



**Universidad Nacional del Comahue  
Centro Regional Universitario Bariloche**

**Efectos de la radiación ultravioleta y de  
nutrientes sobre la comunidad planctónica de  
ambientes marinos patagónicos**

**Trabajo de Tesis**

**María Alejandra Marcoval de Pan**

**para optar al grado de  
Doctor en Biología**

**Director: Dr. E. Walter Helbling  
Co-director: Dr. Fernando Pedrozo**



**2008**

## Contenidos

<b>Resumen.</b>	iv
<b>Abstract.....</b>	vi
<b>Capítulo 1- Introducción</b>	
Conceptos generales	
<b>Ozono. Radiación solar. Radiación ultravioleta.....</b>	1
<b>Importancia de los ecosistemas acuáticos y aporte de nutrientes.....</b>	2
Productores primarios- Fitoplancton.....	3
<i>Estrategias para evitar daños.....</i>	4
<i>Descubrimiento de los Mycosporine-like Amino Acids (MAAs).....</i>	5
Consumidores primarios-y efectos de la RUV.....	8
Área de estudio	
<b>Antecedentes de la zona en relación al aporte de nutrientes y radiación recibida.</b>	10
<b>Poblaciones fitoplanctónicas y zooplanctónicas de la zona.....</b>	13
Objetivo general	
<b>Hipótesis.....</b>	16
<b>Capítulo 2- Materiales y Métodos</b>	
<b>Fitoplancton</b>	
Elección del área de muestreo y metodología.....	17
Lugar y tipos de experimentación.....	17
Diseño experimental.....	18
Muestras, análisis y mediciones.....	19
<b>Zooplancton</b>	
Lugar y tipos de experimentación.....	23
Colecta de organismos.....	23
Diseño experimental.....	24
Muestras, análisis y mediciones.....	24
<b>Tratamiento estadístico de los datos.....</b>	26
<b>Capítulo 3- Respuesta de la comunidad fitoplanctónica marina a la combinación de RUV y agregado de nutrientes</b>	
<b>Resumen.....</b>	27
<b>Introducción.....</b>	28
<b>Materiales y métodos particulares</b>	
Período de estudio.....	29
Diseño experimental.....	29
Muestras, análisis y mediciones.....	30
<b>Resultados.....</b>	30

Diatomeas céntricas y pennadas.....	36
□ <b>Discusión</b> .....	42

**Capítulo 4- Efecto combinado de la RUV y nutrientes sobre el crecimiento y síntesis de compuestos que absorben RUV en cuatro especies fitoplanctónicas marinas**

<b>Resumen</b> .....	47
<b>Introducción</b> .....	48

Experimentos bajo radiación artificial

**Materiales y métodos particulares**

Organismos y condiciones de cultivo.....	50
Experimentación con Radiación UV/muestras.....	50

<b>Resultados</b> .....	51
-------------------------	----

Experimentos bajo radiación solar: Water phyto-PAM

**Materiales y métodos particulares**

Organismos y condiciones de cultivo.....	62
Experimentación /muestras.....	62

<b>Resultados</b> .....	63
-------------------------	----

<b>Discusión</b> .....	78
------------------------	----

**Capítulo 5- Efecto de la RUV y bioacumulación de compuestos que absorben RUV en tres especies de zooplancton**

<b>Resumen</b> .....	83
<b>Introducción</b> .....	84

**Materiales y métodos particulares**

Especies bajo estudio, descripciones generales.....	86
Procedimiento con el fitoplancton	
<i>Alimento</i> .....	88
<i>Conteo de microalgas</i> .....	89
<i>Colecta de organismos</i> .....	89
<i>Siembra</i> .....	90
Tratamientos y alimentación.....	90
Análisis estadístico.....	91

**Resultados**

Especies fitoplanctónicas utilizadas como alimento	
<i>Thalassiosira fluviatilis</i> .....	92
<i>Nannochloropsis</i> sp.....	93
<i>Heterocapsa triquetra</i> .....	94

<i>Chaetoceros gracilis</i> .....	96
Procedimiento con las diferentes especies de zooplancton	
<i>Paracalanus parvus</i> (Copepoda: Calanoidea).....	97
<i>Artemia persimilis</i> (Crustacea: Branchiopoda).....	100
<i>Cyrtograpsus angulatus</i> (Crustacea: Decapoda).....	103
<b>Discusión</b> .....	107
<b>Conclusiones generales</b> .....	112
<b>Lista de tablas y figuras</b> .....	116
<b>Bibliografía</b> .....	121
<b>Agradecimientos</b> .....	141

## Resumen

La disminución en el espesor de la capa de ozono es uno de los cambios climáticos de origen antropogénico más importantes de las últimas décadas. Por su situación geográfica, la región patagónica recibe niveles relativamente mayores de radiación ultravioleta (RUV, 280-400 nm) durante la primavera austral. Estudios recientes indican la considerable sensibilidad del fitoplancton marino a la RUV solar, causando efectos adversos como inhibición de la tasa fotosintética, disminución de la motilidad, daño en el material genético e incluso elevada mortalidad. A nivel de comunidades, la RUV influye sobre la composición específica, la biomasa fitoplanctónica y la productividad primaria, presentando efectos aditivos y/o sinérgicos, al interactuar con otras variables. En tal sentido, la disponibilidad de nutrientes inorgánicos puede reducir los efectos negativos de la RUV (**Capítulo 1**).

Los objetivos principales de este trabajo de tesis fueron el determinar los efectos combinados de la RUV y de los nutrientes, sobre comunidades fitoplanctónicas de ambientes costeros patagónicos, y evaluar su potencial impacto sobre las interacciones fito-zooplanctónicas.

Se consideraron comunidades naturales del Golfo Nuevo en estaciones correspondientes a las épocas de pre-bloom, bloom y post-bloom, estableciéndose diferentes tratamientos de radiación y concentración de nutrientes. Altos niveles de RUV pueden afectar a las comunidades naturales fitoplanctónicas seleccionando las especies más resistentes y consecuentemente alterando la representación de los distintos grupos. En todos los experimentos, las diatomeas predominaron en las comunidades y dentro de ellas las céntricas (*i.e. Thalassiosira sp., Chaetoceros sp.*) resultaron más resistentes a la RUV. Se observó una clara limitación de nutrientes, con mayores tasas de crecimiento y significativo aumento de compuestos que absorben RUV (*i.e. mycosporine-like aminoacids, MAAs*) en los tratamientos que recibieron nutrientes (**Capítulo 3**).

En base a estos resultados, los siguientes experimentos (**Capítulo 4**) se basaron en cultivos mono-específicos de microalgas, evaluando el efecto conjunto de la radiación y

los nutrientes en el rendimiento fotoquímico, por fluorescencia de amplitud de pulso. El objetivo de estos experimentos fue evidenciar específicamente la respuesta fotosintética en relación con la síntesis de MAAs, al agregárseles nutrientes nitrogenados. Las especies estudiadas fueron las diatomeas *Chaetoceros gracilis* y *Thalassiosira fluviatilis* y los dinoflagelados *Heterocapsa triquetra* y *Prorocentrum micans*. Los experimentos se realizaron con radiación solar natural y en condiciones de laboratorio. Los resultados obtenidos para ambos taxones mostraron que existe una respuesta diferencial entre grupos, siendo las diatomeas las que presentan mayores tasas de respuesta al cambio de radiación, (aunque presentaron mayor inhibición en el rendimiento fotoquímico, en comparación con los dinoflagelados).

Los cambios en la composición de especies fitoplanctónicas hallados en estas investigaciones, podrían tener un efecto adverso sobre la calidad del alimento disponible para el zooplancton. En consecuencia se trabajó con los crustáceos *Paracalanus parvus* (Copepoda), *Artemia persimilis* (Branchiopoda) y *Cyrtograpsus angulatus* (Decapoda); con el objetivo de determinar cómo el zooplancton es afectado al ser alimentado con fitoplancton previamente irradiado con RUV. También se estudió la bioacumulación de MAAs por parte de consumidores primarios (**Capítulo 5**). Copepoditos de *P. parvus* fueron alimentados con *T. fluviatilis* y *Nannochloropsis* sp.; nauplios de *A. persimilis* con *H. triquetra*, y zoeas de *C. angulatus* con *C. gracilis*. Las especies algales fueron sometidas a dos tratamientos lumínicos: radiación fotosintéticamente activa (PAR 400-700nm) y PAR+RUV. Ninguna de las tres especies zooplanctónicas discriminó entre tratamientos de radiación. Se observó un pico de absorción en el rango del RUV sólo por parte de los individuos alimentados con microalgas irradiadas con RUV. Tras un período de inanición, se expuso a los zoopláncteres a estrés por RUV, y aquellos individuos que recibieron alimento sólo irradiado con PAR presentaron movimientos lentos en sus apéndices locomotores y tasas de mortalidad ~70 %, mientras que aquellos alimentados con microalgas irradiadas con RUV, no presentaron anomalías en su fisiología, y una mayor proporción de supervivencia (>90%). Se concluye que los estadios larvales de estas tres especies pueden bioacumular compuestos que absorben RUV a través de la dieta y que estos les proporcionan alguna protección ante el estrés por RUV.

## **Abstract**

*Effects of ultraviolet radiation and nutrients on the planktonic community of Patagonian marine environments*, a Doctoral Thesis presented by María Alejandra Marcoval to Universidad Nacional del Comahue (Argentina).

The depletion of the ozone layer represents one of the most important anthropogenic climatic changes of the past decades. Due to its location, the Patagonian region gets relatively higher levels of ultraviolet radiation (UVR, 280-400 nm) during the austral spring. Recent studies point to the considerable sensitivity of marine phytoplankton to solar UVR, which causes adverse effects like inhibition of the photosynthetic rate, motility impairment, damage in the genetic material and even elevated mortality. At the community level, UVR influences the species composition, phytoplankton biomass and primary productivity, showing additive and/or synergistic effects when combined with other variables. In that sense, the availability of inorganic nutrients can reduce the negative effects associated with UVR (**Chapter 1**).

The main objectives of this thesis were to determine the combined effects of UVR and nutrients on the phytoplanktonic assemblages in coastal Patagonian environments, and to evaluate its potential impact on phyto-zooplankton interactions.

A first set of experiments was based on natural communities from Nuevo Gulf (Argentina), in seasons corresponding to the times of pre-bloom, bloom and post-bloom, considering different radiation and nutrient treatments. High levels of UVR affected natural phytoplankton communities, selecting for the most resistant species and consequently altering the representation of the different groups. For all experiments, diatoms predominated in natural communities and in particular centric diatoms (*i.e.* *Thalassiosira* sp., *Chaetoceros* sp.) were most resistant to UVR. A marked nutrient limitation was observed, with higher growth rates and a significant increase in UV-absorbing compounds (*i.e.* mycosporine-like amino acids, MAAs) for those treatments enriched with nutrients (**Chapter 3**).

Based on these results, the experiments presented in **Chapter 4** used monospecific microalgae cultures to study the joint effects of radiation and nutrients on the photochemical yield of individual species by pulse-amplitude-modulated fluorescence. The objective of these experiments was to relate the photosynthetic response to the synthesis of MAAs, as nitrogenous nutrients were added. The species at issue were the diatoms *Chaetoceros gracilis* and *Thalassiosira fluviatilis*, and the dinoflagellates *Heterocapsa triquetra* and *Prorocentrum micans*. The experiments were performed both under natural solar radiation and laboratory conditions. Results showed a differential response between taxonomic groups, with diatoms displaying greater rates of response to the change of radiation (although they presented greater inhibition in photochemical yield, when compared to dinoflagellates).

The changes in the composition of phytoplankton found in these investigations could have an adverse effect on the quality of food available to the zooplankton. Therefore, I worked with the crustaceans *Paracalanus parvus* (Copepoda), *Artemia persimilis* (Branchiopoda) and *Cyrtograpsus angulatus* (Decapoda), to determine how zooplankters are affected when fed phytoplankton previously irradiated with UVR, and to look into bioaccumulation of MAAs by primary consumers (**Chapter 5**). Copepodites of *P. parvus* were fed *T. fluviatilis* and *Nannochloropsis* sp.; nauplii of *A. persimilis* were fed *H. triquetra*, and zoeae of *C. angulatus* were fed *C. gracilis*. Microalgae were grown under two radiation treatments: photosynthetically active radiation (PAR 400-700nm) and PAR+UVR. None of the three zooplankters discriminated between radiation treatments. A peak in absorption in the UVR range was observed only for those specimens fed UV-irradiated algae. Moreover, after a starvation period, zooplankters were exposed to UVR stress, and those individuals fed PAR-treated algae showed impairment in appendices function and mortality rates ~70 %; whereas those fed UVR-irradiated algae did not present any anomalies in their physiology, with survival rates >90%. In conclusion, larval stages of crustaceans can bioaccumulate UV-absorbing compounds through their diets, which give them some protection against UVR stress.

# Capítulo 1: Introducción

## Conceptos generales

### Ozono-Radiación solar-radiación ultravioleta

El sol provee, en forma de radiación electromagnética, la fuente de energía para el funcionamiento de los ecosistemas terrestres y acuáticos basados en la producción de materia orgánica a través del proceso de fotosíntesis. La radiación solar, por lo tanto, es determinante para regular los ciclos naturales (*e.g.* estaciones, día-noche) así como otros factores (*e.g.* estratificación de los árboles, distribución vertical en la columna de agua, etc.). Dentro del espectro de radiación electromagnética la luz visible, fotosintéticamente activa (PAR) se extiende entre los 400 y 700 nm de longitud de onda mientras que la porción que se extiende entre los 280 y 400 nm es la llamada radiación ultravioleta (RUV A-B), a la cual me evocaré con más detalle durante este trabajo de tesis doctoral.

El flujo de la RUV a través de la atmósfera depende tanto de factores atmosféricos como geofísicos. La transmisión atmosférica y la intensidad de radiación dependen de la absorción por parte de los diferentes gases, y entre ellos el ozono estratosférico es por lejos el más importante. Constituye una capa que rodea a la Tierra como un manto protector localizada entre los 15 y 35 kilómetros sobre la superficie de la misma. Su propiedad principal es la de filtrar entre el 95% y 99% de la RUV que se extiende entre los 150 y 300 nm (RUV C-B) procedente del sol (Xenopoulos & Schindler, 2001).

En los últimos años se ha detectado un aumento significativo de la radiación ultravioleta B (RUV-B, 280-315 nm) que llega a la superficie de la Tierra debido a esta disminución del ozono estratosférico (Rozema, 2002). Este es uno de los cambios climáticos más importantes de origen antrópico, provocado por el incremento en las concentraciones de metales traza como los clorofluorcarbonados (CFCs), halógenos y NO<sub>x</sub>, emitidos por la actividad humana (Xenopoulos & Schindler, 2001)

Esta disminución de ozono estratosférico afecta principalmente las zonas polares, en particular sobre Antártida, donde el llamado “agujero de ozono” fue descubierto en 1985 por científicos británicos (Farman, *et al.*, 1985), aunque este fenómeno puede afectar también a latitudes más bajas (Atkinson, 1989). El progresivo deterioro de la capa de ozono es uno de los problemas ambientales más graves con que se enfrenta el planeta con datos estimados para latitudes templadas de una disminución de ozono en un 7% por década (Madronich *et al.*, 1993) y uno de los principales focos de atención de la comunidad científica (Varotsos, 2004). La zona patagónica no está exenta a este cambio y durante la primavera austral recibe niveles relativamente mayores de RUV (Orce & Helbling, 1997), lo que ha motivado gran cantidad de estudios para determinar los posibles efectos sobre los ecosistemas. Ballaré *et al.*, (2001) demostraron que a reducidas dosis, esta radiación es beneficiosa, pero recibida con intensidad puede ser peligrosa para los diferentes ecosistemas. Muchos estudios se han abocado a ecosistemas acuáticos (Weiler & Penhale, 1994). Por ejemplo, los efectos deletéreos que se observan son una significativa reducción en la producción primaria, tasas de crecimiento y daño en el ADN (Buma *et al.*, 2003). Incluso se ha observado que, aún bajo una columna de ozono “normal” (350 a 400 Unidades Dobson), la RUV puede tener efectos perjudiciales sobre los organismos acuáticos (Villafañe *et al.*, 2001, 2003) provocando efectos tanto sobre organismos fotosintéticos como fitoplancton y macroalgas (Häder *et al.*, 2003), como sobre consumidores primarios (Newman, 2000; Hovel & Morgan, 1998). En ecosistemas terrestres, sobre plantas vasculares y musgos (Searles *et al.*, 1999) e incluso la RUV puede inducir daños en el hombre, provocando importantes enfermedades de la piel (Reportes de UNEP 1998 y 2003).

## **Importancia de los ecosistemas acuáticos y aporte de nutrientes**

La producción de biomasa de los ecosistemas acuáticos iguala a la de los ecosistemas terrestres, incorporando entre 90 y 100  $10^9$  ton.. de carbono atmosférico al año como material orgánico (Houghton *et al.*, 1989; Sieghenthal *et al.*, 1993). Por este motivo, es de gran importancia saber cuáles son los efectos que ocasiona un incremento de la

radiación UV-B sobre la productividad marina (Smith *et al.*, 1989; Prézelin *et al.*, 1993) así como el aporte de nutrientes y los procesos relacionados con ello.

En zonas costeras, la adición de nutrientes de origen antropogénicos puede estimular la producción primaria, desencadenando el llamado proceso de eutrofización, con degradación de la calidad del agua y de los sedimentos y pérdida de hábitas para las especies nativas. Por sedimentación, el exceso de biomasa algal generada en la columna de agua es removido y se traduce en un ingreso de materia y energía al bentos. De esta manera se genera un incremento de acople entre la producción de la columna de agua y aquella del sedimento, pudiéndose registrar un aumento de las velocidades de intercambio en su interfase, acompañado de eventos de hipoxia o anoxia y, a largo plazo, mortalidad de macrofauna en sus distintos estados de desarrollo (huevos, larvas, adultos) (Schlesinger, 2000).

Cuando la disponibilidad de nutrientes es excesiva, existe una compleja serie de respuestas (directas e indirectas) que el ecosistema puede presentar. Estas se asocian fundamentalmente a cambios en: la transparencia del agua, la biomasa y diversidad de micro y macroalgas, la biogeoquímica del sedimento y el ciclo de nutrientes, la frecuencia de floraciones de fitoplancton tóxico, la calidad del hábitat para organismos del bentos y del plancton-necton, la diversidad y biomasa de poblaciones de invertebrados pelágicos y bentónicos hasta llegar a cambios en la dinámica y estructura de las comunidades, y la estacionalidad de los procesos funcionales del ecosistema.

La carga de nutrientes que el sistema puede manejar antes que se produzcan dichas consecuencias indeseables es limitada y propia del mismo, ya que no todos los sistemas costeros responden de la misma forma frente al mismo estímulo. Las diferentes respuestas se asocian al grado de sensibilidad y a la presencia de otros factores de estrés que pueden interactuar con el enriquecimiento de nutrientes. La sensibilidad es determinada por atributos físicos y biológicos inherentes al sistema (Cloern, 2001), que de alguna manera actúan filtrando los efectos del enriquecimiento con nutrientes.

### **Productores primarios: Fitoplancton**

Comparable a la descomposición de la materia orgánica, la producción primaria es un proceso clave en el funcionamiento de todos los ecosistemas (Moorhead *et al.*, 1996) y dado que la mayoría de las macroalgas están restringidas a las áreas costeras, los componentes del fitoplancton son por lejos los principales productores de biomasa de los océanos sustentando, junto con los organismos descomponedores, los niveles superiores dentro de los ecosistemas acuáticos.

Un gran número de estudios recientes indican la considerable sensibilidad del fitoplancton a la RUV solar desde los polos hasta los ambientes tropicales (Wängber *et al.*, 1998; Estévez *et al.*, 2001) y en las últimas décadas, estudios por satélite indican una disminución global significativa de la biomasa fitoplanctónica (Gregg & Cokwright, 2002). La razón de este fenómeno, no es muy clara, pero los autores sugieren una marcada estratificación por el hecho ya conocido de que la RUV puede causar efectos adversos variados, que en los organismos autótrofos incluyen, entre otros, inhibición de la tasa fotosintética, disminución de la movilidad, daño en el material genético, como la formación de dímeros de timina (Klisch *et al.*, 2005) y mortalidad en organismos especialmente sensibles (Helbling *et al.*, 1992a; Vincent & Roy, 1993; Häder *et al.*, 1995). Sin embargo, la RUV también tiene aspectos positivos y es utilizada para fotoreparar daño en el ADN, como energía adicional para la fotosíntesis, o degradando la materia orgánica y aumentando la concentración de nutrientes en un medio acuático (Buma *et al.*, 2003, Osburn, 2003).

### ***Estrategias para evitar daños***

A pesar de estos cambios climáticos, la vida sobre la tierra se ha desarrollado en ausencia de ozono estratosférico, y con niveles de RUV mucho más altos que los actuales (Rothchild, 1999; Cockell, 2001). Las poblaciones sobrevivientes de organismos, seguramente poseían estrategias eficientes y mecanismos fisiológicos para prevenir y reparar el daño inducido por la RUV (Rothchild *et al.*, 2001; Nisbet *et al.*, 2001), incluyendo biosíntesis de sustancias que absorben en la longitud de onda de la RUV.

Los organismos acuáticos han desarrollado estrategias básicas para minimizar los efectos de la RUV tales como la migración vertical (Hessen, 1994; Hernando & Ferreira,

2005), la reparación del daño producido en el ADN (Banaszak, 2003) y la síntesis y /o bioacumulación de compuestos que absorben RUV (*e.g.*, carotenoides y mycosporine-like amino acids, MAAs). En cuanto a esta última estrategia, se ha visto que los MAAs son únicamente sintetizados por el fitoplancton y algunas macroalgas (Karentz *et al.*, 1991; Helbling *et al.*, 1996). Sin embargo, pueden adquirirse por simbiosis, como por ejemplo dinoflagelados simbiotes de cnidarios (Banaszak, 2006) o transferirse y bioacumularse a través de la dieta a niveles superiores de la red trófica (Shick *et al.*, 1996, Newman *et al.*, 2000). Asimismo, se sabe que la síntesis de MAAs está condicionada por factores tales como el tamaño celular, la composición taxonómica de la población y la historia lumínica, como así también la disponibilidad de nutrientes nitrogenados. Por estos motivos, no es posible generalizar a la zona patagónica los resultados obtenidos en otras regiones del mundo. Hasta el momento existen muy pocos trabajos tendientes a evaluar el impacto biológico de los niveles normales y aumentados de la RUV-B (esto último por una disminución de ozono) en comunidades acuáticas de la zona patagónica (ver revisión de Villafañe *et al.*, 2001). Al respecto, se han realizado algunos estudios referidos a los efectos de la RUV sobre la fotosíntesis del fitoplancton, dada la importancia ecológica de los productores primarios para los ecosistemas acuáticos (Buma *et al.*, 2001; Helbling *et al.*, 2001; Barbieri *et al.*, 2002; Villafañe *et al.*, 2003b).

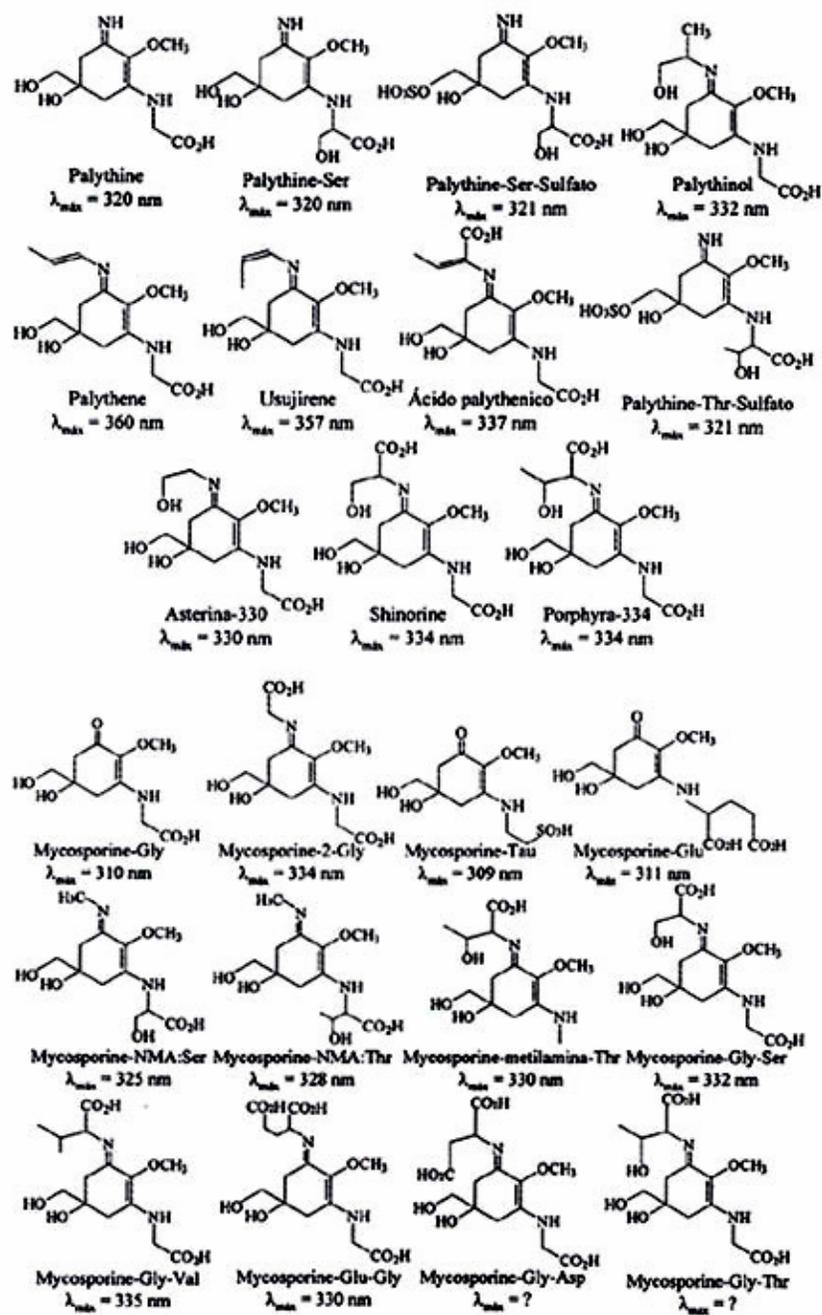
### ***Descubrimiento de los mycosporine-like amino acids (MAAs)***

Tsujino & Saito (1961) descubrieron sustancias que absorbían la radiación UV en algas rojas: se las denominó "sustancia 334". Sin embargo, las micosporinas fueron caracterizadas por primera vez en el hongo *Ascochyta pisi*, de ahí su nombre, y se las relacionó con la inducción lumínica de la esporulación (Leach, 1965). Favre-Bonvin *et al.* (1976), fueron los primeros en describir la estructura química de una micosporina en el hongo *Stereum hirsutum* y fue denominada micosporina-310.

En los últimos años, se han aislado de cianobacterias, algas eucariontes y otros organismos una serie de derivados de la micosporina-310. Se trata de derivados imino-carbonil del cromóforo de ciclohexenona de las micosporinas, y se denominan

aminoácidos tipo micosporina (MAAs). Estos MAAs, son producidos a partir de una rama de la trayectoria hacia el ácido shiquimico, (Favre-Bonvin *et al.*, 1987; Shick *et al.*, 1999), ruta bioquímica que no es factible en animales. Tanto las micosporinas como los MAAs tienen conjugado en el anillo sustituyentes nitrogenados (amino), aminoácidos o sus amino-alcoholes correspondientes: la glicina es el aminoácido más común presente en los MAAs. En cuanto a su localización, los MAAs se pueden acumular dentro de la célula (García-Pichel & Castenholz, 1993), o extracelularmente, como ha sido descrito en cianobacterias (Böhm *et al.*, 1995). Estos autores describieron en *Nostoc commune*, MAAs unidos a oligosacáridos (se denominaron OMAAs) de la cubierta extracelular donde formaban complejos de alto peso molecular unidos a dicha cubierta mediante interacciones no covalentes (Hill *et al.* 1994).

En organismos marinos hay descritos 23 MAAs (Fig. 1.1) con su máxima absorción en un rango entre 309 y 360 nm: micosporina-glicina y asterina-330 (Gleason, 1993), shinorina (Tsuchino *et al.*, 1980), porfira-334 y palitina (Takano *et al.*, 1978a), palitinol (Dunlap *et al.*, 1986), palitene (Takano *et al.*, 1978b), micosporina-aurina y micosporina-2-glicina (Stochaj *et al.*, 1994), ácido palitenico, micosporina-glicina-valina (Karentz *et al.*, 1991b), micosporina-glicina-treonina, micosporina-glicina-serina, y micosporina-glicina-aspartato (Grant *et al.*, 1985), micosporina-metilamina-treonina (Wu Won *et al.*, 1995), palythine-serina, palythine-treonina-sulfato y palythine-serina-sulfato (Wu Won *et al.*, 1997), micosporina-NMA:serina, micosporina-NMA:treonina; micosporina-Glu-glicina, micosporina-Glu y usujirene (Bandaranayake *et al.*, 1996). Existen además otros MAAs desconocidos y parcialmente caracterizados, detectados recientemente como consecuencia de un incremento en el número de organismos estudiados y el desarrollo de nuevas técnicas de separación por cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC). El interés que presentan estos MAAs está dado por su importante rol como UV-fotoprotector y ha sido inferido a partir de su eficiente absorción en el rango de la RUV (Takano *et al.*, 1978a) y la inducción de síntesis dependiente de la luz (Carreto *et al.*, 2005), lo cual ha sido recientemente verificado experimentalmente (Adam & Shick 1996, Neale *et al.*, 1998; Karsten *et al.*, 1999). Es sabido también que algunos MAAs pueden actuar como antioxidantes para prevenir el daño celular provocado por inducción de oxígeno tóxico, en algunas especies (Dunlap, 2002).



**Figura 1.1:** Estructuras químicas y máximos de absorción de los 23 MAAs identificados en organismos marinos

## Consumidores primarios y efectos de la RUV

Los productores primarios como fitoplancton y macroalgas constituyen la base de las intrincadas redes de alimentación en los ambientes marinos y una pérdida en la producción de su biomasa puede afectar de cierta forma los próximos escalones en las cadenas tróficas, incluso el enlace vital hacia las poblaciones, incluyendo las humanas, en especial aquellas que dependen de los ecosistemas acuáticos para proveer su alimento, causando, por ejemplo, pérdidas en el campo de las pesquerías (Nixon, 1988; Gucinski, 1990). Los estadíos tempranos de desarrollo son especialmente sensibles a los efectos de la RUV-B, de los cuales, la disminución en la capacidad reproductiva y el deterioro en el desarrollo larval son los más perjudicados (USEPA, 1987). De esta manera se encontró a la RUV-B como causa directa de daños en peces, cangrejos, y otros animales. Crustáceos de agua dulce son también afectados por la RUV. Sin embargo es interesante ver que especies de *Daphnia* de lagos alpinos son intensamente coloreados y más tolerantes a altas dosis de la RUV-B que aquellas especies de lagos de baja altura donde las dosis de la RUV-B son considerablemente más bajas (Siebeck & Böhm, 1987).

La interacción entre fitoplancton y zooplancton ha sido sugerida como uno de los factores más importantes para conducir la evolución de los océanos (Verity & Smetacek, 1996). El zooplancton es clave como intermediario en la transferencia de energía y regeneración de nutrientes en las cadenas tróficas marinas (Banse, 1995) y dada esa importancia es que comenzaron a estudiarse los efectos de la RUV desde mediados de la década del 80 con los primeros conocimientos sobre la depleción de ozono. (Damkaer *et al.*, 1980; Karanas *et al.*, 1981; Hunter *et al.*, 1982; Ringelberg *et al.*, 1984). Como se menciono anteriormente, hay importante información de cómo las algas responden a la RUV, pero muy poco es lo que se sabe sobre los efectos de la RUV en el zooplancton. Algunas investigaciones se realizaron en agua dulce (Williamson y Zagarese, 1994; Zagarese *et al.*, 1998, Gonçalves *et al.*, 2002), ambientes marinos tropicales (Saito y Taguchi, 1995), latitudes medias (Chalker-Scott, 1995; Naganuma *et al.*, 1997; Kouwenberg *et al.*, 1999) y ecosistemas antárticos (Malloy *et al.*, 1997; Newman *et al.*, 1999, 2000). Existen evidencias que los MAAs en vertebrados e invertebrados marinos

son acumulados a partir de la dieta (Carroll y Shick, 1996; Carefoot *et al.*, 1998), o vía tras-locación a partir de un alga simbiote (Shick *et al.*, 1999), para proveer protección. En un estudio llevado a cabo por Karents *et al.*, 1991 sobre 48 especies de invertebrados marinos antárticos, se encontró en el krill antártico presenta en el cuerpo la tercera mas alta concentración del total de los MAAs.

Varios organismos marinos difieren enormemente en su sensibilidad a la radiación UV-B (Hunter *et al.*, 1982). En un crustáceo se encontró un 50% de mortalidad a irradiancias de RUV-B actuales en la superficie del mar, mientras que larvas de otro crustáceo toleraban posibles irradiancias predichas por una disminución de la capa de ozono en 16%. El umbral de sensibilidad del crustáceo *Thysanoessa raschii* claramente excede los niveles de radiación encontrados en primavera, mientras que en verano 50% de mortalidad ocurriría dentro de los primeros 5 días asumiendo una disminución de la capa de ozono en 16%. Similares inhibiciones han sido encontradas en cultivos del copépodo *Acartia clausi* y en larvas de cangrejos en el Pacifico noroeste.

Estos resultados nos indican que a latitudes de 40° los incrementos de RUV-B medido a fines de la primavera pueden afectar en forma crítica el desarrollo de los diferentes estadios de algunas especies. Aunque sea en incrementos muy pequeños o fluctuaciones temporarias, la RUV-B puede afectar a especies especialmente sensibles.

Actualmente, son muy pocos los estudios dirigidos a evaluar el impacto de la RUV en consumidores primarios, y es evidente, que existe una gran necesidad de continuar estos estudios.

Basándose en estos conocimientos previos se planteó particularmente en este trabajo de tesis realizar experimentos destinados a evaluar los efectos conjuntos de la RUV y de la concentración de nutrientes sobre aspectos de la comunidad fitoplanctónica y sus consecuencias en las interacciones entre las comunidades de fitoplancton y zooplancton.

## Área de estudio

El área de estudio para las experiencias con comunidades naturales se centró en la zona costera Patagónica, particularmente en Bahía Nueva, provincia de Chubut (42° S, 65° W). El lugar de muestreo está localizado en el Golfo Nuevo (Fig.1.2) el cual es un sistema semi-cerrado con poco recambio desde las aguas abiertas del Océano Atlántico (Rivas & Beier, 1990) constituye un ecosistema profundo (184 m, Mouzo *et al.*, 1978) y recibe agua dulce por precipitación (200-300 mm anuales). Las mareas presentan una amplitud promedio de 3.9 m y máximos de 5.76. La transparencia del agua es alta con una profundidad del disco de Secchi entre 5 y 15 m (Gayoso & Fulco, 2006) y un promedio del coeficiente de extensión (K) de 0,15 m<sup>-1</sup>(Solís, 1998).

De acuerdo a datos obtenidos por Gayoso & Fulco, 2006 la temperatura en la superficie del agua oscila entre 7.7 y 18.8 °C con mínimos entre junio y agosto y máximos entre los meses de enero y abril. La salinidad es bastante estable con promedios de 33.9 psu.

## **Antecedentes de la zona en relación al aporte de nutrientes y radiación recibida**

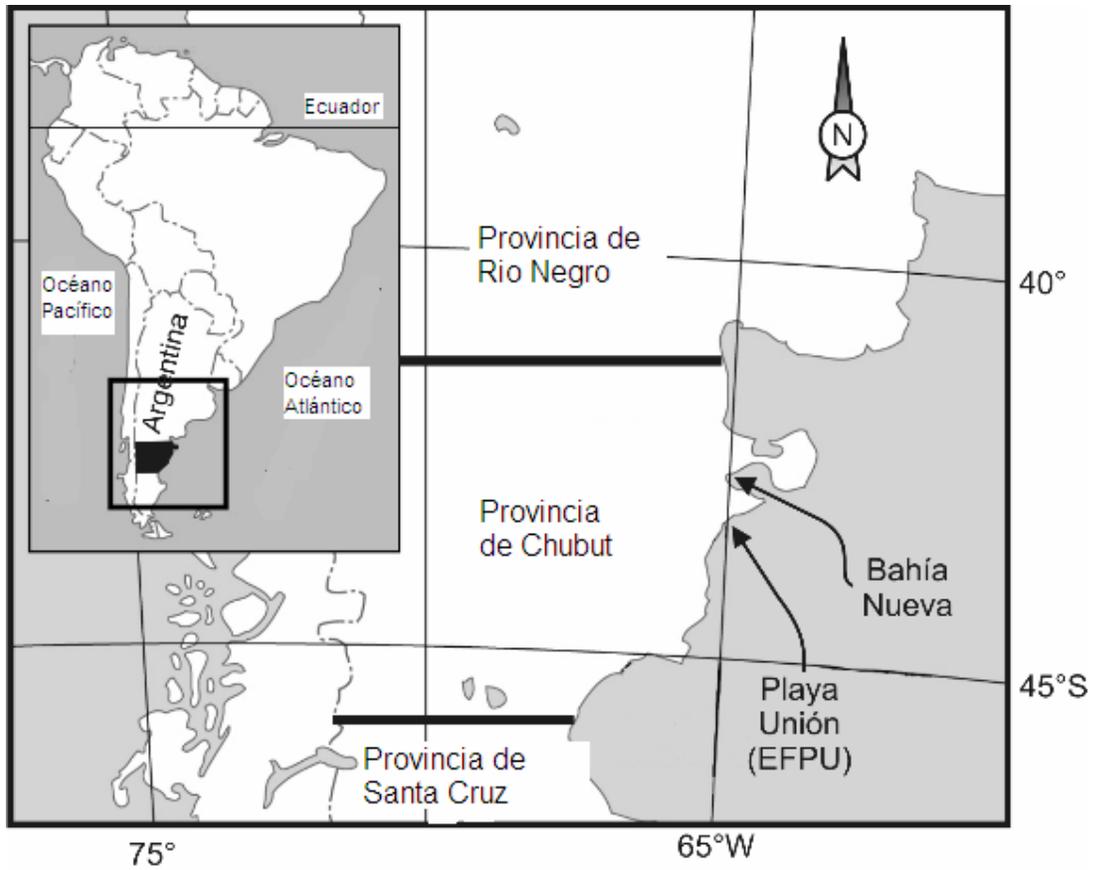
Los procesos de contaminación costera fueron aumentando sensiblemente de magnitud y cambiando su grado de significación en las últimas décadas, constituyendo actualmente un problema ambiental global que afecta a un buen número de regiones del planeta. La Patagonia no está exenta a este problema y se han llevado a cabo varios estudios en relación al área en particular (Gil, 1999)

Hay dos grupos de sustancias que pueden tener incidencia sobre el balance y el equilibrio de los sistemas acuáticos naturales: los nutrientes - al producir un crecimiento biológico irrestricto cuando se hallan en exceso (eutrofización)- y los productos químicos escasamente degradables. Estos compuestos son incorporados al ambiente costero por diversas fuentes, tales como entradas directas de efluentes industriales y domésticos;

volcado de desechos desde las embarcaciones; transporte atmosférico; desechos derivados de la extracción de materiales desde el mar; contaminación producida por industrias de navegación, operaciones portuarias. Asociados a estos compuestos tóxicos están los nutrientes, los cuales son aportados exógenamente por desechos de actividades urbanas hacia los cuerpos de agua principalmente a través de los sistemas cloacales y regulan en gran medida la dinámica de la materia orgánica en los mismos.

