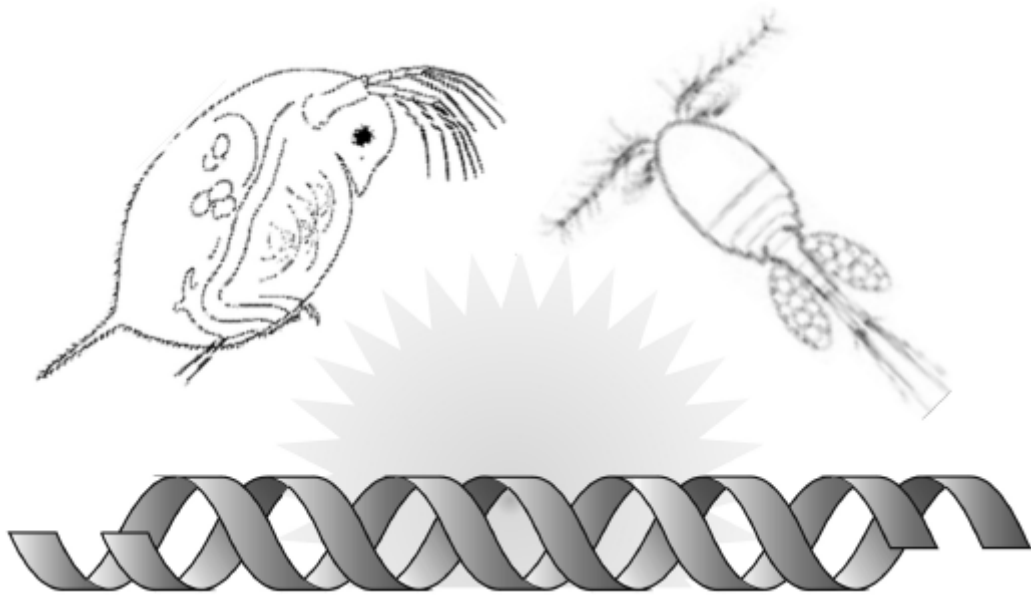


Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco

Tesis de Licenciatura en Ciencias Biológicas



**Efecto de la radiación ultravioleta e
importancia de compuestos protectores y
mecanismos de reparación en especies de
zooplancton de agua dulce**

Rodrigo J. Gonçalves

Director: E. Walter Helbling (Ph. D.)

Marzo 2002

Índice

Índice	2
Agradecimientos.....	3
Resumen.....	4
Introducción	5
Radiación ultravioleta	5
Concentración de ozono	7
Daño y reparación del material genético.....	8
Objetivo e hipótesis	11
Materiales y Métodos.....	12
Área de estudio	12
Radiación ultravioleta en el área de estudio	14
Especímenes	15
Toma de muestras	16
Experimentación.....	17
Determinación de la mortalidad	21
Compuestos protectores	22
Concentración de clorofila a.....	22
Medidas de radiación	23
Tratamiento estadístico de los datos	23
Resultados	24
Fotorreparación a distintas dosis	24
Daño – fotorreparación: Funciones de peso biológico	28
Mortalidad en función de la dosis.....	30
Compuestos protectores	31
Discusión.....	36
Conclusiones y líneas futuras de investigación.....	39
Referencias.....	40

Resumen

Durante el año 2001 se realizaron experiencias con especies de zooplancton -*Daphnia menucoensis* (Cladocera) y *Metacyclops* sp. (Copepoda) colectadas de las Lagunas Caci que Chiquichano y Parque de la Ciudad (43°S) para evaluar la sensibilidad de estas especies a la radiación ultravioleta (RUV, 280-400 nm), y la capacidad de fotorreparación, en términos de mortalidad. En particular, los experimentos estuvieron diseñados para determinar (a) la resistencia de ambas especies a distintas dosis de radiación ultravioleta B (RUV-B, 280-320 nm) (b) la presencia de mecanismos de fotorreparación del daño producido en el ADN por la RUV-B, y (c) la presencia de compuestos potencialmente protectores. Para ambas especies se determinó que la RUV-B causaba una mortalidad significativa (que era, a su vez, función de la dosis recibida) – máxima de 100% y 30% en *D. menucoensis* y *Metacyclops* sp., respectivamente. Para ambas especies se encontró además que la mortalidad disminuía significativamente al ser expuestos los individuos a la radiación ultravioleta A (RUV-A, 320-400 nm) y radiación visible (PAR, 400-700 nm), evidenciando así la presencia de mecanismos de fotorreparación. Si bien la fotorreparación fue más evidente en *D. menucoensis* que en *Metacyclops* sp., se determinó que su efectividad era igual en ambas especies. Por otra parte, las funciones de peso biológico (FPB) sugieren que en general los copépodos son más resistentes a la RUV-B que los cladóceros. Esta mayor resistencia puede deberse a una combinación de factores, y en este trabajo se ha encontrado que los copépodos poseen además compuestos potencialmente protectores de la RUV – “mycosporine like aminoacids” (MAAs) y carotenoides, lo cual proporcionaría a esta especie una ventaja adaptativa adicional al ambiente lumínico al que normalmente se encuentra expuesto.

Introducción

Radiación ultravioleta

La radiación ultravioleta (RUV) es uno de los factores físicos (abióticos) más importantes que determinan las distintas características de los seres vivos que están expuestos temporal o permanentemente a ella. Pero ¿qué es la radiación ultravioleta?

La energía que llega del Sol es responsable de la actividad biológica sobre la Tierra basada en la captación de la radiación y la síntesis de compuestos orgánicos a través del proceso de fotosíntesis. Estos compuestos almacenan esa energía en sus enlaces químicos y la dejan disponible para los consumidores primarios. La energía del Sol llega a la Tierra en forma de *radiación electromagnética*, es decir que tiene una determinada longitud de onda (λ), que es inversamente proporcional a la cantidad de energía que transporta, de acuerdo a:

$$\varepsilon = h\nu = hc/\lambda$$

donde ε es la energía de la radiación, h la constante de Planck (igual a $6,63 \times 10^{-34}$ J s), c la velocidad de la luz y ν es la frecuencia de la onda (inversamente proporcional a la longitud de onda λ); la longitud de onda se mide usualmente en nanómetros ($1\text{nm} = 10^{-9}$ m). Para fines prácticos o de estudio, el hombre ha clasificado las distintas partes del espectro de radiación solar según su longitud de onda, llamando por ejemplo “luz visible”, es decir los colores, a la radiación cuyas λ estén comprendidas entre 400 nm (color violeta) y 700 nm (color rojo). En la Figura 1 se muestra el espectro de radiación solar indicando las distintas longitudes de onda que llegan a la superficie de la Tierra. La energía que llega del Sol está compuesta por radiación ultravioleta, visible e infrarroja. La mayor cantidad de energía corresponde a la radiación infrarroja (aproximadamente 45-55%), mientras que a la radiación visible y ultravioleta les corresponde aproximadamente un 40% y entre un 5-15% (dependiente de la latitud), respectivamente. La radiación visible se denomina también *Radiación Disponible para Fotosíntesis* (su sigla en inglés es PAR, por *Photosynthetically Available Radiation*). La RUV, llamada así por estar “más allá del violeta”, es la que comprende longitudes de onda desde 100 a 400 nm. A su vez, la RUV se divide en RUV-C (100 a 280 nm), RUV-B (280 a 320 nm), y RUV-A (320 a 400 nm). La más energética, la RUV-C, no llega a la superficie de la Tierra (Figura 1), porque se atenúa totalmente en la atmósfera por el oxígeno y el ozono, por lo cual no tiene relevancia ecológica y no se tratará en este trabajo. La RUV-A y la RUV-B, en cambio, llegan en distintas proporciones a la superficie terrestre e inciden sobre los seres vivos. De estas radiaciones que llegan a la Tierra, la RUV-B es la más energética por cuanto (debido a su menor longitud de onda), y por lo tanto es potencialmente más dañina que la RUV-A. La cantidad de

RUV que llega a un punto geográfico determinado varía debido a diversos factores, que cambian su distribución espacial y temporal. Los más importantes son: la época del año, el ángulo cenital y la presencia de nubes; asimismo, la concentración de ozono, integrada en la columna de atmósfera en un punto, es un factor particularmente importante que afecta la cantidad de RUV-B que llega a la superficie terrestre (Blumthaler & Webb, 2002).

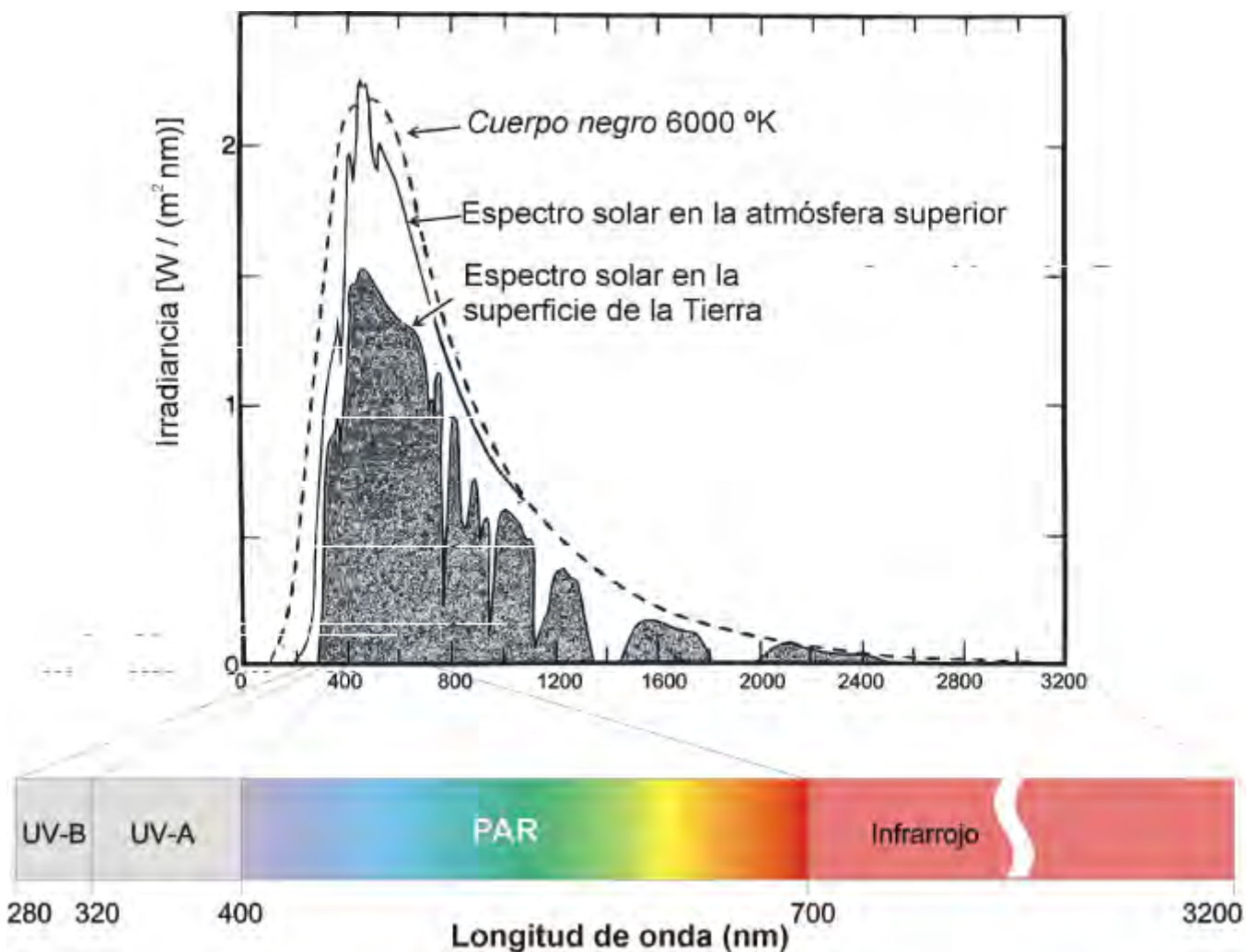


Figura 1 Distribución de la energía por longitud de onda de la irradiancia solar, antes (línea continua) y después (sombreado) de atravesar la atmósfera terrestre, comparadas con el espectro de emisión de un “cuerpo negro” ideal (línea discontinua). La forma irregular del espectro solar en la superficie de la Tierra se debe a la absorción de distintos componentes de la atmósfera (vapor de agua, CO_2 , NO , CH_4 , O_2 , O_3 , aerosoles, etc.) en distintas longitudes de onda. En el esquema inferior se destaca parte del espectro con un detalle de los rangos de longitudes de onda que recibe la superficie terrestre.

Respecto a los ecosistemas acuáticos, la absorción de energía en el cuerpo de agua es quien determinará la proporción de radiación que penetrará hasta cierta profundidad. Por ejemplo, la absorción en un cuerpo natural de agua se debe a componentes propios del ecosistema, tales como el agua misma,

la cantidad de materia orgánica disuelta, organismos fotosintéticos y materia particulada inanimada (Kirk, 1994; Hargreaves, 2002).

Al cuantificar la radiación, usamos dos conceptos: irradiancia y dosis. Estos conceptos son particularmente importantes porque existen respuestas biológicas en función de la dosis o de la irradiancia. La *irradiancia* es la cantidad instantánea de energía que llega a una determinada área. Se mide por ejemplo en W/m^2 . En cambio la *dosis* es la cantidad de energía que recibió un área en un período de tiempo. Se mide en J/m^2 . Por lo tanto, puede considerarse la dosis como la irradiancia integrada en el tiempo (para una determinada longitud de onda), tal como:

$$Dosis = \int Irradiancia * dt$$

Así, por ejemplo, si una célula recibe una irradiancia constante de $5 W/m^2$ durante un segundo, la dosis de radiación recibida por esa célula es de $5 J/m^2$.

Concentración de ozono

La capa de ozono es una zona de la atmósfera, ubicada aproximadamente entre 15 y 25 km de altura (estratósfera), en la cual la concentración de ozono es máxima. El ozono (O_3) es una forma alotrópica del oxígeno, que tiene tres bandas de absorción de radiación. La más importante, debido a que es la que más absorbe, es la denominada banda Hartley, que absorbe continuamente entre 200 y 310 nm. Luego está la banda Huggins, con una pequeña absorción entre 310 y 400 nm. Finalmente, la banda Chappius tiene una muy débil absorción entre 400 y 850 nm (Blunthaler & Webb, 2002). Esto hace que la capa de ozono actúe como un filtro que atenúa principalmente la RUV-B que llega desde el Sol. Una forma de estimar la concentración de ozono es calculando la proporción relativa de energía recibida por RUV-B con respecto a la energía de la RUV-A para el mismo punto y el mismo momento (Orce & Helbling, 1997).

El grosor de la capa de ozono se mide en *unidades Dobson* (UD). Si se comprimiera toda la atmósfera encima de un punto geográfico determinado y se llevara a presión y temperaturas normales (1 atm y $0^\circ C$), la capa de ozono mediría unos milímetros. Así, por ejemplo, si la concentración de ozono en ese punto de la Tierra es de 200 UD, medirá 2 mm, y si la concentración es de 350 UD medirá entonces 3,5 mm (Lubin & Holm-Hansen, 1995). Hay que resaltar que la capa de ozono es más delgada en las zonas tropicales (200-250 UD) y más “gruesa” en los polos (350-450 UD) (Madronich, 1993).

Quizás uno de los primeros trabajos de alerta sobre una disminución de la concentración de ozono estratosférico en la zona Antártica (i.e., el así llamado “agujero” de ozono) fue el de Farman et al. (1985). Posteriormente, otros trabajos determinaron también una disminución a nivel global de aproximadamente un 5% por década en otras zona del planeta (Blumthaler & Webb, 2002). Esta disminución en la concentración de ozono se debe a la presencia de gases de uso industrial, los

compuestos clorofluorcarbonados (CFCs), producidos y liberados a la atmósfera por los países más industrializados. En la Patagonia, la cercanía geográfica del “agujero” de ozono hace que la disminución de ozono relacionada con ese fenómeno antártico pueda detectarse hasta los 37° de latitud sur (Orce & Helbling, 1997), pero solamente algunos días en los meses de Octubre y Noviembre.

Daño y reparación del material genético

La RUV es altamente reactiva desde el punto de vista biológico, y los seres vivos han tenido que hacer frente a sus efectos genotóxicos desde el principio de la evolución de la vida en nuestro planeta (Rothschild, 1999; Cockell, 2001). En particular, la RUV-B puede dañar el material genético (ADN) de las células (Mitchell & Karentz, 1993). Por otro lado, la RUV-A es una de las causas de la formación de radicales libres de oxígeno, que a su vez pueden causar un daño considerable por reacciones químicas en cadena (Kieber et al., 2002; Vincent & Neale, 2000; Friedberg et al., 1995).

