- Tréguer, P. J., D. M. Nelson, A. J. Van Bennekom, D. J. DeMaster, A. Leynaert & B. Quéguiner (1995). The silica balance in the world ocean: A reestimate. *Science* 268, pp. 375-379

- Villafañe, V. E. & F. M. H. Reid (1995). Métodos de microscopía para la cuantificación del fitoplancton. En: Alveal, K., M. E. Ferrario, E. C. Oliveira & E. Sar (eds.): *Manual de métodos ficológicos*. Universidad de Concepción, Concepción, Chile. pp. 169-185
- Villafañe, V. E., K. Sundbäck, F. Figueroa & E. W. Helbling (2003). Photosynthesis in the aquatic environment as affected by UVR. En: Helbling, E. W. & H. E. Zagarese (eds.): *UV effects in aquatic organisms and ecosystems*. Comprehensive Series in Photochemical and Photobiological Sciences. The Royal Society of Chemistry. Cambridge, U. K. pp. 357-397
- Villafañe, V. E., P. J. Janknegt, M. de Graaff, R. J. W. Visser, W. H. van de Poll, A. G. J. Buma & E. W. Helbling (2008). UVR-induced photoinhibition of summer marine phytoplankton communities from Patagonia. *Marine Biology* 154, pp. 1021-1029
- Wellburn, A. R. (1994). The spectral determination of chlorophylls *a* and *b*, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *Journal of Plant Physiology* 144, pp. 307-313
- Williamson, C. E. & H. E. Zagarese (2003). UVR effects on aquatic ecosystems: A changing climate perspective. En: Helbling, E. W. & H. E. Zagarese (eds.): *UV effects in aquatic organisms and ecosystems*. Comprehensive Series in Photochemical and Photobiological Sciences. The Royal Society of Chemistry. Cambridge, U. K. pp. 547-567