La literatura reciente para el área en cuestión (Gayoso & Fulco, 2006) cita una variación anual en la concentración de 0.52 a 3.9  $\mu\text{M}$  para amonio, de 0,01 a 2,97  $\mu\text{M}$  para nitratos, de 0.01 a 0.33  $\mu\text{M}$  para fosfatos y de 0.89 a 7.1  $\mu\text{M}$  para silicatos. Se observa una gran variación estacional con altos valores durante el invierno, declinando hacia fines de primavera y fines de otoño coincidiendo con el bloom de diatomeas.

En relación a la cantidad de radiación recibida en la zona, se observa una marcada variabilidad estacional, debido a las diferencias en el ángulo cenital y la concentración de ozono (Orce & Helbling, 1997; Villafañe *et al.*, 2001). Las dosis diarias calculadas para los períodos de verano e invierno, respectivamente, son cerca de 14 y 1  $\text{MJ m}^{-2}$  para PAR, 2000 y 150  $\text{KJ m}^{-2}$  para RUV-A (radiación ultravioleta A – 400-315 nm.) y 45 a 5  $\text{KJ m}^{-2}$  para RUV-B (radiación ultravioleta B – 315-280 nm.). Investigaciones en fotobiología fueron orientadas a determinar las relaciones entre fotosíntesis *versus* irradiancia (P vs. E; Villafañe *et al.*, 2004)



**Figura 1.2:** Mapa del área de estudio- Bahía Nueva, en la provincia de Chubut-. El cuadro muestra la posición relativa de Chubut en América del Sur.

## Comunidades fito- y zooplanctónicas de la zona

Los estudios fitoplanctónicos en este área han sido enfocados al monitoreo de especies tóxicas tales como *Alexandrium tamarense* y *Prorocentrum lima* (Esteves *et al.*, 1992; Gayoso *et al.*, 2002; Gayoso & Fulco, 2006). Los patrones de distribución estacional están basados en dos blooms: uno de otoño entre los meses de marzo y mayo y el bloom de primavera que se extiende de fines de agosto a principios de octubre. El predominio de las diatomeas es evidente. *Chaetoceros* parece ser el género dominante en cuanto a densidad y número de especies, este se encuentra tanto en el bloom de otoño como de primavera, donde los valores de concentración de clorofila *a* (Chl *a*) aumentan aproximadamente un orden de magnitud (de 0.2 a 2  $\mu\text{g L}^{-1}$ ). La especie *Chaetoceros socialis* es dominante en el bloom de otoño. Otras especies importantes de este género son *C. didymus*, *C. lorenzians*, *C. compressus* presentes en bajas densidades. *Skeletonema costatum* estuvo presente en algunos años durante el bloom de primavera, pero es más abundante durante el bloom de otoño. Entre otros componentes importantes del bloom se encuentra a la especie *Guinardia delicatula*, y a las diatomeas pennadas *Pseudonitzschia pungens* y *Asteriolenopsis glacialis*.

El dinoflagelado *Scrippsiella trochoidea* aparece en concentraciones moderadas entre los meses de octubre y diciembre (densidad de  $4,5 \cdot 10^3 \text{ cel. L}^{-1}$ ), *Prorocentrum micans* es abundante particularmente en verano (densidad de  $30 \cdot 10^3 \text{ cel. L}^{-1}$ ) *Phyrophacus horologicum* y *Dinophysis acuminata* también aparecen durante primavera y verano y a *Alexandrium tamarense* es común observarlo en julio cuando desaparece el bloom de diatomeas.

Hay cierta información que brindan algunos trabajos realizados en la zona cercana (Bahía Engaño), al área de estudio tendiente a determinar la variación en las poblaciones fitoplanctónicas y su sensibilidad a la radiación ultravioleta (Barbieri, *et al.*, 2002; Villafañe, *et al.*, 2003). Durante el año 1999 se han registrado altos valores de Chl *a* durante los meses de Agosto-Octubre, con valores de hasta  $98 \mu\text{g Chl } a \text{ l}^{-1}$ . En Junio de 2000 se registró un máximo de  $124 \mu\text{g Chl } a \text{ l}^{-1}$ , y luego la concentración se mantuvo relativamente alta (más de  $20 \mu\text{g Chl } a \text{ l}^{-1}$ ) hasta el mes de Octubre. Cada vez que se registraron altas concentraciones de Chl *a*, la población estuvo dominada por células

microplanctónicas ( $> 20 \mu\text{m}$ ), y principalmente por la especie *Odontella aurita*, una diatomea característica de la zona. Las floraciones de invierno fueron precedidas por períodos de pre-floraciones donde el grupo dominante fueron los dinoflagelados, con representantes tales como las especies *Prorocentrum micans*, *Alexandrium tamarense* y *Protoperidinium* sp. Luego de la floración de invierno (post-bloom), las poblaciones estuvieron dominadas por monadas, flagelados y pequeñas diatomeas del género *Thalassiosira*.

Otros trabajos realizados en la zona (Villafañe, *et al.*, 1991, Santinelli & Esteves, 1993) han encontrado como especies dominantes las diatomeas *Odontella aurita* (Lyngbye) Agardh y *Aulacosira granulata* (Ehr.) Simonsen. Se ha determinado que la presencia y densidad de ambas especies estaba relacionado con las condiciones y estabilidad de la columna de agua. Para los años de estudio (1986 / 87) Villafañe y colaboradores determinaron que las floraciones de estas dos especies estaban asociados a las condiciones de estratificación de la columna de agua y la variación en la concentración de nutrientes (*i.e.* nitrógeno inorgánico disuelto, principalmente nitrato) (Villafañe, *et al.*, 1991). El régimen interno del estuario estuvo dominado por *Aulacoseira granulata* en períodos de baja descarga, donde la columna de agua estaba poco estratificada y la concentración de nutrientes era alta. Por otro lado, un incremento de la descarga del río (Julio de 1987) favoreció la floración de *Odontella aurita* en el régimen externo, con una alta estratificación y concentración de nutrientes aportados por el río hacia la desembocadura.

En relación a los estudios de zooplancton, los mismos han tratado el área en forma específica y han comprendido el análisis de distribución abundancia y/o variación estacional de diversos grupos faunísticos. Estudios realizados por Akselman (1996), han señalado que existe una clara tendencia al incremento de la abundancia y de la biomasa a partir de los meses invernales hasta el verano en el marco de un ciclo típico de aguas templado-frías. Los copépodos como componente importante de la comunidad zooplanctónica exhiben una estructura de tamaño poblacional dominada por pequeñas especies del sub-orden Calanoidea (Fernández Aráoz, 1994).

Existen varios estudios sobre la distribución y abundancia de diferentes grupos zooplanctónicos de la costa patagónica (Alheit *et al.*, 1991; Viñas *et al.*, 1992; Santos,

1993; Mianzán & Guerrero, 2000); como el ejemplo de blooms tóxicos y no tóxicos (Santos & Ramírez, 1995) o por competencia, como la exclusión de un copépodo reemplazado por un dinoflagelado heterotrófico *Polykrikos schwartzii* como mejor predador al menos durante los blooms tóxicos (Carreto *et al.*, 1985, 1986; Viñas & Santos, 1995). Mientras que otros autores abarcan estudios de la distribución del zooplankton en relación a eslabones superiores de la cadena trófica por ser el alimento disponible para los primeros estadios larvales de anchoita y merluza (Viñas & Santos, 2000)

Las diferencias en la intensidad relativa de las variables viento y marea (con un patrón de variación latitudinal) llevan a patrones de distribución y composición de plancton diferenciales (Sabatini & Martos, 2002). Así, la comunidad mesozooplancónica hacia el norte de un área frontal de la plataforma norpatagónica se caracteriza por la presencia del copépodo *Oithona helgolandica*, cladóceros y apendicularias, presentando una baja fecundidad de copépodos calanoideos la que sugiere que la producción primaria podría estar siendo canalizada a través de procesos microheterotróficos. Hacia el extremo sur en cambio los copépodos calanoideos dominan sobre los ciclopoideos. Asimismo, la abundancia de especies relativamente grandes (*Drepanopus forcipatus*, *Calanoides* cf. *carinatus*) con alta fecundidad sugieren la existencia de una trama trófica clásica, básicamente herbívora. Es de importancia mencionar que *Paracalanus parvus* (especie utilizada en el diseño experimental), está presente en toda el área de influencia del sistema, pero parece ser una especie clave en aguas mezcladas y débilmente estratificadas.

## Objetivos generales:

Los objetivos generales de esta tesis son determinar los efectos combinados de la RUV y de los nutrientes sobre comunidades fitoplanctónicas de ambientes marinos patagónicos y evaluar su potencial impacto sobre las interacciones fito-zooplanctónicas.

## Hipótesis

- 1) Los niveles elevados de RUV afectan las comunidades naturales fitoplanctónicas seleccionando las especies más resistentes y consecuentemente afectando la composición.
  
- 2) Un incremento de nutrientes nitrogenados permite y/o favorece la síntesis de MAAs por parte de algunas especies fitoplanctónicas, brindándoles mayor resistencia a la RUV.
  
- 3) Cambios en la composición fitoplanctónica, debidos al impacto de la RUV, afectan consecuentemente al zooplancton.

## Capítulo 2: Materiales y Métodos

### Fitoplancton

#### Elección del área de muestreo y metodología

La elección del sitio de muestreo para los experimentos con comunidades naturales de fitoplancton se realizó de acuerdo al objetivo de trabajo planteado. Se eligió un lugar de fácil acceso para la toma de muestras y cercano al lugar donde se llevaron a cabo los experimentos. El cronograma de muestreo se determinó en base a los eventos de floración (blooms) del fitoplancton, por lo que se realizaron muestreos y experimentación durante las épocas de pre -bloom, bloom y post-bloom. Durante los meses de primavera / verano (épocas de disminución de ozono estratosférico y de máxima radiación, respectivamente) se intensificaron el muestreo y la experimentación. Cabe aclarar que durante épocas de post-bloom (primavera-verano) los nutrientes limitan el crecimiento del fitoplancton (Villafañe *et al.*, 2003c). Es importante destacar, asimismo, que en nuestra zona de trabajo los blooms de fitoplancton ocurren durante el invierno, tal como fuera documentado anteriormente (Barbieri *et al.*, 2002; Villafañe *et al.*, 2003b).

Las muestras se colectaron en Bahía Nueva, provincia de Chubut (42° S, 65° W). El lugar de muestreo está localizado en el Golfo Nuevo (ver Capítulo 1, Fig. 1.2), cercano a la Estación de Fotobiología Playa Unión (EFPU, 43° S, 65° W), donde se realizaron los experimentos con comunidades naturales. Dada la duración de los mismos (*i.e.* 6 a 12 días) junto a los rápidos cambios de condiciones de radiación que normalmente ocurren en el área, no fue posible repetirlos bajo similares condiciones de radiación.

#### Lugar y tipos de experimentación:

**Experimentos simulados *in situ*:** Se trabajó tanto con comunidades naturales fitoplanctónicas, así como con cultivos fitoplanctónicos mono-específicos expuestos a la radiación solar en la Estación de Fotobiología Playa Unión (EFPU).

**Experimentos en el laboratorio:** Se trabajó en los laboratorios de la EFPU y en el centro de cultivo de la Estación costera J. J. Nágera, dependencia de la Universidad Nacional Mar del Plata, con cultivos mono-específicos (uni-algales) expuestos a la radiación de lámparas artificiales (Q-Pannel UVA-340 para RUV y Philips luz día para PAR). El fotoperíodo fue de 12:12 ciclo luz: oscuridad, y bajo una irradiancia de 300  $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  para PAR, 15  $\text{W m}^{-2}$  para UV-A, y 0.7  $\text{W m}^{-2}$  para UV-B) simulando la radiación externa.

Una comparación entre los dos lugares de experimentación, detallando las características de ambos, se presenta en la siguiente tabla:

<b>Experimentos bajo Radiación solar</b>	<b>Experimentos bajo Radiación artificial</b>
Radiación variable	Radiación constante, aportada por lámparas
Difícil control de variables (Temperatura, Humedad)	Control de variables
Factores externos( lluvia, nubes)	Ausencia factores externos
Baño de agua para mantener temperatura	Sin baño de agua

### **Diseño Experimental**

En el diseño experimental general, las muestras se colocaron en recipientes de policarbonato transparentes al UV (Plexiglas UVT, GS 2458, Röhm and Haas, Darmstadt, Germany) de uno a cuatro litros dependiendo si se trataba de cultivos mono específicos o comunidades naturales, respectivamente y se expusieron por triplicado a diferentes tratamientos de radiación y de nutrientes:

#### **Tres tratamientos de radiación:**

- **Tratamiento PAB:** donde las muestras reciben el total de la radiación (RUV, 280-400 nm., y PAR 400-700 nm.)- recipientes descubiertos.
- **Tratamiento PA:** donde las muestras reciben solo una porción de la RUV (RUV-A, 320-400 nm.) y PAR 400-700 nm., recipientes cubiertos con un filtro **cut-off** (Montagefolie, N°10155099, Folex) (50% transmisión a 320 nm.).
- **Tratamiento P:** donde las muestras reciben solamente PAR, recipientes cubiertos con film Ultraphan (opaco al UV, Digefra, 50% transmisión a 395 nm.).

El espectro de transmisión de los materiales está publicado en Figueroa *et al.* (1997).

### ***Dos tratamientos de nutrientes:***

- **Tratamiento N:** Al comienzo del experimento se le adicionaron los nutrientes ( $\text{NaPO}_4\text{H}_2$  y  $\text{NaNO}_3$ ) a recipientes de cada tratamiento de radiación (por triplicado) llegando hasta concentraciones finales de **0.06 y 0.7 mM**, respectivamente (Marcoval *et al.*, en prensa)
- **Tratamiento N<sub>0</sub>:** *Para comunidades naturales:* los nutrientes se mantuvieron en su concentración original (agua de mar natural). *Para cultivos monoespecíficos:* se mantuvieron los nutrientes del medio original en el cual venían creciendo los cultivos, medio f/2 modificado (silicatos, vitaminas y metales traza f/2 (Guillard & Ryther, 1962), y concentraciones finales de  $\text{NaPO}_4\text{H}_2$  y  $\text{NaNO}_3$  **0.02 y 0.3 mM**, respectivamente)

### **Muestras, análisis y mediciones**

#### **a) Crecimiento de fitoplancton**

El crecimiento de fitoplancton fue calculado en base a las siguientes variables:

- **Determinado por la concentración de clorofila a**

Para determinar la concentración total de clorofila-a (Chl-*a*), se concentra una cantidad de muestra (10-50 ml) a través de un filtro de fibra de vidrio GF/F (25mm) y se extraen los pigmentos en metanol absoluto de acuerdo a la metodología de Holm-Hansen & Riemann (1978). La fluorescencia del extracto de metanol fue medida usando un fluorómetro Turner Designs (modelo TD 700) antes y después de la acidificación, y la Cl-*a* se calculó a partir de esta lectura (Holm-Hansen *et al.*, 1965). La Chl *a* presente en la fracción pico-nanoplanctónica se determinó de manera similar a la descrita anteriormente, pero sobre una muestra prefiltrada a través de una malla Nítex de 20  $\mu\text{m}$  de diámetro de poro. La calibración del fluorómetro se hizo con Chl *a* pura a partir de *Anacystis nidulans* (Sigma n° C6144). Otra forma de calcular la

concentración de clorofila fue a través de un espectrofotómetro por diferencia de la altura de los picos de absorbancia para la Chl- *a* (Porra, 1999).

*A posteriori* se calcularon tasas de crecimiento ( $\mu$ ) a partir de la siguiente formula:

$$M_t = M_0 \cdot e^{\mu t}$$

Donde:

$M_t$  es valor de concentración de Chl *a* en el instante  $t > 0$ ;

$M_0$  es el valor inicial de concentración de Chl *a* al comienzo del experimento;

$\mu$  es la tasa de crecimiento instantánea;

$e$  = base del logaritmo natural (2.718).

- **Determinado por conteo del número de células:**

Para el conteo en comunidades naturales se tomaron muestras y se fijaron con formalina neutralizada (concentración final en la muestra = 0.4% de formaldehído). La cuantificación de especímenes se realizó utilizando un microscopio invertido (Utermöhl 1958). Las muestras fueron decantadas por 24 horas y luego contadas con aumento de 200X para células micropláctónicas ( $> 20 \mu\text{m}$ ) y con un aumento de 400X para el nanoplancton ( $< 20 \mu\text{m}$ ). Antes de la decantación se colorearon las muestras con una gota de Rosa de Bengala para una mejor distinción entre materia orgánica y detritus, siguiendo la técnica descrita en Villafañe & Reid (1995).

Para cultivos más concentrados y cultivos mono-específicos, se utilizaron dos tipos de cámara de conteo de acuerdo a la concentración de las muestras: Cámara Neubauer (0,1 ml) y cámara Sedgewick Rafter (1,0 ml), luego se cuentan con un aumento de 200X las células micropláctónicas y con 400X las células nanopláctónicas.

**b) Determinación de biovolumen celular y biomasa:** A partir del análisis de imágenes obtenidas con una video cámara (Philips LDH 0462/00) (Wintrack Software, Real Time Computers Inc.) fijada al microscopio invertido, se pudo obtener información de biovolumen celular. Este se calculó con las medidas de ancho largo y alto de las células (Kovalá & Larrance, 1966). Para esas medidas fue necesaria una alícuota (25 ml de

muestra), se contaron de 10 a 20 campos y se midieron al menos 100 células. Los valores de biomasa (como concentración de carbono) fueron estimados con la fórmula de Strathmann (1967)

c) **Espectros de absorbanza:** Las muestras (20-100 ml dependiendo de la concentración de fitoplancton) se concentraron en filtros Whatman GF/F de fibra de vidrio (25mm) y se extrajeron los compuestos en 7 ml de metanol absoluto y *a posteriori* se centrifugaron durante 15 minutos a 1000 rpm. La estimación de la concentración de compuestos que absorben RUV (Helbling *et al.*, 1996) se realizó con un espectrofotómetro Hewlett Packard, modelo HP 8453E, de barrido entre 250-750 nm. ; De la bibliografía se conoce que existe una muy buena relación entre la absorción específica a 320-340 nm. y la cantidad de compuestos que absorben RUV, *e.g.* MAAs por biomasa (Dunlap *et al.*, 1995). Con el uso del programa Origin Pro, se calcularon las alturas de los picos de absorbanza de los pigmentos fotosintéticos (OD 420-440) y (OD 665), así como la de los compuestos que absorben RUV (OD 310-360), y se los dividió en función de la concentración de clorofila (Chl *a*) o el número de células del cultivo al momento del muestreo.

d) **Composición taxonómica de la comunidad planctónica por métodos microscópicos.** Se determinó siguiendo la misma técnica del conteo celular (ver arriba), analizando las células con un microscopio invertido (Leica DM IL) luego de un periodo de decantación de la muestra. Dentro de las comunidades naturales se clasificó a los diferentes grupos taxonómicos en cuatro categorías:

Diatomeas céntricas
Diatomeas penadas
Dinoflagelados
Mónadas / nanoflagelados.

**e) Eficiencia fotosintética cuántica (Yield):** Se utilizó un fluorómetro de amplitud de pulso (Water PAM, Walz, Germany) para medir clorofila *in vivo* por fluorescencia (Schreiber *et al.*, 1986). Este instrumento determina la señal de fluorescencia a partir de la Chl *a* (Schreiber *et al.*, 1986) en el fotosistema II (PSII). La eficiencia fotosintética cuántica (**Y**) se calculó tomando muestras cada 10 minutos y usando la ecuación de Genty *et al.* (1989) y Weis & Berry (1987),:

$$Y = (Fm' - Ft) / Fm' = Fv' / Fm'$$

donde,  $Fm'$  es la máxima fluorescencia inducida por un pulso de saturación de luz blanca y  $Ft$  es la corriente de fluorescencia estable inducida por luz roja débil en células adaptadas a la luz. El  $Y$  óptimo fue medido en células adaptadas a la oscuridad, donde  $Fm$  es la fluorescencia máxima inducida por el pulso de saturación; y  $Fv$  la fluorescencia variable inducida por una luz de fondo roja débil.

La inhibición fotosintética para cada intervalo de longitud de onda (*i.e.*, eficiencia fotosintética en los tratamientos PAB y PA en relación al tratamiento control P) sobre el periodo de incubación se calculó como:

$$\text{UV-B inhibition} = [(Y_P - Y_{PAB}) - (Y_P - Y_{PA})] / (Y_P) 100$$

$$\text{UV-A inhibition} = (Y_P - Y_{PA}) / (Y_P) 100$$

donde,  $Y_P$ ,  $Y_{PA}$ , y  $Y_{PAB}$  son las eficiencias fotosintéticas cuánticas en los tratamientos P, PA, y PAB, respectivamente

**e) Medición de la concentración de nutrientes:** En los experimentos con cultivos mono-específicos, se tomaron sub-muestras (220 ml) para determinar las concentraciones de fosfatos, nitratos y nitritos, al comienzo, en la mitad y al final del experimento. El nitrógeno total se determinó por digestión básica y luego fue valorado como nitratos por reducción en columna de cadmio a nitritos. Los nitritos en reacción directa por diazotización, y los nitratos por reducción en columna a nitritos, El fosfato se calculó a partir del fósforo inorgánico (Grasshoff *et al.*, 1983)

f) **Medición de la radiación incidente y otros parámetros atmosféricos:** La radiación solar incidente sobre las muestras de los experimentos *simulados in situ* se determinó utilizando un sensor de banda ancha ELDONET, (Real Time Computers, Inc.) con sensores de PAR (400-700 nm.), RUV-A (315-400 nm.) y RUV-B (280-315 nm.). La unidad terrestre (control) se empleó en forma constante, con una frecuencia de una lectura por minuto. Durante los experimentos, también se midieron cada 10 minutos otros parámetros atmosféricos (*e.g.* temperatura, velocidad y dirección del viento), usando una estación meteorológica (Oregon Scientific model WMR-918). Para medir la radiación incidente de las lámparas se utilizaron dos radiómetros manuales uno para PAR (Lutron Lx. 107) y otro para RUV (Lutron UVA 340), ambos previamente calibrados con el sensor de banda ancha ELDONET.

## Zooplankton

Se trabajó con tres especies de zooplankton basándose en las técnicas descritas en el Manual de Metodología de Zooplankton (Eds. Harris *et al.*, 2000). Siguiendo particularmente las metodologías de muestreo, conteo, alimentación y cálculos de tasas de ingestión y supervivencia.

### **Lugar y tipos de experimentación:**

Las pruebas experimentales con zooplankton se llevaron a cabo en el centro de cultivo de la Estación costera J. J. Nágera, en laboratorio y bajo radiación artificial con condiciones controladas de temperatura y salinidad.

### **Colecta de organismos**

Los organismos se obtuvieron de diferente manera según la especie con que se haya trabajado:

- a) Colectados a 200 metros de la costa mediante una red de plancton de 200  $\mu\text{m}$  de luz de malla y llevados al laboratorio para su cultivo e identificación (Copepoda)
- b) A partir de huevos latentes, sembrados en recipientes de 6 litros con agua de mar filtrada y posteriormente se recolectaron las larvas para su cultivo (Branchiopoda)

- c) A partir de hembras ovígeras, las cuales se recogieron en la costa y se llevaron al laboratorio para esperar el desove y luego recolectar las larvas para su cultivo (Decapoda)

### **Diseño experimental**

**a) Siembra:** Las especies a cultivar, previamente a la siembra, se aclimataron, igualando los factores ambientales (temperatura y salinidad) que presentaban, con respecto al sistema de cultivo. Ya aclimatados se colocaron por conteo individual en los recipientes de cultivo. Se utilizaron dos tipos de recipientes dependiendo la especie: a) Cápsulas de Petri de 300 ml y b) estanques parabólicos de PVC de 10 litros de capacidad con aireación moderada desde el fondo y abiertos en la superficie. Luego se colocaron sobre una mesada bajo condiciones controladas de temperatura ( $22 \pm 1^\circ\text{C}$ ) y salinidad (33 psu), para posteriormente alimentar.

**b) Tratamientos y alimentación:** Al zooplancton se lo alimentó con los cultivos mono-específicos de las algas que respondieron principalmente a los tratamientos de radiación arriba señalados. No se llevó a cabo ningún tratamiento de radiación para el zooplancton durante la alimentación; simplemente se lo mantuvo en oscuridad o en presencia de luz PAR fluorescente (40W).

Luego del periodo de alimentación se determinó, en los organismos sobrevivientes, la presencia/ausencia de compuestos que absorben RUV y *a posteriori* se los colocó bajo el efecto de lámparas de RUV, (Q-panel 340) para determinar supervivencia bajo ese stress (ver detalles en capítulo 5).

### **Muestras, análisis y mediciones**

**a) Tasa de ingestión (gt):** Previamente a los tratamientos de alimentación se calculó para cada especie de zooplancton una **tasa de ingestión (gt)**: Se colocó un individuo en un tubo de ensayo de 10 ml con cultivo de una concentración celular inicial conocida y cada periodos conocidos de tiempo se fueron tomando sub-muestras del cultivo y contando su número de células para determinar si el individuo zooplanctónico se estaba alimentando.

.El cálculo se baso en la formula:

$$g_t = (C_i - C_f) / n * t$$

donde  $C_i$  = Concentración inicial del numero de células fitoplanctónicas;  $C_f$  = concentración final del numero de células fitoplanctónicas;  $n$  = número de individuos zooplanctónicos y  $t$  = tiempo (Bamstedt, 2000).

Se utilizaron en los experimentos tres diferentes zooplancteres y cuatro especies fitoplanctónicas como figura en la siguiente tabla:

Zoo/Fito	<i>Chaetoceros</i> sp	<i>Thalassiosira fluviatilis</i>	<i>Heterocapsa triquetra</i>	<i>Nannochloropsis</i> sp
<i>Paracalanus parvus</i>	$g_t = (C_i - C_f) / n * t$	$g_t$	$g_t$	$g_t$
<i>Artemia persimilis</i>	$g_t$	$g_t$	$g_t$	$g_t$
<i>Cyrtograpsus angulatus</i>	$g_t$	$g_t$	$g_t$	$g_t$

**b) Longitud y desarrollo:** Cada 24 horas se tomaron 3 a 5 organismos de cada tratamiento y se los preservó en alcohol al 70% para su posterior medición. La longitud se considero desde el *rostrum* hasta el *telson*. El desarrollo de los organismos se determino en base al trabajo de Johnson & Olson, (1948).

**c) Espectros de absorbancia:** Las características de absorbancia de las tres especies de zooplancton fueron obtenidas a partir de la extracción en metanol absoluto de los individuos. Estos se colocaron en 5 ml de metanol absoluto a 4 °C al menos durante 4 h. Durante ese periodo los individuos fueron macerados con una varilla de vidrio. Luego de la extracción, las muestras fueron centrifugadas 15 min. a 1000 rpm. La estimación de la concentración de compuestos que absorben RUV (Helbling *et al.*, 1996) se realizó con un espectrofotómetro de barrido entre 250-750 nm (Hewlett Packard. Modelo-HP-8452A). Con el uso del programa Origin Pro, al igual que para el fitoplancton, se calculó las

alturas de los picos de absorbancia de los pigmentos fotosintéticos y de los compuestos que absorben RUV, aunque en este caso en función del número de individuos y/o peso fresco.

**d) Supervivencia:** Se contaron los organismos que se encontraban vivos al final del experimento, considerando muertos a aquellos organismos con ausencia total de movilidad en sus apéndices locomotores. En la supervivencia final se tomó una réplica de cada tratamiento de alimentación, obteniendo así el porcentaje de supervivencia. Se vació el contenido de la cápsula o estanque en un portaobjetos cavado y se lo colocó bajo lupa para poder realizar el conteo fácilmente.

**e) Medición de la radiación incidente:** Para la medición de la radiación incidente a partir de las lámparas se utilizaron los radiómetros manuales para PAR y RUV arriba mencionados.

## Tratamiento Estadístico de los datos:

Los datos son presentados como una media y sus desviaciones estándar. El diseño experimental básico es de una matriz 2x2, con la radiación y los nutrientes como variables, mostrando diferencias significativas entre tratamientos, utilizando un nivel de significancia ( $\alpha$ ) de 0.05 en todas las comparaciones. Se usó un test ANOVA doble factor, con tratamientos de radiación como factor I y tratamientos de nutrientes como factor II (Zar, 1984). Se realizó una transformación logarítmica de los datos para reducir la homogeneidad de varianza y normalidad, y todos los datos fueron testeados por homocedasticidad (Sokal & Rohlf, 1981).

Se empleó el test no paramétrico de Kruskal Wallis (Zar, 1984), para establecer diferencias entre los tratamientos (radiación/ nutrientes). Para los experimentos con cultivos mono específicos se empleó un nivel de significancia del 95% en todos los análisis.

### **Capítulo 3: Respuesta de la comunidad fitoplanctónica marina a la combinación de RUV y agregado de nutrientes**

#### **Resumen:**

A fin de evaluar el efecto combinado de la radiación ultravioleta (RUV) y del agregado de nutrientes sobre el crecimiento y diversidad fitoplanctónica, se realizaron experimentos de 1-2 semanas de duración con aguas colectadas en Bahía Nueva, Chubut (42° S, 65° W). Los mismos se llevaron a cabo a fines de verano, fines de otoño y fines de invierno del año 2003. Las muestras se colocaron en recipientes transparentes a la RUV y se incubaron bajo cuatro tratamientos, dos de radiación y dos de nutrientes; a) Muestras expuestas al total de la radiación (tratamiento PAB 280-700 nm) y b) Muestras expuestas sólo a la radiación fotosintéticamente activa (PAR), cubriendo el recipiente con filtro Ultraphan 395 (tratamiento P, 400-700 nm). Al comenzar los experimentos, se agregaron nutrientes (*i.e.* NaPO<sub>4</sub>H<sub>2</sub> y NaNO<sub>3</sub>) a un set de muestras de cada tratamiento de radiación (cultivos N), mientras que para el otro set de muestras se mantuvo la concentración natural. El tratamiento sin agregado de nutrientes, y expuesto al total de la radiación se considero el control. Durante el transcurso de los experimentos se determinaron el crecimiento (por concentración de clorofila y número de células), la concentración de compuestos que absorben RUV y la composición florística del fitoplancton. Las tasas de crecimiento medidas durante el transcurso del experimento para los cultivos N fueron significativamente más altas ( $p < 0,05$ ) que aquellas de los cultivos no enriquecidos. Al comienzo de los experimentos la comunidad fitoplanctónica estuvo dominada por Mónadas y flagelados nanoplanctónicos; sin embargo al final de los experimentos se determinaron cambios importantes en la comunidad con un predominio de las diatomeas. Los resultados indican que, en la escala temporal de los experimentos, los cambios observados en la composición florística se deben mayormente a la disponibilidad de nutrientes y, en menor grado, a la exposición a la RUV.

## **Introducción:**

En esta etapa del trabajo se evaluó el efecto de la RUV solar en diferentes épocas del año sobre comunidades fitoplanctónicas de una región costera de la Patagonia (Chubut, Argentina). Como se cito en le capitulo 1, ante un estrés por RUV, algunas células fitoplanctonicas poseen mecanismo de aclimatación y son capaces de modificar a nivel individual sus condiciones fisiológicas, como por ejemplo, sintetizando compuestos que absorben RUV (Helbling *et al.*, 1996) o carotenoides ( Underwood, 1999). Pero a nivel de la comunidad, también se han observado varios efectos por RUV tales como alteraciones sobre la composición específica, la biomasa fitoplanctónica (Kim & Watanabe, 1994) y la producción primaria (Villafañe *et al.*, 2003a), incluso, un cambio potencial en la composición de especies podría tener un efecto negativo sobre la calidad del alimento disponible para los consumidores primarios y, consecuentemente, en la red trófica (*e.g.* Goes *et al.*, 1996; De Lange *et al.*, 1999). Además, algunos estudios sobre las comunidades planctónicas, sugieren que los efectos combinados de la RUV con otras variables pueden alterar significativamente los resultados obtenidos cuando se evalúan variables por separado. Así, por ejemplo, estudios que se han realizado en Patagonia, mostraron que la inhibición fotosintética variaba considerablemente entre los diferentes ambientes dependiendo de la profundidad óptica de la columna de agua, registrándose los máximos valores de inhibición (35%) en la superficie (Villafañe *et al.*, 2001), como así también la disponibilidad de los nutrientes inorgánicos (especialmente nitrógeno) son sumamente importantes en la reducción de los efectos negativos de la RUV (Cullen & Lesser, 1991; Korbee *et al.*, 2003).

El diseño experimental aquí planteado tomó en cuenta la contribución de la adición de nutrientes sobre los efectos de la RUV. Es importante considerar que esta región patagónica presenta características interesantes en relación a su radiación climática, con alta heliofanía y eventos episódicos de disminución de ozono (Orce & Helbling, 1997). Actualmente son relativamente pocos los estudios que han evaluado el efecto de la radiación solar sobre comunidades fitoplanctónicas marinas (Buma *et al.*, 2001; Helbling *et al.*, 2001; Villafañe *et al.*, 2001, 2004 *a, b*; Helbling *et al.*, 2005) en esta región del Mar Argentino. Por lo tanto el objetivo de este capítulo es contribuir con

nuevas investigaciones sobre el efecto individual y sinérgico combinado de la RUV y los nutrientes sobre el potencial de fotoaclimatación, el crecimiento y la taxonomía del fitoplancton de esta área.

## **Materiales y métodos particulares:**

### **Período de estudio**

Se realizaron experimentos en recipientes lavados con ácido clorhídrico (1N HCl) con muestras de agua superficial colectadas a 500-1000 m de la costa en Bahía Nueva (ver Capítulo 2). Los experimentos fueron conducidos en la EFPU en las fechas descriptas más abajo:

- experimento n° 1 se llevó a cabo del 25 de febrero al 3 de marzo de 2003 (verano)
- experimento n° 2 se llevó a cabo del 20 de mayo al 1 de junio de 2003 (otoño);
- experimento n° 3 se extendió del 26 de agosto al 7 de septiembre del 2003 (invierno).

### **Diseño Experimental**

La presencia de componentes zooplanctónicos (*i.e.* posibles depredadores capaces de influir en las tasas de crecimiento) fue eliminada al filtrar las muestras con una malla Nitex de 150  $\mu\text{m}$ . diámetro de poro. *A posteriori*, las muestras se colocaron en recipientes de policarbonato transparentes a la RUV de cuatro litros siguiendo el diseño experimental básico descrito en el capítulo 2 y fueron expuestas a cuatro tratamientos:

A) dos tratamientos de radiación:

1) seis recipientes recibieron el total de la radiación, -PAR + RUV- (**trat. PAB**)

2) seis recipientes recibieron por lo tanto sólo luz PAR (**trat. P**)

B) dos tratamientos de nutrientes:

1) al comienzo del experimento a tres recipientes de cada tratamiento de radiación se le adicionó una fuente de fósforo y nitrógeno (*i.e.* los nutrientes  $\text{NaPO}_4\text{H}_2$  y  $\text{NaNO}_3$ ) en concentraciones finales de 0.06 y 0.7 mM, respectivamente (**trat. N**).

2) en los otros tres recipientes se mantuvo la concentración natural de nutrientes (**trat. N<sub>0</sub>**), por lo tanto, se trabajó con concentraciones al menos 2 órdenes de magnitud mayores que aquellas registradas en el campo (ver Cap.1).

Resumiendo, en total los siguientes tratamientos:

**PAB (control)**

**P**

**PAB +N**

**P+N**

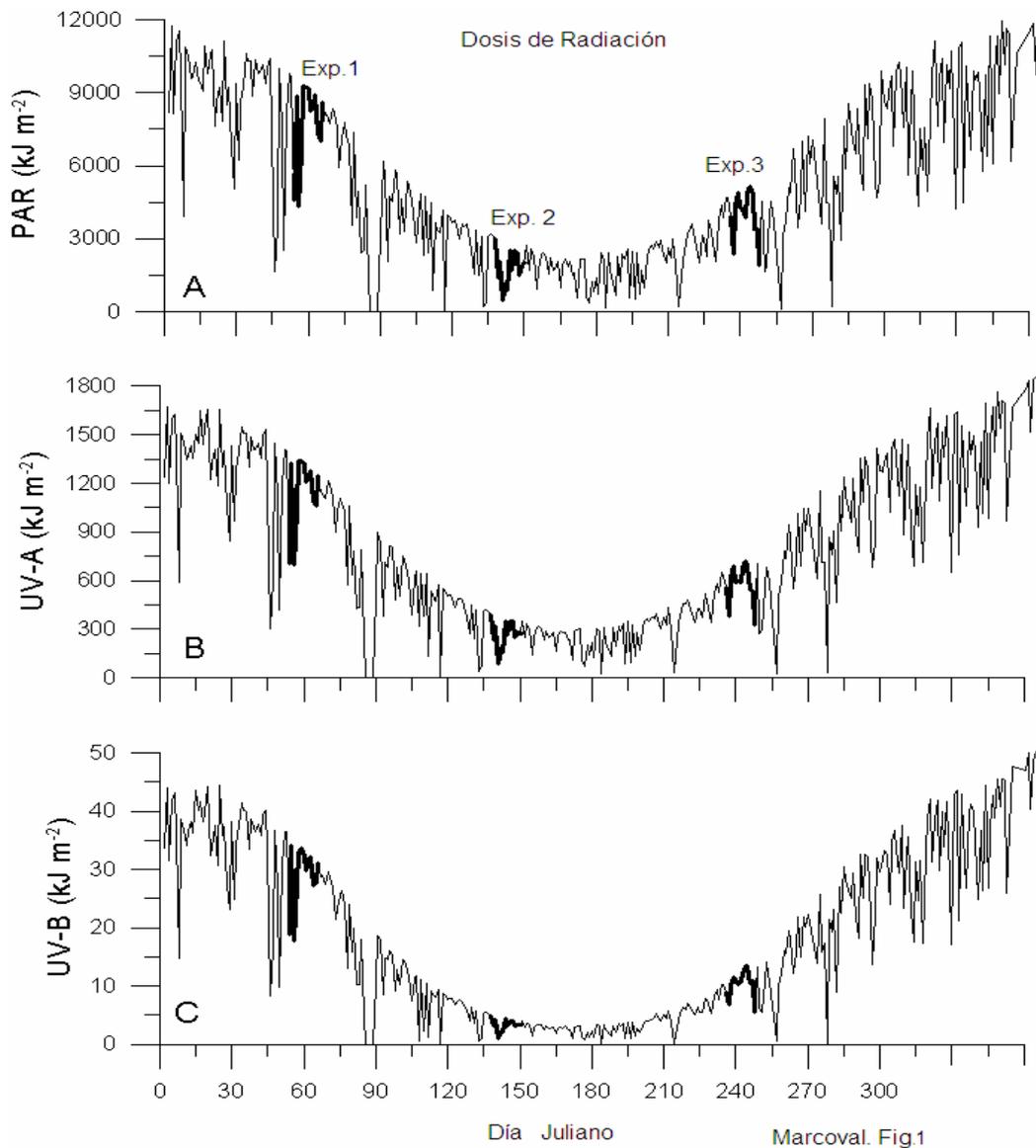
Los recipientes se colocaron expuestos a la radiación solar natural como se mencionó anteriormente. Se utilizó un baño de agua para mantener la temperatura constante, la cual, fue diferente para cada experimento, ajustándola a la media ambiental para cada estación del año, siendo 17 , 12 y 14 °C ( $\pm 2$  °C) para los experimentos n° 1, n° 2 y n° 3, respectivamente.

### **Muestras, análisis y mediciones**

Al comienzo de cada experimento y periódicamente cada 1-3 días se tomaron muestras para determinar las tasas de crecimiento en base a la concentración de clorofila *a* (Chl *a*), para el análisis espectral y composición taxonómica de la comunidad fitoplanctónica. Estos análisis se realizaron como se describe en el capítulo 2.