Para la mayoría de los efectos biológicos de la RUV, tales como letalidad, mutación y transformación, el ADN es considerado el blanco principal (Karu, 1993). Cuando una base nitrogenada del ADN recibe RUV (sobre todo en longitudes de onda cercanas a su máximo de absorción, aprox. 260 nm), ocurre un cambio de configuración de los orbitales moleculares, lo cual absorbe la energía recibida. La base excitada es poco estable, por lo que rápidamente se produce una unión covalente entre dos pirimidinas adyacentes. Se forma así una estructura de cicloadición fotoquímica llamada *dímero de pirimidina* (Mitchell & Karentz, 1993). Esto ocasiona un grave problema para la supervivencia de la célula debido a la dificultad o imposibilidad que tendrá de sintetizar lo que codificaba la zona dañada del ADN.

Hay al menos dos mecanismos bien estudiados de reparación del daño en el ADN (Sancar & Sancar 1988). Estos son: *reparación foto-enzimática* (fotorreparación, PER), y *reparación por escisión de nucleótidos* (NER) (Figura 2). La PER es un proceso específico *in situ* de reparación que directamente revierte los dímeros de ciclobutano en el ADN por la acción combinada de una enzima, la fotoliasa, y la radiación entre 300 y 600 nm. Durante la fotorreparación, la fotoliasa, esta enzima de bajo peso molecular, se une a un dímero de ciclobutano. La enzima absorbe energía dentro del rango RUV-A / PAR, rompe el anillo ciclobutil del dímero, y luego se disocia para “buscar” más zonas dañadas del ADN (Mitchell & Karentz, 1993). La NER es un mecanismo mucho más complejo, que involucra el reconocimiento del daño, incisión de la cadena de ADN en o cerca del sitio de la lesión, remoción del fragmento dañado (~30 bases), escisión y resíntesis del ADN alrededor del sitio dañado, y finalmente el ligado del extremo de la cadena simple luego del desprendimiento de la ADN-polimerasa (Mitchell & Karentz, 1993; Banaszak, 2002).

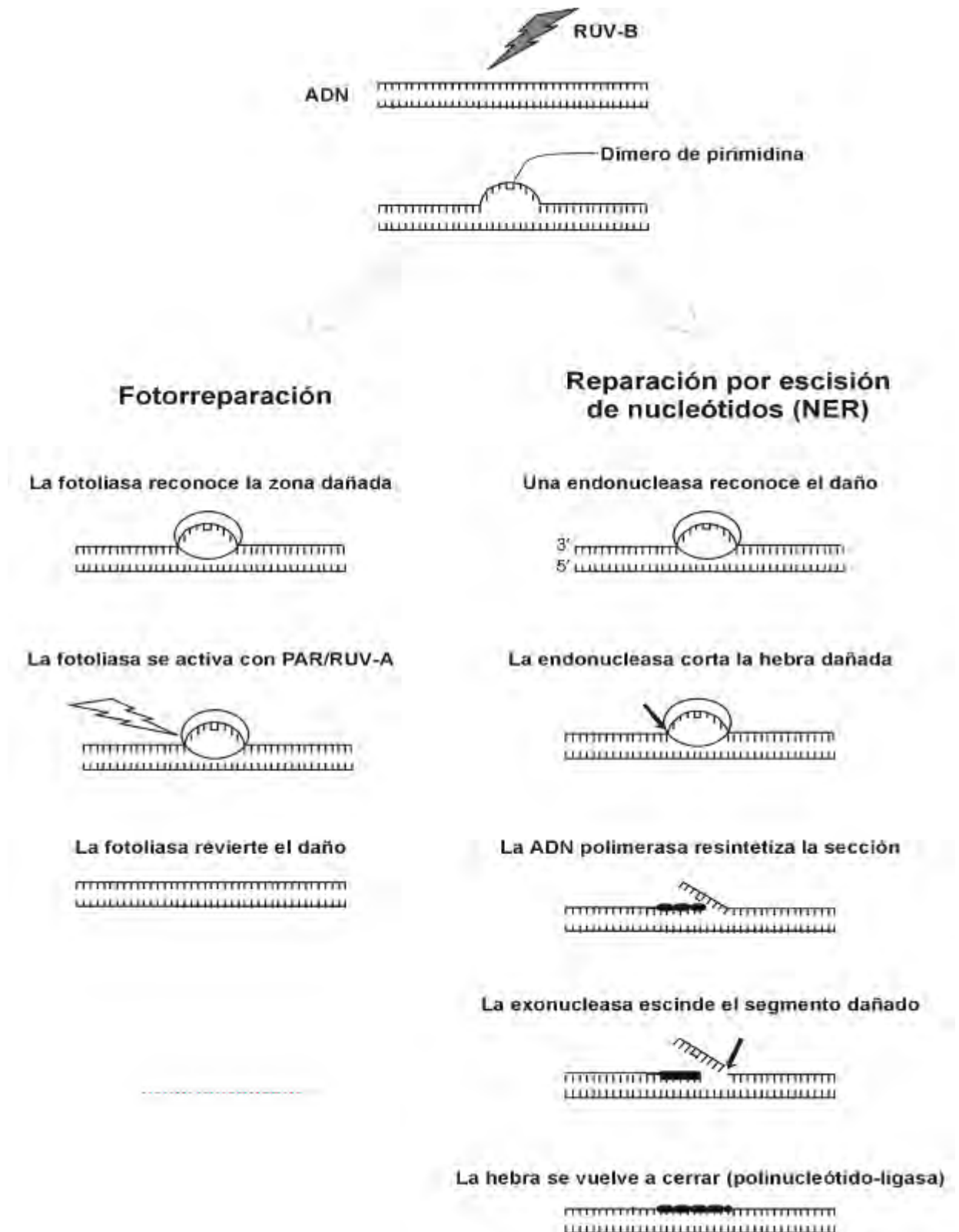


Figura 2 Mecanismos de reparación del daño en el ADN causado por la RUV-B

Teniendo en cuenta el concepto de *dosis* así como el de *daño en el material genético causado por la RUV-B*, es importante destacar que una determinada radiación puede provocar algún cambio en las propiedades de la estructura molecular de cierto compuesto químico o biológico, *siempre y cuando esta energía sea absorbida por dicho ente*. Es decir que si no hay una molécula que pueda absorber la radiación, no habrá ningún daño o transformación molecular, ya que la energía que hace disponible la radiación no es “captada” y atraviesa los tejidos sin causar efectos a nivel molecular. Casi todos los organismos tienen conductas o características naturales que reducen la exposición del ADN a la RUV solar y por ende el daño provocado (Roy, 2000). Muchas plantas y animales tienen cubiertas externas que filtran la RUV. Algunos componentes biológicos tales como la corteza, piel, pelaje, escamas, valvas, caparazón, plumas, etc. pueden atenuar fuertemente o eliminar la RUV que llega a las células o áreas internas del organismo. Por otra parte, los organismos también pueden establecer su lugar de residencia bajo rocas, en la profundidad de un lago o mar, o en lugares protegidos del sol por árboles o el mismo terreno. Otro recurso que han desarrollado algunos organismos durante la evolución es la adquisición o síntesis de compuestos que absorben en la región ultravioleta, que puedan servir como filtros de la RUV solar. Estos compuestos se denominan colectivamente “Mycosporine-like Amino Acids” (MAAs) (Dunlap et al., 1986; Dunlap & Shick, 1998). Su estructura química los hace capaces de absorber energía de longitudes de onda entre aproximadamente 310 y 360 nm (Roy, 2000). La presencia de MAAs ha sido demostrada en varios niveles tróficos de la red alimentaria acuática (Banaszak, 2002), aunque su síntesis está circunscripta a los organismos fitoplanctónicos, cianobacterias y algunas microalgas (Roy, 2000). Sin embargo, se ha encontrado que estos compuestos pueden bioacumularse a través de la dieta, brindando así protección a niveles superiores del ecosistema en cuestión (Adams & Shick, 1996; Carroll & Shick, 1996; Menchi, 2001). También, hay compuestos que, si bien no absorben directamente la radiación, pueden tener un rol de protección. Tal es el caso de los carotenoides, que absorben energía entre 470 y 480 nm, pero tienen, sin embargo, función como antioxidantes, combinándose con radicales libres producidos por la exposición a la RUV, hecho que ha sido demostrado en varios organismos (Hessen, 2002; Kieber et al., 2002).

En la región Patagónica existen muy pocos estudios en relación a los efectos e impacto de la RUV en organismos acuáticos (Villafañe et al., 2001), y son particularmente escasos aquellos relacionados con organismos zooplanctónicos (Zagarese et al., 1997a; b; 1998a; b; Tartarotti et al., 2000). Por lo tanto, se ha planteado este trabajo con el siguiente objetivo / hipótesis:

Objetivo e hipótesis

El objetivo de este estudio es evaluar la sensibilidad a la RUV y la capacidad de fotorreparación que tienen dos especies zooplanctónicas dulceacuícolas, *Daphnia (Ctenodaphnia) menucoensis* (Anomopoda) y *Metacyclops sp.* (Copepoda), las cuales tienen diferente coloración y concentración de compuestos protectores. Las hipótesis propuestas para este estudio son las siguientes:

Hipótesis #1

La supervivencia frente a la RUV-B será mayor si el organismo puede fotorreparar el daño producido en el ADN.

Hipótesis #2

El daño en el ADN es proporcional a la dosis recibida por el organismo. Por lo tanto, a mayor dosis, mayor será el daño en el ADN.

Materiales y Métodos

Área de estudio

Las muestras de zooplancton que se utilizaron en esta tesis fueron recolectadas en dos lagunas patagónicas. Las muestras de cladóceros se obtuvieron en la Laguna Cacique Chiquichano ($43^{\circ}14'55''\text{S}$ $65^{\circ}18'01''\text{W}$), en la ciudad de Trelew, mientras que las muestras de copépodos se tomaron de la Laguna Parque de la Ciudad, en la ciudad de Puerto Madryn ($42^{\circ}40'\text{S}$ $65^{\circ}15'\text{W}$) (Figura 3). Ambos cuerpos de agua reciben similares valores de radiación debido a su proximidad geográfica (aprox. 70 km de distancia). La ausencia de árboles y construcciones en las cercanías de las orillas, sumada a los característicos cielos despejados de la zona hacen propicios estos cuerpos de agua para este estudio, ya que la superficie del agua puede recibir los valores máximos de radiación solar. La Laguna Parque de la Ciudad tiene abundante vegetación acuática, constituyendo un refugio para algunos organismos. En cambio, en la Laguna Cacique Chiquichano, y mientras duró este estudio, no se registraron plantas acuáticas ni macrófitos (aunque sí se observan en épocas estivales, junto a las orillas).

La Laguna Cacique Chiquichano (Tabla 1) es una laguna de aproximadamente 10 hectáreas, con una profundidad media cercana a 2 m y de aguas eutrofizadas (Rivera, 1993) que en los días de viento están sujetas a una fuerte mezcla vertical (Gonzalez & Tappari, 1995). Recibe aportes de la capa freática (Maldonado et al., 1994) y sus aguas salobres (5,8 ‰) sostienen la actividad de tres niveles tróficos, en los que los cladóceros utilizados en este estudio forman parte de los consumidores primarios (Gonzalez y Tappari, 1995). Por su parte, la Laguna Parque de la Ciudad (Tabla 1) es un cuerpo de agua mucho menor, de aproximadamente 0,3 hectáreas de superficie (de hecho, puede ser considerada como un estanque permanente) y una profundidad media de 0.8 m, lo cual hace su volumen muy variable por la alta evaporación en los períodos secos y cálidos del año.

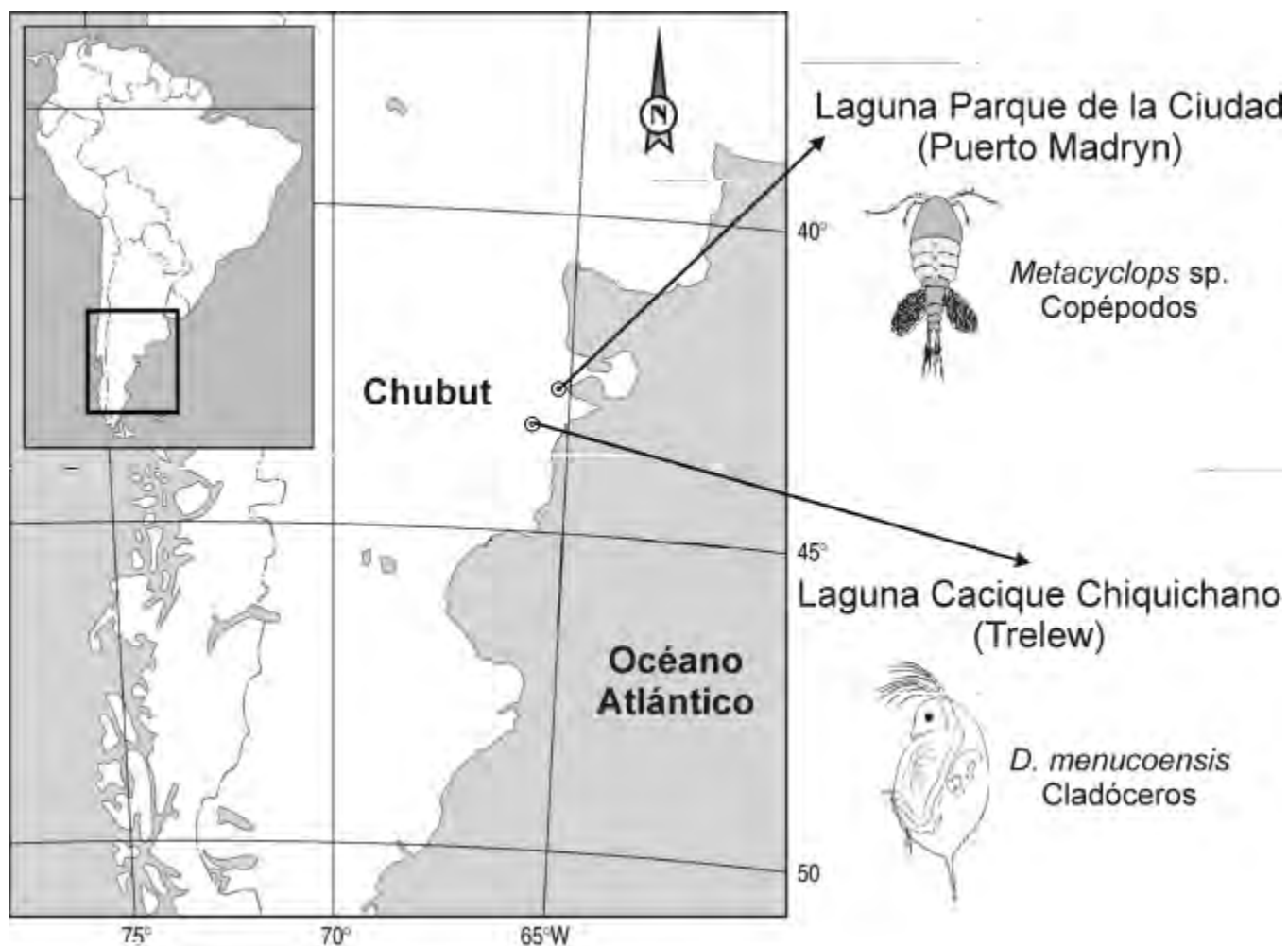


Figura 3 Ubicación del área de estudio y esquema de los organismos utilizados en la experimentación.

Tabla 1 Características generales de las lagunas Cacique Chiquichano (Trelew) y Parque de la Ciudad (Puerto Madryn). Los datos acompañados de un (*) provienen de (Rivera, 1993).

Laguna	<i>Cacique Chiquichano</i>	<i>Parque de la Ciudad</i>
<i>Superficie aprox. (Ha)</i>	10 (*)	0,3
<i>Profundidad media (m)</i>	2 (*)	< 0,8
<i>Conductividad (mS/cm)</i>	7,6	11,4
<i>Temperatura (°C)</i>	6 - 19	4 - 20
<i>Clorofila a (mg clor- a/l)</i>	1 - 450	225 - 425

Radiación ultravioleta en el área de estudio

Para determinar las condiciones de radiación a las que están normalmente expuestos los organismos en la naturaleza, se calcularon las dosis de RUV-B para el año en el que se realizaron los experimentos (Figura 4). La radiación solar incidente en el área de estudio durante el tiempo de experimentación se midió con un radiómetro de banda ancha (Real Time Computers Inc.), el cual posee sensores para PAR (400-700 nm), RUV-A (320-400 nm), y RUV-B (280-320 nm). Este radiómetro, que esta incorporado a la red ELDONET de medición de RUV y PAR, está instalado permanentemente en la Estación de Fotobiología Playa Unión (EFPU, 43°S 65°W), y colecta automáticamente un dato por minuto. Dado que la presencia y composición de nubes condiciona sensiblemente la radiación que llega a la superficie terrestre en determinado momento (Lubin & Jensen, 1995), las dosis de RUV máximas para el período de estudio se calcularon según un modelo de transferencia atmosférica (Björn & Murphy, 1985), teniendo en cuenta variables tales como concentración de ozono, latitud, altura sobre el nivel del mar, concentración de aerosoles, etc. Los máximos valores de RUV-B fueron de $\sim 41 \text{ kJ/m}^2$ durante el verano, mientras que los valores mínimos ($\sim 6 \text{ kJ/m}^2$) se registraron durante el invierno.