### **Resultados**

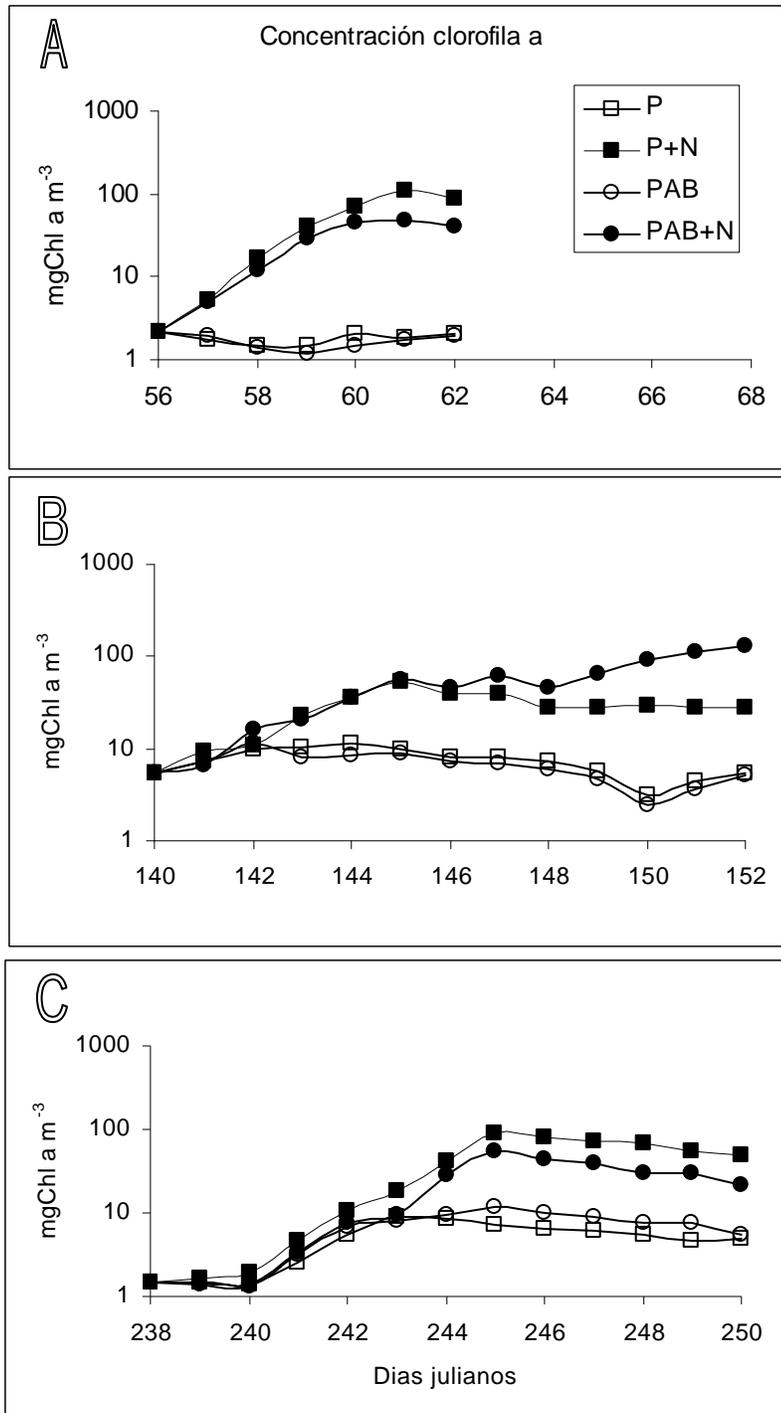
Las dosis diarias de PAR, UVA y UVB durante el año 2003 se muestran en la figura 1. Se observa una muy clara tendencia de valores relativamente altos en verano, decreciendo hacia el invierno e incrementando nuevamente hacia primavera-verano. La alta variabilidad diaria es debido a la presencia de nubes, lo cual es un fenómeno esperable.



**Figura 3.1:** Dosis diaria de radiación solar (en  $\text{kJ m}^{-2}$ ) durante el año 2003. A) PAR, 400–700 nm; B) UV-A, 315-400 nm; C) UV-B, 280-315 nm. Exp. 1 llevado a cabo del 25 de Febrero al 3 de Marzo, Exp. 2, 20 de mayo a 1de Junio; Exp.3 del 26 Agosto al 7 de Septiembre.

Durante el exp. n° 1, las muestras recibieron altas dosis de radiación con valores máximos de 9200, 1300 y 32  $\text{kJ m}^{-2}$  para PAR, UV-A y UV-B respectivamente (verano). Las dosis más bajas se registraron durante el exp. n° 2 (otoño), con valores máximos de 2700, 300 y 4  $\text{kJ m}^{-2}$  para PAR, UV-A y UV-B respectivamente. Los valores de dosis intermedios se registraron durante el exp. n° 3 (invierno) 5100, 700 y 13  $\text{kJ m}^{-2}$  para PAR, UV-A y UV-B respectivamente

El crecimiento del fitoplancton estimado por concentración de mg Chl *a* m<sup>-3</sup> se muestra en la Fig. 3.2. En el exp. n° 1 el crecimiento no fue significativo en los tratamientos sin enriquecimiento con nutrientes, alcanzando valores <2 mg Chl *a* m<sup>-3</sup> (Fig. 3.3A), mientras que aquellos con nutrientes adicionales tuvieron un alto incremento de la concentración de Chl *a* al comienzo del experimento con una diferencia significativa entre los tratamientos de radiación ( $p < 0,05$ ), alcanzando valores máximos entre 48 y 112 mg Chl *a* m<sup>-3</sup> en los tratamientos PAB + N y P + N, respectivamente. En el exp. n° 2 (Fig. 3.3B), el crecimiento del fitoplancton se observó en todos los tratamientos desde las primeras etapas de la experimentación. Sin embargo, mostraron valores diferentes los tratamientos enriquecidos de los no enriquecidos. Los máximos valores alcanzados fueron significativamente más altos ( $p < 0,05$ ) en cultivos enriquecidos (52 y 125 mg Chl *a* m<sup>-3</sup> para los tratamientos P + N y PAB + N, respectivamente), mientras que en los cultivos no enriquecidos los valores fueron de 9 y 12 mg Chl *a* m<sup>-3</sup> para PAB y P, respectivamente. Finalmente, en el exp. n° 3 (Fig. 3.3C) las células mostraron una fase “lag” relativamente corta (*i.e.* 2 días) en todos los tratamientos, para luego alcanzar valores significativamente más altos ( $p < 0,05$ ) con máximos entre 55-90 mg Chl *a* m<sup>-3</sup> en cultivos enriquecidos y 10-12 mg Chl *a* m<sup>-3</sup> en los cultivos no enriquecidos con nutrientes.



**Figura 3.2:** Concentración de Chl *a* (mg Chl *a* m<sup>-3</sup>) durante: **A)** Exp.1; **B)** Exp. 2 y, **C)** Exp. 3). Los símbolos indican los tratamientos nutrientes / radiación impuestos a las muestras: (□) Muestras expuestas solo a luz visible sin adición de nutrientes (trat. P); (○) Muestras expuestas al total de la radiación, PAR+UVR, sin adición de nutrientes (trat. PAB); (■) Muestras expuestas solamente a luz visible con nutrientes agregados (trat. P+N) ;(●) muestras expuestas al total de la radiación PAR+UVR, con nutrientes agregados (trat. PAB+N).Las líneas sobre los símbolos indican desviación estándar.

Los valores de tasa decrecimiento ( $\mu$ ) -basados en medidas de Chl *a*- y sus respectivos desvíos se presentan en la Tabla 3.1. Se observaron valores significativamente altos ( $p < 0.05$ ) en cultivos enriquecidos respecto a los no enriquecidos, sin embargo no hubo diferencias significativas dentro de las mismas condiciones de radiación. Los valores máximos de  $\mu$  se alcanzaron en los tratamientos P + N de los exps. n° 1 y n° 3 (0.99 y 0.77 día<sup>-1</sup>, respectivamente) y en el tratamiento PAB + N del exp. n° 2 (0,48 día<sup>-1</sup>). Por otro lado, en exp. n° 1 no se detectó crecimiento para los tratamientos no enriquecidos, mientras que valores muy bajos de  $\mu$  fueron determinados para tratamientos P (0,3 y 0,38 día<sup>-1</sup> en exp.. n° 2 y n° 3, respectivamente)

<b>Tratamiento</b>	<b>Experimento n°1</b>	<b>Experiment n°2</b>	<b>Experiment n° 3</b>
P	No crecimiento	0.30 (0.03)	0.38 (0.03)
PAB	No crecimiento	0.36 (0.04)	0.45 (0.02)
P+N	0.99 (0.02)	0.46 (0.03)	0.77 (0.01)
PAB+N	0.87 (0.02)	0.48 (0.02)	0.73 (0.01)

**Tabla 3.1:** Tasa de crecimiento ( $\mu$ , en día<sup>-1</sup>, calculado a partir de datos Chl *a*) de las comunidades fitoplanctónicas de Bahía Nueva expuestas a diferentes tratamientos de nutrientes / radiación. Los tratamientos de radiación son señalados por P (PAR solamente) y PAB (PAR+UV-A+UV-B). N indica cultivos que recibieron nutrientes adicionales al comienzo del experimento y los desvíos estándares entre paréntesis.

El análisis florístico revela diferencias en la composición taxonómica de fines de verano, fines de otoño y finales de invierno tomados de Bahía Nueva (Tabla 3.2). Las Monadas y los flagelados nanoplanctónicos numéricamente dominaron la comunidad fitoplanctónica al comienzo de los exp. n° 1 y n° 3. Sin embargo, en término de biomasa dominaron en el exp. n° 1 y co-dominaron con las diatomeas en el exp. n° 3. Los valores más altos de concentración y biomasa para mónadas y flagelados nanoplanctónicos se registraron a fines de verano en exp. n° 1, con 3650 cel. ml<sup>-1</sup> y 93 mg C m<sup>-3</sup>, respectivamente. Los valores más bajos fueron registrados al inicio del bloom para el experimento n° 2 con 317 cel. ml<sup>-1</sup> y 25 mg C m<sup>-3</sup>, respectivamente.

**Tabla 3.2:** Composición taxonómica al comienzo y al final de la experimentación. Los valores iniciales son presentados como concentración celular (cel. ml<sup>-1</sup>), biomasa (mg C m<sup>-3</sup>) y porcentaje (%) del total de la biomasa. Los valores finales son representados como porcentaje del total de biomasa.

	Exp 1	valores iniciales		valores finales			
	T0	T0	T0	P	PAB	P+N	PAB+N
	cel. ml <sup>-1</sup>	mg C m <sup>-3</sup>	% mg C m <sup>-3</sup>				
Diatomeas céntricas	146	16	14	69.1	65.8	59.2	70.7
Diatomeas pennadas	74	4	3	19.3	10.1	27.9	21.8
Dinoflagelados	8	4	3	0.0	0.0	0.7	0.0
Mónadas/flagelados	3650	93	79	11.6	24.1	12.2	7.4
total	3878	117	100	100.0	100.0	100.0	100.0
	Exp 2	valores iniciales		valores finales			
	T0	T0	T0	P	PAB	P+N	PAB+N
	cel. ml <sup>-1</sup>	mg C m <sup>-3</sup>	% mg C m <sup>-3</sup>				
Diatomeas céntricas	175	22	15	12.4	92.7	29.6	85.2
Diatomeas pennadas	396	96	67	83.9	4.0	67.2	13.7
Dinoflagelados	0	0	0	0.0	0.0	0.0	0.0
Mónadas//flagelados	317	25	17	3.7	3.2	3.2	1.2
total	888	143	100	100.0	100.0	100.0	100.0
	Exp 3	valores iniciales		valores finales			
	T0	T0	T0	P	PAB	P+N	PAB+N
	cel. ml <sup>-1</sup>	mg C m <sup>-3</sup>	% mg C m <sup>-3</sup>				
Diatomeas céntricas	50	8	20	88.1	91.0	99.4	87.1
Diatomeas pennadas	96	15	39	0.9	4.0	0.4	11.8
Dinoflagelados	0	0	0	0.0	0.0	0.0	0.0
Mónadas/flagelados	950	16	40	11.0	5.0	0.2	1.1
total	1096	38	100	100.0	100.0	100.0	100.0

Los dinoflagelados estuvieron escasamente representados en el exp. n° 1 (8 cel. ml<sup>-1</sup> y 4 mg. C m<sup>-3</sup>) y ausentes en los otros dos experimentos mientras que las diatomeas dominaron al comienzo de la experimentación en exp. n° 2. La relativa proporción de

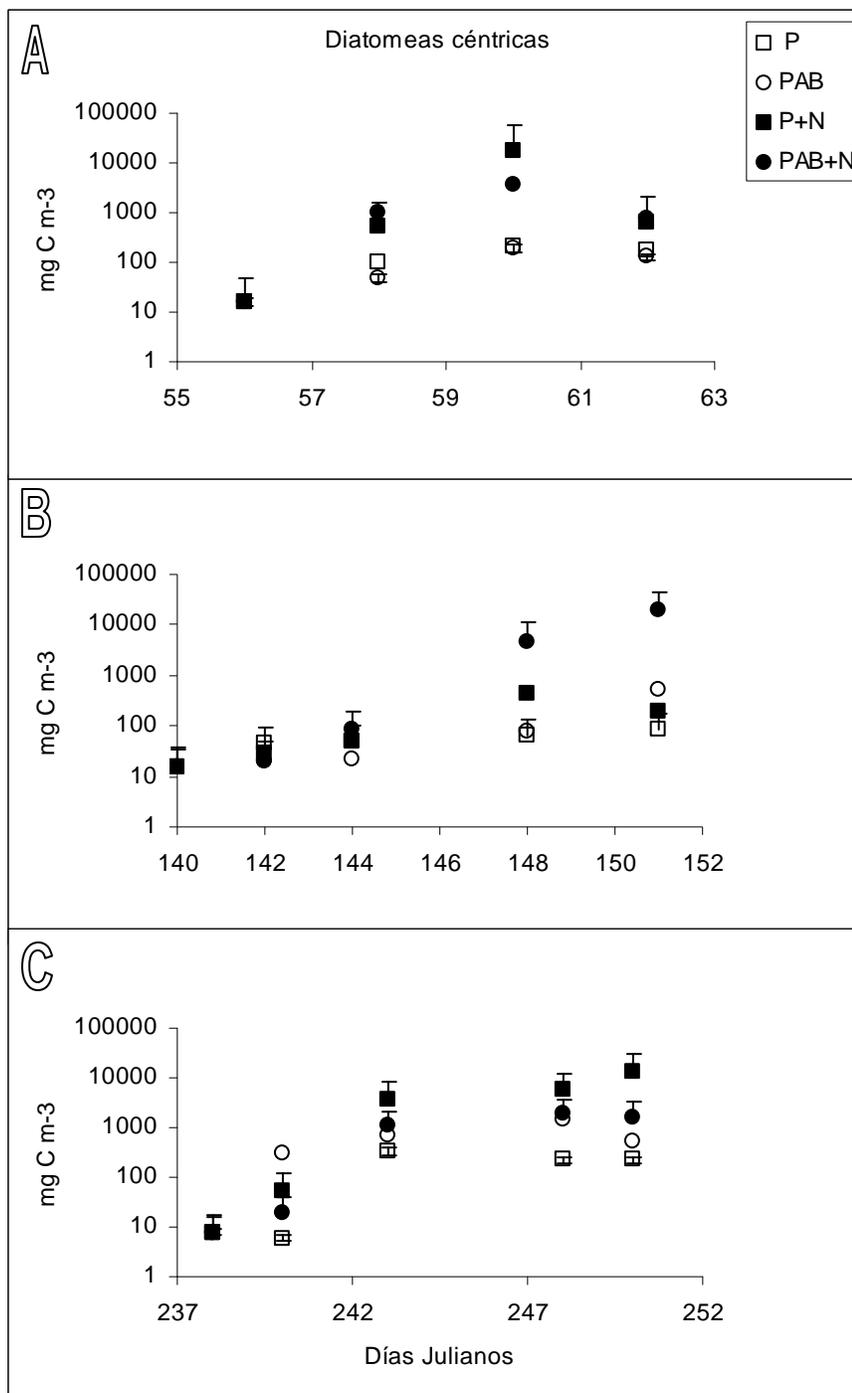
diatomeas céntricas y pennadas fue variable en los tres experimentos: Durante la condición de pre-bloom (exp. n° 1), las diatomeas céntricas fueron más abundantes que las diatomeas pennadas, aunque su biomasa fue relativamente baja (16%). Por otro lado, las diatomeas pennadas sobrepasaron la concentración de diatomeas céntricas durante los experimentos n° 2 y n° 3 (periodos de bloom y post-bloom).

Durante el progreso de la experimentación fue ocurriendo un cambio en la composición de las especies. Hacia el final, las diatomeas dominaron completamente la comunidad con una dominancia del 75-99% del total de la biomasa (Tabla 3.2). Durante las exp. n° 1 y n° 3, la biomasa de diatomeas céntricas fue significativamente más alta ( $p < 0.059$ ) que la biomasa de diatomeas pennadas en todos los tratamientos. Durante la exp. n° 2 sin embargo la biomasa de las diatomeas céntricas fue significativamente mas alta ( $p < 0.05$ ) que la de diatomeas pennadas solamente en muestras expuestas a RUV (*i.e.* PAB y PAB + N). Por otro lado, en los tratamientos P y P + N la biomasa de las pennadas fue significativamente más alta ( $p < 0, 05$ ) que la de diatomeas céntricas.

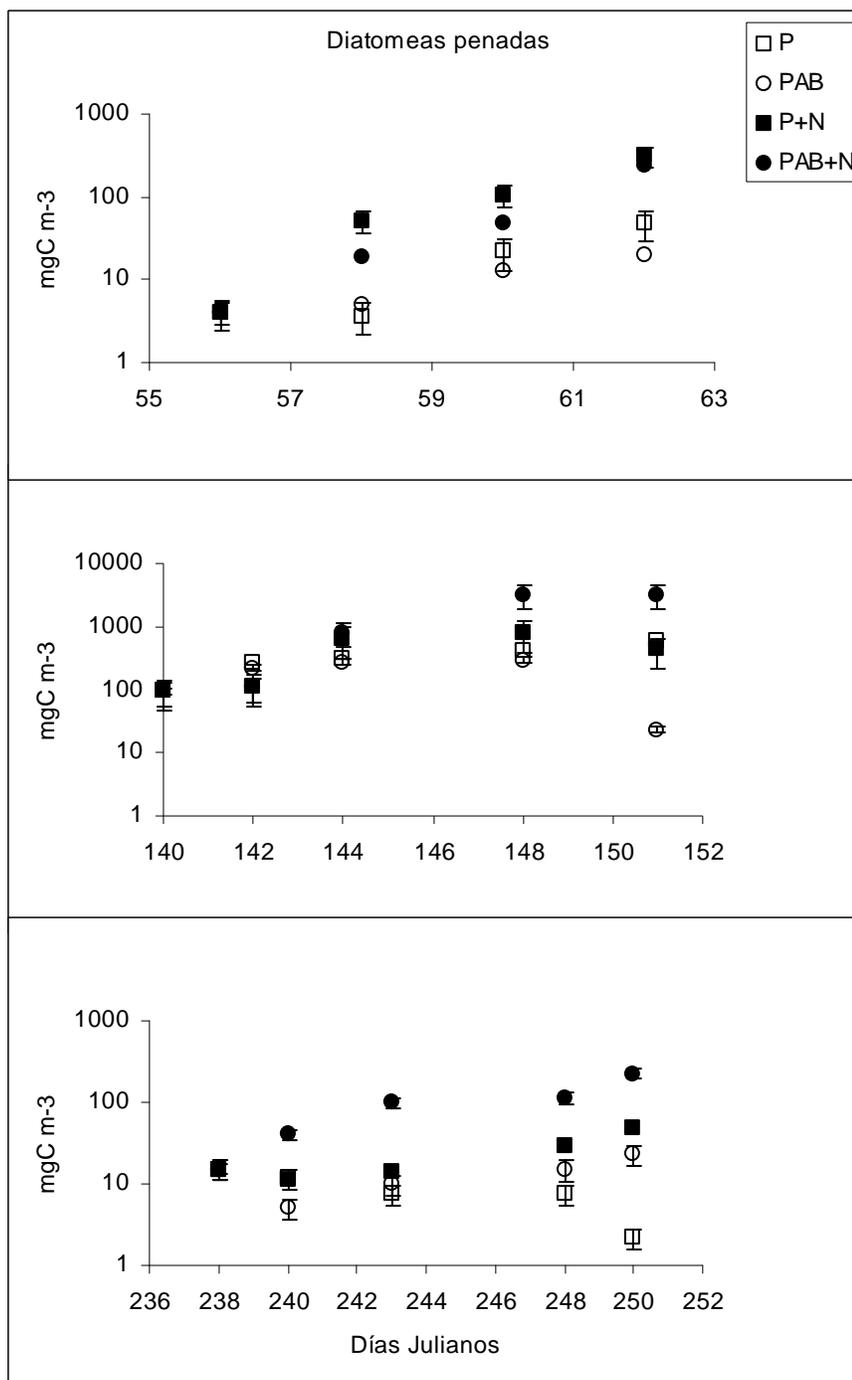
En base a los resultados hasta aquí presentados se decidió continuar el trabajo enfocado especialmente en el crecimiento de las diatomeas (Figs. 3.3 y 3.4), dado que este grupo fue el mejor representado en la biomasa fitoplanctónica (tabla 2) en el progreso del experimento

### **Diatomeas Céntricas y Pennadas**

Cuando comparamos las diatomeas céntricas con las pennadas, si bien hubo un alto grado de variabilidad, se pudieron identificar patrones generales tales como una alta concentración en los cultivos enriquecidos con nutrientes en relación a los cultivos no enriquecidos. Por el contrario, las diatomeas pennadas en el experimento n° 1 (Fig.3.4A) y experimento n° 2 (Fig.3.4B) no mostraron diferencias significativas entre tratamientos de nutrientes. En general y con el mismo experimento, las diatomeas céntricas (Fig.3.3B) alcanzan valores más altos de concentración que las diatomeas pennadas (Fig.3.4B).



**Figura 3.3:** Abundancia de diatomeas céntricas (en mg C m<sup>-3</sup>) durante: **A)** Exp. 1; **B)** Exp. 2 y **C)** Exp. 3. Los símbolos indican diferencias entre los tratamientos nutrientes/radiación impuestos a las muestras: (□) muestras expuestas solo a luz visible sin adición de nutrientes (trat. P); (○) muestras expuestas al total de la radiación, PAR+RUV, sin adición de nutrientes (trat. PAB); (■) muestras expuestas solamente a luz visible con nutrientes agregados (trat. P + N); (●) muestras expuestas al total de la radiación PAR+RUV, con nutrientes agregados (trat. PAB + N). Las líneas sobre los símbolos indican desviación estándar.



**Figura 3.4:** Abundancia de diatomeas pennadas (en mg C m<sup>-3</sup>) durante: **A)** Exp. 1 (fines de verano); **B)** Exp. 2 (fines de otoño) y **C)** Exp. 3 (fines de invierno). Los símbolos indican diferencias entre diferentes tratamientos nutrientes/radiación impuestos a las muestras. (Ver referencia Fig.3.3)

La composición de las diatomeas al final del experimento se resume en la tabla 3. En el experimento n° 1, *Leptocylindricus* sp, fue la más representativa de todas las especies de diatomeas céntricas, pero en co-dominancia con *Skeletonema costatum* en los tratamientos que recibieron solamente PAR. *Nitzschia longissima* caracterizó la comunidad de las diatomeas pennadas en los cultivos no enriquecidos, mientras que el nanoplancton (< 20µm) dominó sobre las pennadas en los cultivos enriquecidos. En el experimento n° 2 *Chaetoceros* spp representó una importante fracción en la comunidad de las diatomeas céntricas, co-dominando con *Leptocylindricus* sp en los cultivos no enriquecidos y con *Thalassiosira* spp. en el tratamiento PAB + N. Las diatomeas pennadas fueron dominantes en todos los casos, representadas especialmente por especímenes relativamente alargados, mayormente del género *Nitzschia* sp y *Pseudonitzschia* sp. Al final del experimento n° 3 *Chaetoceros* spp caracterizó los cultivos no enriquecidos (con co-dominancia de *Thalassiosira* spp en el tratamiento que recibió el total de la radiación), mientras que en los cultivos enriquecidos con nutrientes adicionales fueron caracterizados por una especie de *Thalassiosira* nanoplanctónica.

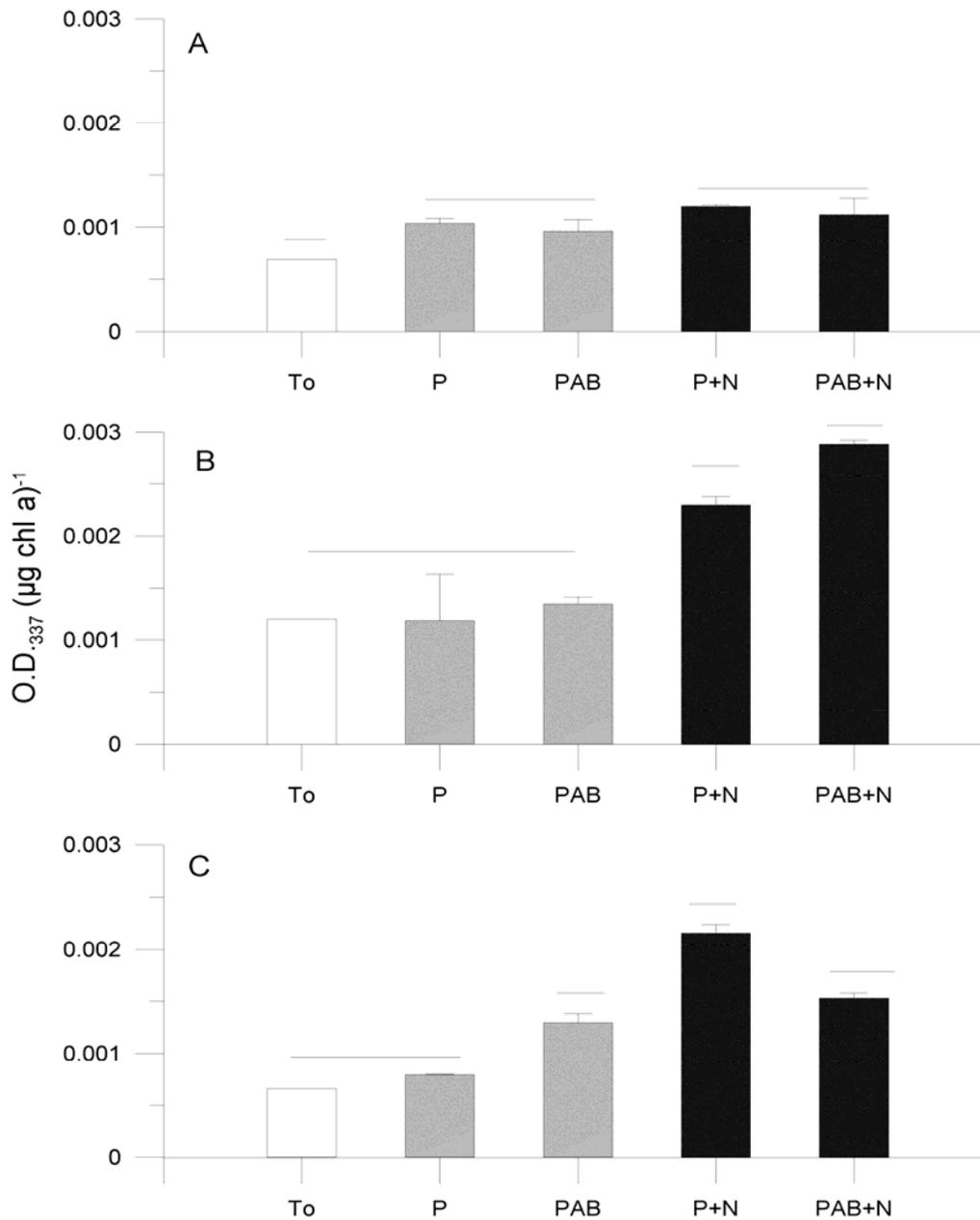
Si bien en el experimento n° 2 las diatomeas pennadas alargadas caracterizaron la fracción de la comunidad, estuvieron virtualmente ausentes en el tratamiento PAB.

Finalmente, se evaluó el potencial de aclimatación a través de la presencia de compuestos que absorben RUV (Fig.3.5). En los experimentos n° 1 y n° 3, la concentración de dichos compuestos (evaluados por la altura de picos de absorbancia 337 en el espectro de radiación) fue significativamente mas baja al comienzo ( $T_0$ ) de los experimentos en relación a la concentración al final de los mismos ( $p < 0.05$ ). Sin embargo en estos experimentos (Figs. 3.5A y 3.5C), la concentración de compuestos que absorben RUV no fue significativamente diferente entre los tratamientos de nutrientes y radiación. En el experimento n° 2 (Fig. 3.5B), sin embargo, los compuestos que absorben RUV se presentaron en concentraciones significativamente más altas ( $p < 0,05$ ) comparadas con muestras colectadas a  $T_0$  sólo en los cultivos que recibieron nutrientes adicionales.

<b>Experimento</b>	<b>Tratamiento</b>	<b>Especies de diatomeas centricas / pennadas representativas</b>
<b>N°1</b>	P	<i>S. costatum</i> , <i>Leptocylidrus</i> sp / <i>N. longissima</i>
	PAB	<i>Leptocylidrus</i> sp. / <i>N. longissima</i>
	P+N	<i>S. costatum</i> , <i>Leptocylidrus</i> sp / pennates 10-20 µm
	PAB+N	<i>Leptocylindrus</i> sp. / pennates 10-20 µm
<b>N°2</b>	P	<i>Chaetoceros</i> sp.; <i>Leptocylindrus</i> sp / pennates 50-100 µm
	PAB	<i>Chaetoceros</i> sp. <i>Leptocylindrus</i> sp / pennates 50-100 µm
	P+N	<i>Chaetoceros</i> sp. / pennates 50-100 µm
	PAB+N	<i>Thalassiosira</i> sp.; <i>Chaetoceros</i> sp. / pennates 50-100 µm
<b>N°3</b>	P	<i>Chaetoceros</i> sp. / pennates 50-100 µm
	PAB	<i>Chaetoceros</i> sp. <i>Thalassiosira</i> sp.
	P+N	<i>Thalassiosira</i> sp. (10-20 µm). / pennates 50-100 µm
	PAB+N	<i>Thalassiosira</i> sp. (10-20 µm) / pennates 50-100 µm

Tabla 3.3: Especies representativas de diatomeas (*i.e.* contribución de diatomeas  $\geq 60\%$  de la concentración total) al final del experimento llevado a cabo con agua de Bahía Nueva. Los tratamientos de radiación son indicados por P (PAR solamente) y PAB (PAR+UV-A+UV-B). N indica cultivos que recibieron nutrientes adicionales al comienzo del experimento.

Por lo que se puede observar, los nutrientes tuvieron un efecto significativo en la acumulación de compuestos que absorben RUV y, en estos mismos tratamientos que recibieron nutrientes adicionales, la radiación solar tuvo un efecto evidente, donde las muestras que recibieron el total de la radiación (tratamientos PAB) presentaron una mayor concentración de compuestos.



Marcova Fig.5

**Figura 3.5:** Concentración de compuestos que absorben UV estimado por el valor promedio del pico de absorción 337 nm dividido por Chl *a* (D.O. (µg Chl *a*)<sup>-1</sup>) para muestras al comienzo (T<sub>0</sub>) y al final de los experimentos (después de la exposición a diferentes tratamientos de nutrientes / radiación). Barras grises indican muestras sin agregado de nutrientes (tratamientos P y PAB) y barras negras con agregado de los mismos (tratamientos P + N y PAB + N). **A)** Exp. 1; **B)** Exp. 2 y, **C)** Exp.3. La línea horizontal sobre las barras indica diferencia no significativa entre barras, conectadas por la línea.

## Discusión

Muchos estudios demostraron que la RUV es un factor importante controlando las comunidades acuáticas, produciendo efectos negativos sobre el fitoplancton, tales como la reducción del crecimiento y de la tasa fotosintética, y daño en el material genético (Hader *et al.*, 1995; Buma, 2003; Villafañe *et al.*, 2003). Se ha observado (Roy, 2000) que el efecto de la RUV sobre las comunidades fitoplanctónicas depende de los niveles de radiación a los cuales los organismos se encuentran expuestos, la tolerancia específica y la capacidad de los mismos de reducir y /o minimizar el daño producido. Sin embargo, cuando los valores de RUV afectan el fitoplancton, es también importante considerar la interacción con otros factores abióticos, tales como temperatura, y el estatus de nutrientes (Lesser, 1996; Lesser *et al.*, 1996; Litchman *et al.*, 2002).

Si bien, se han llevado a cabo varias investigaciones sobre el efecto a “corto tiempo” de la RUV sobre el fitoplancton, es decir, experimentos que han durado menos de un día (ver Villafañe *et al.*, 2003), ha sido relativamente poco estudiado el desempeño de las comunidades fitoplanctónicas a mayores escalas temporales (días / semanas, Villafañe *et al.*, 1995; Cabrera *et al.*, 1997; Zudaire & Roy, 2001). La escala de experimentación utilizada en esta oportunidad fue aprobada dada la influencia de todos los resultados que exponen los experimentos de corto tiempo, que por lo general, proveen una serie de información con efectos por RUV, muy deletéreos, mientras que, experimentos por más tiempo (semanas), le ofrecen al fitoplancton un tiempo de aclimatación a las nuevas condiciones experimentales minimizando los efectos por aumento de la RUV (Banaszak, 2003; Buma, 2003; Villafañe *et al.*, 2003).

Los experimentos con agua colectada de Bahía Nueva se realizaron en base a muestras de las comunidades fitoplanctónicas de verano, otoño e invierno, representadas en cada instancia por una diferente proporción de diatomeas (céntricas y pennadas), móradas y flagelados nanoplanctonicos (Tabla 3.2). Como se han encontrado también en una serie de tiempo llevada a cabo por Gayoso (2001) en el área. La sucesión estacional de fitoplancton, así como los cambios en la composición taxonómica a lo largo del año, se cree que ocurren como resultado de la combinación de varios factores, principales como, luz y disponibilidad de nutrientes (Odum, 1963, Margalef, 1997a) y otros factores

físicos, tales como, la turbulencia y la mezcla (Sverdrup, 1953; Margalef, 1956, 1997b). De esta manera las diferencias encontradas en la estructura de las comunidades fitoplanctónicas de Bahía Nueva, fueron las esperadas. Por otro lado, la disponibilidad de luz también podría jugar un rol importante en la formación de estas comunidades. Se pudieron determinar grandes diferencias en las dosis de PAR y RUV durante los distintos períodos de muestreo/ experimentación (febrero y marzo / mayo / agosto y septiembre), con altos valores durante los últimos meses de verano (exp. n° 1), mientras que los valores mas bajos se encontraron a finales del otoño (experimento n° 2). Similares características se encontraron en estudios previos de la costa de Chubut (Orce & Helbling, 1997; Barbieri *et al.*, 2002; Villafañe *et al.*, 2004).

En relación a la composición florística del fitoplancton, las diferencias pudieron haber estado asociadas a las condiciones de mezcla. Una mezcla profunda dada por fuertes movimientos del viento como ocurre en la primavera/ verano de la zona, podría favorecer el desarrollo de los flagelados -comunidad determinada en el Océano sur- (Kopczynska, 1992; Villafañe *et al.*, 1995b). Una serie de tiempo llevada a cabo en Bahía Engaño, zona próxima a la estudiada (Barbieri *et al.*, 2002; Villafañe *et al.*, 2004), ha demostrado que ocurren floraciones algales microplanctónicas (blooms) durante fines de otoño / principio de invierno, un pre- bloom (fines de verano) y un post- bloom (primavera-verano), donde las comunidades están dominadas por especies aún no identificadas de móradas y flagelados. En otros estudios previos llevados a cabo en Bahía Bustamante (Buma *et al.*, 2001; Helbling *et al.*, 2001b) se han también hallado células muy pequeñas (pico-nanoplanctónicas) durante fines de primavera /verano y la abundancia de clorofila *b* indujo la presencia de eucariotas verdes o proclorofitas. Las condiciones de nutrientes también pueden tener influencia sobre la estructura taxonómica de la comunidad fitoplanctónica. Por ejemplo, se ha encontrado que bajas concentraciones de nutrientes favorece la presencia de pico-nanoplancton por su alta relación superficie-volumen, mostrándolos óptimos para la utilización de los mismos (Falkowski, 1981). Durante fines de verano los experimentos no enriquecidos con nutrientes no mostraron crecimiento, mientras que, en contraposición, se observó un rápido crecimiento exponencial cuando los nutrientes son agregados al comienzo del experimento, lo cual resulta indicativo de una limitación por nutrientes en su formación.

Durante el experimento n° 2 llevado a cabo a fines del otoño, a los pocos días de crecimiento los nutrientes fueron un factor limitante, lo cual fue observado tanto en el tratamiento no enriquecido como en el que lo estaba desde el comienzo del experimento. Estas condiciones favorecieron el desarrollo de una mayor proporción de diatomeas alargadas (64%) comparada con aquellas de los experimentos n° 1 y n° 3

Debido a que las comunidades fitoplanctónicas colectadas en Bahía Nueva presentaron diferencias significativas en la composición taxonómica inicial, se esperaban respuestas diferentes al exponerlas a las condiciones experimentales. De hecho, y conforme lo observado en el progreso de los experimentos, hubo un evidente efecto del agregado de nutrientes (dentro de cada experimento), alcanzando valores más altos de Chl *a* en aquellos cultivos enriquecidos en comparación con los no enriquecidos. En los experimentos n° 1 y n° 3 las diferencias en  $\mu$  están probablemente asociadas tanto a la historia lumínica previa a la formación de la comunidad como a la cantidad de nutrientes. Estas muestras fueron colectadas durante fuertes condiciones de mezcla y aclimatadas a niveles de baja irradiancia y así las células en los cultivos no-enriquecidos estuvieron sometidas a un costo energético relativamente alto, ajustándose a las nuevas condiciones de radiación (similares a estar en la superficie) como las de los cultivos enriquecidos que presentaron la totalidad de las ventajas del agregado de nutrientes. reflejándose en las altas tasas de crecimiento. Esta diferencia en la utilización de nutrientes fue también evidente en la composición florística al final del experimento, por ejemplo en la proporción de diatomeas céntricas y pennadas.

Por otro lado, el crecimiento de las diatomeas céntricas parece estar favorecido por el agregado de nutrientes, mientras que las diatomeas pennadas no despertaron tales diferencias entre los tratamientos de nutrientes, especialmente en los experimentos n° 1 y n° 2. Hubo sin embargo algunas diferencias en relación al grupo de diatomeas especialmente en el experimento n° 3 donde hubo una clara selección de especies acorde al tratamiento de nutrientes impuesto a las muestras: *Chaetoceros* spp dominó en los cultivos no enriquecidos y *Thalassiosira* spp lo hizo en los cultivos enriquecidos. En el experimento n° 1 hubo también una evidencia por la selección hacia pequeñas especies en los tratamientos enriquecidos con nutrientes, siendo dominantes las diatomeas pennadas pequeñas, mientras que en los no enriquecidos la larga *Nitzschia longissima* fue

representativa de esas muestras. Estos resultados también infieren la dependencia del tamaño, donde especies pequeñas tuvieron ventajas en captar los nutrientes, alcanzando valores altos, en concordancia con el trabajo referido llevado a cabo por Falkowski (1981).

Al comparar el efecto de la radiación, dentro de los mismos tratamientos de nutrientes, no se observa una diferencia significativa en las tasas de crecimiento. Esto concuerda con experimentos de largo plazo llevados a cabo en la Antártida por Villafañe *et al.* (1995a) y Davison (1996), los cuales sugirieron que la relativamente rápida aclimatación de las células por algún efecto adverso producido por la RUV no generaron efectos crónicos. Sin embargo, se encontraron diferencias al final de los experimentos n° 1 y n° 2 con altos valores de concentración de Chl *a* en los tratamientos P y PAB, respectivamente. En los experimentos expuestos a baja irradiancia, (experimento n° 2) las células pudieron haber sido capaces de utilizar la RUV como recurso de energía para fotosíntesis como fue también observado en otros estudios llevados a cabo en Patagonia (Barbieri *et al.*, 2002), así como en otros ambientes (Helbling *et al.*, 2003). La aclimatación fisiológica a la RUV en períodos largos ocurre principalmente a través de la síntesis de compuestos protectores tales como las micosporinas (Mycosporine like aminoacids- MAAs, Banaszak, 2003). Sin embargo, no se encontró en las muestras una cantidad significativa de dichos compuestos al comienzo de los experimentos, aunque se observó una tendencia a incrementar los MAAs en los tratamientos enriquecidos, mostrando un efecto de sinergismo entre RUV-nutrientes, especialmente en experimentos n° 2 y n° 3. Algunas referencias en relación a poblaciones naturales concuerdan con estos resultados como el trabajo llevado a cabo por Litchman *et al.* (2002) quien encontró menor cantidad de MAAs bajo condiciones de concentración limitante de nutrientes (asociado a la disminución del tamaño y a la lenta reparación) en el dinoflagelado *Akashiwo sanguinea*.

La aclimatación a la RUV puede ocurrir a través de la selección de especies más tolerantes, como fue sugerido por Worrest (1983). En estos experimentos sin tener en cuenta los tratamientos de radiación (en base a que hubo cambios en la relativa proporción de células), solamente de uno a cuatro taxa de diatomeas dominaron al final de cada fase experimental, claramente indicando una selección hacia las especies

celulares mas adaptadas a los tratamientos de radiación/ nutrientes, como se puede ver en los estudios llevados a cabo por Halac *et al.* (1997). Estos autores observaron que la “selección” por radiación no fue evidente, como también fue referido por Halac *et al.* (1997), Laurion *et al.* (1998) y Vinebrooke & Leavitt (1999). Sin embargo, algunos indicios de este proceso selectivo pudieron verse en el experimento n° 1 donde *Leptocylindrus* sp dominó en todos los tratamientos, y la co-dominancia con *Skeletonema. constatum* en el tratamiento que recibió solo PAR. Esto también concuerda con lo encontrado en Villafañe *et al.* (1995a) y Davison *et al.* (1996) quienes demostraron que la radiación jugó un papel fundamental en la estructura de la comunidad.

Deberían ser tenidas muy en cuenta las condiciones bajo las cuales se realizaron los experimentos a la hora de extrapolar los resultados obtenidos al total del ecosistema. En relación a esto, Sommaruga (2003) indicó la importancia del tamaño experimental de los recipientes al momento de evaluar el impacto de la RUV: en recipientes de pequeño tamaño, los efectos de la RUV pueden ser usualmente mas altos que en recipientes más grandes, probablemente porque en recipientes pequeños las células se encuentran expuestas a más “alta radiación “, y pueden estar desprovistas de ciertos mecanismos tales como la migración vertical o los efectos de mezcla. Sin embargo, el uso de pequeños containeres evita generalmente la presencia de grandes especímenes como los depredadores herbívoros. Este es un factor importante a tener en cuenta, ya que es sabido que la presencia de diferentes niveles tróficos puede alterar significativamente la respuesta de los organismos a la RUV, a diferencia de cuando se los estudia solos, como se ve en el estudio llevado a cabo por Mostajir *et al.* (1999). En un estudio durante 7 días en el estuario St. Lawrence en Canadá, dichos autores encontraron que un aumento de los niveles de RUV-B disminuía la abundancia de ciliados y del fitoplancton microplanctónico, resultando un “feedback” positivo hacia las bacterias, flagelados heterotróficos y nanofitoplancton. En suma, bajo un estrés de RUV, los ecosistemas desarrollaron una cadena alimenticia microbiana con preferencia hacia los herbívoros.

Se puede concluir que a la escala temporal utilizada en nuestros experimentos, los cambios en la composición de las comunidades se deben en mayor grado a los nutrientes disponibles y luego a la exposición a la RUV.

## Capítulo 4: Efecto combinado de la RUV y nutrientes sobre el crecimiento y fotosíntesis de cuatro especies fitoplanctónicas marinas.

### Resumen:

Se mostraron las diferentes respuestas de cuatro especies fitoplanctónicas marinas y su poder de aclimatación al ser sometidas por largo tiempo a la RUV (solar y artificial) y si la presencia de nutrientes agregados influye en la producción de compuestos que absorben RUV.,. Se realizaron experimentos de aproximadamente 1 semana de duración con cultivos de las diatomeas *Thalassiosira fluviatilis* (Hustedt) y *Chaetoceros gracilis* (Schütt) y los dinoflagelados *Heterocapsa triquetra* (Ehrenberg) Stein y *Prorocentrum micans* (Ehrenberg). Las muestras se colocaron en recipientes transparentes a la RUV y se incubaron bajo tres tratamientos de radiación: 1) Muestras que recibieron el total de la radiación (**PAB**, 280-700 nm). 2) Muestras que recibieron radiación fotosintéticamente activa PAR y RUV- A (**PA**, 320-700 nm) y 3) Muestras expuestas sólo a PAR (**P**, 400-700 nm). Al comenzar los experimentos, se agregaron un exceso de nutrientes (*i.e.* NaPO<sub>4</sub>H<sub>2</sub> y NaNO<sub>3</sub>) a un set de muestras de cada tratamiento de radiación (cultivos N), mientras que para el otro set de muestras se mantuvo la concentración original (medio f/2 modificado). Durante el transcurso de los experimentos se determinaron: crecimiento, concentración de compuestos que absorben RUV y rendimiento fotoquímico. Las tasas de crecimiento registradas fueron significativamente más altas ( $p < 0,05$ ) para los cultivos N que aquellas de los cultivos no enriquecidos y las más bajas se registraron en los tratamientos PAB. La inhibición fotosintética fue disminuyendo en el progreso del experimento en aquellos cultivos que recibieron nutrientes excepto en *H. triquetra*. Las diatomeas presentaron mayores velocidades de respuesta al cambio de nutrientes que de radiación, mientras que los dinoflagelados presentaron mayor rendimiento fotoquímico y los nutrientes influyeron en la acumulación de compuestos que absorben RUV en especial en *P. micans*. Los datos indican una fotoaclimatación vía la presencia de compuestos que absorben RUV y una selección hacia las especies mas RUV tolerantes.

## Introducción

EL impacto ecológico sobre comunidades naturales de fitoplancton por un incremento de RUV-B a partir de una depleción de ozono es un fenómeno complejo de determinar. Probablemente, la principal causa está dada por que no todas las especies responden de igual manera a dicho estrés (Wangberg *et al.*, 1996 Villafañe *et al.*, 2003). Varios trabajos muestran la diferente sensibilidad de las especies a la RUV, donde las primnesiofitas y los dinoflagelados son considerados por algunos autores (Calkings *et al.*, 1980, Hannach, 1998) los más “RUV-tolerantes”. Sin embargo, las diatomeas son a menudo dominantes en los blooms algales durante primavera y otoño en latitudes medias oceánicas y en verano en las zonas polares (ver capítulo 3). En este sentido, ciertos autores las han considerado menos susceptibles a la RUV-B que los dinoflagelados, tanto en condiciones naturales (Jokiel & York, 1984) como artificiales (Ekelund, 1990; Martínez *et al.*, 2000).

La mayoría de los estudios que se realizaron sobre especies fitoplanctónicas fueron durante experimentos de corto tiempo (pocas horas o pocos días) y las respuestas estuvieron dadas por declinaciones en el crecimiento como respuesta inmediata al estrés inicial. Otros estudios observaron que ciertas células fitoplanctónicas, sometidas a RUV-B por períodos mas largos, pueden aclimatarse a ese estrés e incluir, esencialmente a nivel individual, modificaciones en sus condiciones fisiológicas, como la presencia de compuestos que absorben RUV, mycosporine-like amino acids (MAAs) (Helbling *et al.*, 1996; Zudaire & Roy, 2001; Banaszak, 2003) ó carotenos (Underwood *et al.*, 1999). En estudios que se hicieron sobre diatomeas, en experimentos de corto tiempo, en general se observó que es muy baja la concentración de estos compuestos en relación a otros grupos (Jeffrey *et al.*, 1999), aunque sometidas a experimentos de largo tiempo se observó un vasto rango de respuesta a la RUV. (Zudaire, *et al.*, 2001). La presencia de estos MAAs no depende únicamente de la radiación solar; otros factores tales como salinidad, temperatura y disponibilidad de nutrientes pueden afectar en la acumulación de estos compuestos (Bandanarayake, 1998; Dunlap & Shick, 1998; Karsten & Wiencke, 1999). El Nitrógeno (N) es un componente crítico para el funcionamiento de los ecosistemas y de todos los procesos bioquímicos. Varios mecanismos de reparación en las células por

daños causados por la RUV involucran enzimas o cofactores con N en su estructura. Pese a que los MAAs son compuestos nitrogenados, son muy escasos los estudios sobre el efecto de la disponibilidad de nitrógeno en la producción de estos compuestos (Banaszak & Neale, 2001; Litchman *et al.*, 2002). Otros estudios llevados a cabo por Korbee Peinado *et al.* (2004) revelaron que no solo la cantidad y calidad de energía recibida induce la síntesis de MAAs en la rodofita *Porphyra columbina*, sino que el amonio en altas concentraciones incrementa significativamente el contenido de MAAs. Sin embargo, en otro estudio llevado a cabo con la especie de rodofita *Grateloupia lanceola* (Huovinen *et al.*, 2006), se encontró que, aunque el aumento en las concentraciones de amonio beneficiaban la recuperación de la actividad fotosintética, el contenido de MAAs no seguía el mismo patrón. En algunos caso es claro que el impacto de la RUV sobre el fitoplancton (expresado como una relación entre efecto negativo (neto) y la capacidad de aclimatación (*e.g.* con la presencia de compuestos potencialmente protectores) dependen no solo de la radiación solar a la que se encuentra expuesto sino a la interacción con otras variables ambientales.

En este capítulo de la tesis se intenta mostrar las diferentes respuestas de cuatro especies fitoplanctónicas marinas y su poder de aclimatación al ser sometidas por largo tiempo a la RUV (solar y artificial). Se estudió particularmente si son capaces de sintetizar compuestos que absorben RUV y si influye en la producción de los mismos la presencia de nutrientes agregados. Se trabajó con dos especies de diatomeas y dos dinoflagelados, las cuales fueron elegidas sobre la base de que son características de las comunidades fitoplanctónicas marinas de la Patagonia, y que experimentos previos de radiación mostraron que dichas diatomeas dominaron ampliamente en biomasa en relación a las especies de dinoflagelados (Marcoval *et al.*, 2008, en prensa)

## Experimentos bajo radiación artificial

### Materiales y métodos particulares

**Organismos y condiciones del cultivo:** Se trabajó con cultivos de tres especies fitoplanctónicas de diferentes tamaños: *Thalassiosira fluviatilis*, Hustedt (promedio tamaño celular 10  $\mu\text{m}$ ), *Heterocapsa triquetra* (Ehrenberg) Stein (promedio tamaño celular 20  $\mu\text{m}$ ) y *Prorocentrum micans* (Ehrenberg) (promedio tamaño celular 50  $\mu\text{m}$ ). Estas células estuvieron creciendo en un medio f/2 modificado (ver Cap. 2 metodología), en una cámara de cultivo iluminada (Sanyo modelo ML 350) a 20 ° C usando un fotoperíodo de 12:12 ciclo luz: oscuridad con una irradiancia (PAR) de 200  $\text{W m}^{-2}$  hasta el momento de la experimentación (ver abajo).

Previamente a la experimentación con diferentes tratamientos de radiación se sometió a las células a diferentes tratamientos de nutrientes, manteniendo constante la irradiancia (PAR) de 200  $\text{W m}^{-2}$  con el fin de determinar una concentración mínima necesaria para el crecimiento de los cultivos. Para ello se empleó agua de mar natural (sin agregado de nutrientes), hasta llegar a un agregado máximo de nutrientes (*i.e.*  $\text{NaPO}_4\text{H}_2$  y  $\text{NaNO}_3$ ) en concentraciones finales de 0.02 y 0.6 mM, respectivamente.

**Experimentación con Radiación UV/ muestras:** Para cada experimento se colocaron alícuotas del cultivo mono-específico en ocho recipientes de 4 litros, de policarbonato transparente a la RUV, por duplicado, en una cámara de cultivo bajo radiación artificial (ver capítulo 2), durante 7-10 días dependiendo la especie Siguiendo el diseño experimental básico descrito en el capítulo de metodología, fueron expuestos a cuatro tratamientos:

A) dos tratamientos de radiación

1) cuatro recipientes recibieron el total de la radiación: 300  $\mu\text{mol foto. m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  para PAR, 15  $\text{W m}^{-2}$  para UV-A, y 0.7  $\text{W m}^{-2}$  para UV-B (**trat. PAB**)

2) cuatro recipientes recibieron sólo luz PAR:  $300 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  para PAR (**trat. P**)

B) dos tratamientos de nutrientes:

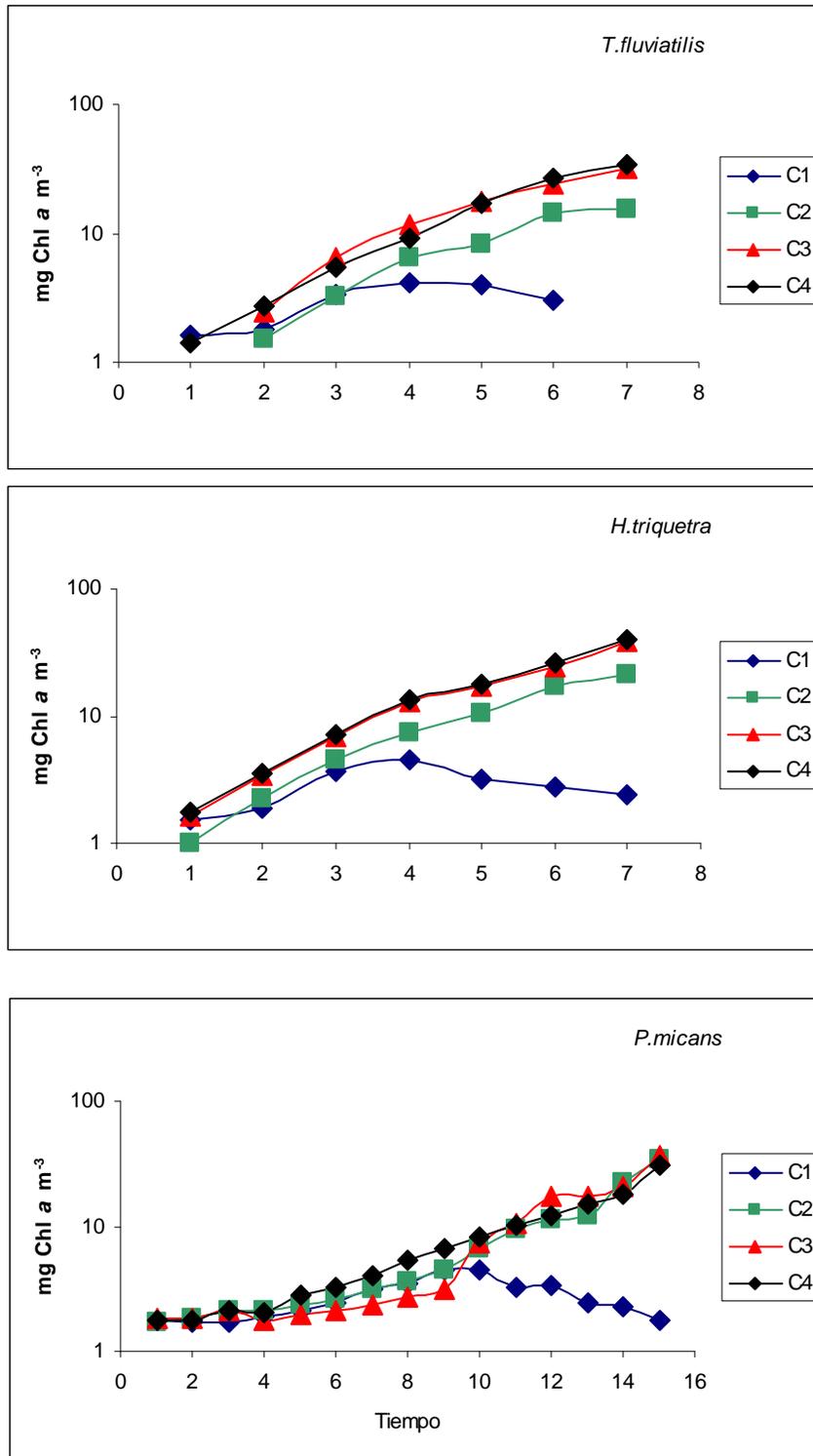
1) al comienzo del experimento a dos recipientes de cada tratamiento de radiación se le adicionó nitrógeno y fósforo en exceso (*i.e.*  $\text{NaPO}_4\text{H}_2$  y  $\text{NaNO}_3$ ) en concentraciones finales de 0.02 y 0.6 mM, **-cultivos N**

2) los otros dos recipientes mantuvieron la concentración original (medio f/2 modificado) **-cultivos N<sub>0</sub>**-(en concentraciones finales de 0.006 y 0.162 mM de  $\text{NaPO}_4\text{H}_2$  y  $\text{NaNO}_3$ ).

Diariamente fueron tomadas muestras para cuantificar clorofila *a*, determinar la presencia de MAAs a través del valor del pico de absorbancia en el rango de la RUV A (334-337nm) y para recuento celular. Se tomaron también muestras para análisis de Nitratos en tres oportunidades (comienzo, en la mitad y al final de cada experimento) con el fin de comparar la variación de su concentración con la presencia de los MAAs.

## Resultados:

En la Fig.4.1.1 se muestran las curvas de crecimiento estimado por Chl *a* para los cultivos de *Thalassiosira fluviatilis*, *Heterocapsa triquetra* y *Prorocentrum micans* antes de ser expuestos a los diferentes tratamientos radiación. Se observa claramente que es apenas apreciable el crecimiento en los cultivos con el agua de mar natural (C1), sin agregado de nutrientes, (**Tabla 4.1.1**) donde los máximos valores para Chl *a* son alcanzados aproximadamente al tercer día de experimentación (*i.e.* 4.08; 4.47 y 4.56  $\mu\text{g}$  Chl *a* para *T. fluviatilis*, *H. triquetra* y *P. micans*, respectivamente). Luego los valores decaen abruptamente, mientras que el crecimiento con las restantes concentraciones, no mostraron diferencias significativas, comparado con el control (C3). Con tales resultados, se eligieron las concentraciones C2 y C4 para los experimentos expuestos a diferentes radiaciones (**Tabla 4.1.1**)

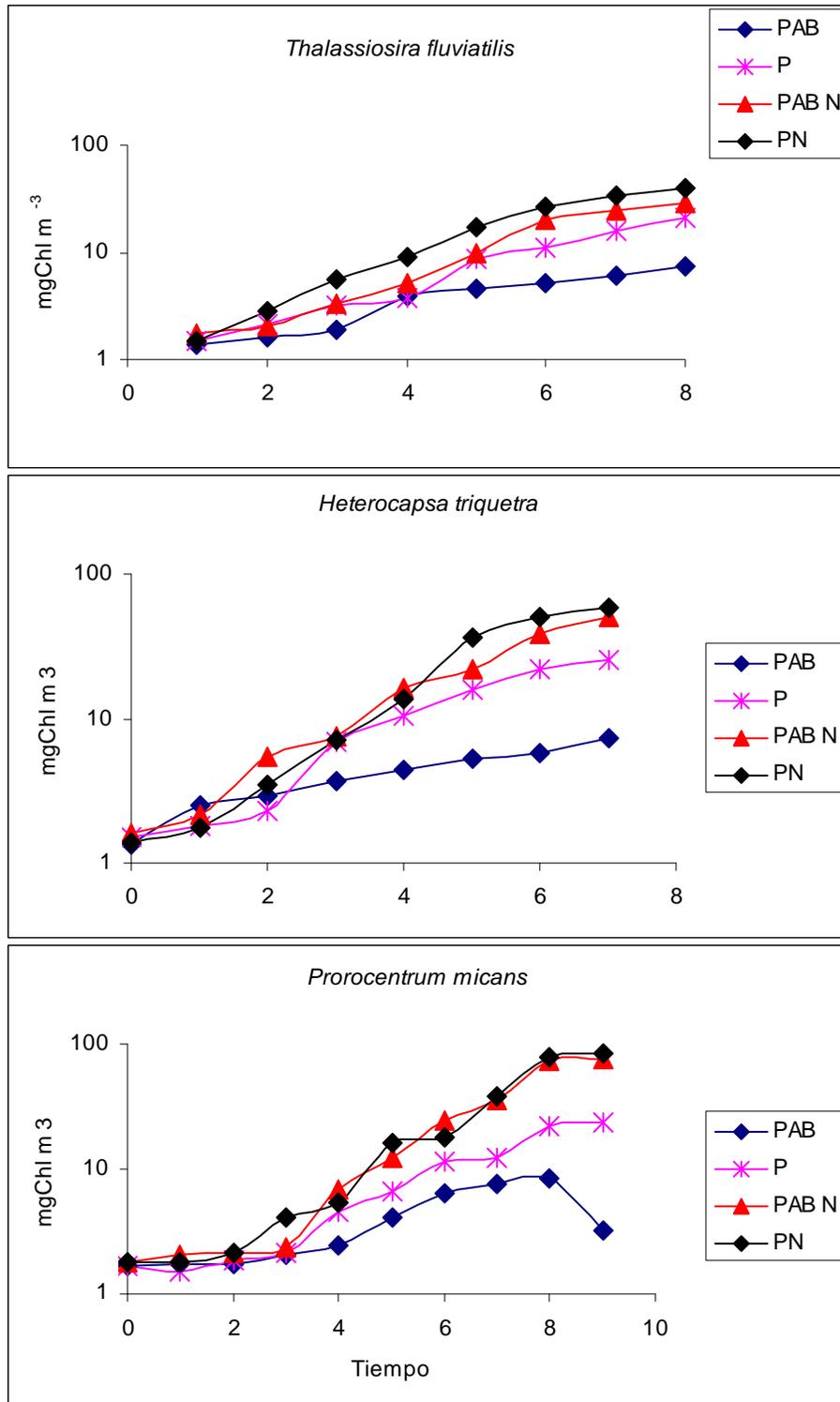


**Figura 4.1.1:** Curvas de crecimiento ( $\text{mg Chl } a \text{ m}^{-3}$ ) en función del tiempo para: *T. fluviatilis*, *P. micans*, y *H. triquetra* con cuatro concentraciones de nutrientes (ver tabla 4.1.1) con radiación PAR ( $200 \text{ Wm}^{-2}$ )

Concentraciones finales de NaPO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> y NaNO <sub>3</sub>	FOSFATOS (mM)	NITRATOS (mM)	Cultivo (Guillard f/2 modificado) adicionado.
<b>C1</b>	0.00035	0.00026	0.0 (agua de mar natural)
<b>C2</b>	0.00637	0.161	0.5 ml
<b>C3</b>	0.012	0.302	1.0 ml (recomendado por FAO. 1989)
<b>C4</b>	0.025	0.644	2.0 ml

**Tabla 4.1.1:** Concentraciones finales de los nutrientes NaPO<sub>4</sub>H<sub>2</sub> y NaNO<sub>3</sub> (mM) utilizados en los cultivos de *T. fluviatilis*, *H. triquetra* y *P. micans*, previamente a someterlos a tratamientos de radiación.

En la Fig. 4.1.2 se muestran las curvas de crecimiento (en mg Chl *a* m<sup>-3</sup>) para las tres especies durante los diferentes tratamientos nutrientes /radiación (dosis diarias de 12.96 mmol de fotones m<sup>-2</sup>, 0.64 MJ m<sup>-2</sup> y 30. 24 KJ m<sup>-2</sup> para PAR, RUV-A y RUV-B respectivamente). El tratamiento PAB alcanza los menores valores de concentración de Chl *a* en todas las especies, mientras que en los tratamientos P con y sin nutrientes y en el tratamiento PAB +N, las curvas de crecimiento son semejantes en todas las especies alcanzando los máximos valores en el tratamiento P+N de *P. micans* (83.5 mg Chl *a* m<sup>-3</sup>).



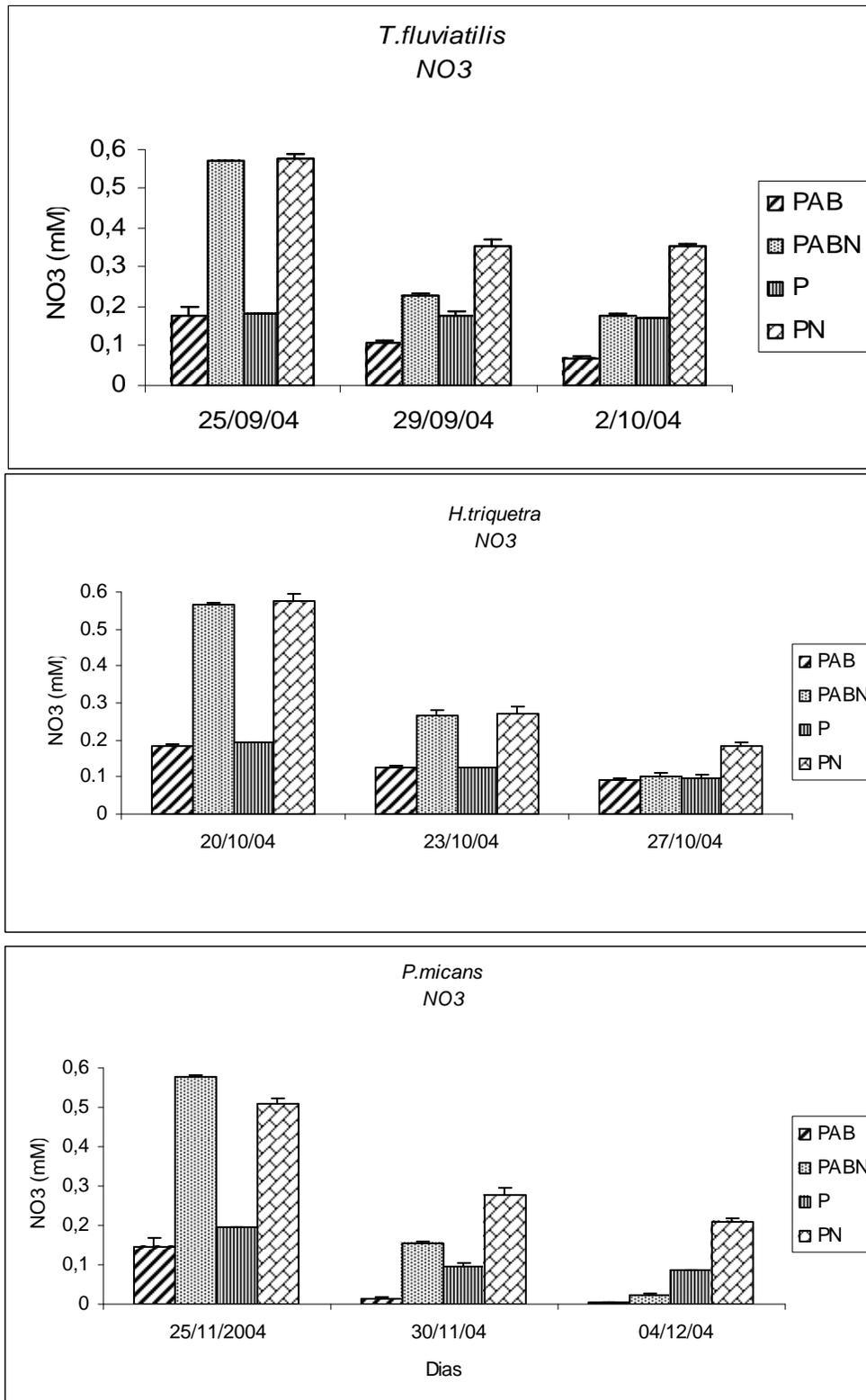
**Figura 4.1.2:** Curvas de crecimiento (mg Chl a m<sup>-3</sup>) en función del tiempo para: *T. Fluviatilis*, *P micans*, y *H. triquetra* para diferentes tratamientos radiación/nutrientes PAB: RUV y PAR; P: PAR. N denota nutrientes adicionales

Las tasas de crecimiento ( $\mu$ ) para los cultivos basados en las medidas de Chl *a* se presentan en la Tabla 4.1.2. Los valores mas bajos de  $\mu$  se registraron en los tratamientos PAB en todas las especies (*i.e.* 0.31, 0.21, y 0.32 día<sup>-1</sup> para, *T. fluviatilis*, *P. micans* y *H. triquetra*, respectivamente), mientras que los valores más altos se determinaron en los tratamientos P+N también en todas las especies (*i.e.* 0.63; 0,69 y 0.74 día<sup>-1</sup> en *T. fluviatilis*, *H. triquetra*, y *P. micans* respectivamente). *P. micans* presentó la mayor tasa de crecimiento para el tratamiento PAB+N, mientras que, *H. triquetra* presentó los menores valores para el tratamiento PAB.

<b>Tratamiento / cultivo</b>	<b><i>Thalassiosira fluviatilis</i></b>	<b><i>Heterocapsa triquetra</i></b>	<b><i>Prorocentrum micans</i></b>
<b>PAB</b>	0.31 (0.01)	0.21 (0.01)	0.32 (0.01)
<b>P</b>	0.39 (0.02)	0.45 (0.01)	0.38 (0.03)
<b>PAB_N<sup>+</sup></b>	0.45 (0.01)*	0.52 (0.01)*	0.60 (0.01)*
<b>P_N<sup>+</sup></b>	0.63 (0.02)*	0.69 (0.01)*	0.74 (0.02)*
<b>P(<math>\mu=\mu</math>N<sup>+</sup>)</b>	<0.05	<0.05	<0.05

**Tabla 4.1.2:** Tasa de crecimiento ( $\mu$ , en día<sup>-1</sup>) de *T. fluviatilis*, *H. triquetra* y *P. micans* expuestas a diferentes tratamientos de nutrientes / radiación. Los tratamientos de radiación son indicados por PAB (PAR+UVA+UVB), y P (solo PAR). N indica cultivos con nutrientes adicionales. P ( $\mu=\mu$ N<sup>+</sup>) indica grado de significancia entre medias de los mismos tratamientos de radiación. Los asteriscos indican diferencias significativas entre los tratamientos de nutrientes (*i.e.* comparando el mismo tratamiento de radiación).

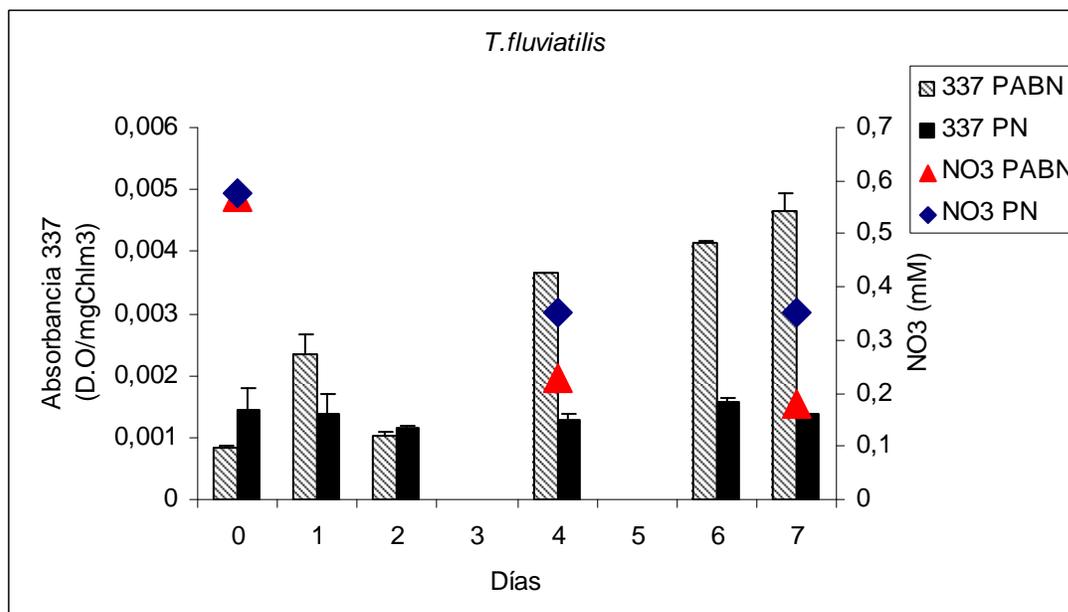
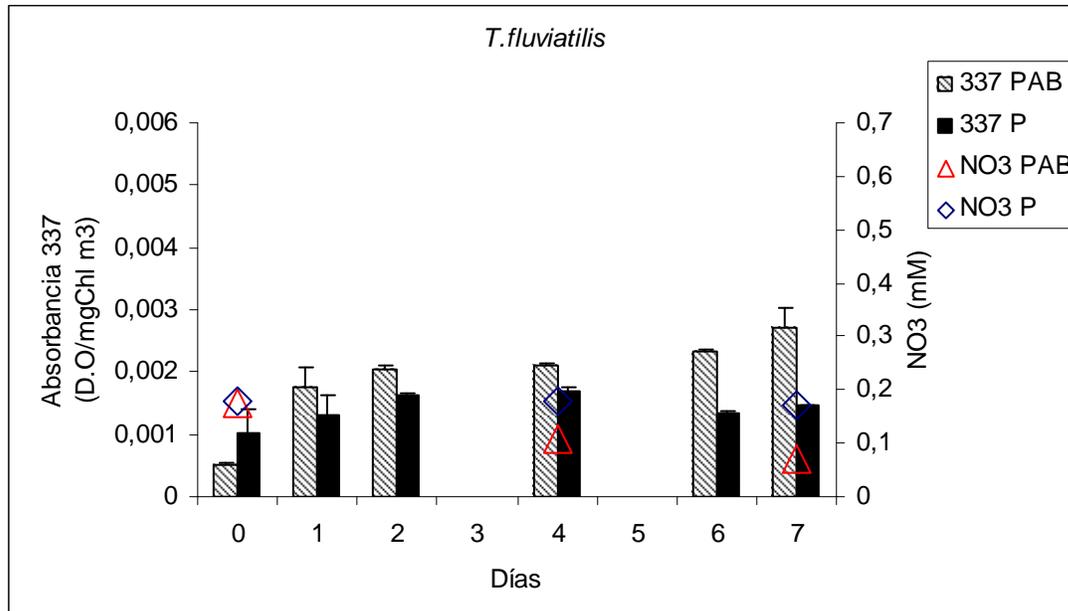
En la figura 4.1.3 observamos el grafico de la variación de nitratos durante el progreso de los experimentos para las tres especies testeadas. Podemos observar que las concentraciones de los nutrientes nitrogenados (*i.e.* NaNO<sub>3</sub>) fueron disminuyendo a medida que transcurrían los experimentos en las tres especies.



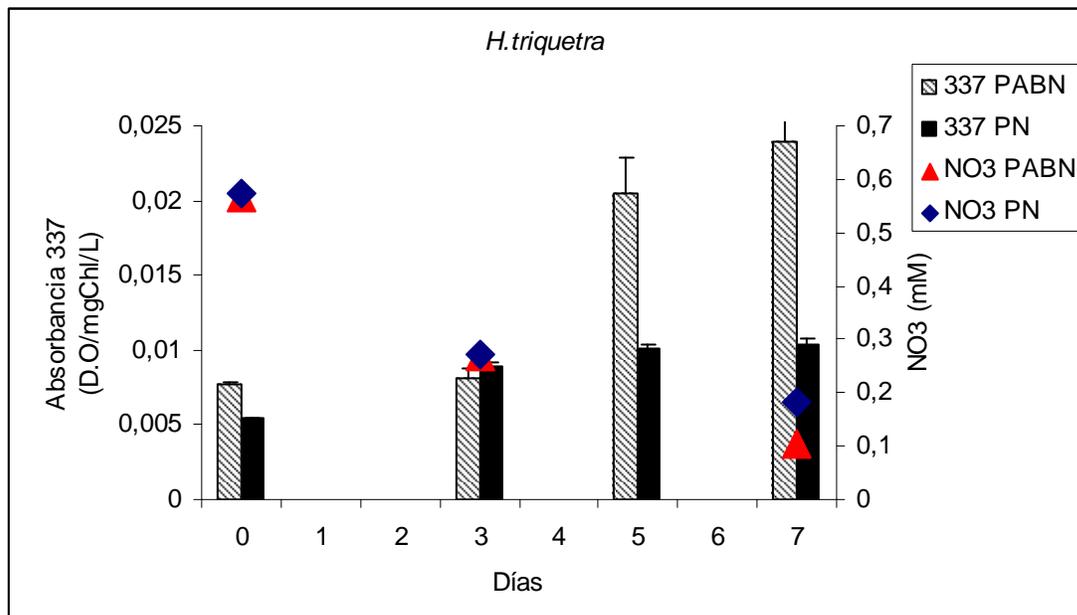
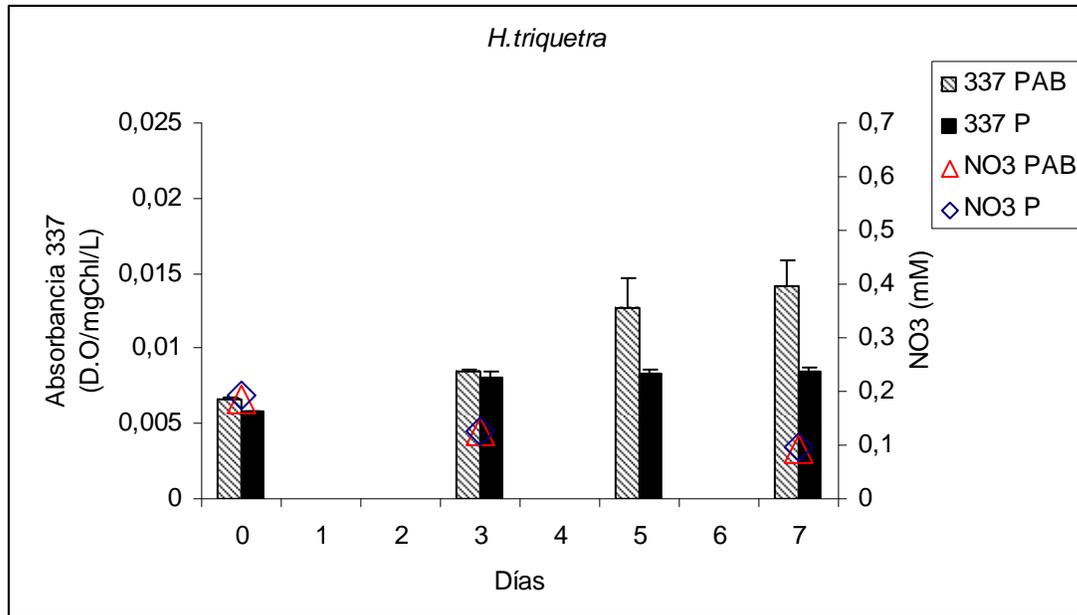
**Figura 4.1.3:** Concentración de nitratos al comienzo, a la mitad y al final de los experimentos para *T. fluviatilis*, *H. triquetra* y *P. micans* en los diferentes tratamientos radiación/nutrientes

En el cultivo de *T. fluviatilis* en el tratamiento P+N la concentración de nitrato decreció de 0.57 a 0.35 mM durante los primeros cinco días y esa concentración se mantiene constante hasta el final del experimento, mientras que en el tratamiento PAB +N continúa la disminución hasta el octavo día, alcanzando valores de 0.17 mM. En los tratamientos sin nutrientes agregados, los valores se mantienen prácticamente constantes en el tratamiento P con valores de 0.18 mM, mientras que en el tratamiento PAB disminuyen progresivamente de 0.17 a 0.07 mM hacia el último día de experimento. En los cultivos de *H. triquetra* se presenta un patrón semejante pero con una disminución en todos los tratamientos alcanzando valores de 0.18 y 0.10 mM para P y PAB con nutrientes adicionales y valores de 0.09 mM para P y PAB. *P. micans* mostró una rápida disminución de la concentración de nitratos en los primeros 5 días, variando de 0.57 a 0.15 mM para el tratamiento PAB +N. Algo similar ocurrió en los demás tratamientos, observándose las menores concentraciones al final de los experimentos con valores de 0.0025, 0.02, 0.08 y 0.2 mM para PAB, PAB +N, P y P + N, respectivamente.