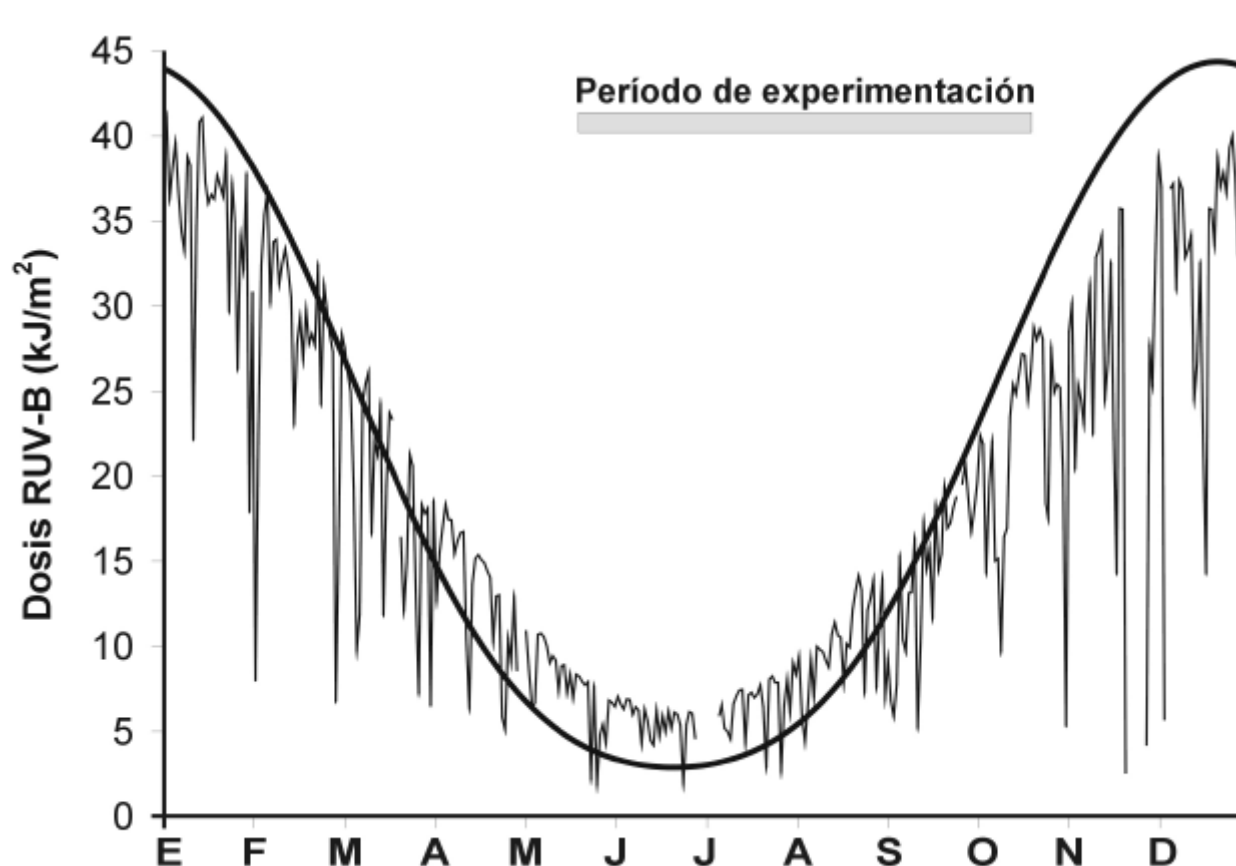


Figura 4 Dosis diarias de RUV-B para la zona de estudio (línea fina). Se pueden observar las variaciones debidas a nubes. La línea gruesa señala los valores predichos por el modelo de Björn & Murphy (1985).

Especímenes

Los organismos zooplanctónicos utilizados en este estudio fueron a) Cladóceros: *Daphnia* (*Ctenodaphnia*) *menucoensis* (Anomopoda; Daphniidae) (Paggi, 1996), y b) Copépodos: *Metacyclops* sp. (Copepoda, Cyclopoida). Los ejemplares utilizados en la experimentación fueron adultos, y fueron identificados por las Dras. María Cristina Marinone y Silvina Menú-Marque.

a) Los cladóceros (Figura 5A) son crustáceos acuáticos comúnmente conocidos como “pulgas de agua” debido a su particular forma de natación. El cuerpo presenta una cubierta quitinosa en forma de valvas que se abre centralmente, dejando al dorso una cavidad en la que se alojan los huevos. Poseen 2 pares de antenas, de las cuales el segundo está modificado para impulsarse en la natación (produciendo los característicos “saltos” en su trayectoria), y el resto de los apéndices son utilizados para crear y filtrar corrientes de agua que contienen su alimento (algas y micro zooplancton). En el caso de los machos, el primer par de apéndices torácicos está modificado para sujetar a la hembra durante la cópula. Estos cladóceros tienen un solo ojo medio, compuesto, con un pedúnculo muscular. Presentan alternancia de generaciones, una sexual y otra partenogenética, ambas producen huevos que serán cargados por la hembra en la cámara dorsal. Los huevos producto de la reproducción sexual funcionan como estructuras de resistencia, tolerando sequías, temperaturas extremas y grandes variaciones del ambiente abiótico durante meses, incluso años (Grassé et al., 1976). Los huevos partenogenéticos son de menor tamaño, más frágiles y producidos en mayor número, pero también su desarrollo (que en todos los casos es directo) es más rápido (horas o días). Los cladóceros son muy comunes en lagos y lagunas poco profundas, tolerando salinidades de aguas salobres y sobreviviendo en cuerpos de agua eutrofizados y temporarios (Hrbáček, 1987; Paggi, 1996; 1999). El grupo de los cladóceros es más común en ambientes dulceacuícolas que en el mar, y en aquellos suele constituir uno de los principales alimentos que sustenta la red trófica de los predadores superiores e intermedios (aves, peces) (Lampert, 1987).

b) Los copépodos (Figura 5b) son pequeños crustáceos, de cuerpo cilíndrico, segmentado (cabeza, tórax, y abdomen) con 5 pares de apéndices para la natación., 2 pares de antenas birramosas y un exoesqueleto quitinoso. Estos crustáceos tienen usualmente un solo ojo simple (ojo naupli). Se reproducen sexualmente y los machos a menudo tienen la primera antena modificada para la cópula. Viven por períodos de semanas o meses, y pueden ser tanto herbívoros (los de pequeño tamaño) como carnívoros (los de mayor tamaño). En general su alimento está constituido por bacterias, algas microscópicas, zooplancton unicelular y otros microorganismos, que pueden ser atrapados filtrando el agua circundante mediante la producción de corrientes de agua con sus extremidades o por una búsqueda activa. El desarrollo es indirecto, con 12 mudas entre las etapas de nauplii y el estado adulto reproductivo (Grassé et al., 1976). Los huevos producidos por la hembra son transportados en sacos

ovígeros, unidos a un par de patas o a la base del abdomen. En general, los copépodos pueden ser parásitos o de vida libre, y forman el grupo de mayor número de especies animales en las comunidades mesozooplanctónicas. En cuanto a su distribución, los copépodos se encuentran en casi todo el planeta, desde aguas antárticas hasta lagos oligotróficos andinos de grandes alturas tales como el Lago Titicaca. Existen formas pelágicas y bentónicas, y la gran biomasa que representan en los ecosistemas los convierte en un importante eslabón en el flujo de energía hacia los niveles tróficos superiores y en la permanencia de nutrientes en la zona eufótica en el caso de los copépodos pelágicos (Kiørboe, 1998).

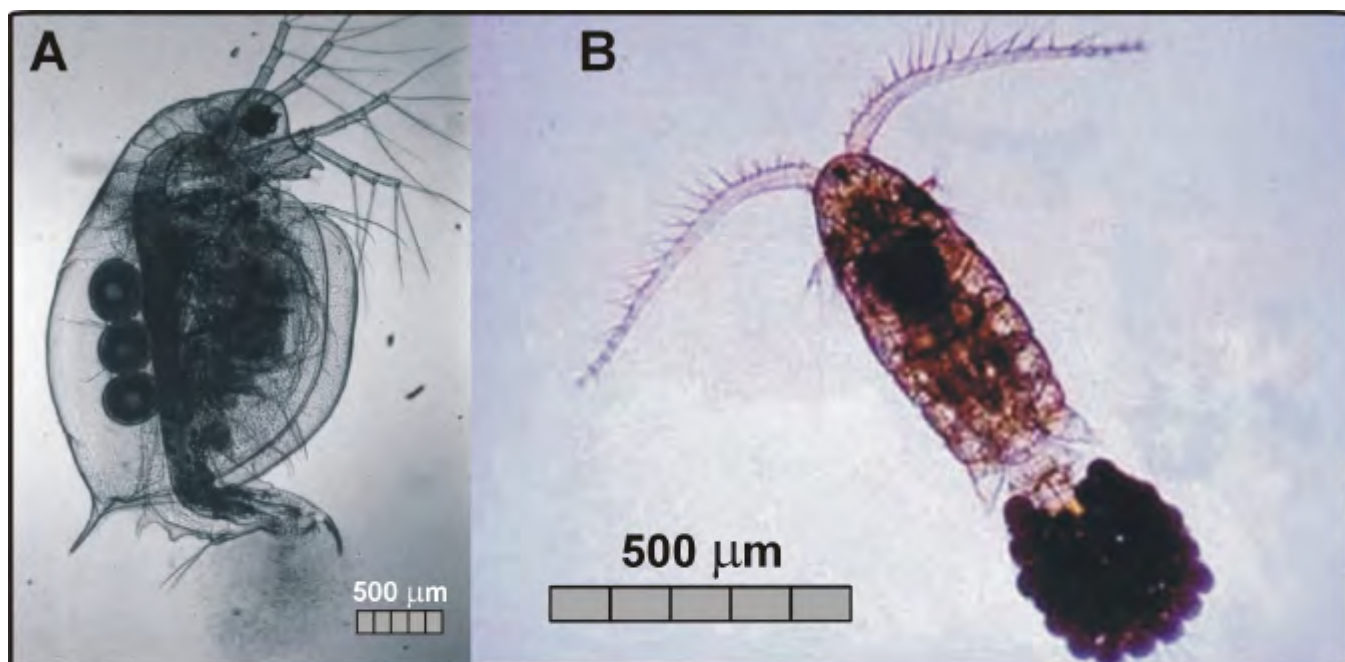


Figura 5 Fotografías de un cladóceros (A) con tres huevos en la cámara dorsal, y un copépodo (B) con un saco ovígero impar. Se puede observar la transparencia del cladóceros, y la fuerte coloración del copépodo. Nótese también la diferencia de escalas.

Toma de muestras

Las muestras para experimentación de *D. menucoensis* y *Metacyclops* sp. se obtuvieron semanalmente, durante los meses de Mayo a Octubre de 2001. Los individuos de *D. menucoensis* fueron recolectados mediante arrastre de una red de plancton (malla Nitex® de 200 µm de poro), de 18 cm de diámetro de boca. El sitio de recolección (en la Laguna Cacique Chiquichano) es cómodo y accesible gracias a una plataforma de cemento que permite recoger la red sin que ésta toque el fondo. Por el contrario, en el caso de la Laguna Parque de la Ciudad, la escasa profundidad no permitió utilizar la red, por lo cual las muestras se colectaron directamente en recipientes aplanados para no capturar animales del bentos. Una vez colectadas, las muestras se transportaron en una conservadora hasta el laboratorio,

donde se separaron del resto de los organismos acompañantes presentes en el agua de origen. Las muestras de zooplancton fueron utilizadas para los experimentos dentro de las 15 horas después de su recolección. Asimismo, se tomaron muestras de agua superficial con una botella de policarbonato previamente enjuagada con ácido clorhídrico 1N con el fin de evaluar la presencia de compuestos protectores y estimar la biomasa fitoplanctónica. Toda la experimentación y análisis de datos se realizó en la EFPU (Playa Unión, provincia de Chubut).

Durante el período de experimentación, las muestras de zooplancton recolectadas con la red de plancton en la Laguna Cacique Chiquichano estuvieron dominadas ampliamente por *D. menucoensis* (llegando a más de 100 individuos por litro). En el caso de la Laguna Parque de la Ciudad, los copépodos aparecieron integrando una comunidad acuática compartida por anfípodos, coleópteros, larvas de insectos, etc. En ningún momento del estudio se registró la presencia de *D. menucoensis* en la Laguna Parque de la Ciudad. Para todos los experimentos se tuvo especial cuidado al seleccionar los grupos de *D. menucoensis* y de *Metacyclops* sp. para que los tamaños sean homogéneos. El largo promedio de los individuos fue de 3 mm en *D. menucoensis* (cabeza-espina valvar) y 1 de mm en el caso de *Metacyclops* sp. (cabeza-extremo de las furcas).

Experimentación

Para cumplimentar el objetivo de este estudio y probar las hipótesis planteadas, se realizaron experimentos bajo dos enfoques: a) Experimentos de *fotorreparación* (Hipótesis #1) y, b) Experimentos de *mortalidad en función de la dosis* de RUV-B (Hipótesis #2). La determinación de compuestos protectores se realizó en cada muestra que se utilizaba para los experimentos arriba mencionados, y su importancia y posible rol de protección se determinó en base a los datos de mortalidad obtenidos.

Los *experimentos de fotorreparación* se diseñaron con el fin de evaluar la potencial fotorreparación de un daño causado en el ADN, y esto se determinó a través de la diferencia de mortalidad entre los organismos expuestos sólo a la RUV-B y aquellos expuestos a la RUV + PAR, dando así información acerca de la actividad de la enzima de reparación foto-dependiente (ver Figura 2). Cada experimento de fotorreparación se realizó en dos etapas: una fase “oscura”, en la cual se determinó la mortalidad de los organismos irradiados sólo con RUV-B, y una fase “clara”, que consistió en irradiar a los zoopláncteres con RUV + PAR. Ambas fases tuvieron una duración de 6 hs. En la fase “oscura”, la dosis y longitud de onda de la RUV-B recibida por el organismo determinan un daño en el material genético y consecuentemente la mortalidad. La única diferencia experimental de la fase “clara” respecto a la “oscura” es la presencia de luz visible (PAR). La radiación visible (junto con parte de la RUV-A) activa la fotoliasa (enzima de fotorreparación), por lo cual el daño en el ADN comienza a ser reparado a

una determinada velocidad. Esta *fotorreparación* se va a evidenciar en una menor mortalidad en la fase “clara” respecto a la fase “oscura”, siempre que este mecanismo enzimático exista y se active.

Para estos experimentos, se colocaron individuos de una misma especie en grupos de 20 (*D. menucoensis*) ó 30 (*Metacyclops* sp.) en cápsulas de Petri (5,5 cm de diámetro x 1,0 cm de alto) con 10 ml de agua filtrada (a través de una malla de 50 μm poro) de la laguna de origen. Las cápsulas, conteniendo los individuos para experimentación, se colocaron sobre una bandeja giratoria (5,5 rpm) a fin de lograr un campo homogéneo de radiación, y se expusieron a la RUV-B (fase “oscura”) o RUV+PAR (fase “clara”) dentro de una cámara de incubación (Sanyo modelo MLR-350), a una temperatura constante de 15°C (Figura 6). Todas las cápsulas se cubrieron con un filtro de cuarzo, transparente a la RUV, para evitar la evaporación. En ambas fases se contó, asimismo, con dos tratamientos control, uno envuelto en papel aluminio (y por lo tanto no recibía radiación) y otro con filtro de Mylar-D (bloquea la RUV-B). Todos los tratamientos fueron hechos por duplicado. Al finalizar el tiempo de irradiación, las muestras estuvieron en oscuridad por 18 horas hasta la primera determinación de mortalidad y luego 24 horas más hasta la determinación final. No existieron mayores diferencias entre ambas determinaciones y los datos definitivos presentados en este trabajo son los obtenidos en el segundo conteo.

Se realizaron distintos tratamientos de radiación a fin de proveer a los organismos de distintas intensidades y calidades de RUV. Esto se logró colocando filtros entre la fuente de RUV-B y los organismos. Los filtros fueron de dos tipos: i) de *cantidad*, que dejan pasar la misma proporción relativa de longitudes de onda de la radiación incidente, pero atenúan la *energía*, y ii) *filtros de calidad*, los cuales cambian la *composición espectral* de la radiación incidente (i.e., restringen la radiación de determinadas longitudes de onda). Los filtros de cantidad se construyeron adaptando mallas de densidad neutra a las cápsulas de Petri, a fin de atenuar la radiación al 85, 63 y 23% de la incidente. Por su parte, los filtros de calidad son materiales específicos para estos fines; en este caso se utilizaron filtros Schott WG 280, WG 295, WG 320 y GG 400. Las características de transmisión de estos filtros de calidad se muestran en la Figura 7.



Figura 6 Fotografías de la cámara de cultivo mostrando las cápsulas y arreglo experimental.