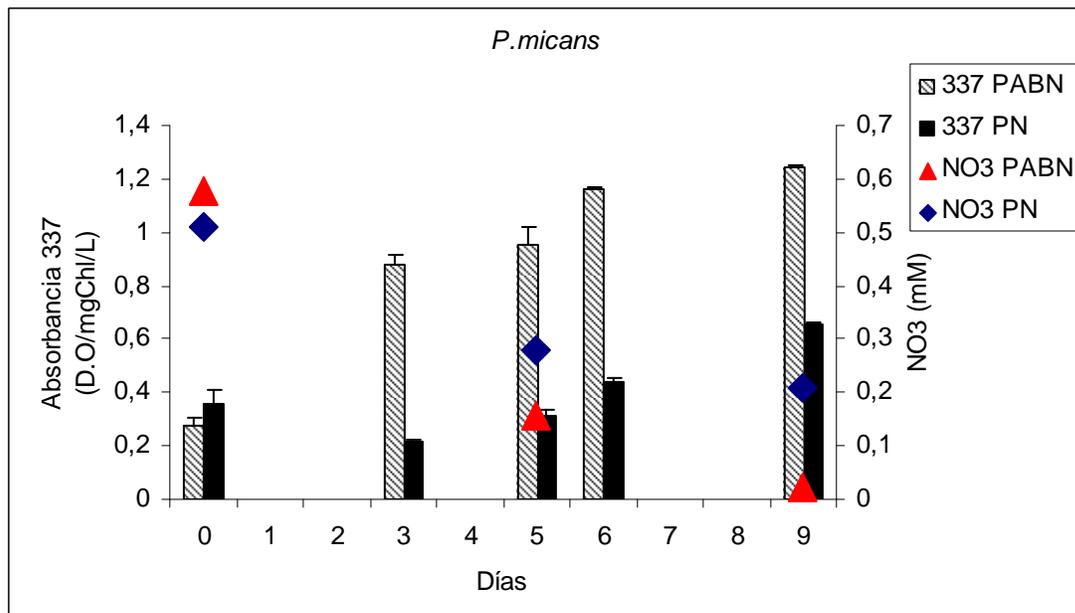
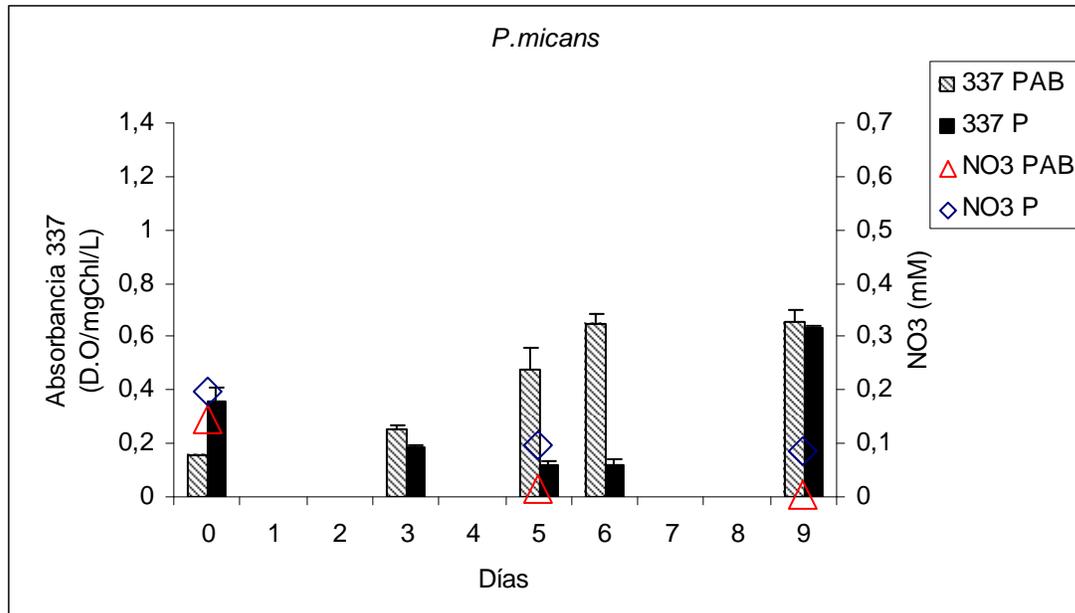
En base a las características del espectro de absorción (D. O. mg Chl  $a^{-1}$ ) de las tres especies usadas en el experimento, en las Figs. 4.1.4, 4.1.5 y 4.1.6 se representan la variabilidad temporal, durante los experimentos, de los compuestos potencialmente protectores (*i.e.* compuestos que absorben RUV) junto con la concentración de NO<sub>3</sub> para las tres especies testeadas. Al comienzo de los experimentos los compuestos que absorben RUV (rango: 310-360 nm) fueron especialmente abundantes en *P. micans*, pero estuvieron en muy bajas concentraciones (o virtualmente ausentes) en las otras dos especies testeadas.



**Figura 4.1.4: Evolución del pico de absorbancia 334-337, y concentración de NO3 para *T. Fluviatilis*, bajo diferentes tratamientos de nutrientes / radiación artificial. PAB: RUV y PAR; P: PAR. N denota nutrientes agregados**



**Figura 4.1.5: Evolución del pico de absorbancia 334-337, y concentración de NO3 para *H. triquetra* bajo diferentes tratamientos de nutrientes / radiación artificial. PAB: RUV y PAR; P: PAR. N denota nutrientes**



**Figura 4.1.6: Evolución del pico de absorbancia 334-337, y concentración de NO3 para *P. micans* bajo diferentes tratamientos de nutrientes / radiación artificial. PAB: RUV y PAR; P: PAR y N denota nutrientes**

En general hubo una tendencia en todas las especies al incremento de los compuestos en función del tiempo. En estas especies la concentración mas alta de compuestos que absorben RUV estuvo representada en los cultivos que recibieron nutrientes adicionales, mientras que en los cultivos expuestos a P sin adición de nutrientes mantuvieron aproximadamente la misma concentración que al comienzo del experimento. En *T. fluviatilis* (Fig. 4.1.4) en las muestras enriquecidas y expuestas a PAB se incrementaron la concentración de los compuestos que absorben RUV a lo largo del experimento a medida que la concentración de los nutrientes iba disminuyendo, mostrando una correlación negativa ( $R_{(OD/NO_3)}=-0.94$ ,  $p < 0.05$ ) Por otro lado, en relación a los tratamientos de radiación, las muestras que recibieron sólo PAR mantuvieron prácticamente la misma concentración de compuestos durante los días que duró la experimentación( $R_{(OD/NO_3)}=-0.3$ ,  $p < 0.05$ )

En *H. triquetra* (Fig. 4.1.5) el incremento de los compuestos que absorben RUV fue más evidente pero solo en muestras expuestas al total de la radiación y especialmente en muestras enriquecidas. ( $R_{(OD/NO_3)}=-0.89$ ,  $p < 0.05$ ) En todos los demás tratamientos la concentración se mantuvo baja a lo largo del tiempo. ( $R_{(OD/NO_3)}=-0.48$ ,  $p < 0.05$ ) Finalmente, un comportamiento similar a *H. triquetra* se observó en *P. micans* (Fig. 4.1.6). En las muestras expuestas a PAB se incrementaron en forma considerable la concentración de compuestos que absorben RUV hacia el final del experimento, especialmente en los cultivos N. ( $R_{(OD/NO_3)}=-1$ ,  $p < 0.002$ ) Sin embargo, los tratamientos sin adición de nutrientes también mostraron un incremento significativo de los compuestos ( $R_{(OD/NO_3)}=-0.885$ ,  $p < 0.05$ )

Con el fin de determinar las respuestas de estas mismas especies a las diferentes condiciones ambientales y el comportamiento a la exposición de irradiancias naturales se presentan a continuación experimentos bajo radiación solar con la utilización de un fluorómetro de amplitud de pulso, técnica reciente utilizada en fotobiología.

## Experimentos bajo radiación solar: Water phyto-PAM.

### Materiales y métodos particulares

**Organismos y condiciones del cultivo:** Se trabajó con los mismos cultivos anteriormente citados y se agregó para esta serie de experimentos una nueva especie de diatomea también presente en la comunidad fitoplanctónica patagónica: *Chaetoceros gracilis* Schütt (promedio tamaño celular 5µm) Previamente a los experimentos las células estuvieron creciendo en un medio f/2 modificado (ver Cap. 2 de metodología), en una cámara de cultivo iluminada (Sanyo modelo ML 350) a 20 ° C con un fotoperíodo de 12:12 ciclo luz: oscuridad con una irradiancia (PAR) de 200 W m<sup>-2</sup> hasta el momento de la experimentación (ver abajo). Los experimentos se llevaron a cabo en la EFPU entre el 2 de febrero y el 20 de marzo del 2005 en las siguientes fechas:

- experimento con *Chaetoceros gracilis* se llevó a cabo del 2 al 8 de febrero.
- experimento con *Thalassiosira fluviatilis* se llevó a cabo del 11 al 16 de febrero.
- experimento con *Prorocentrum micans* se extendió del 28 de febrero al 7 de marzo.
- experimento con *Heterocapsa triquetra* se extendió del 14 al 20 de marzo.

**Experimentación / muestras:** Para cada experimento se colocaron alícuotas del cultivo mono-específico en doce recipientes de 1 litro y de policarbonato transparente a la RUV, por duplicado siguiendo el diseño experimental básico descrito en el capítulo 2. Se expusieron a cinco tratamientos:

A) tres tratamientos de radiación

- 1) cuatro recipientes recibieron el total de la radiación (**tratamiento PAB**)
- 2) cuatro recipientes recibieron luz PAR y RUV-A (**tratamiento PA**)
- 3) cuatro recipientes recibieron por lo tanto sólo luz PAR (**tratamiento P**)

B) dos tratamientos de nutrientes:

1) al comienzo del experimento a dos recipientes de cada tratamiento de radiación se le adicionó nitrógeno y fósforo en exceso (*i.e.* NaPO<sub>4</sub>H<sub>2</sub> y NaNO<sub>3</sub>) en concentraciones finales de 0,02 y 0,6 mM, **-cultivos N-**.

2) los otros dos recipientes mantuvieron la concentración original (medio f/2 modificado) **-cultivos N<sub>0</sub>-**.

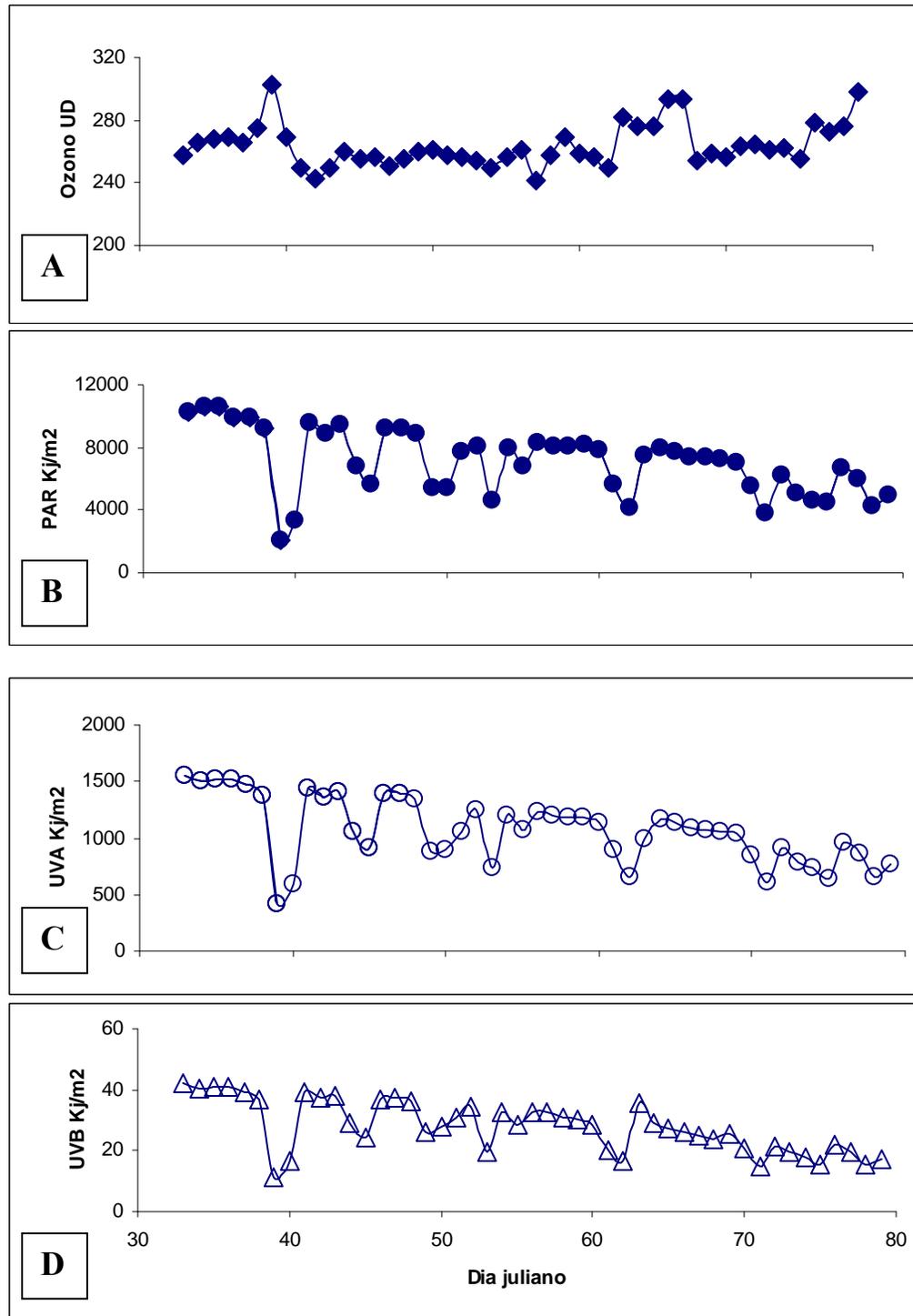
Se siguió la metodología de muestreos de los experimentos con radiación artificial anteriormente mencionados en este capítulo. Conjuntamente con estas muestras, y como datos complementarios a la investigación, fueron tomadas cada día sub-muestras (*i.e.* 8am, 1pm y 5pm) con el fin de obtener parámetros de fluorescencia (*i.e.* rendimiento fotoquímico del fotosistema II (Yield)). Se tomaron también muestras para análisis de Nitratos en tres oportunidades (comienzo, en la mitad y al final de cada experimento).

## **Resultados:**

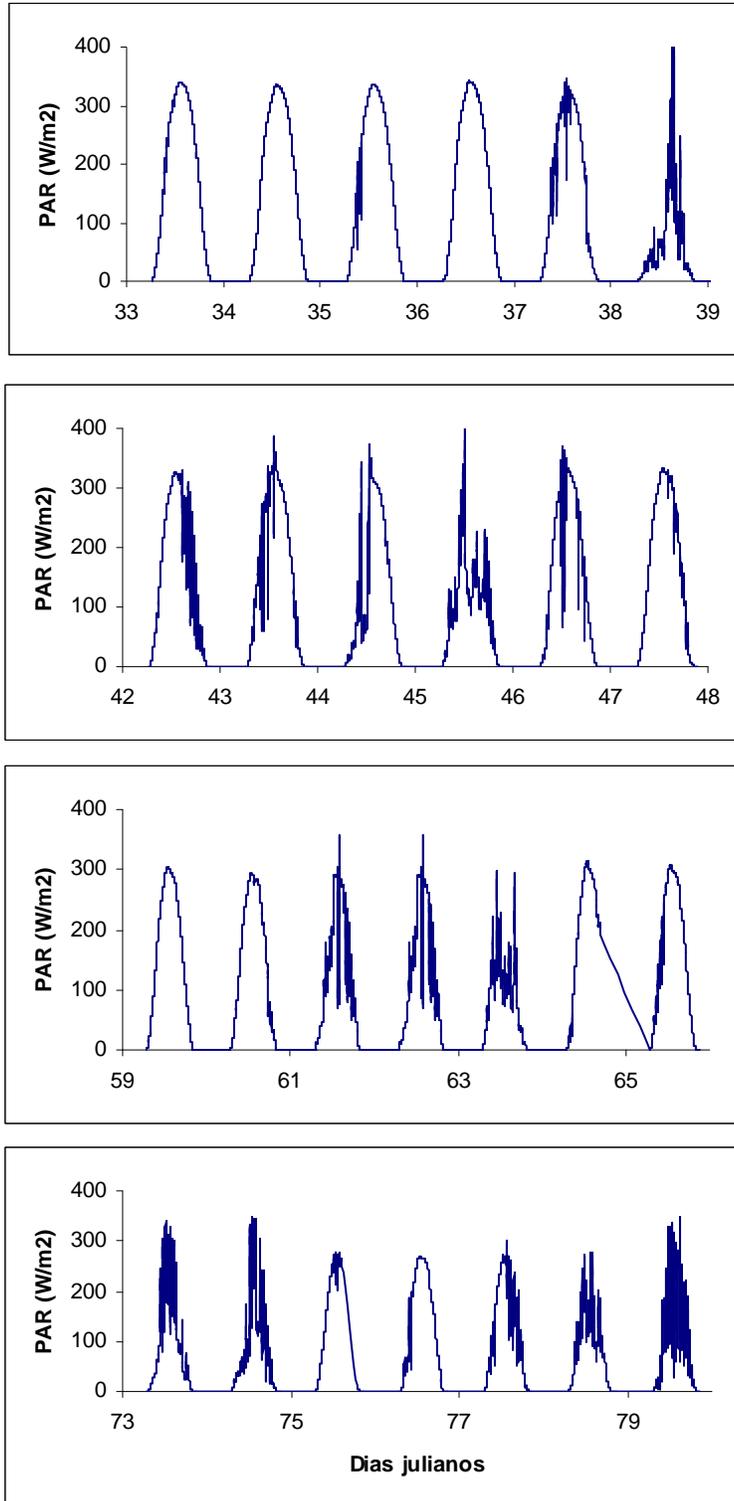
Las dosis diarias de radiación y valores de concentración de la columna de ozono durante el período de experimentación - 2 de febrero al 20 de marzo de 2005 (día juliano 33 a 79) se muestran en la Fig. 4.2.1. Los datos de concentración de la columna de Ozono para Playa Unión obtenidos de <http://toms.gsfc.nasa.gov/> muestran una gran variabilidad con valores máximos y mínimos de 298 y 241 Unidades Dobson (U.D) en los días Julianos 79 y 57, respectivamente (Fig. 4.2.1A). Las dosis diarias registradas para PAR, UV-A y UV-B (Figs. 4.2.1B-D) muestran una gran variabilidad día tras día en todos los experimentos debido a la presencia de nubes, pero sin embargo se observó una clara tendencia de disminución de valores hacia el final del período de estudio. La dosis diaria de UV-B varió entre 11 y 42 KJ m<sup>-2</sup> (Fig. 4.2.1B) mientras que UV-A entre 400 y 1500 KJ m<sup>-2</sup> (Fig. 4.2.1C). La radiación PAR siguió la misma tendencia que UVR con un rango de dosis diarias entre 2100 y 10500 KJ m<sup>-2</sup> (Fig. 4.2.1D). La relación de UV-B a PAR se extendió durante el período de estudio entre 0.33% y 0.51%, en los días Julianos 68 y 50, respectivamente.

La variación de la radiación solar incidente PAR para cada período de estudio se muestra en la Fig. 4.2.2, en general los máximos valores de PAR registrados fueron durante los experimentos con *Chaetoceros gracilis* (Fig. 4.2.2A) y *Thalassiosira*

La variación de la radiación solar incidente PAR para cada período de estudio se muestra en la Fig. 4.2.2, en general los máximos valores de PAR registrados fueron durante los experimentos con *Chaetoceros gracilis* (Fig. 4.2.2A) y *Thalassiosira fluviatilis* (Fig. 4.2.2B) ( $\sim 350 \text{ W m}^{-2}$ ) en lugar de aquellos llevados a cabo con los dinoflagelados ( $\sim 300 \text{ W m}^{-2}$ ) (Figs. 4.2.2 C y D). En general, los máximos valores de PAR (así como también los de UV-A y UV-B, datos no mostrados) fueron similares dentro de cada experimento, excepto para los dos últimos días en el experimento de *C. gracilis* (Fig. 4.2.2A) donde la cobertura de las nubes resultó en una reducción de 50% en las dosis diarias de radiación solar.



**Figura 4.2.1:** Valores de Ozono y Dosis diarias de radiación PAR, , UV-A y UV-B, durante el período que duraron los experimentos que abarca desde el 2 de febrero al 20 de marzo de 2005.



**Figura 4.2.2:** Variación diaria de irradiancia PAR (en  $W\ m^{-2}$ ) durante el período de experimentación (desde el 2 de febrero al 20 de marzo de 2005).

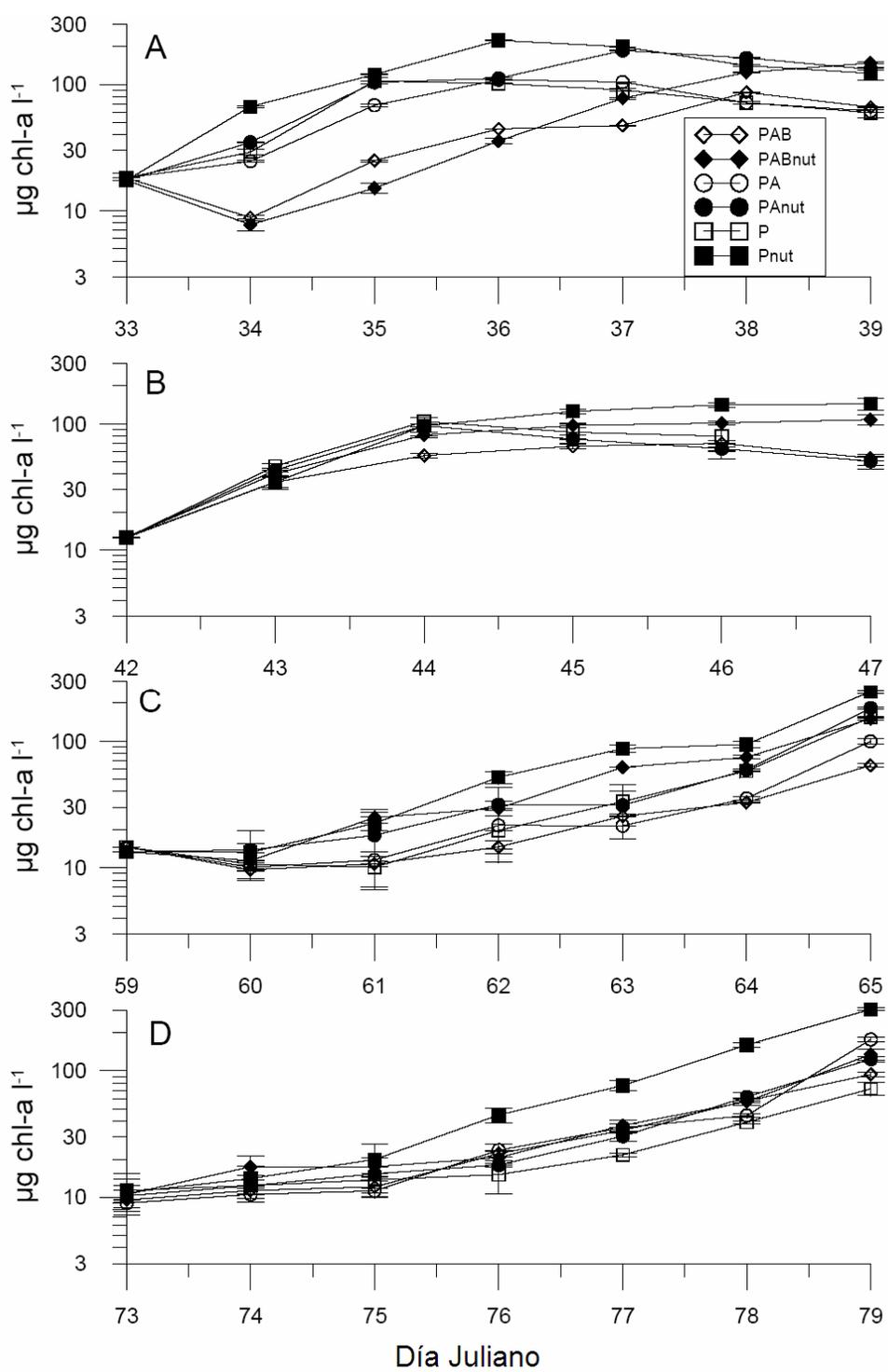
Las curvas de crecimiento (representadas por concentraciones de Chl *a*) para *C. gracilis*, *T. fluviatilis*, *P. micans* y *H. triquetra* expuestas a diferentes tratamientos radiación/nutrientes se muestran en la Fig.4.2.3. El rasgo observado mas evidente fue la falta de fase *lag* en las diatomeas (Fig. 4.2.3A –D) excepto para las muestras de *C. gracilis* expuestas al total de la radiación. En los otros tratamientos la concentración de células de *C. gracilis* y Chl *a* se incrementó tan pronto como el experimento comenzó (Fig. 4.2.3 A). En las muestras expuestas a los tratamientos P y PA también se observó un mayor crecimiento en general en aquellos cultivos que recibieron nutrientes adicionales, con valores de concentración de Chl *a* más altos que aquellos que no los recibieron. En suma, los tratamientos con nutrientes adicionales, bajo condiciones de PAB, presentaron bajas concentraciones de células y Chl *a* durante la mayor parte del tiempo que duro el experimento. Sin embargo, al final estos alcanzan concentraciones similares que los tratamientos PA y P.

Durante el experimento llevado a cabo con *T. fluviatilis* (Fig. 4.2.3B) fueron determinadas curvas de crecimiento similares en todos los tratamientos durante los primeros dos días. Posteriormente, las muestras que recibieron nutrientes adicionales bajo los tratamientos P y PA fueron las que mostraron los mayores valores de concentración de Chl *a*. Sin embargo, la concentración de células fue la misma en los tres tratamientos de radiación (datos no mostrados). Las muestras en el experimento llevado a cabo con *P. micans* (Fig. 4.2.3C) tuvieron una fase *lag* de 1-2 días y luego las concentraciones de células y Chl *a* incrementaron en todos los tratamientos con los valores mas altos representados en el tratamiento P+ N. Finalmente, en el experimento con *H. triquetra* (Fig. 4.2.3D) hubo una fase *lag* de tres días, después de la cual las muestras P+N mostraron los mayores valores de crecimiento.

Tratamiento / cultivo	<i>Chaetoceros gracilis</i>	<i>Thalassiosira fluviatilis</i>	<i>Prorocentrum micans</i>	<i>Heterocapsa triquetra</i>
PAB	0.52 (0.01)	0.41(0.02)	0.44(0.03)	0.49 (0.02)
PA	0.64 (0.02)	1.02 (0.03)	0.77 (0.01)	0.61 (0.03)
P	0.89 (0.01)	1.05 (0.03)	0.75 (0.01)	0.63 (0.01)
PAB_N <sup>+</sup>	0.62 (0.01)*	0.68 (0.02) *	0.50 (0.02)*	0.61 (0.03)*
PA_N <sup>+</sup>	0.59 (0.01)	1.08 (0.01)	0.74 (0.03)	0.65 (0.02)
P_N <sup>+</sup>	0.85(0.01)	1.06 (0.01)	0.97 (0.01)*	0.69 (0.01)*

**Tabla 4.2.1:** Tasa de crecimiento ( $\mu$ , en día<sup>-1</sup>) de *C.gracilis* sp, *T. fluviatilis* P. *micans* y *H. triquetra* expuestas a diferentes tratamientos de nutrientes / radiación. Los tratamientos de radiación son indicados por PAB (PAR+UVA+UVB), PA (PAR+UVA), y P (solo PAR). N indica cultivos con nutrientes adicionales. Los asteriscos indican diferencias significativas entre tratamientos de nutrientes dentro del mismo tratamiento de radiación ( $p < 0,05$ )

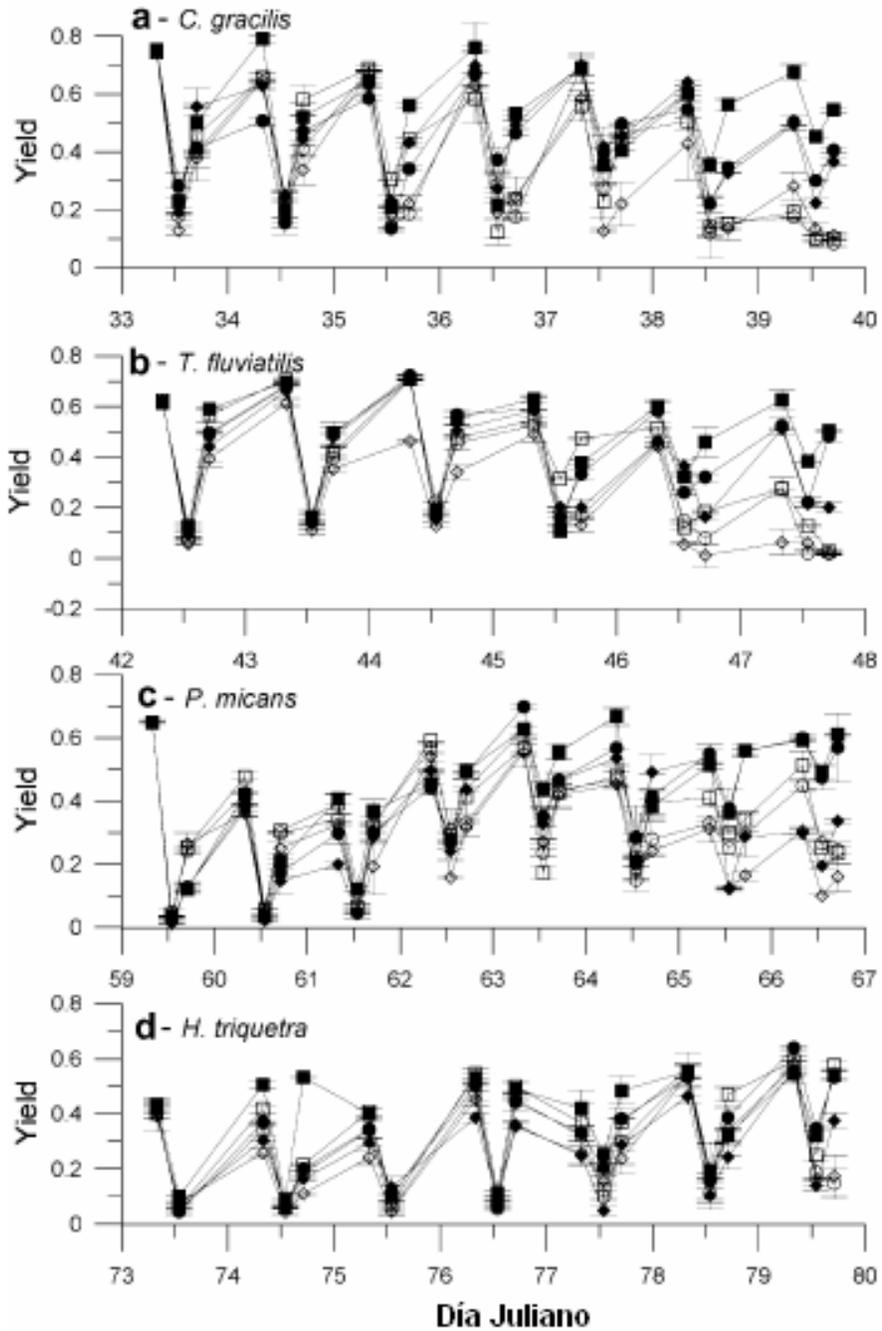
Las tasas de crecimiento ( $\mu$ ) para los cultivos basados en las medidas de Chl *a* se presentan en la Tabla 4.2.1. Los valores mas bajos de  $\mu$  se registraron en los tratamientos PAB (no enriquecidos) en todas las especies (*i.e.* 0.52, 0.41, 0.44 y 0.49 día<sup>-1</sup> en *C. gracilis*, *T. fluviatilis*, *P. micans* y *H. triquetra*, respectivamente), mientras que los valores más altos se determinaron en los tratamientos P+N también en todas las especies (*i.e.* 0.85; 1.06, 0.97 y 0.69 día<sup>-1</sup> in *C. gracilis*, *T. fluviatilis*, *P. micans* y *H. triquetra*, respectivamente). Sin embargo, en los cultivos enriquecidos únicamente en los tratamientos que recibieron el total de la radiación las tasas de crecimiento fueron significativamente más altas ( $p < 0.05$ ) en relación a los cultivos no enriquecidos. Por otro lado entre los mismos tratamientos de radiación, las tasas de crecimiento del tratamiento PAB fueron significativamente más bajas ( $P < 0.05$ ) que en el tratamiento P para las cuatro especies fitoplanctónicas.



**Figura 4.2.3:** Curvas de crecimiento ( $\mu\text{g Chl } a \text{ m}^{-3}$ ) en función de los días julianos para *C. gracilis*, *T. fluviatilis*, *P. micans*, y *H. triquetra* durante el período de experimentación.

Similares conclusiones sobre las tasas de crecimiento se obtuvieron a partir de los valores de concentración de células (datos no mostrados).

Las variaciones diarias de la eficiencia fotosintética (Y) son mostradas en la Fig. 4.2.4. El patrón general para las cuatro especies fue que Y decrece significativamente cerca del mediodía local en todos los tratamientos, aunque fue observada una recuperación durante la tarde y noche. En *C. gracilis* (Fig 4.2.4a), Y fue decreciendo significativamente a lo largo del experimento con valores iniciales de 0.7 hacia valores ~0.1 en los cultivos no enriquecidos y ~0.4-0.5 en cultivos enriquecidos al final del período de experimentación (Fig. 4.2.4 a). En los cultivos no enriquecidos no se presentaron diferencias significativas en Y al final del experimento entre tratamientos de radiación, mientras que en los enriquecidos, las muestras expuestas a PAR presentaron valores significativamente mas altos en relación a los tratamientos PAB y PA. Similares resultados se obtuvieron cuando el experimento se repitió con *T. fluviatilis*. (Fig. 4.2.4b) donde al final del experimento Y decreció significativamente desde valores iniciales de 0.6 a 0.3-0.5 en muestras enriquecidas bajo los tratamientos PAB y PA/P, respectivamente a valores de 0.1 en todos los tratamientos de radiación en cultivos no enriquecidos. En cultivos de *P. micans* (Figs. 4.2.4c) las curvas de Y también muestran valores significativamente mas altos en cultivos enriquecidos que en los no enriquecidos. Sin embargo el tratamiento PAB+N presentó valores significativamente mas bajos (*i.e.* 0.3) que aquellos bajo los tratamientos PA/P (*i.e.* 0.5-0.6) al final de la experimentación. Resulta interesante destacar que hubo un fuerte incremento de Y al mediodía local presentando valores ~0 durante los primeros 3 días, incrementando a > 0.1 a medida que el experimento fue progresando. Finalmente, en el experimento llevado a cabo con *H. triquetra* (Figs.4.2.4d) hubo una fuerte inhibición al final del día, que fue evidente durante la mañana temprano de los primeros días. Sin embargo los valores de Y se incrementaron con el tiempo al final del experimento en muestras enriquecidas bajo los tratamientos PA y P. Muestras no enriquecidas del tratamiento P presentaron al final del experimento valores significativamente más altos (> 0.5) que el resto de las muestras de los otros dos tratamientos de radiación (PA y PAB). Estos valores fueron aún mas altos que los valores medidos al comienzo del experimento (*i.e.* 0.4-Fig. 4.2.4d).



**Figura 4.2.4:** Rendimiento fotoquímico (Yield) del fotosistema II a las 8, 13 y 17 h en función de los días julianos para a-*C. gracilis*, b-*T. Fluviatillis*, c- *P micans* y d- *H. triquetra* durante el periodo de experimentación. Los símbolos indican los diferentes tratamientos nutrientes/radiación impuestos a las muestras: círculo, muestras expuestas a luz PAR + RUV-A; diamantes, muestras expuestas al total de la radiación, (PAR+RUV) y cuadrados, muestras expuestas solamente a luz visible (PAR). Los símbolos abiertos indican muestras sin adición de nutrientes y los rellenos, indican nutrientes agregados.

Tratamiento/tiempo	T0 (mM)	T1 (mM)	Tf (mM)
P	0.078 (0.01)	0.053 (0.01)	0.042 (0.01)
PA	0.075 (0.02)	0.051 (0.02)	0.041 (0.01)
PAB	0.076 (0.03)	0.031 (0.02)	0.028 (0.01)
P +N	0.122 (0.03)	0.098 (0.02)	0.065 (0.02)
PA +N	0.120 (0.05)	0.091 (0.02)	0.072 (0.01)
PAB +N	0.126 (0.05)	0.071 (0.01)	0.035 (0.01)

**Tabla 4.2.2:** Valores promedio de la concentración de  $\text{NO}_3$  (y sus desvíos estándares) en función del tiempo para cada tratamiento radiación/nutrientes de la cuatro especies estudiadas en los experimentos.

En relación a la concentración de  $\text{NO}_3$  (mM), esta fue variando durante el progreso de los experimentos en las cuatro especies estudiadas. En la tabla 4.2.2 podemos observar que el nivel de nutrientes nitrogenados (*i.e.*  $\text{NaNO}_3$ ) fue disminuyendo a medida que transcurrían los experimentos presentándose el mismo patrón de variación sobre las cuatro especies. Los cultivos sin nutrientes adicionales, independientemente del tratamiento de radiación, presentaron una mayor tasa de disminución que aquellos cultivos con nutrientes adicionales ya que al mismo tiempo (T1), en los cultivos P, PA y PAB se registraron valores entre un 30 y 50 % de los nutrientes nitrogenados, mientras que en los cultivos con nutrientes adicionales los valores disminuyeron entre 20 y 40 %. La relación varió hacia el final del experimento (Tf) ya que los cultivos P y PA mantuvieron aproximadamente constante el nivel de nutrientes alcanzando valores hasta un 50 % de la concentración original. Por su parte, el nivel de nitratos en los tratamientos P +N y PA +N continuaron bajando hasta llegar aproximadamente de la misma manera a un 50% de la concentración original, mientras que aquellos cultivos con y sin nutrientes adicionales bajo el tratamiento PAB presentaron un mayor decrecimiento en los nutrientes que en el resto de los tratamientos de radiación, con valores al final del experimento del 63% y del 71% de los  $\text{NaNO}_3$  originales para PAB y PAB +N, respectivamente.