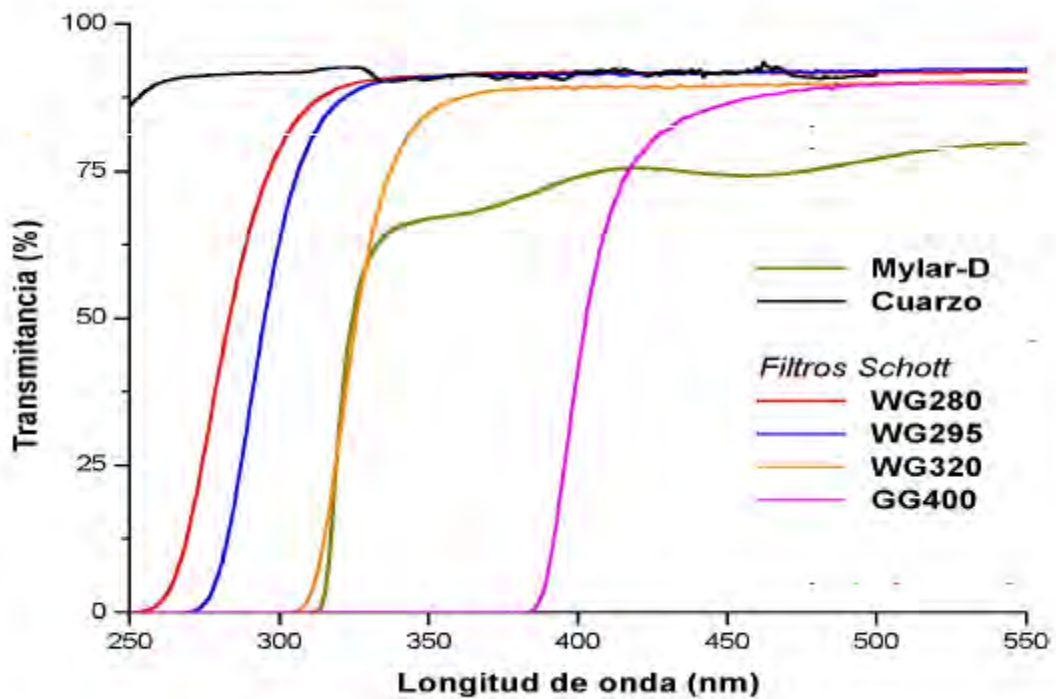


Figura 7 Transmitancia de los filtros utilizados.

Los experimentos de **mortalidad en función de la dosis de RUV-B** estuvieron orientados a determinar la vulnerabilidad de las dos especies, al ser expuestas a dosis crecientes de RUV-B. Esto se logró irradiando los organismos con una fuente constante de RUV-B, y determinando la mortalidad a diferentes tiempos de exposición.

Cada experimento consistió en exponer a los individuos (en cápsulas de Petri, tal como se describió para los experimentos de fotorreparación) únicamente a la fuente RUV-B dentro de la cámara de incubación durante distintos períodos de tiempo. Se implementaron dos tratamientos de calidad de radiación: a) muestras (10 cápsulas por experimento) bajo filtro de cuarzo y, b) muestras control (10 cápsulas por experimento) bajo filtro de cuarzo y filtro Mylar-D, opaco a la RUV-B (Figura 7). Así tenemos individuos que recibieron toda la radiación de la fuente UV, e individuos que reciben sólo RUV-A. Las cápsulas (20 en total) se colocaron en la bandeja giratoria de la misma forma que en los experimentos de fotorreparación. Como segundo control, se colocaron 3 réplicas fuera del alcance de la RUV-B y envueltas en papel aluminio, para asegurar que no recibieran radiación por reflexión en las paredes internas de la cámara. Una vez comenzada la irradiación, se fueron tapando a intervalos variables (mínimo de 3 horas) dos réplicas, elegidas al azar, de cada tratamiento (i.e., cuarzo, y cuarzo + Mylar-D). Las cápsulas se taparon con papel aluminio para evitar que sigan recibiendo radiación y detener en ese momento la acumulación de dosis, y de esta manera, al finalizar el experimento (15 horas para *D. menucoensis* y 21 horas para *Metacyclops* sp.) se tuvo un par de réplicas para cada tratamiento y dosis recibida. Cada tratamiento se hizo por duplicado y el control en oscuridad (aluminio) por triplicado. La determinación de la mortalidad se realizó al finalizar cada experimento, y en base a estos datos se ajustó una ecuación para los valores de mortalidad en función de la dosis recibida y se calculó la *dosis letal 50%* (LD_{50} , la dosis de radiación a la cual se observa la muerte del 50% de los individuos expuestos).

Fuente de radiación: Como fuente de RUV-B se utilizó una lámpara Spectroline (modelo XX-15F/B, Spectronics Corporation, NY, USA), con un máximo de energía emitida a los 312 nm, entregando una irradiancia total de $3,1 \text{ W/m}^2$ a 27,5 cm (distancia entre la fuente y las cápsulas). Para cada experimento se cubrió la lámpara de RUV-B con un filtro de acetato de celulosa para eliminar la emisión de longitudes de onda menores a 280 nm (longitudes de onda que no llegan a la Tierra). Por otro lado, la fuente PAR para los experimentos de fotorreparación fueron tubos fluorescentes (Philips daylight) montados en las paredes internas de la cámara, los cuales emitían una irradiancia de $59,7 \text{ W/m}^2$. En la Figura 8 se presenta un espectro de emisión de la lámpara de RUV-B, así como también, a modo de comparación, la composición espectral de la radiación solar para las mismas longitudes de onda.

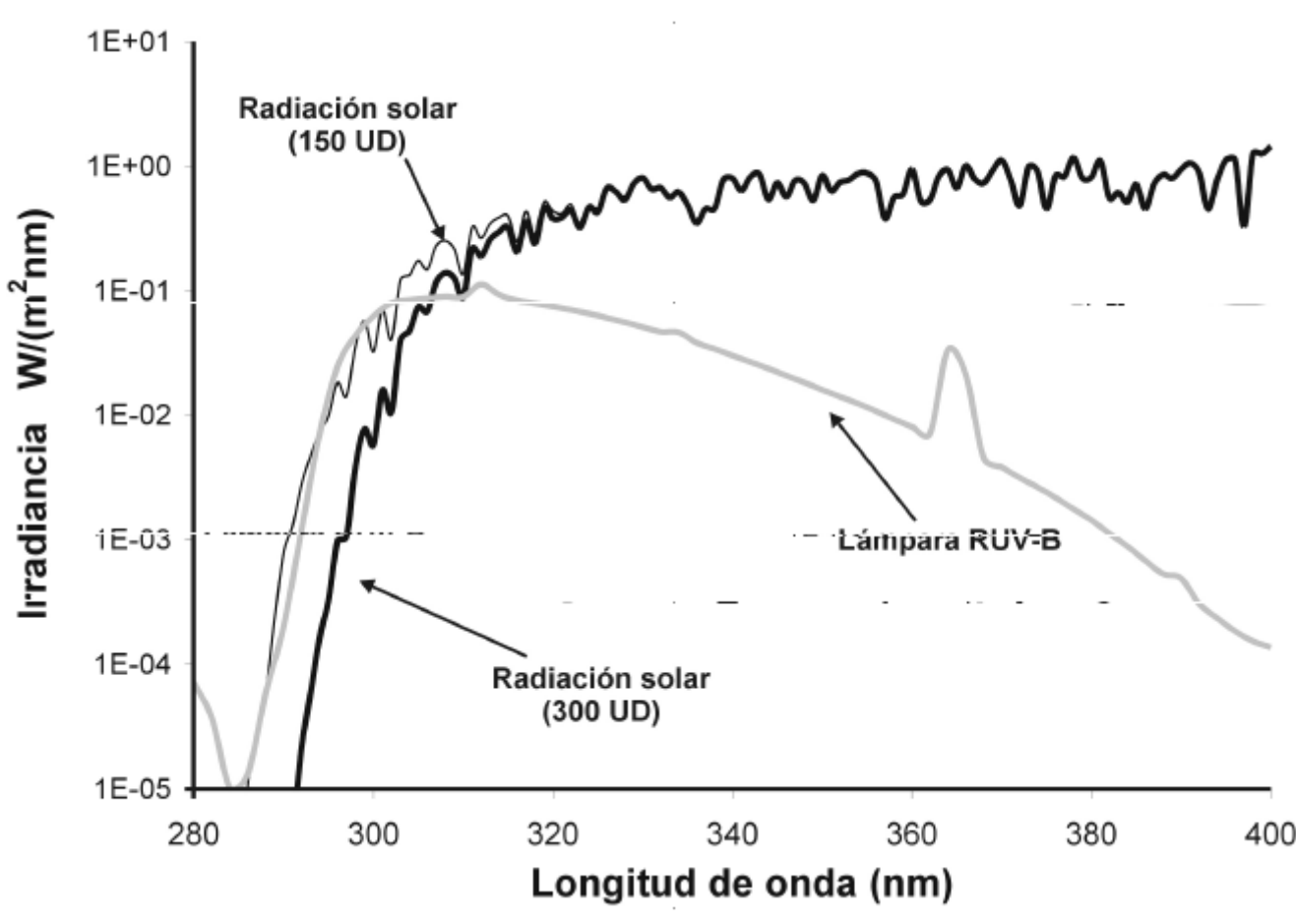


Figura 8 Espectro de emisión de la fuente de RUV-B utilizada en los experimentos. Se presenta también el espectro de radiación solar a 43 °S para las mismas longitudes de onda, pero en dos condiciones de concentración de ozono.

Determinación de la mortalidad

Tanto en los experimentos de fotorreparación, como en los de mortalidad versus dosis, los conteos de individuos se hicieron bajo lupa (Bausch & Lomb, modelo HG 121711) con un aumento de 30X. Los organismos se catalogaron como *vivos*, *muertos* y *moribundos*. Se consideró *muerto* a aquel organismo en el que no se observaba en absoluto movilidad de los apéndices filtradores. Se consideró *moribundo* al organismo que movía los apéndices lentamente y no realizaba movimientos de cambios de posición o natación (usualmente tanto *D. menucoensis* como los *Metacyclops* sp. utilizados realizan movimientos rápidos y vigorosos, ya sea en su activa natación o durante la alimentación por filtración). Para los datos finales, se consideró a los organismos moribundos como parte de la mortalidad total, ya que pueden ser considerados como *ecológicamente muertos*. Esta consideración tiene en cuenta que si bien el organismo está aún respirando y con actividad metabólica, tiene una alta probabilidad de ser consumido por algún predador, infectado por algún parásito, morir o debilitarse por falta de alimentación al disminuir la tasa de filtración, etc.

Compuestos protectores

En el caso del fitoplancton, se filtró un volumen de agua variable entre 100 y 500 ml (prefiltrada con una malla Nitex® de 200 µm de poro), en un filtro de fibra de vidrio Whatman GF/F (47 mm). El filtro se colocó en un tubo de ensayo con 7 ml de metanol absoluto para extraer los compuestos solubles de la muestra retenida en el filtro. La extracción se realizó a 4 °C en oscuridad durante al menos dos horas. Luego, la muestra se centrifugó a 200 rpm y se realizó un barrido entre 250 y 750 nm con un espectrofotómetro de arreglo de diodos (Hewlett Packard, modelo HP 8453E) utilizando una cubeta de 1 cm de paso óptico, siguiendo la técnica descrita en Helbling et al. (1996).

Para el caso del zooplancton, se separaron muestras de 90-100 individuos (previamente se había comprobado que ese número era el adecuado para obtener una buena señal del instrumento). Los animales estaban vivos al momento de ser separados y no habían sido sometidos a ningún tratamiento experimental de radiación. Se colocaron sobre filtros Nitex® de 250 µm y se les quitó tanta agua como fue posible. Los organismos se colocaron dentro de tubos de ensayo con 5 ml de metanol y se maceraron con una varilla de vidrio para facilitar la extracción. Luego los compuestos solubles se dejaron extraer en un tubo de ensayo a 4 °C durante al menos dos horas. Pasado este tiempo, se centrifugaron, y con el sobrenadante se realizó un barrido de la misma manera que para las muestras de fitoplancton. Los valores de absorbancia (i.e., densidad óptica) se normalizaron luego con el número de individuos (para realizar una comparación precisa entre ambas especies animales). Los datos de absorbancia por individuo también se normalizaron por volumen corporal, asimilando a *D. menucoensis* con una esfera (1,5 mm de radio) y a *Metacyclops* sp. con un cilindro (1 mm de alto y 0,2 mm de radio). Los espectros del zooplancton se utilizaron para visualizar máximos de absorción y para determinar las diferencias relativas en las concentraciones de los compuestos solubles en metanol, teniendo en cuenta que se procuró siempre trabajar con individuos de tamaños homogéneos durante todos los experimentos.

Para identificar los compuestos que absorben RUV (i.e., MAAs) en ambas especies de zooplancton, se analizaron muestras representativas de los experimentos utilizando técnicas de HPLC (High Performance Liquid Chromatography). Estos análisis fueron realizados en la Friederich Alexander Universität (Alemania), siguiendo la técnica descrita en Helbling et al (1996).

Concentración de clorofila a

La concentración de clorofila a (clor-a) de ambas lagunas, se utilizó como estimadora de la cantidad de fitoplancton presente y se midió por fluorimetría (Holm-Hansen et al.,1965). Para tal fin, se prefilaron muestras del agua de cada laguna con una malla Nitex® de 200 µm para eliminar los organismos zooplantónicos mayores. Luego, se filtró un volumen de agua variable entre 10 y 200 ml utilizando un filtro de fibra de vidrio Whatman GF/F de 25 mm de diámetro. El filtro, conteniendo la

muestra de fitoplancton, se colocó dentro de un tubo de ensayo con 7 ml de metanol absoluto en oscuridad a 4°C, al menos durante dos horas, para la extracción de los compuestos solubles en metanol (Holm-Hansen y Riemann, 1978). El tubo de ensayo conteniendo la muestra se centrifugó a 200 rpm durante 15 minutos. Finalmente, se midió la fluorescencia del sobrenadante en un fluorómetro (Turner Designs, modelo TD 700) antes y después de acidificar la muestra con HCl 1N. Con estas lecturas se calculó la concentración de clor-a en la muestra. El fluorómetro se calibró con clor-a pura extraída de *Anacystis nidulans*.

Medidas de radiación

La radiación dentro de la cámara incubación (donde se llevaron a cabo los experimentos), se midió con sensores portátiles de banda ancha para PAR (Lutron, modelo LX-107), y para RUV (Lutron, modelo UV-340), intercalibrados con el radiómetro ELDONET.

Tratamiento estadístico de los datos

Todos los tratamientos se realizaron al menos con dos réplicas. Se calculó la media y desviación estándar para cada conjunto de valores de mortalidad. Para evaluar la significación estadística de las diferencias de mortalidades en los experimentos de fotorreparación se utilizaron tests no paramétricos (Kruskal-Wallis) utilizando el software estadístico SPSS.

Para los experimentos de mortalidad en función de la dosis, se realizó un ajuste polinomial en forma iterativa a los valores obtenidos para cada especie. Para ello se utilizó el software Microcal (TM) Origin ® Working Model 6.0 (Microcal Software). Con el mismo software se calcularon los intervalos de confianza del 95% para los ajustes, los estadísticos de regresión y sus probabilidades.

Resultados

La primera hipótesis a probar estaba referida al hecho de que la supervivencia sería mayor en organismos que pudieran fotorreparar el daño al ADN producido por la RUV-B. En las dos secciones siguientes se presentarán los resultados de las experiencias de fotorreparación en función de la cantidad y calidad de radiación que apoyan esta hipótesis.

Fotorreparación a distintas dosis

En la Figura 9 se muestran los datos de mortalidad para distintas dosis de RUV-B de *D. menucoensis* obtenidos en los experimentos de fotorreparación. Los datos presentados corresponden a los distintos tratamientos, a los que se les restó la eventual mortalidad en el control oscuro y en el tratamiento control de Mylar-D. En todos los experimentos la mortalidad en el control oscuro fue esporádica y no significativamente diferente de cero ($p = 0,4$); en el control de Mylar-D, por su parte, no hubo mortalidad. Es posible observar que existen diferencias significativas ($p < 0,05$) en la mortalidad de individuos expuestos a la RUV-B (barras grises - fase “oscura” sin posibilidad de fotorreparación), en comparación con individuos que recibieron RUV + PAR (barras blancas - fase “clara”, con posibilidad de fotorreparación). La mortalidad en la fase “oscura” varió entre 11,5% (para una dosis de RUV-B de 10 kJ/m^2) y 73% (para una dosis de RUV-B 63 kJ/m^2). Es decir que al no tener luz visible para activar la fotorreparación en la fase “oscura”, el daño en el material genético fue acumulado hasta cierto punto que determinó la muerte del organismo. Sin embargo, los datos indican una fotorreparación activa en *D. menucoensis* al recibir RUV en presencia de PAR para todas las dosis a las que fueron expuestas las muestras. Por otro lado, es evidente que a medida que aumenta la dosis, la mortalidad es significativamente mayor ($p < 0,002$) para los individuos que recibieron RUV-B. Sin embargo, y aunque la mortalidad en los individuos expuestos a RUV + PAR aumentó levemente con mayores dosis, este aumento no fue significativo ($p = 0,144$).