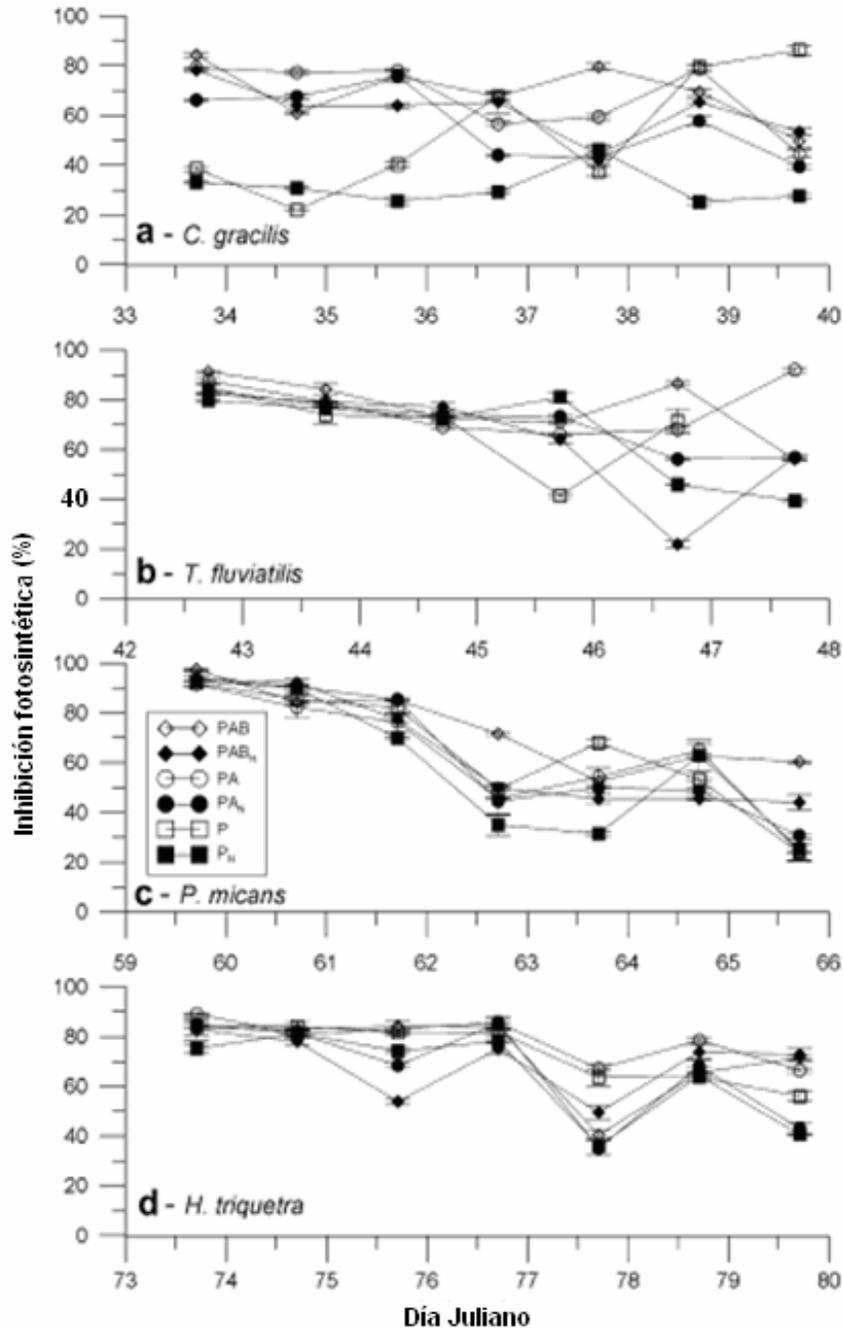
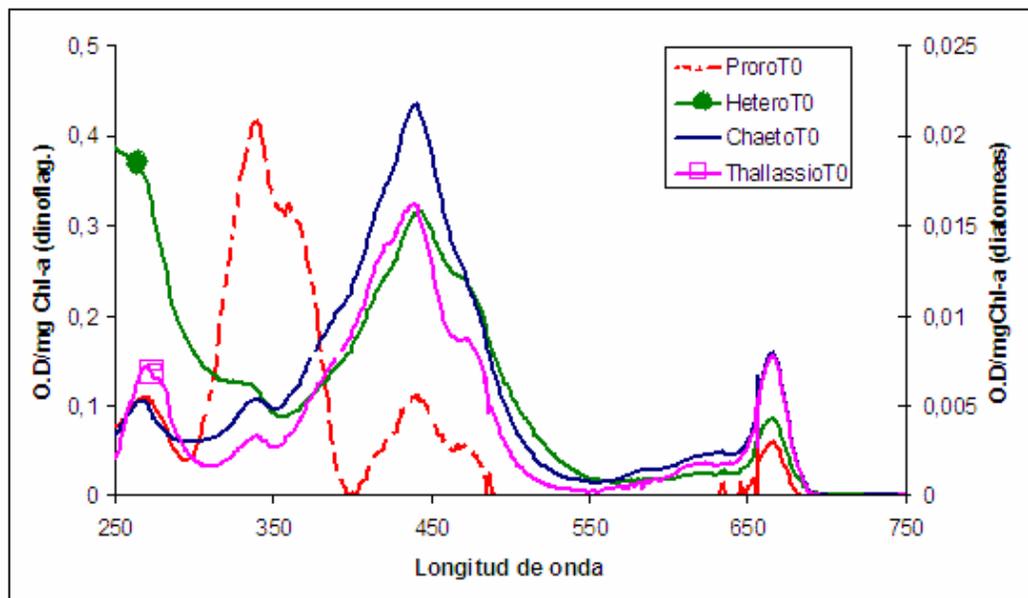


Figura 4.2.5: Inhibición de la fotosíntesis (%) por radiación en función de los días julianos para a-*C. gracilis*, b-*T. Fluviatillis*, c- *P micans* y d-*H. triquetra*

La inhibición de la fotosíntesis (*i.e.* desde la mañana al mediodía) calculada a partir de los valores del Y a lo largo del experimento, se presenta en la Fig. 4.2.5. *C. gracilis* fue la única especie que presentó la menor inhibición en las muestras bajo el

tratamiento P comparadas con aquellas que recibieron RUV adicional, incluso en los tratamientos con nutrientes, para los tres primeros días de experimentación (Fig. 4.2.5a). Sin embargo, al finalizar el experimento las muestras del tratamiento P fueron las más inhibidas (i.e. 100%). En *T. fluviatilis* (Fig.4.2.5b) la inhibición decreció con el tiempo y no se observaron diferencias significativas entre tratamientos nutrientes /radiación durante los primeros tres días de experimentación. Luego, hacia el final del experimento, las muestras que recibieron nutrientes adicionales presentaron una menor inhibición que aquellas que no los recibieron. En *P. micans* (Fig. 4.2.5c) la inhibición decreció continuamente a través del experimento, mientras en *H. triquetra* (Fig. 4.2.5d) mantuvo una relación constante durante los primeros cuatro días y luego decreció.

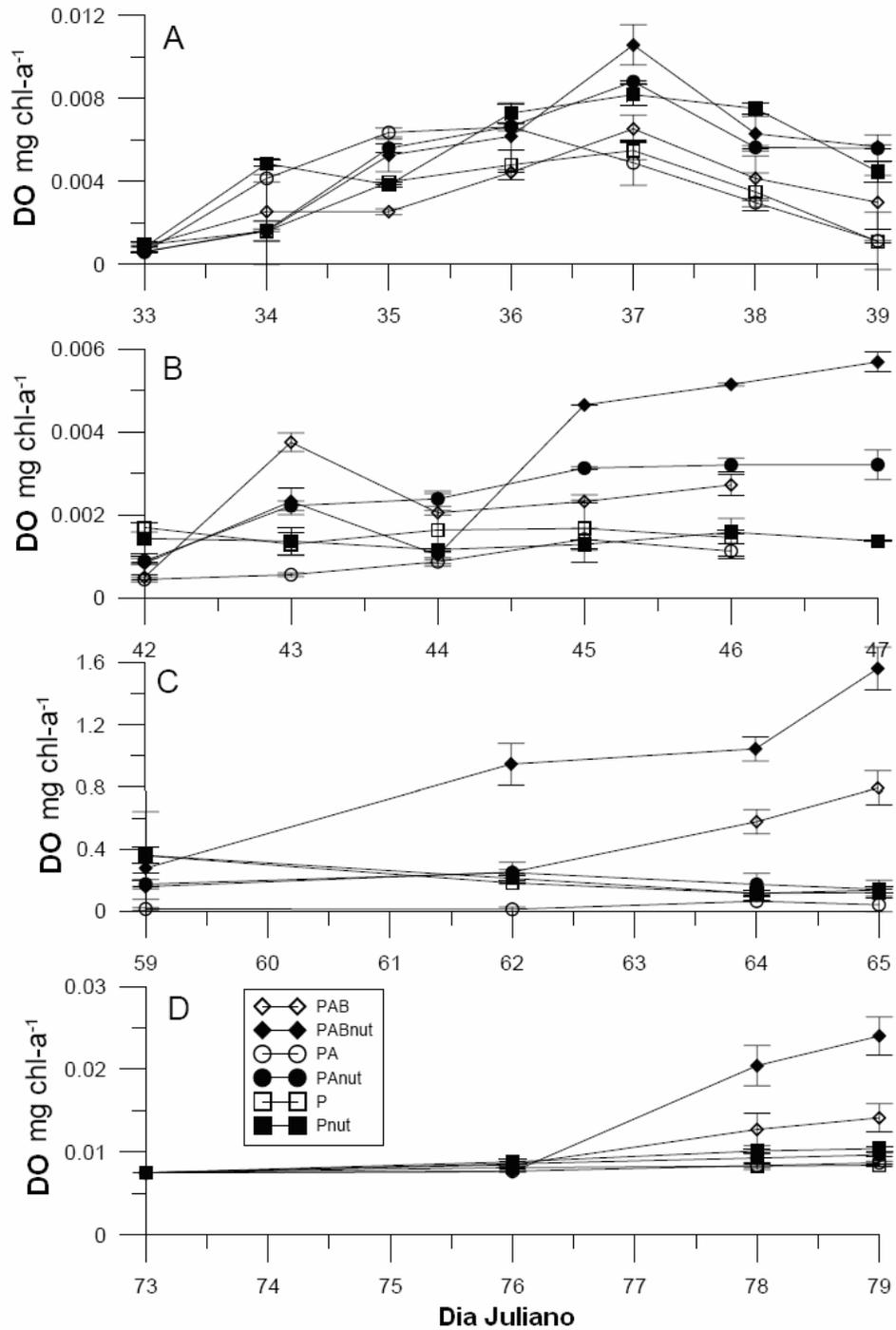
Existen mecanismos por los cuales las especies pueden adaptarse a las condiciones impuestas en los experimentos (i.e. a través la presencia de compuestos que absorben RUV). Las características del espectro inicial de absorción (D.O. mg Chl  $a^{-1}$ ) de las cuatro especies empleadas en el experimento son representadas en la Fig. 4.2.6. Todas las especies presentaron el pico característico de la Chl *a* en 445 y 665 nm. Los carotenoides ( $\lambda_{\text{max}} = 470$  nm) estuvieron presentes en *T. fluviatilis*, *P. micans* y *H. triquetra*, pero ellos fueron prácticamente inapreciables en *C. gracilis*. Los compuestos que absorben RUV (máximo rango de absorción de 310-360 nm) fueron especialmente abundantes en *P. micans*, pero estuvieron en muy bajas concentraciones (o virtualmente ausentes) en las otras tres especies estudiadas.



**Figura 4.2.6;** Espectro inicial de absorción para *C.gracilis*, *T. Fluviatillis*, *P micans* y *H. triquetra* obtenidos a partir de la extracción en metanol absoluto.

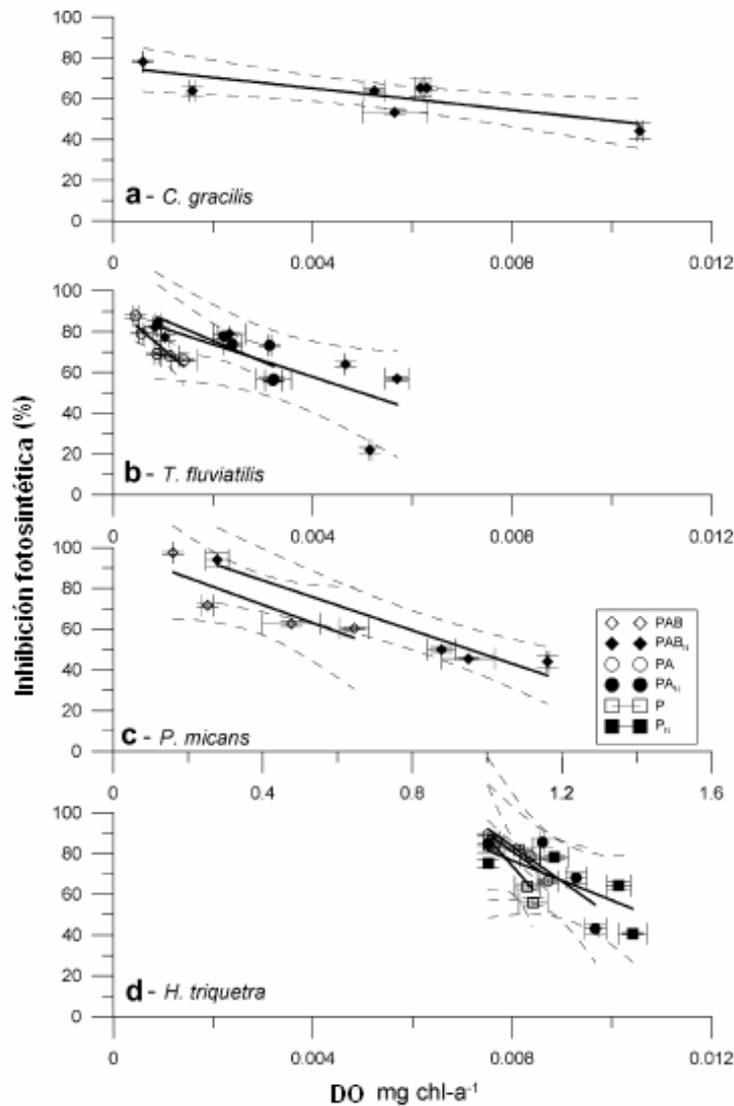
La variabilidad temporal de los compuestos potencialmente protectores (*i.e.* compuestos que absorben RUV, pico a 334-337 nm) durante los experimentos, se muestra en la Fig. 4.2.7. En general hubo una tendencia en todas las especies al incremento de los compuestos en función del tiempo. Sin embargo el incremento fue variable entre las especies de acuerdo al tratamiento impuesto en las muestras. En *C. gracilis* (Fig. 4.2.7A), esta tendencia fue especialmente evidente durante los primeros cuatro días de experimentación y posteriormente la concentración de los compuestos que absorben RUV decreció ligeramente. En estas especies la concentración más alta de compuestos que absorben RUV estuvo representada en los cultivos que recibieron nutrientes adicionales, mientras que en los cultivos expuestos a P y PA mantuvieron aproximadamente la misma concentración que al comienzo del experimento. En *T. fluviatilis* (Fig. 4.2.7B), los tratamientos PAB+N y PA+N incrementaron en forma significativa la concentración de compuestos que absorben RUV a lo largo del experimento. En forma adicional en relación a los tratamientos de radiación, las muestras

que recibieron solo PAR mantuvieron prácticamente la misma concentración de compuestos durante los seis días que duró la experimentación.



**Figura: 4.2.7:** Evolución del pico de absorbancia 334-337 para A- *C.gracilis*, B- *T. Fluviatillis*, C-*P micans* y D-*H. triquetra* durante el período de experimentación bajo radiación solar.

En *P. micans* (Fig. 4.2.7C) el incremento de los compuestos que absorben RUV fue más evidente pero solo en muestras expuestas al total de la radiación y especialmente en muestras enriquecidas. En todos los demás tratamientos la concentración se mantuvo similar y relativa baja a lo largo del tiempo. Finalmente, un comportamiento similar a *P. micans* se observó en *H. triquetra* (Fig. 4.2.7D), con muestras expuestas a PAB incrementando en forma considerable la concentración de compuestos que absorben RUV hacia el final del experimento, con una especial evidencia en los cultivos N.



**Figura: 4.2.8:** Pendiente del porcentaje de inhibición (%) en función de la concentración de MAAs (OD mg Chl-a<sup>-1</sup>) para las diatomeas a-*C. gracilis* y b-*Th.fluviatilis* y los dinoflagelados *P micans* y *H.triquetra* en tratamientos sin nutrientes y tratamientos con nutrientes

La relación entre la inhibición del fotosistema II (Fig.4.2.5) y la concentración de compuestos que absorben RUV (Fig.4.2.7) es representada en la Fig.4.2.8 a, b. Las relaciones que fueron significativas ( $P < 0.05$ ) con un  $R^2$  entre 0.6 y 0.94 fueron graficadas en esta figura. Al comparar las cuatro especies, resulta interesante encontrar una relación significativa entre los diferentes tratamientos. En el caso de *C. gracilis* (Figs. 4.2.8a) solo la inhibición de la fotosíntesis en el tratamiento PAB +N decreció significativamente con el incremento de la concentración de los compuestos que absorben RUV. En *T. fluviatilis* (Figs. 4.2.8b) la inhibición fotosintética en los tratamientos PAB+N y en ambos tratamientos bajo PA decrecieron con el incremento de la concentración de los compuestos que absorben RUV. En *P. micans* (Figs. 4.2.8c) solo aquellos tratamientos que recibieron el total de la radiación (*i.e.* PAB y PAB +N) tuvieron una disminución de la inhibición en función de la concentración de compuestos que absorben RUV. Finalmente, en *H. triquetra* (Figs. 4.2.8b) los tratamientos PA y P (ambos con y sin nutrientes adicionales) fueron aquellos que tuvieron una significativa disminución de la inhibición

## **Discusión:**

Además de los estudios que demuestran que taxa de diatomeas presentan una mayor tolerancia a la exposición RUV que taxa de dinoflagelados (Jokiel & York, 1984; Ekelund, 1990, Karentz, 1994), una susceptibilidad diferencial a la RUV también ha sido encontrada entre diatomeas (Davison *et al.*, 1994) y entre dinoflagelados (Ekelund, 1990), lo cual representa un fuerte argumento en contra a que diferencias taxonómicas por sobre atributos individuales podrían explicar la respuesta de las especies frente a los incrementos en dosis de RUV.

Como parte de una respuesta global del fitoplancton frente a altas dosis de RUV, las especies muestran una conducta variable que difiere en función de numerosos atributos individuales, entre los cuales el tamaño corporal ha sido descrito como una variable que predice la sensibilidad, con grandes daños asociados a pequeños tamaños (Karentz, *et al.*, 1991a; García Pichel, 1994, Hader *et al.*, 1995). Sin embargo contrario a

la hipótesis de dependencia de tamaño, muchos estudios basados en comunidades fitoplanctónicas naturales bajo el efecto de RUV, han resaltado la variabilidad de respuestas específico-específicas, existiendo numerosa evidencia que indica que diferencias interespecíficas en mecanismos y procesos fisiológicos estarían determinando la inhibición diferencial entre microalgas (Wangberg *et al.*, 1996, Quesada & Vincent, 1997), siendo algunas especies relativamente tolerantes y otras mas sensibles (Villafañe *et al.*, 2003). Sin embargo, en combinación con otros factores de estrés, las especies pueden responder de manera diferente si solo consideramos la RUV, dado que la interacción puede ser tanto sinérgica como antagonica. Como se observó en Cullen & Lesser (1991), los cultivos limitados por nitratos de *T. pseudonana* resultaron 8.6 veces mas sensibles a la RUV que cultivos repletos de nitratos, mostrando un efecto *sinérgico* entre la RUV y los nutrientes, donde aquellos tratamientos que recibieron RUV consumieron más nutrientes que aquellos que no los recibieron.

En el presente estudio se compararon las respuestas ante la RUV y la adición de nutrientes en cuatro especies fitoplanctónicas (dos diatomeas y dos dinoflagelados) los cuales son comunes de encontrar en ambientes marinos. Los resultados pueden resumirse como sigue: Las cuatro especies mostraron algunos signos de estrés cuando fueron expuestas a la radiación solar, tanto en el crecimiento (Fig. 4.2.3) como en el rendimiento fotosintético -Y-(Fig.4.2.4). Sin embargo, se presentaron evidencias de aclimatación hacia el final de los experimentos especialmente en los dinoflagelados estudiados. Otra característica encontrada es la variabilidad de respuesta entre las especies estudiadas aún bajo similares condiciones de radiación (Figs. 4.2.1 y 4.2.2) y de nutrientes a las que fueron expuestas, indicando que las respuestas observadas fueron específico-específicas.

En principio, uno podría pensar que la inhibición tanto en crecimiento como en fotosíntesis (Figs. 4.2.3-4.2.5) observada en los experimentos ocurrió dada la exposición a altos niveles de radiación solar *i.e.* altas dosis (Fig.4.2.1) e irradiancias (Fig.4.2.2) a las cuales los organismos estuvieron sometidos. Estos altos niveles de radiación son característicos del área de la Patagonia (Helbling *et al.*, 2005), pudiendo ocurrir en combinación de la alta heliofanía y largos períodos día –luz (Orce & Helbling, 1997) durante el verano. Incluso estos niveles de radiación durante el verano son comparables con aquellos que reciben las áreas tropicales a mediados de la primavera/otoño (Helbling

*et al.*, 2006, Villafañe *et al.*, 2007). Bajo estos altos niveles de radiación (tanto PAR como RUV) es esperable una reducción significativa en el crecimiento y las tasas de fotosíntesis como efectivamente ocurre en los experimentos (Figs. 4.2.3-4.2.5). Sin embargo esa parece ser una característica común de los organismos fitoplanctónicos como se ha visto en estudios llevados a cabo tanto con comunidades naturales como con cultivos monoespecíficos (Villafañe *et al.*, 2003)

La adición de nutrientes en estos experimentos mostró indirectamente su papel clave a nivel fisiológico permitiendo a estas especies enfrentarse mejor con la exposición a la radiación solar. Esto fue visto claramente al comparar crecimiento y fotosíntesis en los cultivos en condiciones enriquecidas y no enriquecidas, observándose los valores más altos en los cultivos que recibieron suplemento de nutrientes (Figs. 4.2.3 a, b), particularmente en el tratamientos PAB donde cultivos enriquecidos presentaron tasas de fotosíntesis significativamente más altas ( $P < 0.05$ ) que cultivos no enriquecidos. Este proceso fue evidente en los dinoflagelados, donde la inhibición de la fotosíntesis fue menor al final de los experimentos que al comienzo. Estos datos sugieren que el suplemento de nutrientes estaría asociado a la síntesis de compuestos que absorben RUV, los cuales son considerados en muchas especies como uno de los principales mecanismos de defensa ante un estrés por RUV (Banaszak, 2003).

Comparado con otros taxa, (*i.e.* clorofitas o cianobacterias), tanto las diatomeas como los dinoflagelados han sido considerados grupos relativamente resistentes a la RUV (Demers, *et al.*, 1991). Sin embargo, la aparente resistencia puede estar dada por diferentes mecanismos: en diatomeas, el esqueleto de sílice puede cumplir un importante papel absorbiendo RUV y confiriendo en cierta forma protección a la célula (Van de Poll, 2005). En dinoflagelados, la síntesis de compuestos que absorben RUV (*e.g.* MAAs) parece ser el mecanismo más importante ante el estrés de RUV. Sin embargo el grado que actúan estos mecanismos puede variar entre taxa y/o especies. Por ejemplo, trabajos que se realizaron con diatomeas antárticas (Helbling *et al.*, 1996) demostraron que las diatomeas céntricas fueron más resistentes que las pennadas, y esto podría darse ya que las primeras tienen la capacidad de producir compuestos que absorben RUV a diferencia de las segundas (Gröniger *et al.*, 2000). En dinoflagelados hubo una variedad de respuestas ante el estrés por RUV (Carreto *et al.*, 1990 Klish *et al.*, 2002, Taira *et al.*,

2004) y la deficiencia de nutrientes pareció estar asociada al aumento de sensibilidad a la RUV comparando con especies creciendo en condiciones no limitadas (Litchman *et al.*, 2002).

Los datos presentes en este capítulo muestran que las diatomeas presentaron concentraciones de compuestos que absorben RUV mucho mas bajas que los dinoflagelados, aunque al final de los experimentos estas concentraciones crecieron significativamente en aquellos tratamientos que recibieron nutrientes. Por ejemplo, en los estudios llevados a cabo por Korbee Peinado *et al.* (2004) revelaron que los nutrientes nitrogenados en altas concentraciones incrementan significativamente el contenido de MAAs. Lo particular de los experimentos llevados a cabo en este capítulo de la tesis, es que la concentración inicial de los nutrientes no fue limitante ni siquiera en aquellos cultivos que no los recibieron en forma adicional, ya que la concentración del número de células y Chl *a* incrementó a lo largo de los experimentos. En general se observó que la concentración de nitratos es inversamente proporcional a la curva de crecimiento a lo largo de los experimentos sugiriendo un mayor consumo de NO<sub>3</sub> en los tres primeros días de los experimentos, para luego permanecer aproximadamente constantes, tal como se observó en experimentos con comunidades naturales (Mostajir *et al.*, 1999) donde la concentración de nitratos decreció de 10 a 0,9 µM en los tres primeros días y luego se mantuvo constante.

Es posible que las células pudieran invertir esos nutrientes en otros procesos más que en la producción de compuestos que absorben RUV. De esta manera podrían interpretarse las tasas de crecimiento más altas en diatomeas (especialmente en *T. fuviatilis*) que en dinoflagelados. Aunque en dinoflagelados la inhibición de la fotosíntesis fue disminuyendo hacia el final del experimento asociado al aumento de la concentración de compuestos que absorben RUV (Fig. 4.2.8). La curva que representa los valores de NO<sub>3</sub> también se muestra inversamente proporcional a la curva de compuestos que absorben RUV, particularmente en el dinoflagelado *P. micans* quien presentó las mayores tasas de disminución de nitratos coincidiendo con la mayor concentración de compuestos que absorben RUV al final del experimento en el tratamiento PAB +N.

Con este estudio no se puede descartar la contribución de otros mecanismos protectores tales como la activación del ciclo de las xantófilas o cubierta celular

protectora. En efecto el ciclo de las xantofilas ha sido encontrado como un efectivo mecanismo protector para la diatomea *Thalassiosira weissflogii* (Zudaire & Roy, 2001). En ese estudio la concentración de MAAs se incrementó luego de 16-22 días de exponer las células a RUVB, lo que lleva a pensar que ocurrió después de que las células lograron recuperarse del estrés gracias al ciclo de las xantófilas. En estos experimentos citados en el capítulo no se presenta información sobre xantofil-pigmentos, pero los compuestos que absorben RUV aumentaron al menos en algunos tratamientos desde el comienzo de los experimentos. Se puede inferir que los compuestos son capaces de aumentar ante largas exposiciones y así las células podrían ser efectivamente protegidas. Sin embargo, las curvas de crecimiento de las diatomeas (Fig. 4.2.3) mostraron una fase estacionaria 'plateau' (al final de la fase exponencial) donde los compuestos no mostraron crecimiento, en este punto la cubierta celular podría tener un rol importante en la protección de las células, como se ha visto en estudios llevados a cabo en la cianobacteria *Arthorspira platensis* (Wu *et al.*, 2005).

## Capítulo 5: Efecto de la RUV y bioacumulación de compuestos que absorben RUV en tres especies de zooplancton.

### Resumen

Con el fin de determinar que un cambio potencial en la composición de especies fitoplanctónicas podría tener un efecto negativo sobre la calidad del alimento disponible para los consumidores primarios (*i.e.* zooplancton), se trabajó con tres especies zooplanctónicas: *Paracalanus parvus* (Copepoda), *Artemia persimilis*, (Branchiopoda), y larvas de *Cyrtograpsus angulatus* (Decapoda), y se determinó cómo son afectadas al ser alimentadas con fitoplancton previamente irradiado con RUV y si existe una potencial bioacumulación de MAAs por parte de estos consumidores primarios. Fueron utilizados cultivos de cuatro especies fitoplanctónicas: *Chaetoceros gracilis*. (5µm), *Thalassiosira fluviatilis* (10µm), *Heterocapsa triquetra*. (20µm) a las cuales les es posible inducir la formación de compuestos que absorben RUV y la especie *Nannochloropsis* sp (5µm) (Chlorophyceae). Las cuatro especies fueron creciendo en cultivos semi-continuos durante 20 días bajo dos tratamientos de radiación: PAR y PAR + RUV. Como resultados se observaron que los tres géneros de zooplancton, al alimentarse no discriminaron entre tratamientos. Al someterlos a una extracción de pigmentos se observó un pico de absorción en el rango del la RUV sólo por parte de aquellos que fueron alimentados con especies fitoplanctónicas irradiadas con RUV y al dejar de alimentarlos y exponerlos a la RUV durante tres días, sobrevivieron, 85-90% de los copéodos que presentaron bioacumulación, sólo el 30% de los que no presentaron bioacumulación y 95% de aquellos alimentados con *Nannochloropsis* sp. irradiada, los cuales presentaron un pequeño pico de absorbancia en el rango del UV. En cultivos de *A. persimilis*, y larvas de *C. angulatus* se observó en los individuos que fueron alimentados con cultivos que recibieron solo PAR, al someterlos a la radiación UV luego de un periodo de inanición, una mortalidad de 40%. Los que fueron alimentados con alimento irradiado con RUV presentaron una acumulación de MAAs y al someterlos a estrés con lámparas de RUV, presentaron 90% de supervivencia. Se concluye que *P parvus*, *A. persimilis* y larvas de *C. angulatus* pueden bioacumular compuestos que absorben UV a través de la dieta y que éstos le proporcionan protección al ser sometidos a estrés por la RUV.

## **Introducción:**

Como se ha mencionado anteriormente, las algas pueden responder a la radiación ultravioleta mediante diferentes mecanismos entre los cuales se encuentran la síntesis de compuestos que absorben RUV (Riegger & Robinson, 1997) y reparación del daño de ADN (Buma *et al.*, 1997). Las algas también pueden responder de acuerdo a su sensibilidad hacia la RUV (Neale *et al.*, 1998), la cual puede afectar la sucesión en favor de las especies más RUV tolerantes (Bothwell *et al.*, 1993, 1994). A diferencia de la gran cantidad de estudios sobre estos productores, se han realizado pocas investigaciones sobre los efectos de la RUV en consumidores.

Como se presentó en el capítulo uno, el zooplancton representa una llave intermedia en la transferencia de energía trófica y regeneración de nutrientes en las cadenas de alimentación marinas. (Banse, 1995). Aumentos de la RUV-B pueden afectar al zooplancton, tanto directamente (Karanas, 1979, Danmker *et al.*, 1980, Przeslawski *et al.*, 2005) como de forma indirecta a través de la cadena trófica (Bothwell *et al.*, 1994, Mostajir *et al.*, 1999, Newman *et al.*, 2000). Los compuestos que absorben RUV (*e.g.* MAAs) son comunes tanto en microalgas (Jeffrey, *et al.*, 1999) como en macrolagas (Banaszack & Lesser, 1995), y son producidos a través de una rama de la ruta del ácido shikímico (Shick *et al.*, 1999), una ruta bioquímica que no está presente en animales. La evidencia de tantos MAAs en invertebrados como en vertebrados indica que fueron acumulados a partir de la dieta (Crefoot *et al.*, 1998, Newman *et al.*, 2000) o bien vía traslocación a partir de algas simbiotas (Shick *et al.*, 1999) con el fin de proveer protección ante la RUV (Whitehead, 2001).

En relación a estudios realizados en zonas costeras patagónicas (Akselman, 1996), existe una clara tendencia al incremento de la abundancia y de la biomasa de zooplancton a partir de los meses invernales hasta el verano en un marco de un ciclo típico de aguas templado-frías. Los copépodos como componente importante de la comunidad zooplanctónica de la zona, exhiben una estructura de tamaño poblacional dominada por pequeñas especies del suborden Calanoidea (Fernández Aráoz, 1994). Debido a los antecedentes de estudio que existen sobre los consumidores primarios y el efecto de la RUV (Zagarese *et al.*, 1998, Gonçalves *et al.*, 2000) se decidió trabajar en esta oportunidad con cultivos del copépodo *Paracalanus parvus*, larvas del decápodo

*Cyrtograpsus angulatus* (cangrejo de las rocas), ambos importantes representantes de la costa Patagónica, y una especie de importante interés comercial *Artemia persimilis* (Piccinelli & Prosdocimi, 1968), utilizada en acuicultura como alimento vivo (Navarro *et al.*, 1999) de importantes crustáceos como *Pleoticus muelleri* (camarón rojo), y *Artemesia longinaris* (langostino), también representantes de la costa patagónica (Spivak, 1997)

El objetivo principal de este capítulo es determinar si diferentes especies componentes del zooplancton, son capaces de bioacumular compuestos que absorben RUV (*e.g.* MAAs) a través de la ingesta de diferentes microalgas previamente inducidas a la formación de dichos compuestos al ser sometidas a la RUV. De esta forma se intenta determinar el rol protector de los compuestos al someter a las especies zooplanctónicas a estrés por RUV posteriormente a la alimentación.

## **Materiales y métodos particulares:**

### **Especies bajo estudio, descripciones generales.**

Los **copépodos** marinos son probablemente los metazoarios más abundantes en el mundo, sobrepasando a los insectos y los nemátodos (Hardy, 1970).

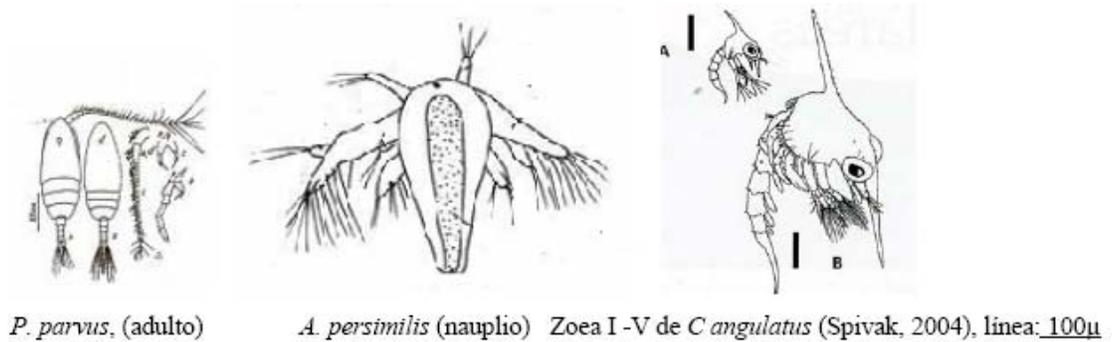
Los trabajos realizados sobre copépodos en su mayoría corresponden a descripciones taxonómicas. Muy pocos estudios se han dedicado al cultivo, y los trabajos que existen se basan principalmente en analizar la supervivencia, reproducción y contenidos nutricionales (Mauchline, 1998, Shields *et al.*, 2005, Ianora, 2005; Marcus, 2005). La mayor parte de los copépodos son filtradores y consumen partículas de fitoplancton que llega a su boca por las corrientes de agua que produce el movimiento de las piezas bucales y de las antenas, el alimento es triturado por las gnatobases de las mandíbulas e introducido dentro de la boca por las setas de los apéndices (Campos & Suarez, 1994). La tasa de filtración en *Calanus* varía de 3 a 30 ml/día (Marshall & Orr, 1995). Sin embargo otros autores han observado una tasa de filtración mayor, de hasta 1200 ml/día. Existen trabajos como los realizados por Nanton y Castell (1999), donde utilizaron 2 especies marinas de copépodos harpactoides los cuales fueron alimentados con *Isochrysis galvana* y *Dunaliella tertiolecta* cultivados a temperaturas de 20, 15 y 6° C, obteniéndose mayor cantidad de ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) alimentado con *I. galvana* a una temperatura de 6 °C.. Son organismos que presentan una gran diversidad de formas y de hábitos alimenticios (Björnberg, 1981). La mayoría es de forma cilíndrica o cónica, presenta tres partes distintas que son el cefalotórax, el prosoma y el urosoma, la cabeza tiene un ojo central y numerosas antenas que son generalmente muy largas. Su forma varía en cada uno de los estadios (nauplio, copepodito, adulto). La reproducción es generalmente interna. Los machos depositan los espermátóforos dentro de la hembra donde luego liberan los ovocitos hacia el exterior para después eclosionar como nauplio. Posteriormente después de 5 a 6 estadios pasan a ser copepoditos, después de 5 estadios logran ser adultos maduros. El desarrollo puede durar menos de una semana hasta lo largo de un año y su longevidad va desde 6 meses hasta un año (FAO, 1996).

Desde el punto de vista pesquero, algunos autores han considerado a los copépodos como fuente principal de alimento para peces (Browman & Marcotle, 1987; Uye & Yamaoka, 1990) y probablemente en crustáceos. Björnberg (1981), los considera como indicadores de zonas ricas para la pesca. *Paracalanus parvus* se encuentra presente en la plataforma continental norpatagónica (Sabatini & Martos, 2002) y es considerado uno de los principales alimentos en los estadios tempranos de desarrollo de la merluza - *Merluccius hubssi*- (Viñas & Santos, 2000; Sabatini, 2004).

El genero *Artemia* vive en condiciones extremas de temperatura y en cuerpos de agua hipersalinos. En la República Argentina se encuentra la especie *Artemia persimilis* (Piccinelli & Prosdocimi 1968) y existen abundantes biotopos hipersalinos propios para la presencia de poblaciones de este género. (Angelelli *et al.*, 1976, Angelelli *et al.*, 1980, Schalamuk *et al.*, 1983, Schalamuk *et al.*, 1999). Con el desarrollo que ha adquirido la acuicultura en todo el mundo, el uso de *Artemia* como alimento vivo para las larvas en cultivo llegó a ser generalizado (Lavens & Sorgeloos 2000). El género *Artemia* tiene la capacidad de producir quistes, a partir de los cuales, se obtienen fácilmente por eclosión, estadios naupliares. Es por ello que *Artemia* constituye el alimento vivo más utilizado para las formas larvarias de peces y crustáceos (Navarro *et al.*, 1999). De quiste o primera larva a adulto demora entre 8 y 18 días, y muere aproximadamente a los dos meses y medio. Los adultos miden aproximadamente un centímetro de largo y nunca paran de mover sus once pares de patas, que les sirven tanto para la locomoción, como para crear corrientes de agua y alimentarse con algas unicelulares, protozoos y bacterias. De cada unión se produce una puesta (pueden producir de 3 a 4 en toda la vida) que da lugar a un promedio de 60 descendientes cargados en el ovisaco de la hembra, con dos destinos posibles: nacer como larvas con provisiones suficientes hasta alcanzar el siguiente estadio en el que deben alimentarse por sí mismos o bien ser liberados como quistes. En este último caso, permanecen en estado de latencia hasta que encuentran las condiciones para su desarrollo.

El decápodo *C. angulatus* (Varunidae) se extiende entre los 22 y 55 °S, (Spivak, 1997). Es un cangrejo estuarial pero se caracteriza porque en su ciclo de vida, las zoeas

planctotróficas, que eclosionan directamente de los huevos, se desarrollan en el mar (Anger *et al.*, 1994). La vida larval incluye varios estadios zoea, cada uno de mayor tamaño y complejidad (Spivak, 2004) hasta llegar al estadio intermedio de megalopa la cual se asienta nuevamente en el estuario.



## Procedimiento con el fitoplancton

### Alimento

La actividad de alimentación ya sea de copépodos adultos como de larvas de otros crustáceos, requiere mucha energía. Por lo tanto, la calidad del alimento presa afecta principalmente el crecimiento y reproducción. Es por eso que presentan una alimentación selectiva sobre células vegetales con alto contenido de nutrientes y una selección negativa sobre aquellas que resultan no digeribles optimizando la eficiencia de alimentación (Kuwata *et al.*, 2005), por lo tanto en los siguientes experimentos se utilizaron especies de microalgas que aparte de estar presentes en la zona patagónica donde se aboca el estudio (Sabatini, 2004), previamente fueron utilizadas para acuicultura por otros autores (Donaghay & Small, 1979; Stoecker & Evans, 1985; Mallo & Fenucci, 2004; Pérez, 2006) con el fin de descartar que los decesos de individuos se deban a la calidad del alimento desde el punto de vista nutricional y no por la acción de la RUV.

El sistema consistió en dejar crecer en medio f/2, cultivos semi-continuos de diferentes especies de algas durante 20 días. Los recipientes que se utilizaron fueron cápsulas de Petri de 300 ml para *P. parvus* y *A. persimilis* y recipientes de PVC de 4

litros para alimentar *larvas de C. angulatus*. Los recipientes se expusieron a dos tratamientos de radiación: PAR y PAR + RUV, bajo lámparas de RUV y cubiertos con filtros que cortan la radiación a las longitudes de onda correspondientes para cada tratamiento (*i.e.* P, PA, y PAB; Ver capítulo 2).

### *Conteo de microalgas*

Para todos los cultivos se realizó el conteo de microalgas durante todo el experimento con una cámara de Neubauer de 0.1 ml de profundidad y que contiene dos cámaras con un retículo de 9 cuadros de 1 mm por lado. El volumen de cada una de las cámaras es de 0.9 microlitros. Para el conteo se usó un microscopio compuesto utilizando aumentos de 200X para células >20µm y 400X para células <20µm. El procedimiento que se llevó a cabo para poder realizar el conteo y conocer el número de células por mililitro fue basado en el trabajo de Pérez (2006), con unas mínimas modificaciones.

### *Colecta de organismos*

**Copepoda:** Los copépodos fueron colectados el 11 de septiembre de 2006 a 200 metros de la costa en la Playa Complejo Chapadmalal, (38° S 57° W) mediante una red de plancton de 200µ de malla. Los animales colectados (en estadios de C3 y C4) fueron llevados al laboratorio para su cultivo e identificación. Se aclimataron durante dos días igualando los factores ambientales (temperatura y salinidad) que presentaban con respecto al sistema cultivo, en una pecera de 50 litros y luego se los sometió a la alimentación con las microalgas bajo diferentes tratamientos de radiación.

**Branchiopada:** Quistes de *A. persimilis* fueron obtenidos de la Estación Costera JJ Nágera y se procedió a la descapsulación con **hipoclorito de sodio** para facilitar la eclosión (Lavens & Sorgeloos, 2000). Los nauplios (NI) que nacieron a las 24 horas siguientes se colocaron en un recipiente de vidrio con 6 litros de agua de mar filtrada para la aclimatación. A las 48 horas de la eclosión las larvas se encontraban en estadio naupliar II (NII) y se las sometió a los diferentes tratamientos de alimentación.

**Decapoda:** 16 Hembras ovígeras de *C angulatus* fueron colectadas de la costa (38° S 57° W) el 27 de enero de 2007 y llevadas hasta el laboratorio inmediatamente. Luego de pesarlas y medirlas, se las colocó en peceras de 100 litros con agua de mar filtrada a 22 ° C (en cantidad de 4 hembras por pecera) durante dos días en inanición con el propósito de aclimatarse a las nuevas condiciones.

### *Siembra*

La especie de zooplancton a cultivar, previamente aclimatada, se la colocó por conteo individual y por triplicado de la siguiente manera:

Especie	Recipiente (ml de agua de mar filtrada)	Número de individuos	Estadio de desarrollo	Salinidad/ Temperatura	Condiciones de luz durante alimentación	Días de alimentación + hs. exposición a RUV
<i>P. parvus</i>	Cápsula Petri 200	200	C III y C IV	33/22	oscuridad	5 d.+ 48 h.
<i>A. persimilis</i>	Cápsula Petri 300	300	NI - NV	33/22	oscuridad	7 d.+ 72 h.
<i>C. angulatus</i>	PVC semicircular 5000	500	ZI - ZIV	33/ 23	Luz PAR 400 W/m <sup>2</sup>	6 d.+ 24 h.

**Tabla 5.1:** Recipientes, número de individuos, estadios de desarrollo y condiciones ambientales en donde transcurrieron los experimentos de alimentación. C, indica estadio de copepodito, en *P parvus*. N, indica estadio larval de Nauplio en *A. persimilis* y Z estadio de larva Zoea en *C. angulatus*

### **Tratamientos y alimentación**

Las especies de microalgas utilizadas como alimento en los experimentos fueron obtenidas de la Estación de fotobiología Playa Unión, la Estación Costera JJ Nágera y del Instituto Nacional de Investigaciones Pesqueras (INIDEP). Se mantuvieron creciendo en los respectivos recipientes con los tratamientos de radiación anteriormente mencionados a una temperatura de 20/22 °C y con foto período (12 L: 12 D). Se colocaron en una

mesada a 20 cm. de las lámparas recibiendo irradiancias de 300 moles de fotones  $m^{-2} s^{-1}$  para PAR y 20  $W m^{-2}$  de RUV.

Las dietas que se utilizaron como alimento bajo los tratamientos PAR y RUV +PAR consistieron en:

<i>Chaetoceros gracilis</i>
<i>Thalassiosira fluviatilis</i>
<i>Heterocapsa triquetra</i>
<i>Nannochloropsis</i> sp

De acuerdo a experimentos previos de otros autores (Isiordia-Perez *et al.*, 2006, Mallo & Fenucci, 2002) la densidad de alimentación considerada para el presente experimento fue de 50.000 a 100.000 células  $ml^{-1}$  que diariamente fueron suministradas a los organismos.

Los ml de cultivo que fueron necesarios agregar, se obtuvieron con la siguiente formula:

$$V_f = V_i * C_i / C_f$$

Donde:

$V_f$  = Volumen de cultivo a agregar

$V_i$  = Volumen de agua contenida en la cápsula (250 o 5000 ml)

$C_i$  = Número de células en el cultivo

$C_f$  = Concentración de células por ml a la que debo alcanzar (50000 o 100000 cel  $ml^{-1}$ )

### **Análisis Estadístico:**

Los datos de longitud de los zooplancteres fueron sometidos a las pruebas de normalidad de Lilliefors y de homogeneidad de varianzas de Bartlett (Zar, 1974). Una vez identificada la normalidad y homocedasticidad de los datos, las tallas de los tratamientos se contrastaron con un análisis de varianza de una vía. En los tratamientos que mostraron diferencias significativas, los valores medios fueron comparados con la prueba de rangos

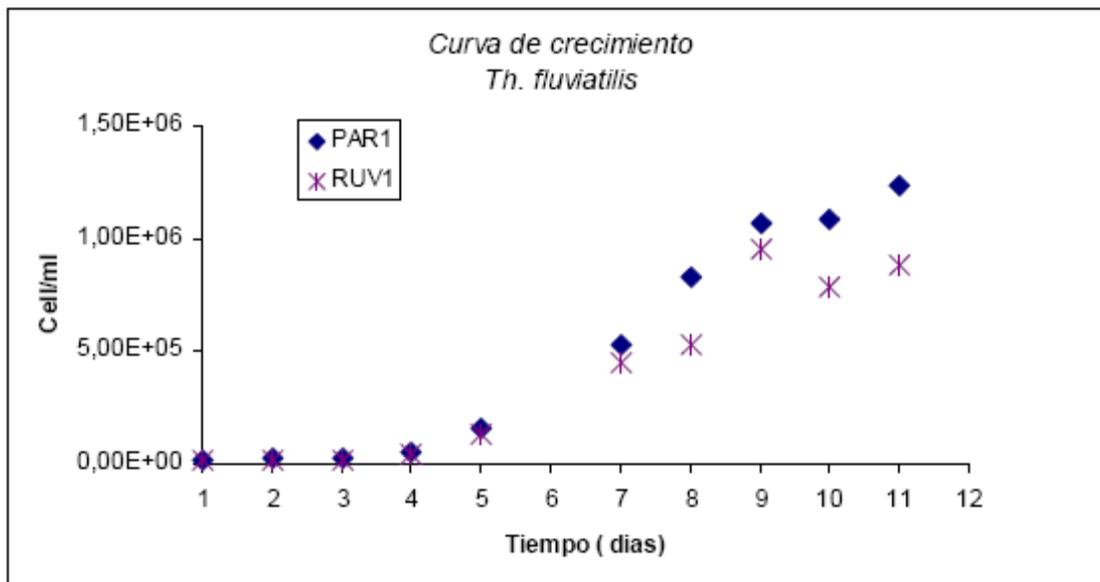
múltiples de Tukey (Zar, 1974). Todos los análisis fueron realizados con el paquete estadístico Statistix 8, (ver, 2000), con un nivel de significación de  $\alpha=0,05$ .

## RESULTADOS:

### Especies fitoplanctónicas utilizadas como alimento

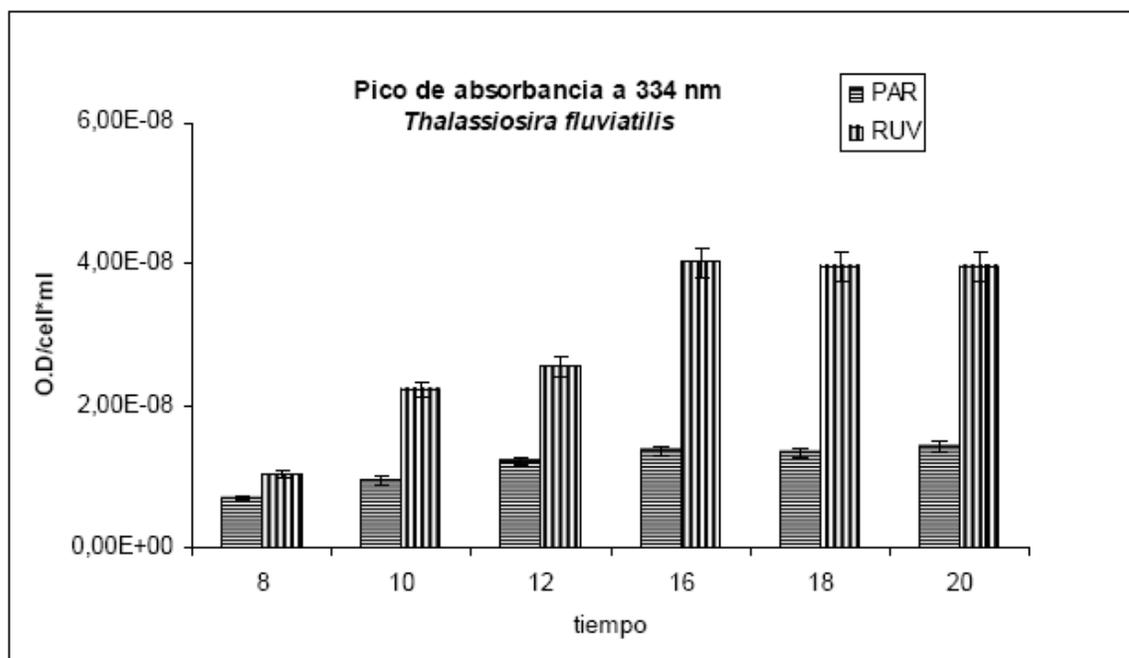
#### *Thalassiosira fluviatilis*

Los cultivos de *T. fluviatilis* fueron creciendo bajo los tratamientos de radiación PAR y PAR +RUV, aproximadamente durante 8 días cuando alcanzaron su etapa exponencial, con concentraciones  $\sim 830.000$  y  $530.000$  cel.  $\text{ml}^{-1}$  para los tratamientos PAR y PAB, respectivamente. (Fig. 1). A partir del octavo día se mantuvieron los cultivos en dichas concentraciones durante 12 días más, renovando el medio fresco f/2 diariamente (cultivos semi-continuos) para de esta manera inducir a la formación de compuestos que absorben RUV.



**Figura 5.1:** Curva de crecimiento para *T. fluviatilis* bajo dos tratamientos de radiación PAR y PAR + RUV

En el gráfico 5.2 se presenta la evolución de los compuestos que absorben RUV (estimado por el pico de absorbancia a 334-337nm, dividido por el número de células) durante los 12 días en los que se mantuvo la fase exponencial del cultivo semi-continuo de *T. fluviatilis* (días 8 a 20). Se observa que a pesar que la concentración de células es constante, la altura del pico de absorbancia a 334 va en aumento en los cultivos que reciben RUV (Inducción de formación de compuestos que absorben RUV) hasta llegar a una constante de 0.025-0.026 DO (en 530000 cel ml<sup>-1</sup>) a partir del día 16, mientras que en el tratamiento PAR, la altura del pico de absorbancia 334 se mantiene constante en 0.013-0.014 D O. (en 830000 cel ml<sup>-1</sup>) desde el comienzo de la fase exponencial (día 8)



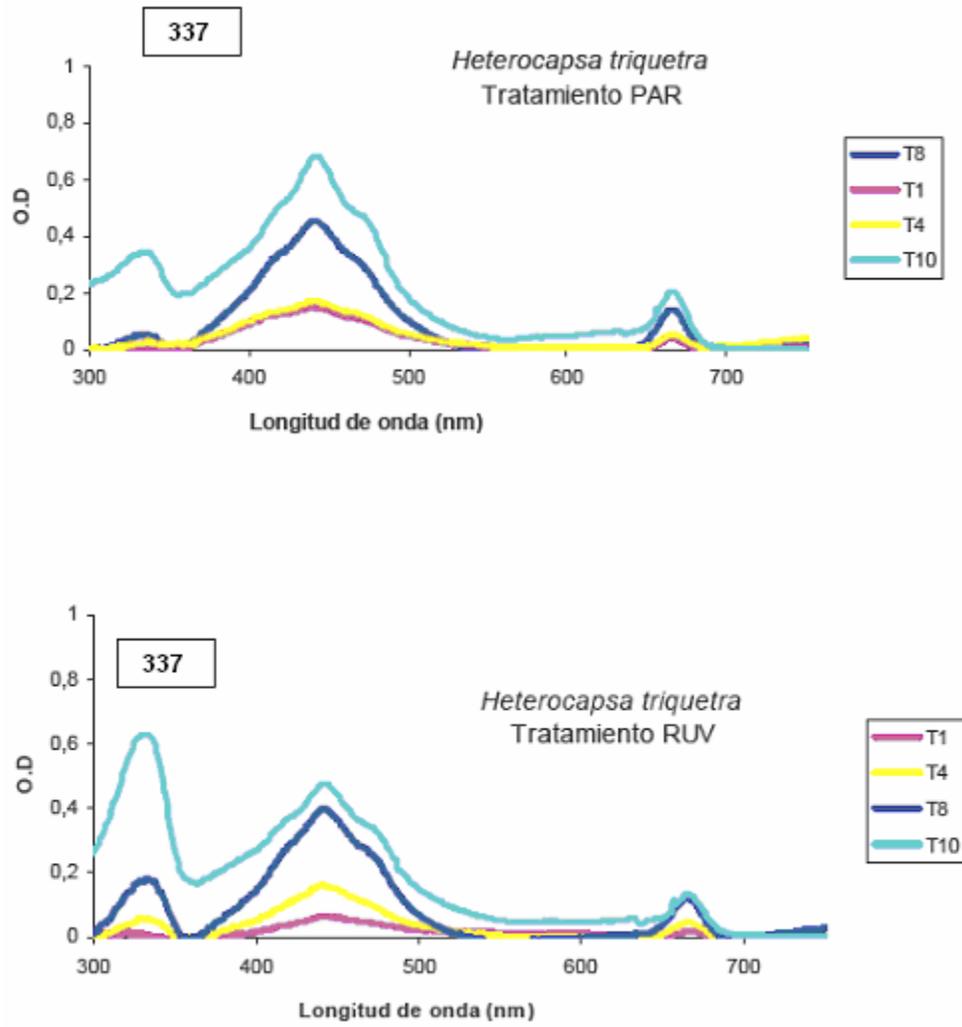
**Figura 5.2:** Evolución del pico de absorbancia 334 durante la fase exponencial del cultivo semi-continuo de *T.Fluviatilis* bajo dos tratamientos de radiación: PAR y PAR +RUV

### *Nannochloropsis* sp

Por otro lado, *Nannochloropsis* sp presenta curvas de crecimiento similares pero alcanzando su etapa exponencial al tercer día de cultivo con concentraciones de 987000 y 865000 cel ml<sup>-1</sup> para PAR y PAB, respectivamente. No presenta un pico en el rango de la RUV detectable y no es apreciable un aumento del mismo durante la inducción a lo largo de los 17 días restantes (datos no mostrados).

### *Heterocapsa triquetra*

Los cultivos de *H triquetra* fueron creciendo hasta alcanzar su etapa exponencial, aproximadamente al décimo día, con concentraciones  $\sim 500000$  y  $430000$  cel  $\text{ml}^{-1}$  para los tratamientos PAR y PAB, respectivamente. Luego se los mantuvo en dichas concentraciones hasta completar los 20 días como cultivos semi-continuos (renovando el medio fresco  $f/2$  diariamente) para inducir la formación de compuestos que absorben RUV. En la Fig. 5.3 se observa los espectros de absorción correspondientes a los cultivos PAR y PAB donde se muestra la evolución de los pigmentos fotosintéticos y compuestos que absorben RUV, representado por el pico de absorción 337. Al décimo día se observa un pico de absorbancia de 0.14 y 0.44 para los tratamientos PAR y PAB, respectivamente

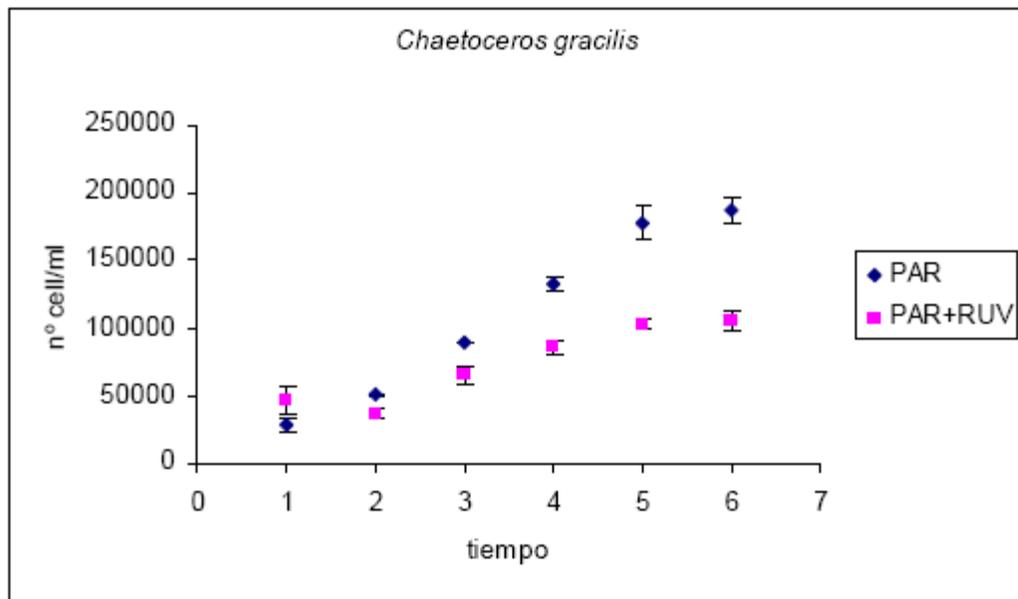


**Figura 5.3:** Espectros de Absorbancia durante el crecimiento de *H triquetra* bajo dos tratamientos de radiación

Durante los restantes 10 días en que se mantuvo el cultivo en su fase exponencial los compuestos que absorben RUV también mantuvieron constantes sus valores y se consideró dicha concentración como el máximo alcanzado.

### *Chaetoceros gracilis*

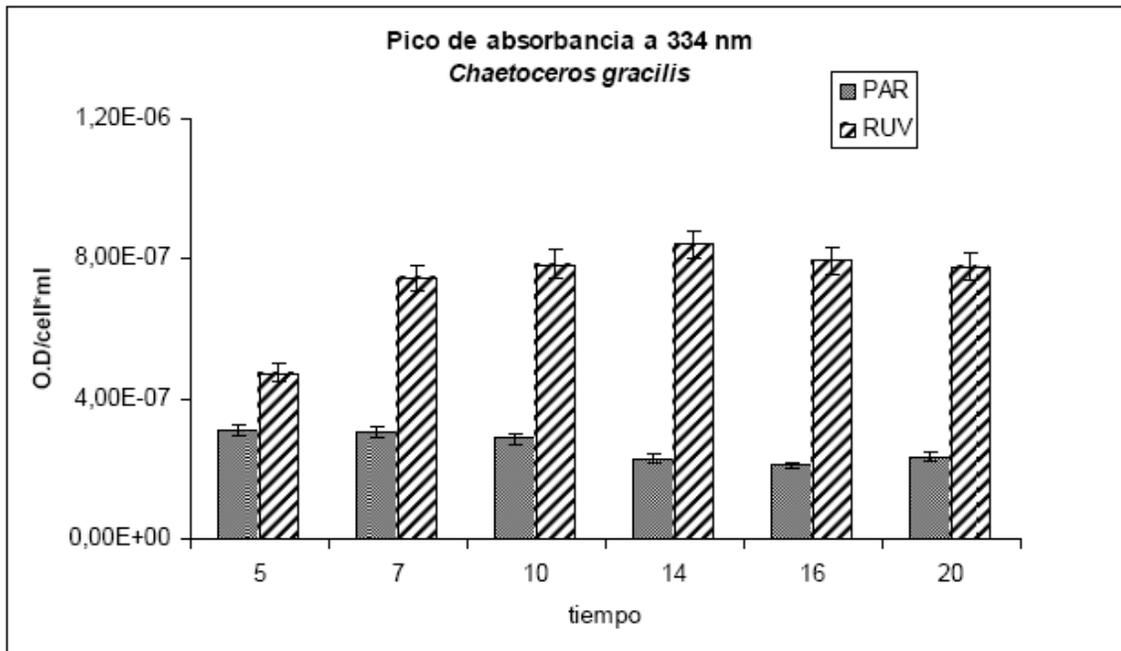
Se utilizó para esta especie el mismo mecanismo de cultivo que las especies anteriormente mencionadas.



**Figura 5.4:** Curva de crecimiento para *C.gracilis* bajo dos tratamientos de radiación PAR y PAR + RUV.

En la Fig. 5.4 se presenta la curva de crecimiento de *C gracilis*, donde los mayores valores registrados fueron alcanzados al quinto día de exposición en ambos tratamientos, con concentraciones de número de células de 186000 y 105900 cel ml<sup>-1</sup> para los tratamientos PAR y PAB, respectivamente. Luego se mantuvieron constantes hasta el día 10, donde las concentraciones de compuestos que absorben RUV se encontraban en los valores de 0.023 y 0.08 para los tratamientos PAR y PAB, respectivamente (Fig. 5.5)

Del día 10 en adelante las concentraciones de compuestos que absorben RUV se mantuvieron constantes hasta el día 20.



**Figura 5.5:** Evolución del pico de absorbanca 334 durante la fase exponencial del cultivo semi-continuo de *C. gracilis* bajo dos tratamientos de radiación: PAR y PAR +RUV

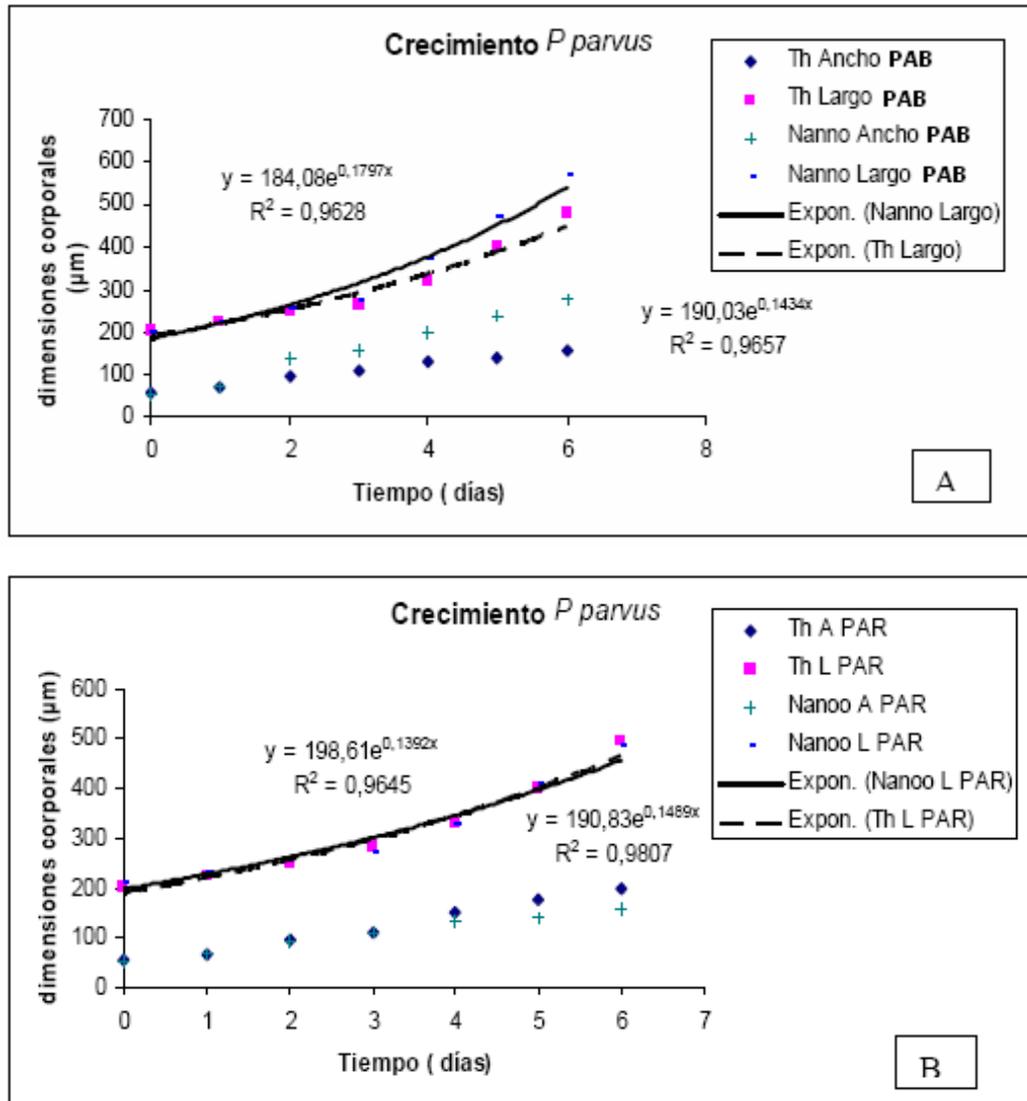
### Procedimiento con las diferentes especies de zooplancton

En base a estos resultados con el fitoplancton se presentan a continuación las diferentes curvas de crecimiento de las especies de zooplancton utilizadas en estos experimentos, a saber:

#### *Paracalanus parvus*

Los copépodos fueron alimentados con las especies *Thalassiosira fluviatilis* y *Nannochloropsis* sp. En la figura 5.6 se observa la curva de crecimiento de los copépodos durante 5 días que duró la alimentación con las especies *T fluviatilis* y *Nannochloropsis* sp, irradiadas con PAR y PAB. Se observa durante el experimento que los copépodos alimentados con el alga verde *Nannochloropsis* sp., irradiada con RUV, presentaron una mayor tasa de crecimiento (aunque no significativa) que los copépodos alimentados con

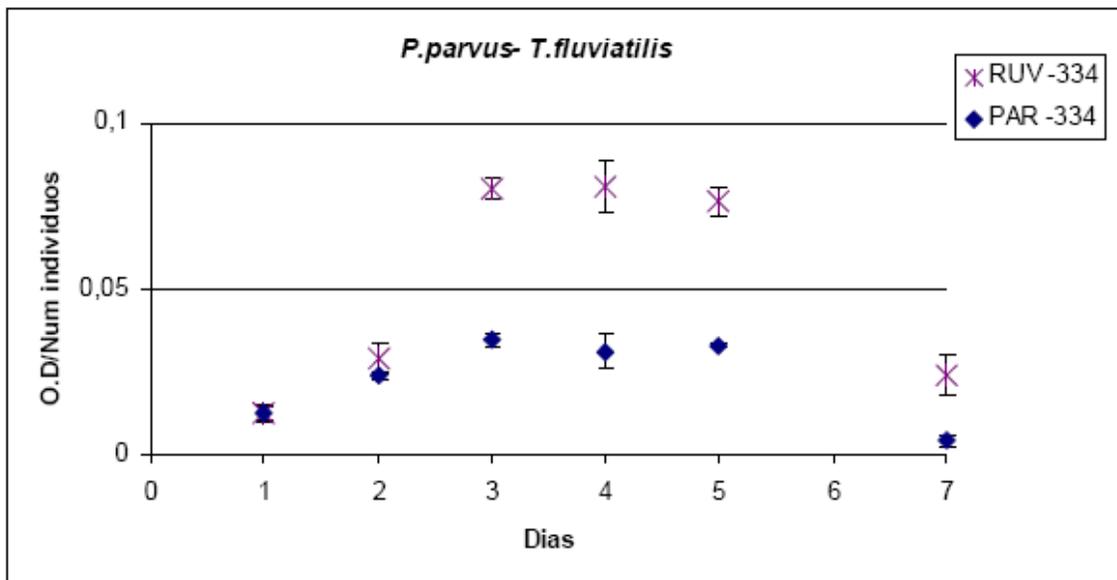
*T. fluviatilis*. Los copepoditos alimentados con *Nannochloropsis* sp. alcanzaron al sexto día valores de longitud de 537Largo/295Ancho  $\mu\text{m}$  mientras que los alimentados con *T. fluviatilis* valores de 478Largo/156Ancho  $\mu\text{m}$ .



**Figura 5.6:** Curva de crecimiento de *P. parvus* alimentado durante 5 días con *T. fluviatilis* y *Nannochloropsis* sp bajo los tratamientos de radiación A) tratamiento PAB y B) tratamiento PAR

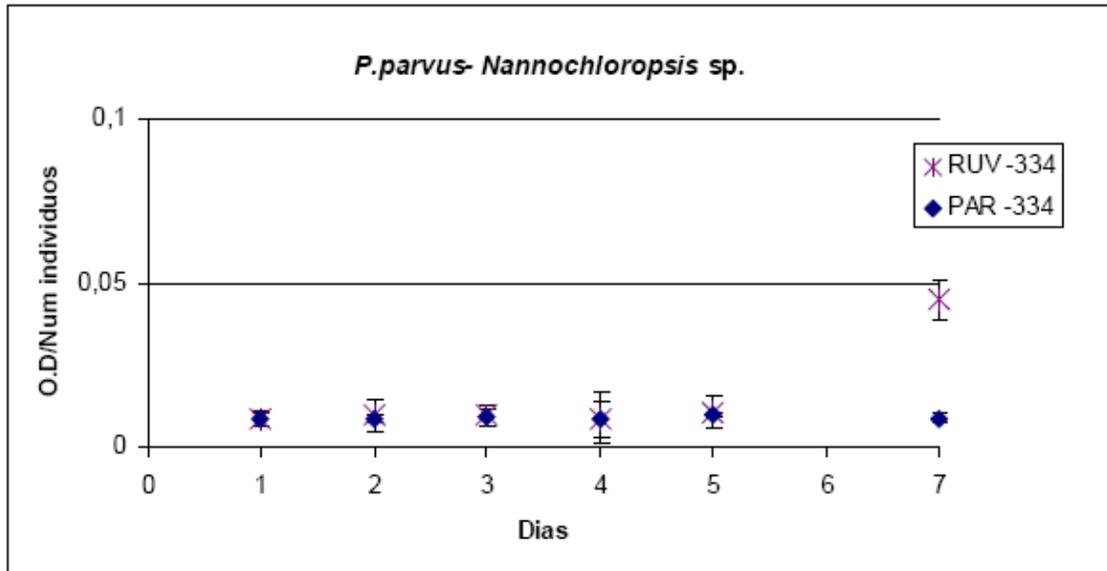
En la Fig. 5.7 se observa que al alimentar a los copéodos diariamente con *T. fluviatilis*, la concentración de los compuestos que absorben RUV por individuo va en aumento mientras el sistema digestivo esté repleto de alimento. Los picos de absorbancia corresponden a dicho contenido digestivo (n = 20). Cuando el pico 334 se mantuvo

aproximadamente constante (*i.e.* 0.034 y 0.080 para PAR y PAB, respectivamente), se consideró el máximo alcanzado. Posteriormente se colocó a los copépodos en inanición durante dos días en agua de mar filtrada, hasta que el sistema digestivo estuvo vacío (observaciones a la lupa). Por espectrofotometría se detectó un pico de absorbancia 334 significativamente menor ( $P < 0.05$ ) a cuando estaban alimentándose, que correspondería a los compuestos que absorben RUV bioacumulados en los tejidos (*i.e.* 0.004 y 0.02 para PAR y PAB respectivamente). Cabe aclarar que trabajando con unidades tan pequeñas de concentración fue necesario tomar la mayor cantidad de individuos posibles para obtener una señal en el espectrofotómetro ( $n = 46$ )



**Figura 5.7:** Curva del pico de absorción a 334-337 en el copépodo *P. parvus* durante los 5 días de alimentación con *T. fluviatilis* y luego de 2 días de inanición (numero 7). Los primeras cinco puntos corresponden al contenido del tubo digestivo y el ultimo punto (7) a la concentración bioacumulada en los tejidos.

Por otro lado, las larvas alimentadas con *Nannochloropsis* sp. irradiada con RUV, no presentan señales de crecimiento del pico de absorbancia 337 durante los cinco días de alimentación, pero cuando se realiza la extracción en las larvas que pasaron en inanición durante dos días, se observa un pico de 0.045 en el rango de 334-337. No así para aquellas que solo recibieron alimento que creció bajo la luz visible –PAR- (Fig. 5.8)

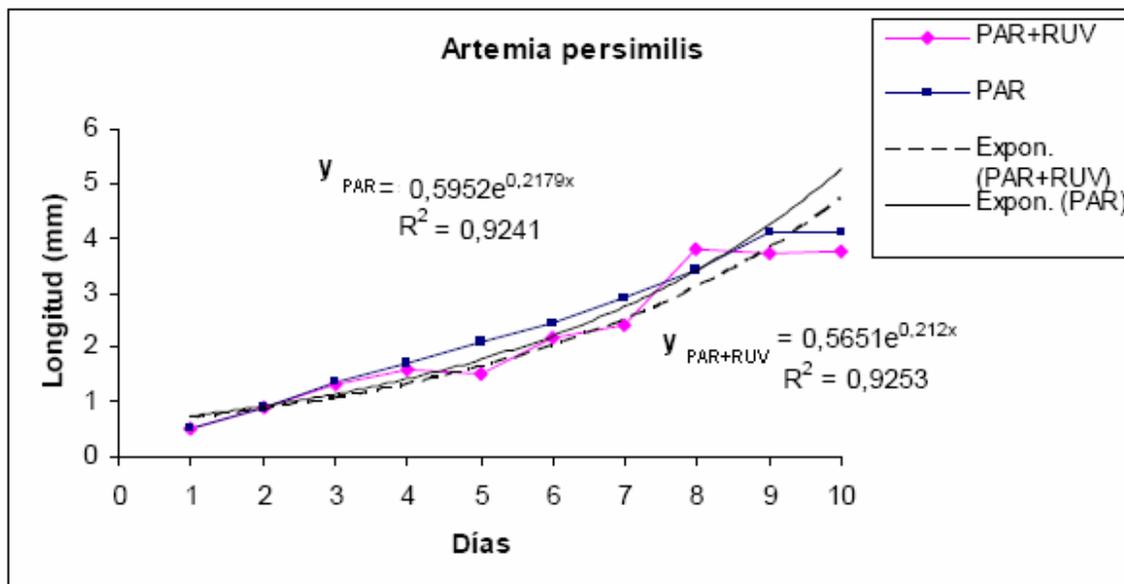


**Figura 5.8;** Evolución del pico de absorción a 334-337 en el copépodo *P. parvus* durante los 5 días de alimentación con *Nannochloropsis* sp. y luego de 2 días de inanición. Los primeras cinco puntos corresponden al contenido digestivo y la ultimo punto (7) a la concentración bioacumulada en los tejidos

### *Artemia persimilis*

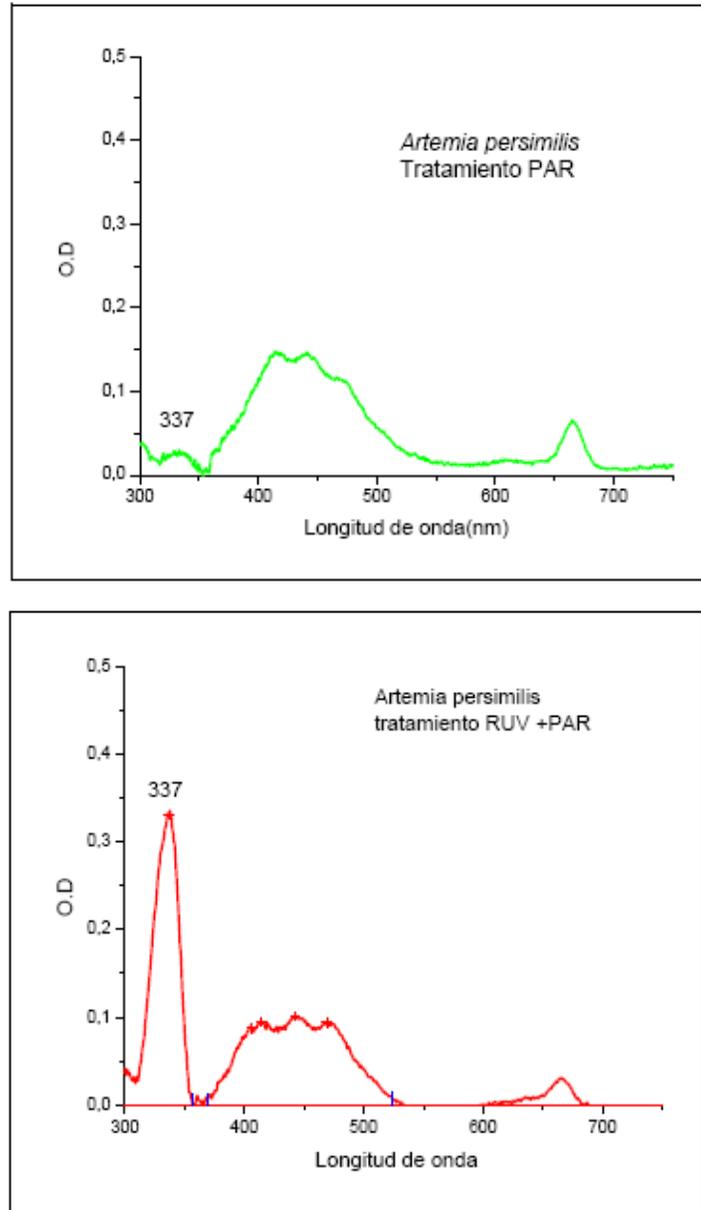
Este organismo del orden Anostraca (Fryer, 1987) se alimentó en oscuridad a partir de su estadio naupliar I (aproximadamente 10 hs luego de la eclosión), con cultivos de *Heterocapsa triquetra* en su etapa exponencial y previamente irradiados con PAR y PAR +RUV

En la Fig. 5.9 se presenta las curva de crecimiento de *Artemia persimilis*, con longitudes iniciales de 0.5 mm (Nauplio I) al comienzo de los tratamientos de alimentación alcanzando máximos valores de 4.11 y 3.72 mm para los tratamientos de alimentación, PAR y PAB, respectivamente, al final del experimento (nauplio VI).



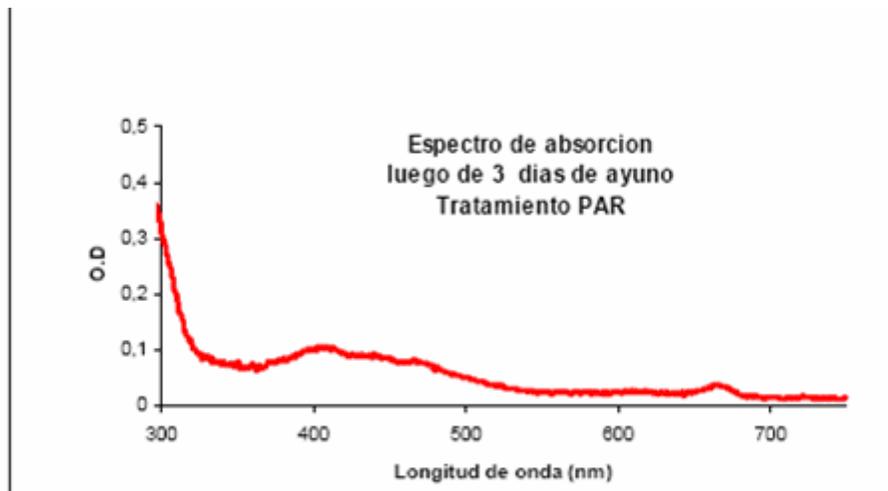
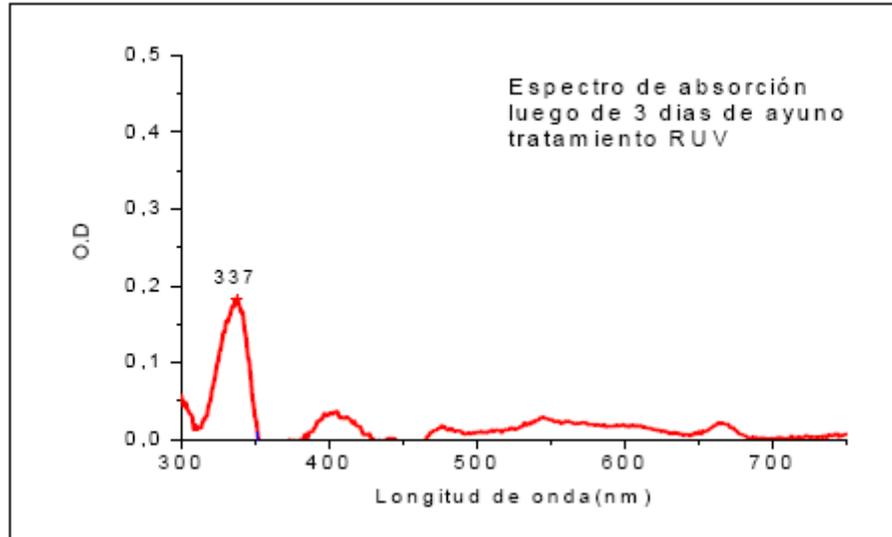
**Figura 5.9:** Curva de crecimiento para *Artemia persimilis* durante la alimentación (días 1-7) con cultivos de *H. triquetra* previamente irradiados con PAR y PAR + RUV (PAB) y durante el periodo de ayuno (días 7-10).