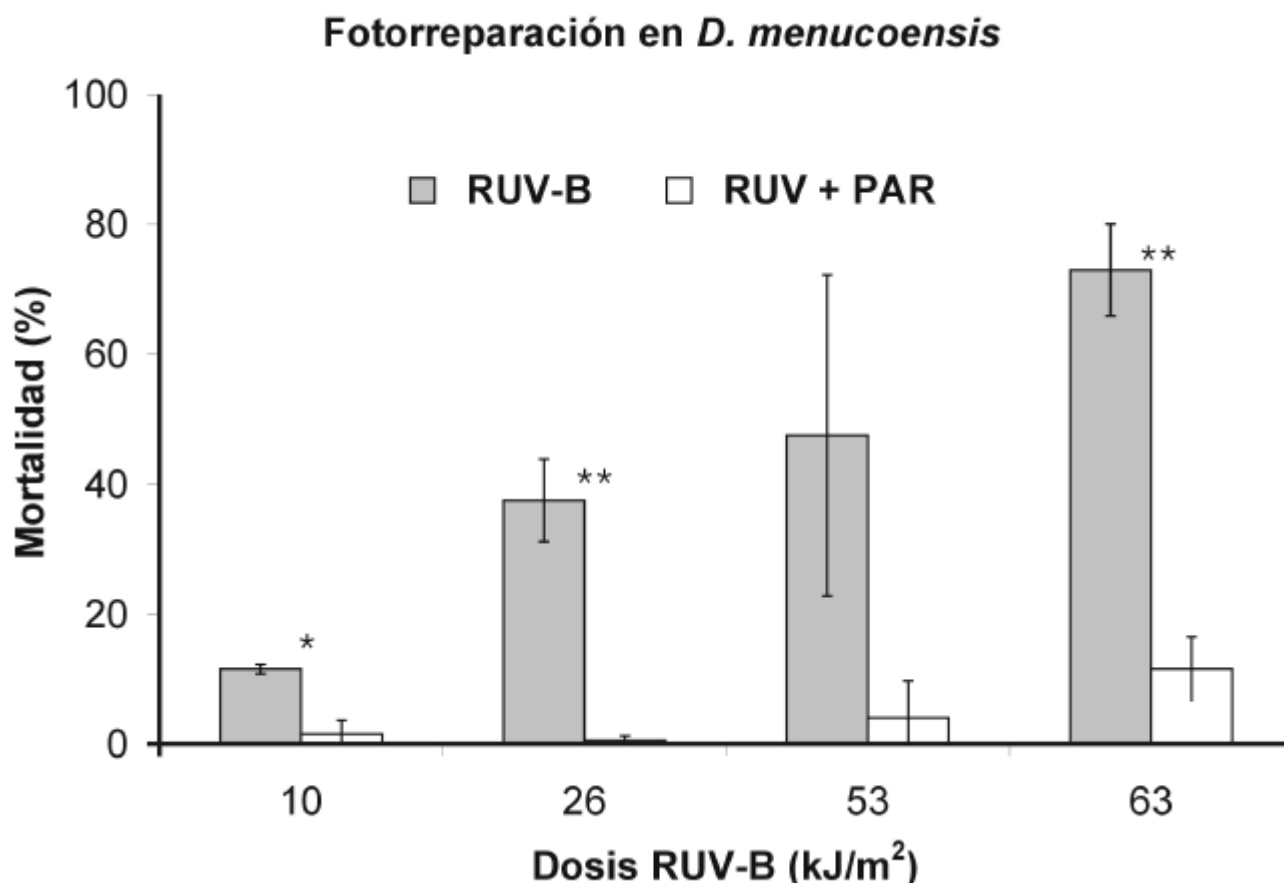


Figura 9 Mortalidad a distintas dosis de RUV-B para los individuos de *D. menucoensis* expuestas a RUV + PAR (barras blancas – fase “clara”), y sólo RUV-B (barras grises – fase “oscura”). Las líneas verticales indican la desviación estándar. Resultados del análisis no paramétrico Kruskal-Walis al comparar las fases “oscura” y “clara” para cada dosis: ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$.

Los individuos de *Metacyclops* sp., por su parte, también muestran una capacidad de fotorreparación significativa ($p < 0,05$), aunque los valores de mortalidad en la fase “oscura” no superaron el 27 % (Figura 10). Se observó también un aumento significativo de la mortalidad ($p < 0,02$) en la fase “oscura” con dosis crecientes de RUV-B, sin embargo, no hubo una mortalidad significativa ($p = 0,62$) para los individuos expuestos a RUV + PAR.

Fotorreparación en *Metacyclops* sp.

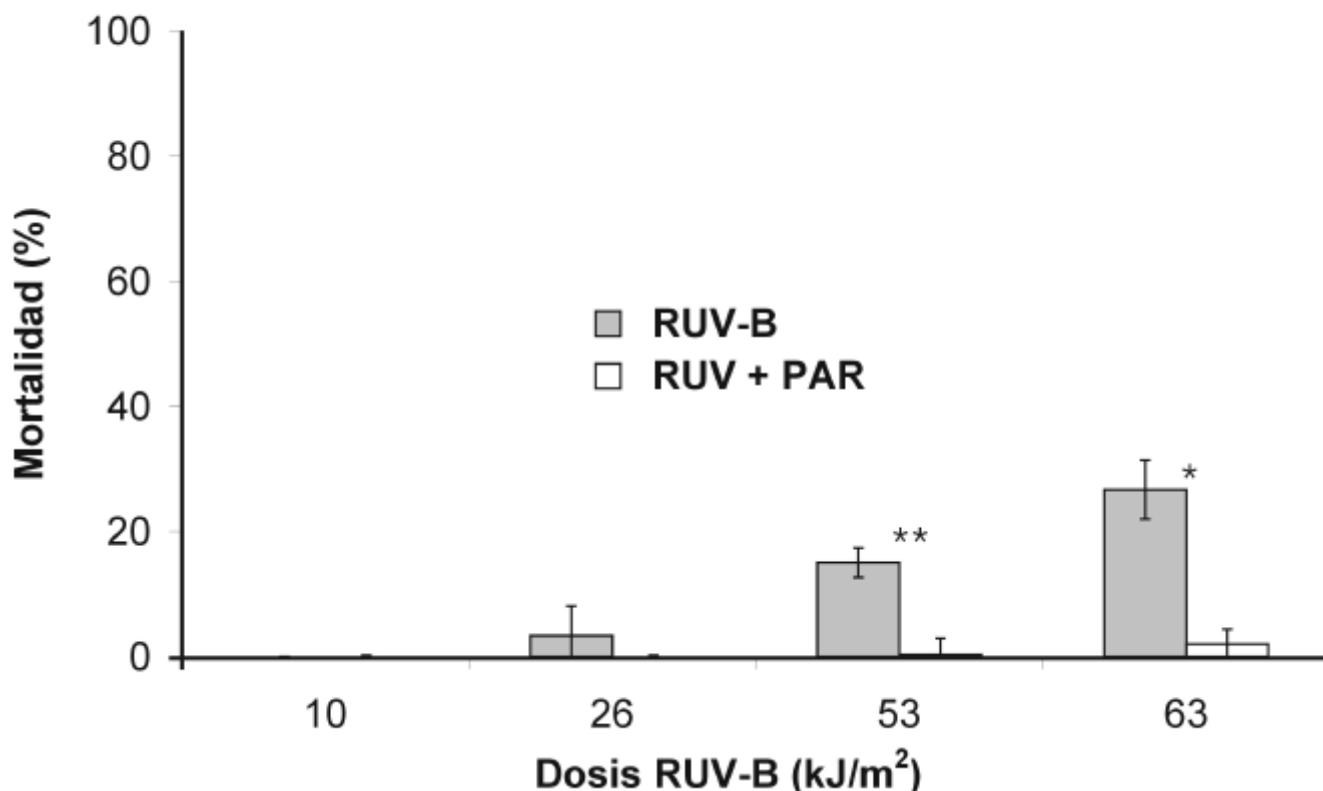


Figura 10 Mortalidad a distintas dosis de RUV-B para los individuos de *Metacyclops* sp. expuestos a RUV +PAR (barras blancas – fase “clara”), y sólo RUV-B (barras grises – fase “oscura”). Las líneas verticales indican la desviación estándar. Resultados del análisis no paramétrico Kruskal-Walis al comparar las fases “oscura” y “clara” para cada dosis: ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$.

Para evidenciar la actividad fotorreparadora de ambas especies, se graficó la diferencia de mortalidad entre la fase “oscura” y la “clara” en función de la dosis de RUV-B recibida (Figura 11). Si no existiera fotorreparación, la mortalidad sería la misma en las dos fases, y por ende la diferencia sería nula. Tal como se mencionó anteriormente, la fotorreparación fue en general significativa para ambas especies (ver Figuras 9 y 10), sugiriendo que los individuos en estudio pueden reparar el daño producido por la RUV-B. Claramente, los valores de reparación para *D. menucoensis* son más altos para cualquiera de las dosis de exposición, mientras que en *Metacyclops* sp. la fotorreparación sólo toma valores significativos ($p < 0,05$) a partir de los 53 kJ/m².

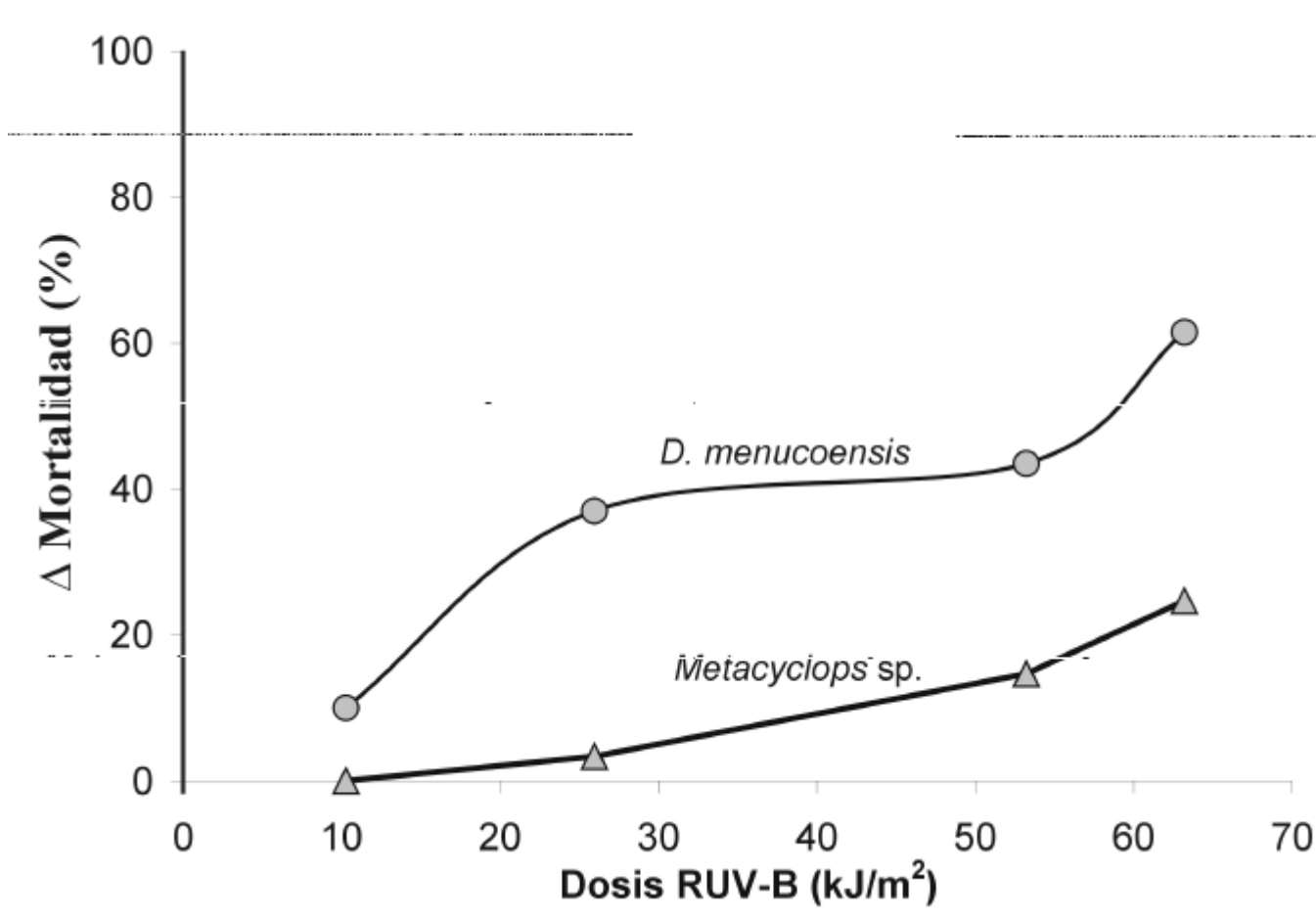


Figura 11 Diferencia de mortalidad entre la fase “oscura” y “clara” (estimación de la fotorreparación) en función de la dosis recibida para *D. menucoensis* y *Metacyclops* sp.

La Figura 11 solamente indica en cuanto mejoró la supervivencia (i.e., un mayor Δ mortalidad indica una mayor supervivencia), pero no se pueden hacer consideraciones acerca de la *efectividad* del proceso de fotorreparación. Por ejemplo, los individuos de *Metacyclops* sp. muestran valores de fotorreparación inferiores a los de *D. menucoensis*, pero, ¿indica esto una menor efectividad en fotorreparar o solamente una menor mortalidad de *Metacyclops* sp. debido a una menor sensibilidad? Una forma de responder a esta pregunta es estimando una tasa de fotorreparación normalizando los datos de la Figura 11 por la mortalidad absoluta en la fase “oscura”. El resultado de esta normalización (las diferencias de la Figura 11 divididas por la mortalidad en la fase oscura para cada dosis) se muestra en la Figura 12, e indica que no existen diferencias significativas ($p = 0,45$) en la tasa de fotorreparación a distintas dosis. Más aún, esta tasa de fotorreparación es similar para ambas especies, y cercana a 1, indicando que todo el daño producido por la RUV-B pudo ser reparado.

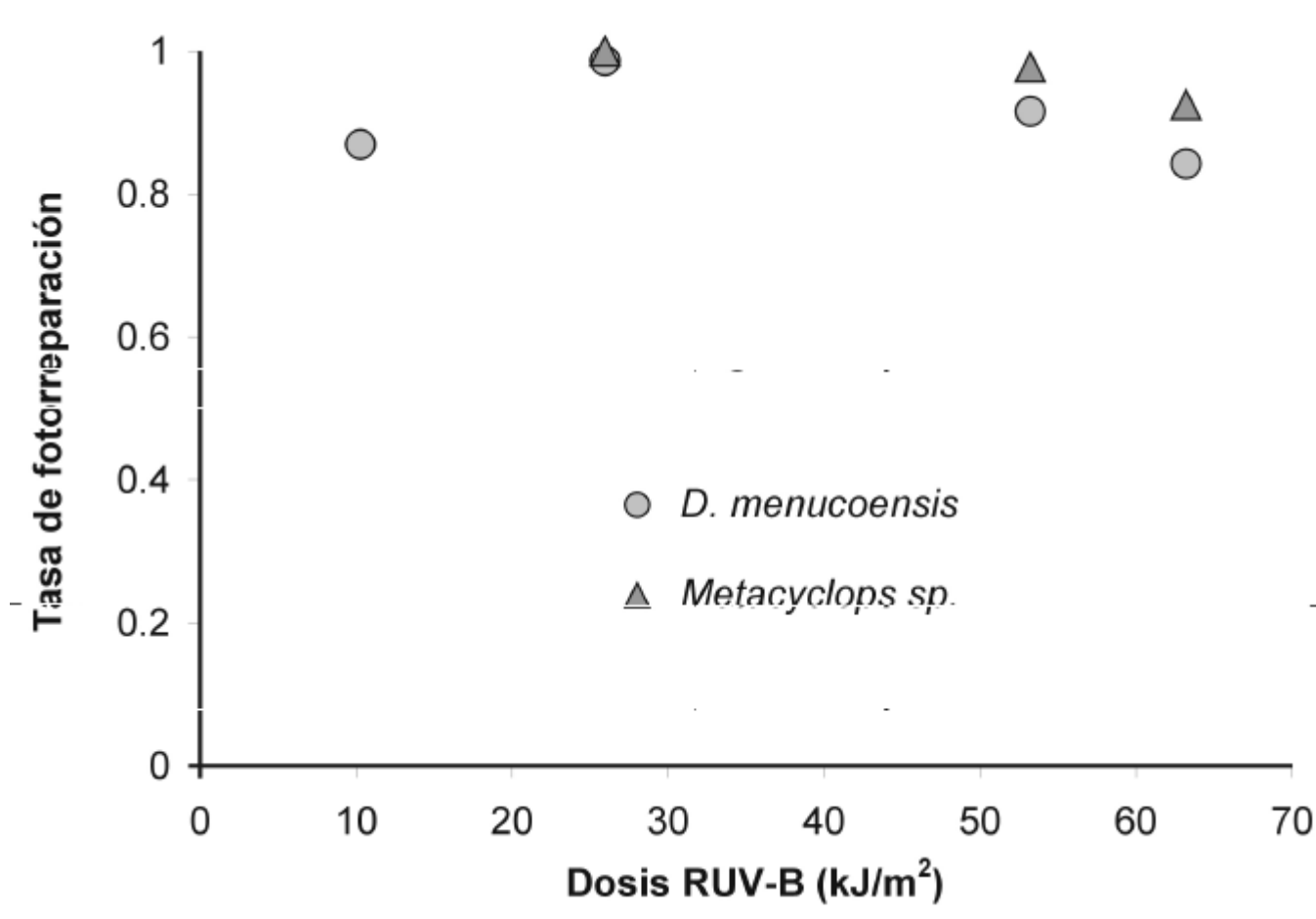


Figura 12 Tasa de fotorreparación en función de las dosis recibida para *D. menucoensis* y *Metacyclops sp.* Los datos representan los valores de la diferencia de mortalidad entre las fases, dividida por la mortalidad en la fase oscura.

Daño – fotorreparación: Funciones de peso biológico

Los resultados presentados anteriormente consideran el daño producido por la RUV-B y la fotorreparación del ADN cuando se atenúa la cantidad de energía que reciben los organismos. En esta sección se presentarán los resultados de mortalidad y fotorreparación cuando los organismos estuvieron expuestos sin que la radiación incidente fuera atenuada, pero fuera variada en “calidad” mediante el uso de filtros selectivos (ver Figura 7). La idea en este tipo de experimentación es determinar el daño producido por unidad de energía para intervalos discretos de longitudes de onda (Rundell 1983). Este tipo de modelo se conoce como funciones biológicas de peso – FPB- (en inglés *Biological Weighting Function, BWF*) y resultan fundamentales para modelos predictivos de impacto de la RUV o para comparar la sensibilidad de distintos organismos. En esta tesis, se calcularon las FPB para *D. menucoensis* durante las fases “oscura” y “clara”, y para *Metacyclops sp.* durante la fase “oscura” (Figura 13). Los individuos de *Metacyclops sp.* no tuvieron mortalidad en la fase “clara”, por eso no se pudo calcular una FPB. La tendencia de las FPBs para ambas especies es la de un mayor daño a

menores longitudes de onda. Así por ejemplo, la FPB para la fase “oscura” de *D. menucoensis*, tiene un “peso biológico” de 0,035 a 286 nm y de 0,0033 a 319 nm. Esto significa que una dosis de 1 J/m² a 286 nm producirá un efecto que será 11 veces mayor que la misma dosis a 319 nm. Por otro lado, los individuos de *D. menucoensis* presentan una mayor sensibilidad a la RUV-B que los *Metacyclops* sp. (i.e., mayores “pesos biológicos”), para individuos en la fase “oscura”. Sin embargo, la sensibilidad de *D. menucoensis* disminuye significativamente en la fase “clara” cuando los individuos pueden fotorreparar. Por su parte, *Metacyclops* sp. muestra una mayor resistencia a la RUV para longitudes de onda menores de aproximadamente 298 nm.

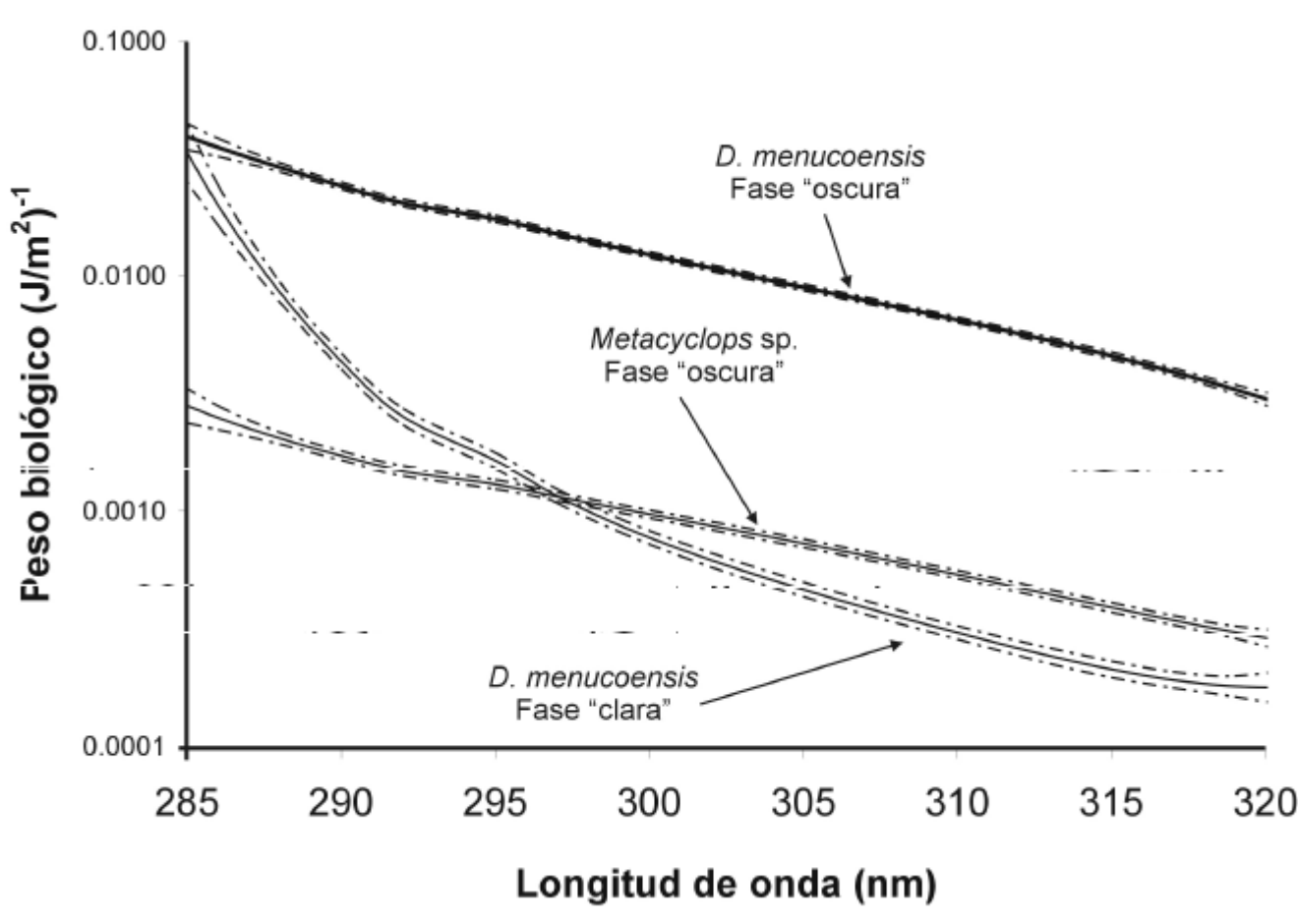


Figura 13 Funciones de peso biológico (FPB) para *D. menucoensis* (fases “oscura” y “clara”) y para *Metacyclops* sp. (fase “oscura”). Los datos de mortalidad a distintas longitudes de onda fueron normalizados por la dosis recibida en ese intervalo de longitudes de ondas y luego ajustados con un polinomio de cuarto grado. Las líneas de puntos indican el 95% intervalo de confianza para cada función.

La segunda hipótesis de esta tesis se refería al daño en función de la radiación, de tal manera que a mayor dosis, mayor iba a ser el daño en el ADN. En la sección siguiente se presentarán datos de mortalidad en la fase “oscura” (i.e., sin posibilidad de fotorreparar) en apoyo a esta hipótesis.

Mortalidad en función de la dosis

Para todo el intervalo de dosis utilizadas, y tanto para *D. menucoensis* como para *Metacyclops* sp., se encontró una significativa mortalidad creciente en función de la RUV-B recibida ($p < 0,001$ y $p < 0,0001$, respectivamente). Se puede afirmar que el total de la mortalidad en estos experimentos es debida a la RUV-B, ya que aquellos individuos que recibieron sólo RUV-A (bajo el filtro de Mylar-D), presentaron una mortalidad nula en ambos grupos. Sin embargo, como ya fuera observado en las secciones anteriores, la mortalidad en *D. menucoensis* es más alta que en los individuos de *Metacyclops* sp., los cuales demostraron ser muy resistentes (Figura 14).

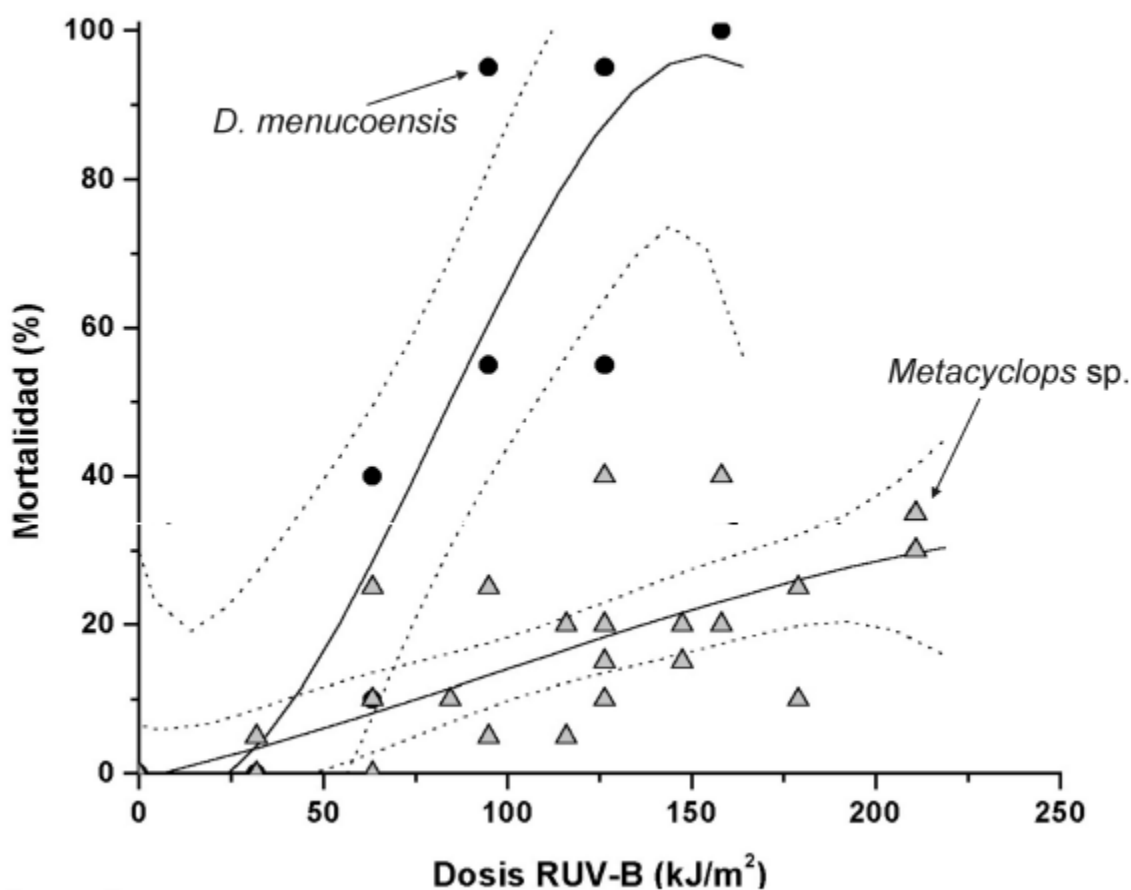


Figura 14: Mortalidad de *D. menucoensis* (●) y *Metacyclops* sp. (▲) en función de la dosis de RUV-B recibida. Los datos corresponden a la fase “oscura” comparados con el control de filtro Mylar-D. Los ajustes son polinomiales de 3^{er} grado ($R^2=0.86$ en *D. menucoensis* y $R^2=0.57$ en *Metacyclops* sp.). Las líneas de punto indican el 95% intervalo de confianza.

Para el caso de los *D. menucoensis*, los datos muestran una curva creciente de mortalidad a partir de una dosis de RUV-B de aproximadamente 25 kJ/m^2 , hasta llegar a la mortalidad máxima (aproximadamente 100%) cuando la dosis de RUV-B era de 150 kJ/m^2 . La dosis letal 50 (LD_{50}) se calculó en $86,8 \text{ kJ/m}^2$. Para *Metacyclops* sp., los valores de mortalidad no superaron el 30% aún en las mayores dosis utilizadas en la experimentación.

Parte del objetivo de este trabajo se refería al posible rol protector de diferentes compuestos que absorben radiación en distintas longitudes de onda, de tal manera que aquellos organismos con color o presencia de estos compuestos podrían tener una menor mortalidad. En los próximos párrafos se presentan resultados en relación a este tema.

Compuestos protectores

En la Figura 15 se muestran las absorbancias (i.e., densidad óptica – D.O.) normalizadas con la concentración de clor-a de los extractos de fitoplancton en metanol, para longitudes de onda de la región UV y visible. La concentración promedio de clor-a durante el período de experimentación fue de 1.7 y $451 \mu\text{g/l}$ para la Laguna Cacique Chiquichano y Laguna Parque de la Ciudad, respectivamente. La densidad óptica del extracto del fitoplancton por unidad de clor-a (absorbancia específica) en la Laguna Cacique Chiquichano fue superior en casi todas las longitudes de onda a la de la Laguna Parque de la Ciudad. Sin embargo, hay que tener en cuenta que la concentración de los pigmentos en un lugar y momento determinado es lo que va a determinar la penetración de la radiación. Las máximas absorbancias para ambas poblaciones corresponden a la clor- a (440 y 665 nm) y carotenoides (aprox. 470 nm). En el fitoplancton de la Laguna Cacique Chiquichano también se detectó un máximo de absorción a 400 nm, perteneciente a un compuesto que no se pudo identificar.

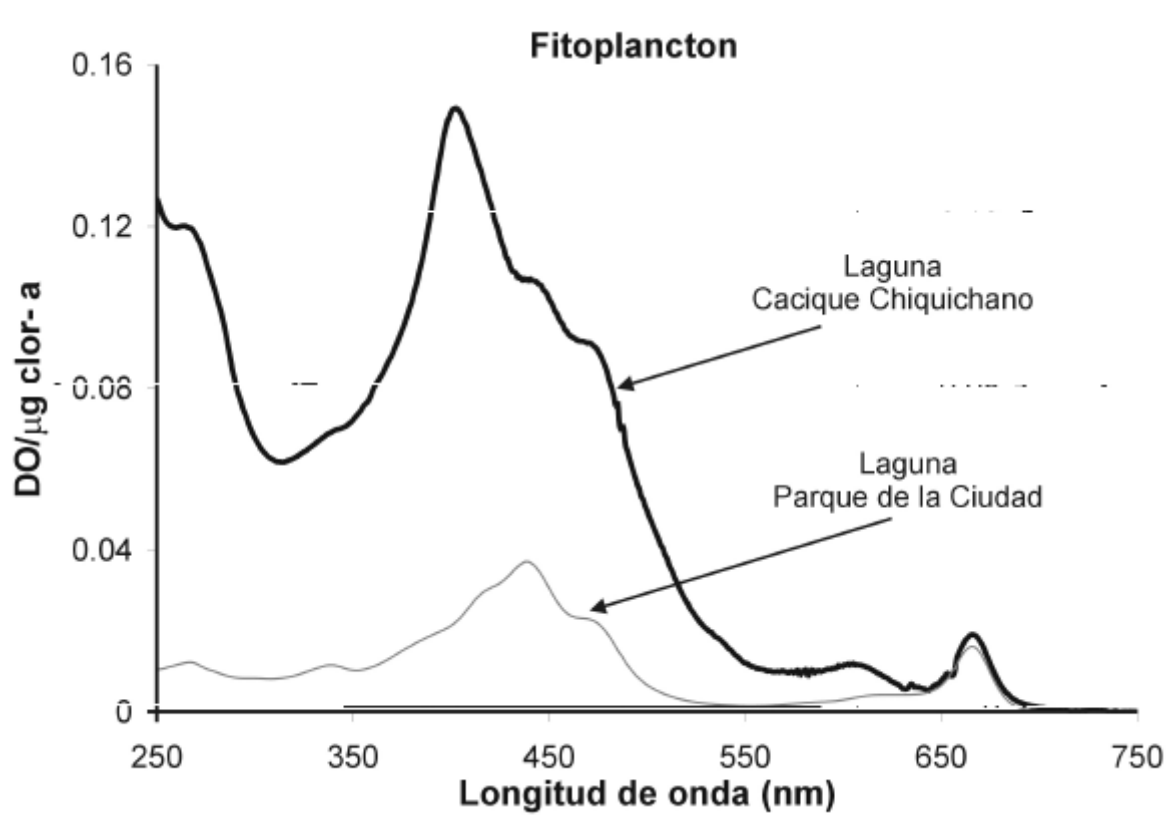


Figura 15 Espectro representativo de la absorbancia específica en función de la longitud de onda para el fitoplancton de la Laguna Cacique Chiquichano (línea gruesa) y Laguna Parque de la Ciudad (línea clara).

Los espectros de absorbancia para los extractos de zooplancton se muestran en la Figura 16. El espectro de *D. menucoensis* muestra un máximo de absorbancia alrededor de 400 nm, que es probablemente el correspondiente al compuesto (no identificado) presente en el fitoplancton de la Laguna Cacique Chiquichano y que fuera ingresado por bioacumulación. Los individuos de *D. menucoensis* también presentaron otros dos máximos de absorción correspondientes a clor-a y carotenoides, reflejando la acumulación de estos compuestos por la dieta. En el caso de los *Metacyclops* sp., hay un leve aumento en la absorbancia a los 334 nm, aunque los valores son pequeños en comparación con los máximos correspondientes a clor-a y carotenoides. La Figura 16A no refleja la mayor pigmentación observada en *Metacyclops* sp., ya que el extracto de *D. menucoensis* presentó mayores absorbancias para todas las longitudes de onda, a pesar de tener claramente una menor pigmentación (observable a simple vista). Sin embargo, y dado que los tamaños relativos de los individuos de *D. menucoensis* y *Metacyclops* sp. varían sustancialmente, si se normalizan los valores de absorbancia por el volumen corporal, se obtiene el gráfico de la Figura 16B. Se observa que, de esta manera, la absorbancia por unidad de volumen para *Metacyclops* sp. es en todo caso superior, lo cual está en concordancia con el hecho de que los individuos de *D. menucoensis* eran traslúcidos, mientras que los de *Metacyclops* sp. eran, a simple vista, bien rojizos y opacos.

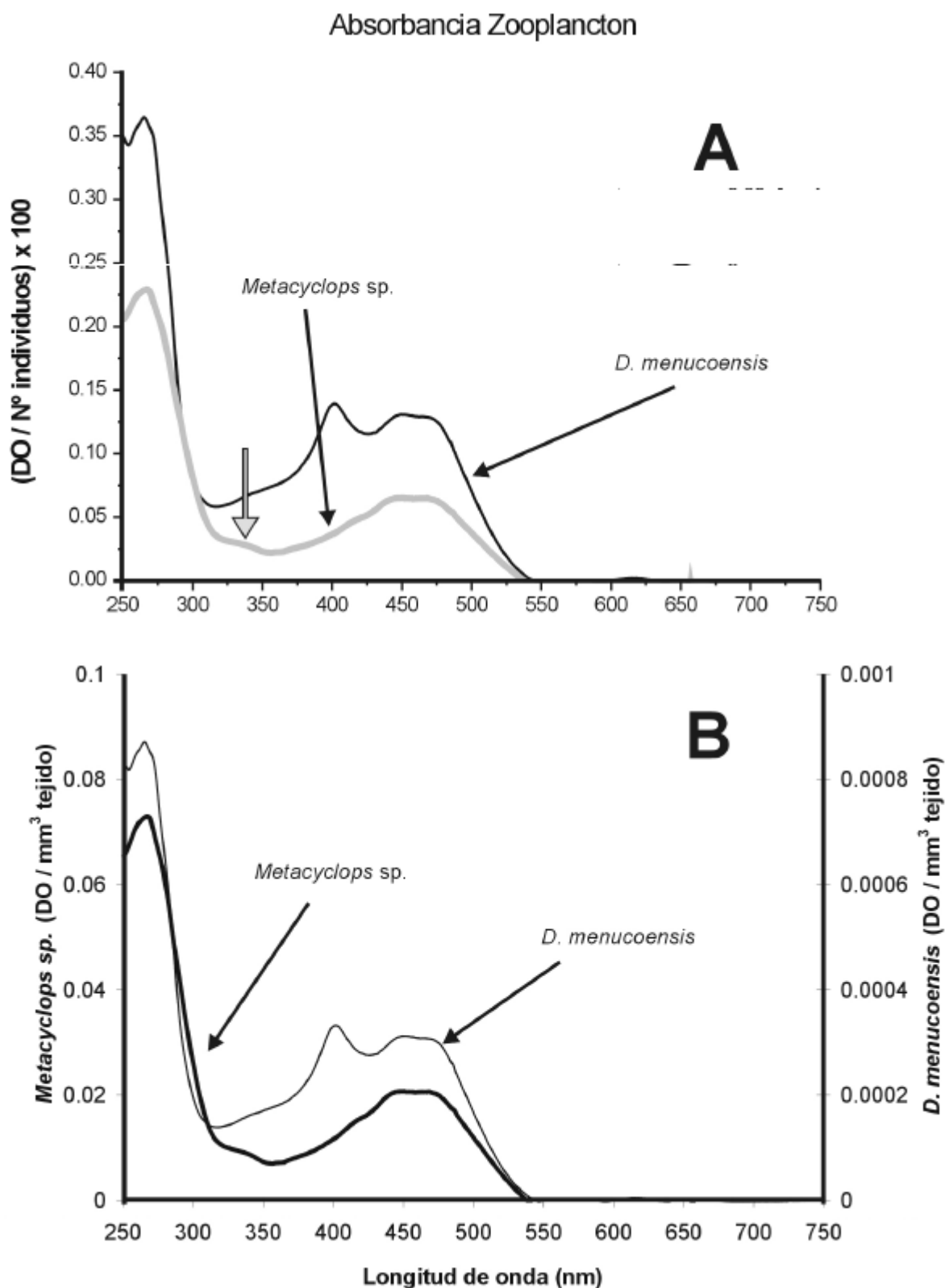


Figura 16 Espectro de absorbancia para *D. menucoensis* y *Metacyclops sp.* en función de (A) N° de individuos, y (B) volumen corporal estimado. Nótese en (B) un segundo eje de ordenadas para los valores de *D. menucoensis*. La flecha gruesa en (A) indica el pequeño pico de absorbancia en la región UV.

En la Figura 17 se muestran los resultados de los análisis de HPLC para identificar los compuestos que absorben RUV (i.e., MAAs) en *Metacyclops* sp. En *D. menucoensis* no se detectaron MAAs en ninguna de las muestras analizadas. Para *Metacyclops* sp., sin embargo, el pequeño aumento de absorbancia que se observó en los espectros de la Figura 16A (flecha gruesa), era debido a la presencia de MAAs. En la Figura 17A se muestra el cromatograma en el que se pueden evidenciar cuatro picos a distintos tiempos de retención (1,9; 2,4; 2,6 y 3,4 minutos). Para la identificación y poder determinar cuáles de estos picos correspondía a algún MAA conocido, se utilizó co-cromatografía, en la cual el extracto de *Metacyclops* sp. fue inyectado en el cromatógrafo conjuntamente con un estándar conocido (Figura 17B). El resultado de esta co-cromatografía se muestra en la Figura 17C, donde se identifican los picos de retención de los *Metacyclops* sp. y del estándar utilizado. Dos de estos picos (1 y 3) pertenecían a dos MAAs, Shinorine y Porphyrin-334 respectivamente, ambos con un máximo de absorción a 334 nm.

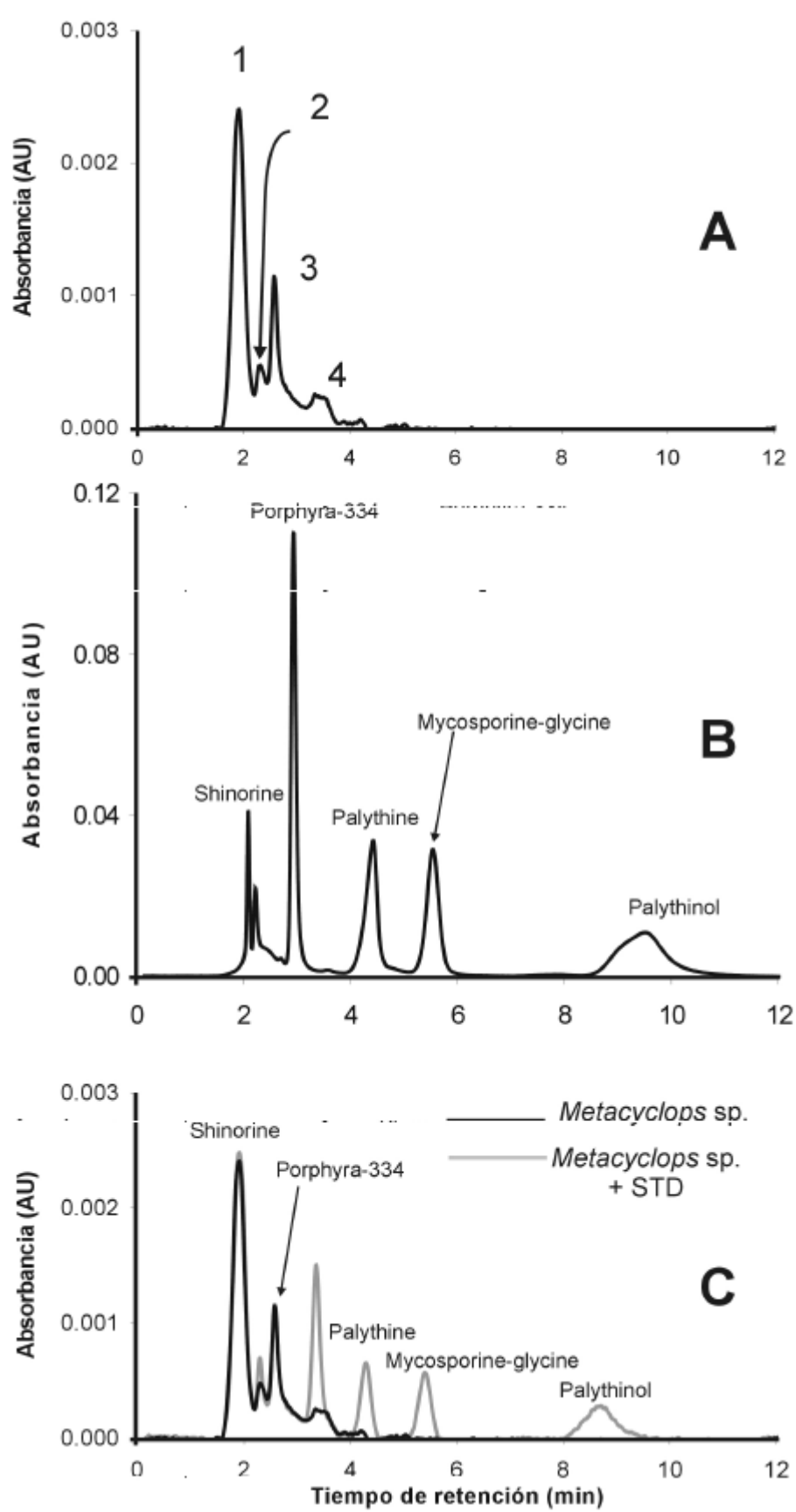


Figura 17 Cromatogramas (HPLC) para identificación de MAAs en *Metacyclops* sp. A) Cromatograma de extractos metanólicos en *Metacyclops* sp., B) cromatograma del estándar e identificación de los picos y C) co-cromatografía de *Metacyclops* sp. y estándar.

Discusión

Si bien la radiación solar es necesaria para el proceso de fotosíntesis y para poder mantener los diferentes niveles tróficos de la red alimentaria, parte de esta radiación puede ser perjudicial para los organismos. La actividad del hombre sobre la Tierra, ha producido cambios climáticos que han alterado parte del equilibrio sutil entre las especies y los diversos factores abióticos. Unos de estos cambios, la disminución de ozono estratosférico y el consecuente aumento de RUV-B (Madronich, 1993; Blumthaler & Webb, 2002), ha impulsado una gran cantidad de estudios para evaluar el impacto que este aumento de RUV-B podía tener sobre distintos ecosistemas. La mayoría de estas investigaciones se han centrado en organismos autótrofos (Helbling et al., 1992; Smith et al., 1992; Holm-Hansen et al., 1993; Neale et al., 1998a; revisión en Villafañe et al., 2002), debido a que son ellos quienes incorporan directamente la energía solar. En cambio, los estudios acerca del impacto de la RUV sobre heterótrofos – y particularmente organismos zooplanctónicos, son comparativamente escasos (Hessen, 1994; Zagarese et al., 1997a; b; 1998a; b, Helbling et al., 2002, revisión en Hessen 2002). Aunque existen muchos efectos negativos producidos por la RUV, los organismos han adquirido a través de su evolución distintas estrategias para minimizar o evitar el potencial daño así producido. Estas estrategias las podemos agrupar en dos tipos (Roy, 2000): a) Evitando la exposición a la RUV y, b) reparando el daño producido por la RUV. En los párrafos siguientes se discutirán estas estrategias en función de los datos obtenidos en esta tesis.

Los dos sistemas acuáticos utilizados reciben aproximadamente la misma cantidad de radiación solar (Figura 4), debido a su proximidad y similares condiciones meteorológicas. Por lo tanto, al momento de comparar la radiación que reciben los individuos en las dos lagunas – Cacique Chiquichano y Parque de la Ciudad - es de fundamental importancia no sólo conocer el comportamiento de los organismos considerados (i.e., migración vertical, protección en zonas sombreadas, etc.), sino también los factores que condicionan la atenuación de la radiación en los cuerpos de agua, tales como la cantidad de materia disuelta y particulada. Las dos especies consideradas en este estudio pueden, de hecho, realizar migraciones verticales, pero dado la baja profundidad en las lagunas (Tabla 1), esta migración es más bien limitada. En un primer análisis se podría pensar que debido a su menor profundidad, los organismos de la Laguna Parque de la Ciudad (e.g., *Metacyclops* sp.), estarían expuestos a una mayor radiación en la columna de agua que los organismos de la Laguna Cacique Chiquichano. Sin embargo, la gran concentración de fitoplancton en la Laguna Parque de la Ciudad (i.e., con valores tan altos como 425 µg clor-a/l durante el período de experimentación) provoca una fuerte atenuación de la radiación, reduciendo así la zona fotodinámica (Neale et al 2002). Por el contrario, la menor concentración de fitoplancton en la Laguna Cacique Chiquichano durante el período de experimentación (i.e., con valores

medios de $\sim 2 \mu\text{g}$ clor-*a*/l) hace que la radiación pueda penetrar a más profundidad y por lo tanto los organismos estar más expuestos. Esta diferencias en la penetración de la radiación en ambas lagunas es también evidente en la absorción específica del fitoplancton (Figura 15), ya que valores más altos de absorción específica (como la del fitoplancton de la Laguna Cacique Chiquichano) indicaría una mayor relación carbono / clorofila, y por ende una aclimatación a una radiación comparativamente mayor. La comparación entre los dos organismos, *Daphnia menucoensis* y *Metacyclops* sp., permite suponer que potencialmente podrían tener estrategias distintas para hacer frente a la RUV: *D. menucoensis* no podría evitar estar expuesta a niveles relativamente altos de radiación solar debido al ambiente donde se desarrolla (Laguna Cacique Chiquichano), mientras que *Metacyclops* sp. podría estar expuesta a niveles de RUV relativamente menores debido a la atenuación de la radiación en la laguna Parque de la Ciudad.

En este trabajo se hizo hincapié en un enfoque experimental para determinar la potencial fotorreparación del daño al ADN causado por la RUV y su impacto a dosis diferentes. *D. menucoensis* parece ser, en principio, mucho más sensible a la RUV-B que *Metacyclops* sp., al menos en lo que respecta a los datos de mortalidad obtenidos en la fase “oscura” (Figuras 9 y 10). Sin embargo, su estrategia para sobrevivir en condiciones normales de radiación se basaría en la fotorreparación del daño. Este mecanismo se activó con las mínimas dosis utilizadas en el presente trabajo, y fue capaz de disminuir la mortalidad significativamente aún con dosis de hasta 63 kJ/m^2 (Figura 9). Esta dosis de 63 kJ/m^2 corresponde aproximadamente a un día y medio de exposición continua a la radiación que se recibe en el verano (Figura 4). La fotorreparación ha sido demostrada en varios organismos zooplanctónicos (Zagarese et al., 1997a; Hessen 2002) como un modo muy efectivo de contrarrestar los efectos negativos de la RUV en el ADN. *Metacyclops* sp., por otra parte, si bien tuvo una mortalidad inferior en la fase “oscura”, también pudo fotorreparar el daño ocasionado al ADN (Figura 10). Un punto importante para destacar es que en ambas especies, independientemente de la dosis recibida, la efectividad de la fotorreparación fue la misma (Figura 12). Esto estaría sugiriendo un valor umbral de fotorreparación, a partir del cual el daño producido al ADN es mayor que la fotorreparación. Esto se puede deducir también del aumento en la mortalidad en la fase “clara” al aumentar la dosis a la que estaban expuestos los organismos (Figuras 9 y 10), aunque este aumento no fue significativo.

El balance fotorreparación / daño depende, entre otros parámetros, de la relación de energías que producen ese daño y que pueden fotoreactivar, como así también de otros factores tales como la temperatura, metabolismo (Sancar & Sancar, 1988). En los presentes experimentos, los organismos fueron expuestos a una relación de energías (i.e., $E_{\text{daño}} / E_{\text{fotorreparación}}$) mayores que las que reciben en su ambiente natural, tal como se observa en el espectro de la lámpara utilizada (Figura 8). Esta relación mayor de energías, de hecho simulan un aumento relativo de la RUV-B tal como aquel que ocurre durante eventos de disminución de ozono estratosférico (Madronich, 1993), exponiendo así a los

organismos a condiciones extremas de radiación. Bajo estas condiciones, las funciones de peso biológico (Figura 13) muestran que *D. menucoensis* es más sensible que *Metacyclops* sp. al ser expuesta a la RUV-B cuando no tiene posibilidad de fotorreparar, y que esta sensibilidad disminuye significativamente al activarse la fotorreparación del ADN.

Si bien todo lo presentado anteriormente demuestra que la fotorreparación es un mecanismo importante y eficiente en *D. menucoensis* para contrarrestar los efectos de la RUV-B, y que éste es también “potencialmente” efectivo en *Metacyclops* sp., surge la pregunta: ¿Cuál es el mecanismo de *Metacyclops* sp. para ser resistente a la RUV-B aún sin activar los mecanismos de fotorreparación? Esta resistencia es también evidente en la comparación de las LD₅₀: por ejemplo, *Metacyclops* sp. no tuvo nunca mortalidades mayores al 30% aún con dosis de RUV-B relativamente altas (Figura 14); sin embargo, algunos estudios realizados en lagos cordilleranos (Zagarese et al 1997a) muestran una mayor sensibilidad de otras especies de copépodos, de tal forma que las LD₅₀ de *Boeckella brevicaudata*, *B. gibbosa* y *B. gracilipes* eran de 32 KJ m⁻², 8.4 KJ m⁻² y 1.1 KJ m⁻², respectivamente). La estrategia de *Metacyclops* sp. parece más bien estar asociada a la presencia de compuestos potencialmente protectores que absorben la RUV, tales como los MAAs. Esto explicaría el mayor umbral de dosis que son capaces de recibir antes de mostrar una mortalidad significativa, lo cual se evidencia tanto en los experimentos de fotorreparación (Figura 10), como en los de mortalidad en función de la dosis de RUV-B (Figura 14), y en la comparación de las FPB (Figura 13). Aunque en los espectros de absorbancia de *Metacyclops* sp. se detectó una absorción baja en el rango del UV, los datos de HPLC evidencian la presencia de compuestos tales como Shinorine y Porphyrin-334 (Figura 17). Estos compuestos han sido encontrados en varios niveles tróficos de las redes alimentarias (Banaszak, 2002), pero solo pueden ser sintetizados por organismos que dispongan de la ruta metabólica Shikimate (Favre-Bonvin 1987) tales como el fitoplancton. Por lo tanto, estos compuestos llegan a los consumidores sólo a través de su dieta debido a procesos de bioacumulación (Carroll & Shick, 1996; Menchi 2001; Helbling et al., 2002). La presencia de estos compuestos y su rol de protección ha sido demostrada en muchos organismos (Adams & Shick, 1996; Neale et al., 1998b) incluso zooplanctónicos (Helbling et al., 2002). Además de los MAAs, varios estudios han demostrado el rol protector de los carotenoides. Esta protección, sin embargo, no se debe a una absorción directa en el UV, ya que los carotenoides absorben en el visible, entre 470 y 480 nm (Figura 16), sino que proveen una protección indirecta debido a su combinación con radicales libres (Banaszak 2002). La formación de radicales libres dentro de los organismos, está mediada por RUV y principalmente por la RUV-A (Vincent & Neale, 2000; Kieber et al., 2002) dada la mayor cantidad de energía a estas longitudes de onda. En los experimentos acá realizados, la dosis de RUV-A ha sido muy baja (Figura 8), hecho que, conjuntamente con la determinación de que no hubo mortalidad significativa por la RUV-A (control de Mylar-D), hace suponer que la formación de radicales libres ha sido

despreciable y por ende el rol de los carotenoides. Sin embargo, lo que no es despreciable es el cambio de absorbancia entre las dos especies debido a estos compuestos (Figura 16). Esto está de acuerdo con otras investigaciones (Hessen, 1994; 2002), que citan niveles de carotenoides en copépodos diez veces mayores que en cladóceros. Es posible argumentar que pueden existir variaciones en cada especie, pero en particular las especies aquí utilizadas de hecho tenían una coloración que indica una diferencia en la pigmentación. Hessen (2002) hace también hincapié en diferencias de color en *Daphnia* debido a la presencia de melanina. Así, las *Daphnia* que contenían melanina eran oscuras y mucho más resistentes a la RUV que las que no tenían (i.e., transparentes).

La estrategia de *D. menucoensis* para hacer frente a la RUV-B esta claramente orientada a reparar el daño que ésta provoque en el ADN (i.e., fotorreparación efectiva). *Metacyclops* sp., por su lado, si bien dispone de mecanismos de fotorreparación efectiva, es utilizada al recibir altas dosis de RUV-B, siendo entonces su estrategia primaria tener coloración y compuestos protectores. Por lo tanto, un continuo aumento de la RUV-B, debido a la disminución de ozono estratosférico, podría tener un impacto mayor en *D. menucoensis*, que en *Metacyclops* sp., ya que al cambiar las proporciones de energía (RUV-B/RUV-A) se afectaría directamente el balance daño / reparación del ADN.

Conclusiones y líneas futuras de investigación

Este tipo de estudios ha provisto nueva información acerca de los efectos de la RUV en organismos zooplanctónicos de cuerpos de agua dulce de la región Patagónica, los que eventualmente pueden estar expuestos a niveles incrementados de radiación debido a una disminución de ozono estratosférico. Si bien la RUV, especialmente la RUV-B, produce una mortalidad significativa en las dos especies estudiadas, puede considerarse que estos organismos se encuentran bien adaptados a los niveles de radiación normales que reciben. Esto es posible a través de (al menos) dos estrategias diferentes: fotorreparación efectiva del ADN (*D. menucoensis*) y presencia de compuestos protectores (*Metacyclops* sp.).

Si bien en este trabajo se ha podido dar respuestas acerca de estas dos estrategias adaptativas a la RUV, los resultados no son exhaustivos. De hecho, a partir de estos resultados, se abren nuevas líneas de investigación en relación al impacto de la RUV en organismos zooplanctónicos, los cuales incluyen la evaluación conjunta de diversas variables (tales como materia orgánica, relaciones tróficas, etc) que interactúan con la RUV.

Referencias

- Adams, N. L. & J. M. Shick. 1996. Mycosporine-like amino acids provide protection against ultraviolet radiation in eggs of the green sea urchin, *Strongylocentrotus droebachiensis*. *Photochemistry and Photobiology*, 64: 149-158.
- Banaszak, A. T. 2002. Photoprotective physiological and biochemical responses by marine and freshwater organisms to 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. En Prensa.
- Björn, L. O. & T. M. Murphy. 1985. Computer calculation of solar ultraviolet radiation at ground level. *Physiol. Veg.*, 23: 555-561.
- Blumthaler, M. & A. R. Webb. 2002. UVR climatology. 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. En Prensa.
- Carroll, A. K. & J. M. Shick. 1996. Dietary accumulation of UV-absorbing mycosporine-like aminoacids (MAAs) by the green sea urchin (*Strongylocentrotus droebachiensis*). *Marine Biology*, 124: 561-569.
- Cockell, C. S. 2001. A photobiological history of Earth. En: Cokell, C. S., A. R. Blaustein (eds.). *Ecosystems, evolution, and ultraviolet radiation*. Springer-Verlag, New York, pp. 1-35.
- Dunlap, W. C., B. E. Chalker & J. K. Olivier. 1986. Bathymetric adaptations of reef-building corals at Davies Reef, Great Barrier Reef, Australia. III. UV-B absorbing compounds. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 104: 1-10.
- Dunlap, W. C. & J. M. Shick. 1998. Ultraviolet radiation-absorbing mycosporine-like amino acids in coral reef organisms: A biochemical and environmental perspective. *Journal of Phycology*, 34: 418-430.
- Farman, J. C., B. G. Gardiner & J. D. Shanklin. 1985. Large losses of total ozone in Antarctica reveal seasonal ClO_x/NO_x interaction. *Nature*, 315: 207-210.
- Favre-Bonvin, J., N. Arpin & C. Brevard. 1987. Biosynthesis of mycosporines: mycosporine glutaminol in *Trichthecium roseum*. *Phytochemistry*, 26: 2509-2514.
- Friedberg, E. C., G. C. Walker & W. Siede. 1995. *DNA repair and mutagenesis*. American Society of Microbiology Press, Washington, D.C., p. 698.
- Gonzalez, C. & F. Tappari. 1995. Características geológicas, biológicas y ambientales de la zona de la laguna Cacique Chiquichano de Trelew. Informe de trabajo práctico de integración, Universidad Nacional de la Patagonia, p. 95.
- Grassé, P. P., R. A. Poisson & O. Tuzet. 1976. *Zoología, Tomo 1, Invertebrados*. Editorial Masson, S.A. París, p. 938.
- Hargreaves, B. 2002. 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. En Prensa.
- Helbling, E. W. V. E. Villafañe, M. E. Ferrario & O. Holm-Hansen. 1992. Impact of natural ultraviolet radiation on rates of photosynthesis and on specific marine phytoplankton species. *Marine Ecology Progress Series*, 80: 89-100.

- 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: 85-101.
- Helbling, E. W., F. Zaratti, L. O. Sala, E. R. Palenque, C. F. Menchi & V. E. Villafañe. 2002. Mycosporine like aminoacids protect the copepod *Boeckella titicacae* against high levels of solar UVR. *Journal of Plankton Research*, 24: 225-234.
- Hessen, D. 1994. *Daphnia* responses to UV-light. *Archiv für Hydrobiologie, Ergebnisse der Limnologie*, 43: 185-195.
- Hessen, D. 2002. UVR and pelagic metazoans. 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. En Prensa.
- 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: 3-15.
- Holm-Hansen, O. & B. Riemann. 1978. Chlorophyll a determination: Improvements in methodology. *Oikos*, 30: 438-447.
- Holm-Hansen, O., E. W. Helbling & D. Lubin. 1993. Ultraviolet radiation in Antarctica: inhibition of primary production. *Photochemistry and Photobiology* 58: 567-570.
- Hrbáček, J. 1987. Systematics and biogeography of *Daphnia* species in the northern temperate regions. En: Peters, R. H. & R. De Bernardi (eds.). *Daphnia*. Memorie dell'Istituto Italiano di Idrobiologia Dott. Marco de Marchi. Verbania, Pallanza. Vol. 45. pp. 37-76.
- Karu, T. 1993. Can cellular responses to continuous-wave and pulsed UV radiation differ? En: Young, A. R, L. O. Björn, J. Moan & N. Wilhelm (eds.). *Environmental UV photobiology*. Plenum Press, New York, pp. 203-232.
- Kieber, D. J., B. M. Peake & N. M. Scully. 2002. Reactive oxygen species in aquatic ecosystems. 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. En Prensa.
- Kirk, J. T. O. 1994. *Light and photosynthesis in aquatic ecosystems*, Cambridge University Press, United Kingdom, p. 504.
- Kjørboe, T. 1998. Population regulation and role of mesozooplankton in shaping marine pelagic food webs. *Hydrobiologia*, 363: 13-27.
- Lampert, W. 1987. Feeding and nutrition in *Daphnia*. En: Peters, R. H. & R. De Bernardi (eds.). *Daphnia*. Memorie dell'Istituto Italiano di Idrobiologia Dott. Marco de Marchi. Verbania, Pallanza. Vol. 45. pp. 143-192.
- Lubin, D. & O. Holm-Hansen. 1995. Atmospheric ozone and the biological impact of solar ultraviolet radiation. En: *Encyclopedia of environmental biology*, Vol. I. Academic Press, Inc., pp. 147-168.
- Lubin, D. & E. H. Jensen. 1995. Effects of clouds and stratospheric ozone depletion on ultraviolet radiation trends. *Nature*, 377: 710-713.
- Madronich, S. 1993. The atmosphere and UV-B radiation at ground level. En: Young, A. R, L. O. Björn, J. Moan & N. Wilhelm (eds.). *Environmental UV photobiology*. Plenum Press, New York, pp. 1-39.
- Maldonado A., M. Vallés, P. Cochia & M. Vallejo. 1994. Laguna Cacique Chiquichano. Informe de Cátedra, Universidad Nacional de la Patagonia. p. 41.

- Menchi, C. F. 2001. Bioacumulación de compuestos potencialmente protectores de radiación ultravioleta (RUV) en crustáceos herbívoros del mesolitoral. Tesis de Licenciatura, Universidad Nacional de la Patagonia, p. 41.
- Mitchell, D. L. & D. Karentz. 1993. The induction and repair of DNA photodamage in the environment. En: Young, A. R, L. O. Björn, J. Moan & N. Wilhelm (eds.). *Environmental UV photobiology*. Plenum Press, New York, pp. 345-377.
- Neale, P. J., R. F. Davis & J. J. Cullen. 1998a. Interactive effects of ozone depletion and vertical mixing on photosynthesis of Antarctic phytoplankton. *Nature*, 392: 585-589.
- Neale, P. J., A. T. Banaszak & C. R. Jarriel. 1998b. Ultraviolet sunscreens in *Gymnodinium sanguineum* (Dinophyceae): Mycosporine-like amino acids protect against inhibition of photosynthesis. *Journal of Phycology*, 34: 928-938.
- Neale, P. J., E. W. Helbling & H. E. Zagarese. 2002. Modulation of UVR exposure and effects by vertical mixing and advection. 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. En Prensa.
- Orce, V. L. & E. W. Helbling. 1997. Latitudinal UVR-PAR Measurements in Argentina: Extent of the "Ozone Hole". *Global and Planetary Change*, 15: 113-121.
- Paggi, J. C. 1996. *Daphnia* (*Ctenodaphnia*) *menucoensis* (Anomopoda; Daphniidae) a new species from athalassic saline waters in Argentina. *Hydrobiologia*, 319: 137-147.
- Paggi, J. C. 1999. Status and phylogenetic relationship of *Daphnia sarsi* Daday, 1902 (Crustacea: Anomopoda). *Hydrobiologia*, 403: 27-37.
- Rivera, S. G. 1993. Variación espacio – temporal en la estructura comunitaria del fitoplancton de la laguna Cacique Chiquichano Trelew – Chubut – Patagonia Argentina. Tesis de Licenciatura, Universidad Nacional de la Patagonia, p. 37.
- Rothschild, L. J. 1999. The influence of UV radiation on protistan evolution.. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 46:548-555.
- Roy, S. 2000. Strategies for the minimization of UV-induced damage. En: De Mora, S., S. Demers & M. Vernet (eds.). *The effects of UV radiation in the marine environment*, Cambridge Environmental Chemistry Series 10, Cambridge University Press, United Kingdom, pp. 177-205.
- Rundel, R. D. 1983. Action spectra and estimation of biologically effective UV radiation. *Physiologia Plantarum*, 58: 360-366.
- Sancar, A. & G. B. Sancar. 1988. DNA repair enzymes. *Annual Review of Biochemistry*, 57: 29-67.
- Smith, R. C. B. B. Prézelin, K. S. Baker, R. R. Bidigare, N. P. Boucher, T. L. Coley, D. Karentz, S. MacIntyre, H. A. Matlick, D. Menzies, M. Ondrusek, Z. Man & K. J. Waters. 1992. Ozone depletion: Ultraviolet radiation and phytoplankton biology in Antarctic waters. *Science*, 255: 952-959.
- Tartarotti, B., W. Cravero & H. E. Zagarese. 2000. Biological weighting function for the mortality of *Boeckella gracilipes* (Copepoda, Crustacea) derived from experiments with natural solar radiation. *Photochemistry and Photobiology*, 72: 314-319.
- Villafañe, V. E., E. W. Helbling & H. E. Zagarese. 2001. Solar ultraviolet radiation and its impact on aquatic ecosystems of Patagonia, South America. *Ambio*, 30: 112-117.
- Villafañe, V. E., K. Sundbäck, F. L. Figueroa & E. W. Helbling. 2002. 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. En Prensa.

- Vincent, W. F. & P. J. Neale. 2000. Mechanisms of UV damage to aquatic organisms. En: De Mora, S., S. Demers & M. Vernet (eds.). *The effects of UV radiation in the marine environment*, Cambridge Environmental Chemistry Series 10, Cambridge University Press, United Kingdom, pp. 149-176.
- Zagarese, H. E., M. Feldman & C. E. Williamson. 1997a. UV-B induced damage and photoreactivation in three species of *Boeckella* (Copepoda, Calanoida). *Journal of Plankton Research*, 19: 357-367.
- Zagarese, H. E., C. E. Williamson, T. L. Vail, O. Olsen & C. Queimaliños. 1997b. Long-term exposure of *Boeckella gibbosa* (Copepoda, Calanoida) to *in situ* levels of solar UVB radiation. *Freshwater Biology*, 37: 99-106.
- Zagarese, H. E., W. R. Cravero, P. González & F. Pedrozo. 1998a. Copepod mortality induced by fluctuating levels of natural ultraviolet radiation simulating vertical water mixing. *Limnology and Oceanography*, 43: 169-174.
- Zagarese, H. E., B. Tartarotti, W. R. Cravero & P. González. 1998b. UV damage in shallow lakes: The implications of water mixing. *Journal of Plankton Research*, 20: 1423-1433.