En los gráficos de la Fig. 5.10 se observa los espectros de absorción para los individuos alimentados con *H. triquetra* irradiada con PAR y con PAR + RUV. Para estos últimos, el pico de absorción a 337 nm máximo alcanzando es de 0.35 O.D al séptimo día de alimentación, mientras que los individuos alimentados con algas no irradiadas con RUV mantuvieron las concentraciones relativamente bajas (< 0.05 O.D) de este pico de absorbancia.



**Figura 5.10:** Pico de absorbancia en *A.persimilis* al séptimo día de alimentación con cultivos de *H triquetra* irradiada con PAR y PAR +RUV

Pasados los 10 días y luego de ser sometido los individuos al periodo de 3 días de ayuno, puede observarse en la Fig. 5.11 los espectros correspondientes para los dos tratamientos donde, *Artemia* alimentadas con *H triquetra* irradiada con RUV presenta un pico de absorbancia en el rango de la RUV (~0,15 O.D), mientras que el otro grupo carece de tal pico de absorbancia.

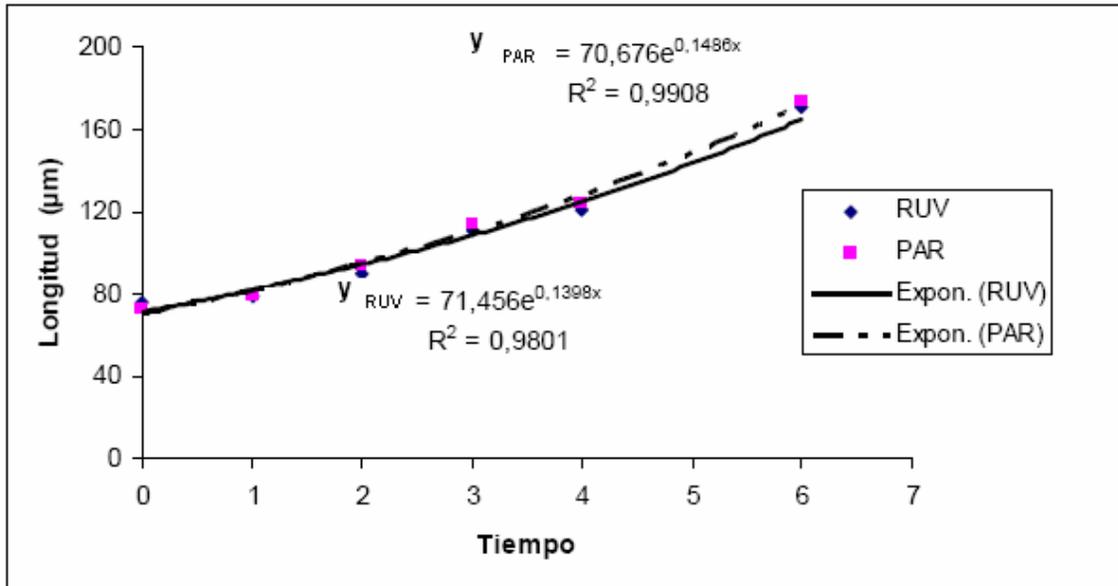


**Figura 5.11** Pico de absorbancia en *A. persimilis* luego de 3 días de ayuno de cultivos de *H triquetra* irradiada con PAR y PAR +RUV

*Cyrtograpsus angulatus*.

Las hembras con las que se trabajó presentaban tallas promedio entre 2,5 y 3,5 cm de longitud del cefalotórax (n = 18). Durante el periodo de aclimatación de las mismas se controló la temperatura a 22 °C y luego del segundo día de inanición se comenzaron a alimentar con tentáculo de calamar fresco. Todas las hembras estaban ovígeras, aunque presentaban diferentes estadios de maduración. Se observaron algunos huevos al microscopio y dependiendo del estado de

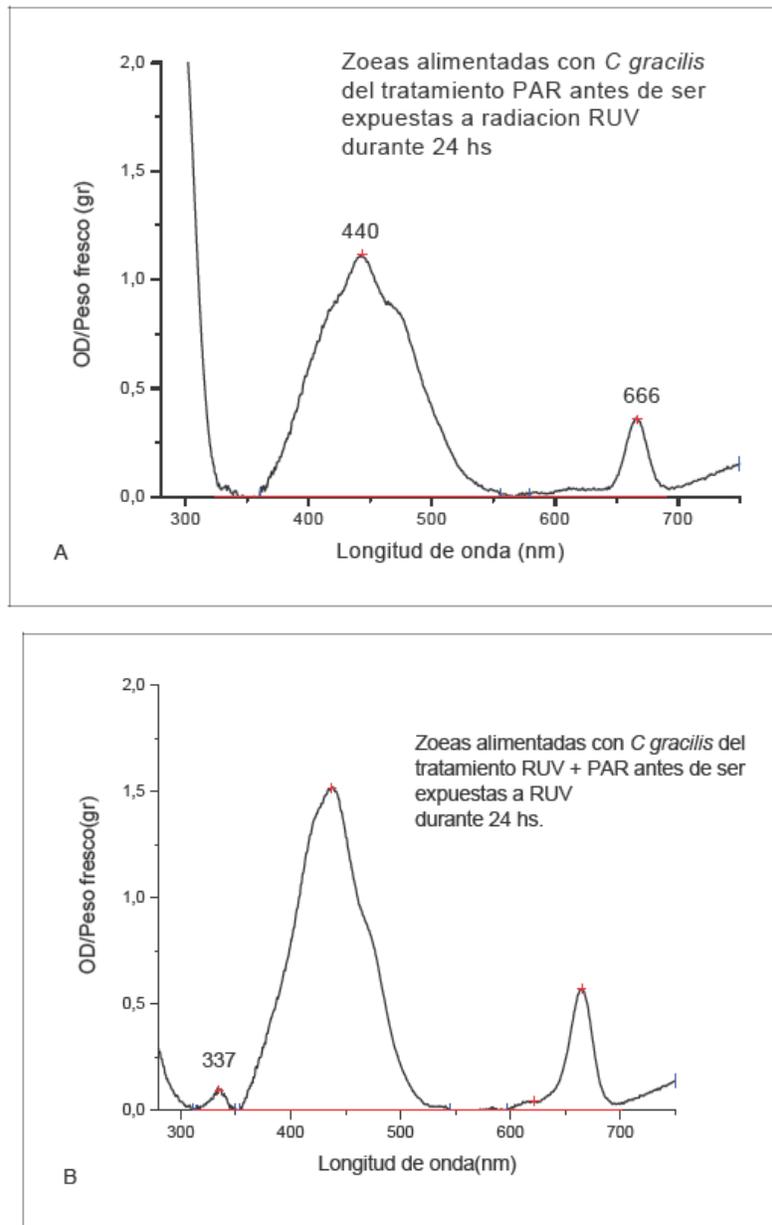
desarrollo del embrión se agruparon en las diferentes peceras con agua de mar filtrada y salinidad 33 ppm. Las primeras hembras eclosionaron luego de 10 días y con temperaturas óptimas de 25 °C. Inmediatamente las larvas Zoeas se colocaron en las condiciones presentadas en tabla 5.1



**Figura 5.12:** Curva de crecimiento para larvas de *C. angulatus* durante el periodo de alimentación con *C. gracilis* irradiado con ◊ RUV y ■ PAR.

Las curvas de crecimiento de las Zoeas alimentadas con *C. gracilis* bajo diferentes tratamientos de radiación están representadas en la Fig. 5.12, donde se observa que ZI de una longitud de ~70 µm (distancia entre las espinas rostral y dorsal), alcanzan un estadio de desarrollo hasta Z IV con una longitud de hasta 170 µm para ambos tratamientos, y ambas curvas responden a un crecimiento exponencial ( $R^2 = 0,98$ ).

Luego de 6 días de alimentación se sometieron a extracción en metanol absoluto 90 larvas (PF: 0, 26 gr) del tratamiento PAR y 200 larvas (PF: 0, 45 gr) del tratamiento RUV +PAR. Se observó en las larvas que se alimentaron con *C. gracilis* irradiado con RUV un apenas detectable pico de absorbancia en el rango de la RUVA (334-337) de 0.0921 pero significativo respecto a las otras larvas que no recibieron RUV y no presentaron ninguna señal de pico de absorbancia en ese rango. (Fig. 5.13)



**Figura 5.13:** Espectros de absorbancia para zoeas IV de *C. angulata*, alimentadas previamente con *C. gracilis* irradiado con PAR y RUV + PAR. Figs. A y B, respectivamente.

Durante la alimentación y crecimiento de las Zoeas se calculó la supervivencia de las mismas cuya curva se encuentra representada en la Fig. 5.14, donde se observa que no existen diferencias significativas, con una supervivencia al final del experimento de ~70% para los dos tratamientos.

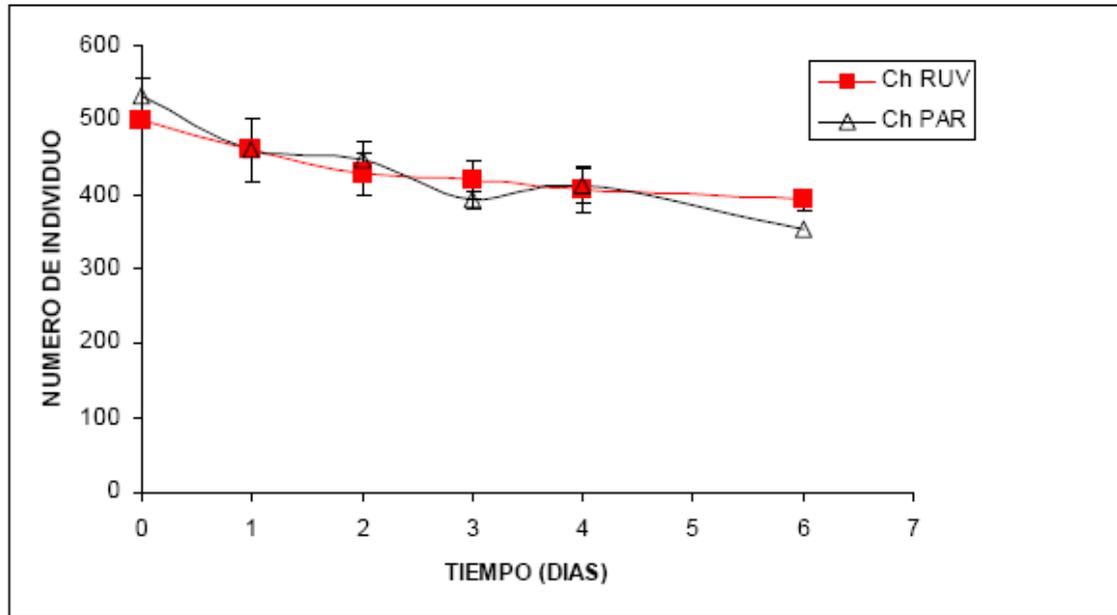


Figura 5.14: Curva de supervivencia para las zoeas alimentadas con *C. gracilis* bajo dos tratamientos de radiación ■ -RUV y ▲ -PAR durante 6 días.

Posteriormente a la alimentación y luego de someter los diferentes zooplancteres a inanición se los colocó bajo el estrés de radiación ultravioleta. Podemos comparar las diferentes tasas de supervivencia para las diferentes especies en la siguiente tabla 5.2, donde se observa que se cumple el mismo patrón de mayor supervivencia en aquellas especies que recibieron alimento irradiado previamente con RUV, donde la especie *Artemia persimilis* resulto ser la más resistente y las larvas zoeas de *Cyrtograpsus angulatus* las más sensibles, ya que aquellas alimentadas con alimento que recibió solo PAR no resistieron mas de 24 h a estrés por RUV. Los copepoditos de *Paracalanus parvus* presentaron supervivencias intermedias y una mayor resistencia aquellas que recibieron *NannoCloropsis* sp.irradiada con RUV.

Tratamiento del alimento / especie alimentada	PAR 24 h	PAR 48h	PAR 72h	RUV 24 h	RUV 48 h	RUV 72 h
<i>Paracalanus parvus</i> <i>Nannochloropsis</i>	85	60	30	100	95	50
<i>Paracalanus parvus</i> <i>Thalassiosira</i>	80	55	20	95	90	40
<i>Artemia persimilis</i> <i>Heterocapsa</i>	60	55	50	100	99	92
<i>Cyrtograpsus</i> <i>angulatus</i> <i>Chaetoceros</i>	26	2		65	20	

**Tabla 5.2:** Tasas de supervivencia (en %) para los individuos de *P parvus*, *Artemia persimilis* y *Cyrtograpsus angulatus* luego de un periodo de estrés con lámparas RUV Q-panel 340. Zooplancteres alimentados con N: *Nannochloropsis* sp. , T: *Thalassiosira fluviatilis*, H: *heterocapsa triquetra* y C: *Chaetoceros gracilis*.

## Discusión

Experimentos previos (Checkle, 1980; Turner, 1984) demostraron que *P parvus* es capaz de alimentarse con diatomeas de largo tamaño. Otro trabajo de Vargas y Gonzáles (2004) apoyan estas observaciones, concluyendo que esta especie es capaz de consumir diatomeas de hasta 50  $\mu\text{m}$  de diámetro. Estudios realizados con el copépodo *Acartia clausi* (Donaghay & Small, 1979) demostraron que esta especie es selectiva sobre diatomeas de gran tamaño siempre que se encuentren dentro del rango de ingestión.

En la tabla 4 se presentan las tasas de ingestión de los copépodos con cada una de las especies fitoplanctónicas utilizadas como alimento en este capítulo. Son semejantes los valores para ambas diatomeas, mayores tasas resultan ser para *Nannochloropsis* sp y no se registraron tasas de ingestión para *H. triquetra* por parte de estos copépodos. En base a estos resultados se decidió trabajar con una de las dos diatomeas y con el alga verde para los tratamientos de alimentación, utilizando únicamente las especies *Thalassiosira fluviatilis* y *Nannochloropsis* sp.

	Tratamiento PAR ( ml d <sup>-1</sup> )	Tratamiento PAB ( ml d <sup>-1</sup> )
<i>Chaetoceros gracilis</i>	6±1	6±0.8
<i>Thalassiosira fluviatilis</i>	7±0.5	6±1.2
<i>Heterocapsa triquetra</i>	No ingestión	No ingestión
<i>Nannochloropsis sp</i>	10±1.04	10±0.9

**Tabla 5.3.** Tasas de ingestión de *P. parvus* frente a cuatro géneros fitoplanctónicos diferentes dispuestas como alimento

En los resultados obtenidos en estos experimentos, estadios tempranos de desarrollo del copépodo *P. parvus*, presentaron un factor de crecimiento de 3 alimentándolos con la diatomea *T. fluviatilis*, demostrando que esta especie aporta los nutrientes necesarios para el desarrollo de *P. parvus* al menos durante los primeros estadios de desarrollo.

En relación al genero *Artemia*, estudios previos en acuicultura han demostrado la supervivencia de los primeros estadios de desarrollo alimentándolos con algas del grupo de las Bacillariophyceae y Chlorophyceae aunque pocos resultados se han obtenido alimentándolas con Dinophyceae. Algunos estudios de D'agostino, (1980) demuestran la supervivencia de los primeros estadios de desarrollo alimentándolos con *Prorocentrum micans*, sobreviviendo hasta 9 días después de la eclosión. En los resultados de estas tesis se presenta que nauplios de *A. persimilis* pueden sobrevivir alimentándolos con *H. triquetra* hasta 7 días después de la eclosión. Durante la alimentación de *A. persimilis* se calculó la tasa de ingestión y resultó ser ~ 11900 y 11833 cel. min<sup>-1</sup> para los cultivos de *H. triquetra* de los tratamientos PAR y PAB, respectivamente

Thorson (1950) sugiere que la temperatura, la predación y la limitación de alimento son los tres factores más importantes que afectan la supervivencia y crecimiento de las larvas de decápodos. Estudios previos en laboratorio sobre la alimentación de larvas zoeas de decápodos han mostrado su naturaleza planctotrófica y carnívora, depredando principalmente sobre alimento de origen animal (e.g. otras larvas). Mientras que la presencia de fitoplancton en el cultivo permite la supervivencia de las larvas, el alimento de origen animal permite el crecimiento y movilidad de las mismas (Sandoz & Rogers, 1944; Sulkin, 1975; Bigford, 1977). La falta de crecimiento a partir de las algas

puede deberse a dificultades mecánicas, limitaciones nutricionales o ambas (McConaughy, 1985). Otros estudios donde se alimentaron larvas con diatomeas y dinoflagelados mostraron que si bien pueden consumir diatomeas, su pequeño tamaño (6-100  $\mu\text{m}$ ) puede limitar la tasa de ingestión. Diatomeas intactas se reportaron no digeridas por algunas larvas (Roberts, 1974). Esto sugiere la falta de enzimas capaces de extraer nutrientes a partir de esas formas de alimento (Plett & McConaughy, 1987, 1988). **Una importante excepción** a la regla se encontró en las larvas de *Cancer anthonyi* alimentadas con una mezcla de diatomeas y dinoflagelados (Yazdandoust, 1985). Se observó que el estadio larval I alimentado con algas mudó más rápido y presentó tasas mayores de crecimiento comparadas con larvas alimentadas con nauplius de *Artemia*. Una mezcla de algas permitió el desarrollo a través de cinco estadios de zoea de esta especie (Yazdandoust, comunicación personal a McConaughy). Brick, 1974 sugiere que el alga puede ofrecer la condición del medio removiendo metabolitos y liberando oxígeno. Una situación similar se encontró en larvas de *Thor floridanus* (Sandifer, 1972) donde se produjo un efecto beneficioso de una dieta de algas comparada con una dieta basada en nauplios de *Artemia* durante los primeros cinco estadios de Zoea, aunque luego del estadio V la tasa de alimentación sobre *Artemia* pasó a ser mayor. En estos experimentos donde zoeas del género *Cyrtograpsus* fueron alimentadas con la diatomea *Chaetoceros* sp no se registraron diferencias significativas (ANOVA  $p < 0,01$ ) para la tasa de ingestión de los alimentos bajo los dos tratamientos de radiación siendo de 1527 y 1591  $\text{cell min}^{-1}$  para los tratamientos PAB y PAR, respectivamente. En este trabajo de tesis, las larvas de *C. angulatus* presentaron un factor de crecimiento igual a 2,4, luego de alimentarse por 5 días con *C. gracilis* sugiriendo que las larvas pudieron obtener de la diatomea elegida los nutrientes necesarios para su desarrollo a lo largo de cuatro estadios de zoea.

En relación a la bioacumulación de los compuestos que absorben RUV, hay evidencias de transferencia de compuestos a partir de productores primarios hacia niveles superiores de la cadena trófica (Carroll & Shick, 1996). Estudios sobre fitoplancton de la Antártida revelaron la bioacumulación de MAAs en invertebrados a partir de la dieta de macroalgas y diatomeas (Karentz *et al.*, 1991a; Mc Clintock & Karentz, 1997). Estudios previos sobre crustáceos pero alimentados con macroalgas a las cuales se les indujo la formación de compuestos que absorben RUV (Helbling *et al.*, 2002), presentaron

resultados similares en cuanto a la protección de los compuestos a través de la dieta, ya que aquellos que recibieron algas con compuestos que absorben RUV resistieron más a la RUV moderada que aquellos alimentados con algas que no presentaron MAAs. En este estudio, para las tres especies zooplanctónicas se observó una mayor resistencia y supervivencia de las especies que recibieron alimento irradiado con RUV, ante un estrés por RUV moderada. Incluso para el copépodo *P. Parvus* que recibió cultivo de algas verdes (con menor porcentaje de compuestos que absorben RUV) que crecieron bajo la influencia de la RUV, la resistencia fue mayor, indicando un efecto indirecto a través de la dieta. Estudios previos con copépodos de agua dulce (Gonçalves *et al.*, 2002) evidenciaron que la presencia de MAAs disminuye el porcentaje de mortalidad en el copépodo *Metacyclops mendocinus* (Wierzejski) al ser sometido a estrés por RUVB.

En ninguna de las tres especies de zooplancton se registraron diferencias significativas en la tasa de ingestión entre tratamientos de radiación de las especies de algas utilizadas como alimento. Esto indicaría que la irradiación con RUV sobre el alimento no afecta en la palatabilidad del zooplancton que lo está consumiendo.

Diferencias significativas se observaron en la supervivencia de los zooplanctones al someterlos a moderada RUV luego de ser alimentados con las algas irradiadas. Copepoditos de *P. parvus* que recibieron algas verdes (sin concentraciones relevantes de compuestos que absorben RUV) luego de la exposición presentaron un pico de absorbancia en el rango de la RUV, lo que indicaría que los compuestos se encontraban potencialmente en el alimento, fueron asimilados por los zooplanctones y en concentraciones apenas apreciables fueron igualmente efectivos para proteger al zooplancton ante un estrés como la RUV, dado que los copepoditos presentaron hasta un 95% de supervivencia luego del estrés, en comparación con aquellos que recibieron *Nannochloropsis* sp irradiada solo con PAR, (60%), esto indicaría la bioacumulación de los compuestos por parte de *P. parvus*. Demostrándose que los MAAs aun estando presente en bajas concentraciones, contribuyen a la absorción de la radiación UV (Whitehead & Vernet 2000).

Por su lado, los nauplios de *A. persimilis* fueron alimentados con *H. triquetra*. Esta alga presenta compuestos dentro del rango del RUV en concentraciones mayores que las diatomeas, (incluso sin ser expuestas a RUV), pero se observa que cuando los

nauplios son sometidos a estrés por RUV luego de un periodo de inanición la concentración no es suficiente y a las 24 h se observa 40% de mortalidad, ante 0% en los individuos alimentados con *H. triquetra* irradiada con RUV. Aunque el porcentaje de mortalidad sigue aumentando en los dos días sucesivos se observa que el mayor porcentaje de mortalidad es al primer día y que luego los individuos sobrevivientes podrían haberse aclimatado a las nuevas condiciones ya que solo se pierden 5% en relación a las primeras 24 h.

Larvas de *C. angulatus* responden de manera semejante a las otras dos especies con porcentajes mayores de supervivencia en las zoeas alimentadas con *C. gracilis* irradiado con RUV, luego de exponer a las larvas durante 24 h a una RUV moderada.

Como conclusión podemos decir que tanto *P. parvus*, *A. persimilis* como *C. angulatus* pueden bioacumular compuestos que absorben RUV a través de la dieta. Estos compuestos (*e.g.* MAAs) le proporcionan una potencial protección ante un estrés por RUV, e incluso pueden incrementar la concentración de los mismos cuando se los somete a RUV moderada aunque en el alimento no se hayan detectado estos compuestos. Estos resultados sugieren la importancia de estos compuestos en las cadenas tróficas ya que podrían ser absorbidos por niveles superiores de la cadena trófica y ofrecer así resistencia a niveles aumentados de RUV. De esta manera podrían encontrarse especies más resistentes o tolerantes que otras, con implicancias en la biodiversidad. Como se mencionó anteriormente actualmente se conocen varias funciones de estos compuestos como ser osmorreguladores, antioxidantes e incluso algunas especies que son capaces de bioacumularlos cuando los nutrientes nitrogenados se encuentren en exceso en el medio para tener así reservorio de nitrógeno en periodos de baja concentración de nutrientes (Korbee *et al.*,2006).

## Capítulo 6: Conclusiones generales

En base a los resultados y discusiones de los experimentos llevados a cabo en el desarrollo de esta tesis se desprenden las siguientes conclusiones:

Basándose en las hipótesis planteadas acorde con los objetivos de este trabajo, se puede decir que efectivamente altos niveles de radiación ultravioleta afectan a las comunidades naturales fitoplanctónicas, donde se observan especies más tolerantes a la RUV evidenciadas con un mayor desarrollo y crecimiento que otras más sensibles donde las tasas de crecimiento y el desarrollo fueron menores. En estos experimentos el grupo de las diatomeas predominó notablemente (~ 90%) en la comunidad luego de exponer microcosmos a la RUV, aunque no solo se consideró a la RUV como única variable ya que la adición de nutrientes cumplió el rol principal a tener en cuenta sobre el crecimiento. Se pudo observar el efecto combinado de ambos e incluso sinérgico al observar como las comunidades expuestas a RUV con agregado de nutrientes consumen mas nutrientes que aquellas expuestas solo a luz visible y ofrecen mayor tolerancia al estrés que aquellos cultivos con concentración de nutrientes del agua de mar natural (principalmente en los experimentos que se realizaron en otoño e invierno). Fue interesante observar como diatomeas de menor tamaño como *Chaetoceros* sp. dominaron en los cultivos no enriquecidos, mientras que diatomeas de mayor tamaño como *Thalassiosira* sp lo hizo en cultivos enriquecidos, observándose una clara selección hacia especies mas pequeñas con ventajas al momento de captar nutrientes, en cultivos limitados por nutrientes. Sin embargo, se encontraron diferencias en cuanto a los tratamientos de radiación al final del experimento n° 2 (expuesto baja radiación natural) con altos valores de concentración de Chl *a* en el tratamiento PAB. Las células pudieron haber sido capaces de utilizar la RUV como recurso de energía para fotosíntesis como fue también observado en otros estudios llevados a cabo en Patagonia (Barbieri *et al.*, 2002),

Es importante aclarar que de todas maneras no fue la intención de la tesis extrapolar estos resultados a una comunidad natural en su medio ambiente, ya que para ello sería necesario tener en cuenta otras variables (*e.g.* mezcla, depredadores, etc.), pero para ello sería conveniente trabajar con recipientes mucho mas grandes (*e.g.* mesocosmos de 1000 litros), de todas maneras se cumplió el objetivo que se planteó de alcanzar una

mejor comprensión del efecto combinado de la RUV solar y de los nutrientes sobre las características de una comunidad de la Patagonia en diferentes épocas del año y así agregar información a trabajos previos ya realizados para la misma área (Barbieri *et al.*, 2002, Helbling *et al.*, 2005, Villafañe *et al.*, 2004, Villafañe *et al.*, 2004b) a los cuales se los considera un sustancial soporte de datos. Se puede concluir además que si bien se cumple la hipótesis uno de esta tesis, no es posible generalizar el rol tanto de la radiación como del agregado de nutrientes sobre la comunidad fitoplanctónica de la Patagonia, sino que deben ser tomadas en cuenta las condiciones ambientales, tales como, la historia lumínica y la concentración de nutrientes junto con el estado fisiológico de las células, a la hora de comprender las respuestas observadas. Sin embargo, estos estudios, dado que fueron realizados por períodos largos de tiempo (1-2 semanas), pueden indicar que los cambios observados en el crecimiento del fitoplancton y la composición de las especies fueron mayormente por la disponibilidad de nutrientes y en menor proporción por la exposición a la RUV solar.

Al observar este comportamiento en la comunidad natural se decidió trabajar con cultivos monoespecíficos comparando la respuesta entre diferentes grupos taxonómicos y dentro del mismo grupo. De esta manera se pudo responder la hipótesis dos, donde se plantea la capacidad de sintetizar compuestos que absorben RUV (*e.g.* MAAs) por parte de algunas especies al agregar nutrientes nitrogenados. Así al comparar dos diatomeas de diferente tamaño y dos dinoflagelados, se tomaron en cuenta no solo las variables ambientales como luz y nutrientes sino el grupo taxonómico. Efectivamente se comprobó que en condiciones de alta concentración de nutrientes nitrogenados (*e.g.* ya sea por influencia del río o como resuspensión en el periodo de mezcla) los dinoflagelados podrían competir con las diatomeas produciendo mayor cantidad de compuestos que absorben RUV y siendo de esta manera mas resistentes ante un estrés por RUV. Si bien las diatomeas, presentaron mayores velocidades de respuesta al cambio de nutrientes y de radiación, los dinoflagelados presentaron mayor rendimiento fotoquímico y los nutrientes influyeron en la acumulación de compuestos que absorben RUV indicando una fotoaclimatación vía la presencia de compuestos que absorben RUV y una selección hacia las especies más RUV tolerantes. Es importante este punto, donde una comunidad fitoplanctónica como la estudiada en la Patagonia se puede encontrar expuesta al aumento

de nutrientes nitrogenados volcados a partir de actividades portuarias o directamente desde el río. Aquellas especies que tienen la capacidad, podrían utilizar esos nutrientes a su favor para producir compuestos que absorben RUV que además de ser fotoprotectores cumplen otras muchas funciones beneficiosas.

Volcándose a la tercera hipótesis de este trabajo doctoral, al tomar en cuenta las interacciones fito-zooplancónicas en función de la cadena trófica, se pudo determinar que efectivamente un cambio en la comunidad fitoplanctónica dada por un efecto de la RUV sobre esta, podría ejercer una influencia sobre la comunidad zooplancónica.

Contrariamente a lo que se podría esperar, esta influencia no es negativa, ya que al observar el comportamiento de las tres especies zooplancónicas estudiadas no se observó una diferencia significativa en la elección de la dieta entre especies irradiadas con RUV y sin irradiar, no afectando aparentemente la palatabilidad del zooplancton, ya que las tasas de ingestión fueron similares para los dos tratamientos. Sin embargo, fue interesante observar los efectos positivos cuando las especies zooplancónicas expuestas a RUV, luego de ser alimentadas con fitoplancton irradiado con RUV, presentaron altas tasas de supervivencia y no se vio afectada su fisiología en general, en comparación con aquellas alimentadas con algas que crecieron solo con luz visible. Esto indica que aquellas especies de fitoplancton produjeron compuestos que absorben RUV y éstos fueron transferidos al zooplancton y confirieron protección al bioacumularse en los tejidos. Por otra parte, se vio un resultado muy interesante al alimentar a copepoditos de *Paracalanus parvus*, con la especie *Nannochloropsis* sp., un alga verde (Chloroficeae), la cual es utilizada en acuicultura, entre otros motivos por su contenido proteico y tamaño adecuado. Al inducir a *Nannochloropsis* sp. a la formación de compuestos que absorben RUV de la misma forma que se pudo inducir en diatomeas y dinoflagelados durante 20 días de exposición a la RUV, no se observó la presencia de compuestos protectores, (esperable dado que no hay registro de los mismos en esta especie, Häder *et al.*, 1995) de todas maneras se alimentó a los copepoditos con esta alga irradiada y si bien no presentaron biocumulación luego de la alimentación, se observó un pico de absorbancia dentro del rango de la RUVA en el zooplancton cuando se expuso a los copépodos a la RUV por 3 días. Esto podría indicar que si bien el alga verde no formó compuestos en la cantidad que podría visualizarse en un espectro de absorbancia, pudieron haber formado

lo suficiente como para ofrecerle protección a los copépodos y realmente estos los bioacumularon en los tejidos, observándose el pico absorbancia al finalizar los tres días de exposición. Como conclusión se puede decir que los compuestos que absorben RUV producidos por algunas especies de algas pueden ser transferidos a través de la dieta. Estos podrían proporcionarle protección antes un estrés por RUV, ya que se observó la capacidad de bioacumular estos compuestos en los tejidos y una disminución de la mortalidad asociada a esta inducción de compuestos que absorben RUV. Estos resultados indicando que la bioacumulación es posible en consumidores primarios, podrían ser interesante a la hora de considerar eslabones superiores de la cadena trófica (*e.g.* peces, aves) que se alimentan directamente del zooplancton, y la posible bioacumulación de compuestos que absorben RUV a través de la dieta otorgándole una mayor resistencia cuando son expuestas a altas dosis de RUV.

En base a estos resultados, queda pendiente para investigaciones futuras estudiar otras especies de fitoplancton, inducir a la formación de compuestos que absorben RUV y alimentar a otras especies de zooplancton, intentar exposiciones tanto de las algas como del zooplancton por mayores periodos de tiempo a la RUV y con diferentes intensidades de radiación o nutrientes, y considerar la transferencia de estos compuestos a niveles superiores de la red trófica.

## Lista de tablas y figuras:

**Figura 1.1:** Estructuras químicas y máximos de absorción de los 23 MAAs identificados en organismos marinos

**Figura 1.2:** Mapa del área de estudio- Bahía Nueva, en la provincia de Chubut-. El cuadro muestra la posición relativa de Chubut dentro de América del Sur.

**Figura 3.1:** Dosis diaria de radiación solar (en  $\text{KJ m}^{-2}$ ) durante el año 2003. A) PAR, 400–700 nm; B) UV-A, 315-400 nm; C) UV-B, 280-315 nm. Exp. 1 llevado a cabo del 25 de Febrero al 3 de Marzo, Exp. 2, 20 de mayo a 1de Junio; Exp.3 del 26 Agosto al 7 de Septiembre.

**Figura 3.2:** Concentración de Chl *a* ( $\text{mg. Chl } a \text{ m}^{-3}$ ) durante: A) Exp.1; B) Exp. 2 y, C) Exp. 3). Los símbolos indican diferentes tratamientos nutrientes / radiación impuestos a las muestras: ( $\square$ ) Muestras expuestas solo a luz visible sin adición de nutrientes (tratamiento P); ( $\circ$ ) Muestras expuestas al total de la radiación, PAR+UVR, sin adición de nutrientes (tratamiento PAB); ( $\blacksquare$ ) Muestras expuestas solamente a luz visible con nutrientes agregados (tratamiento P+N) ;( $\bullet$ ) muestras expuestas al total de la radiación.

**Tabla 3.1:** Tasa de crecimiento ( $\mu$ , en  $\text{día}^{-1}$ , calculado a partir de datos Chl *a*) de las comunidades fitoplanctónicas de Bahía Nueva expuestas a diferentes tratamientos de nutrientes / radiación. Los tratamientos de radiación son señalados por P (PAR solamente) y PAB (PAR+UV-A+UV-B). N indica cultivos que recibieron nutrientes adicionales al comienzo del experimento.

**Tabla 3.2:** Composición taxonómica al comienzo y al final de la experimentación. Los valores iniciales son presentados como concentración celular ( $\text{cel. ml}^{-1}$ ), biomasa ( $\text{mg C m}^{-3}$ ) y porcentaje (%) del total de la biomasa. Los valores finales son representados como porcentaje del total de biomasa.

**Figura 3.3:** abundancia de diatomeas céntricas (en  $\text{mg. C m}^{-3}$ ) durante: A) Exp. 1 (al final del verano); B) Exp. 2 (final de otoño) y C) Exp. 3 (final de invierno). Los símbolos indican diferencias entre diferentes tratamientos nutrientes/radiación impuestos a las muestras ( $\square$ ) muestras expuestas solo a luz visible sin adición de nutrientes (tratamiento P); ( $\circ$ ) muestras expuestas al total de la radiación, PAR+RUV, sin adición de nutrientes (tratamiento PAB); ( $\blacksquare$ ) muestras expuestas solamente a luz visible con nutrientes.

**Figura 3.4:** Abundancia de diatomeas pennadas (en  $\text{mg C m}^{-3}$ ) durante: A) Exp. 1 (fines de verano); B) Exp. 2 (fines de otoño) y C) Exp. 3 (fines de invierno). Los símbolos indican diferencias entre diferentes tratamientos nutrientes/radiación impuestos a las muestras. (Ver referencia Fig.3.3).

**Tabla 3.3:** Especies representativas de diatomeas (*i.e.* contribución de diatomeas > 60% de la concentración total) al final del experimento llevado a cabo con agua de Bahía Nueva. Los tratamientos de radiación son indicados por P (PAR solamente) y PAB (PAR+UV-A+UV-B). N indica cultivos que recibieron nutrientes adicionales al comienzo del experimento.

**Figura 3.5:** Concentración de compuestos que absorben UV estimado por el valor promedio del pico de absorción 337 nm dividido por Chl *a* (D.O. ( $\mu\text{g Chl } a\text{-}^1$ ) para muestras al comienzo (T0) y al final de los experimentos (después de la exposición a diferentes tratamientos de nutrientes / radiación). Barras grises indican muestras sin agregado de nutrientes (tratamientos P y PAB) y barras negras con agregado de los mismos (tratamientos P + N y PAB + N). A) Exp. 1; B) Exp. 2 y, C) Exp.3. La línea horizontal sobre las barras indica diferencia no significativa entre barras, conectadas por la línea.

**Figura 4.1.1:** Curvas de crecimiento (mgChl *a* m<sup>3</sup>) en función del tiempo para: *T. fluviatillis*, *P. micans*, y *H. triquetra* con cuatro concentraciones de nutrientes (ver tabla 1) con radiación PAR (200 Wm<sup>-2</sup>).

**Tabla 4.1.1:** Concentraciones finales de los nutrientes NaPO<sub>4</sub>H<sub>2</sub> y NaNO<sub>3</sub> (mM) utilizados en los cultivos de *T. fluviatillis*, *H. triquetra* y *P. micans*, previamente a someterlos a tratamientos de radiación

**Figura 4.1.2:** Curvas de crecimiento (mgChl *a* l<sup>-1</sup>) en función del tiempo para: *T. fluviatillis*, *P. micans*, y *H. triquetra* para diferentes tratamientos radiación/nutrientes PAB: RUV y PAR; P: PAR. N denota nutrientes adicionales.

**Tabla 4.1.2:** Tasa de crecimiento ( $\mu$ , en día<sup>-1</sup>) de *T. fluviatillis*, *H. triquetra* y *P. micans* expuestas a diferentes tratamientos de nutrientes / radiación. Los tratamientos de radiación son indicados por PAB (PAR+UVA+UVB), y P (solo PAR). N indica cultivos con nutrientes adicionales. P ( $\mu=\mu\text{N}+$ ) indica grado de significancia entre medias de los mismos tratamientos de radiación. Los asteriscos indican diferencias significativas entre los tratamientos de nutrientes (*i.e.* comparando el mismo tratamiento de radiación).

**Figura 4.1.3:** Curva de nitratos al comienzo, a la mitad y al final del los experimentos para *T. fluviatillis*, *H. triquetra* y *P. micans* en los diferentes tratamientos radiación/nutrientes.

**Figura 4.1.4:** Evolución del pico de absorbancia 334-337, y concentración de NO<sub>3</sub> para *T. Fluviatillis*, bajo diferentes tratamientos de nutrientes / radiación artificial. PAB: RUV y PAR; P: PAR. N denota nutrientes agregados

**Figura 4.1.5:** Evolución del pico de absorbancia 334-337, y concentración de NO<sub>3</sub> para *H. triquetra* bajo diferentes tratamientos de nutrientes / radiación artificial. PAB: RUV y PAR; P: PAR. N denota nutrientes.

**Figura 4.1.6:** Evolución del pico de absorbancia 334-337, y concentración de NO<sub>3</sub> para *P. micans* bajo diferentes tratamientos de nutrientes / radiación artificial. PAB: RUV y PAR; P: PAR y N denota nutrientes.

**Figura 4.2.1:** Valores de Ozono y Dosis diarias de radiación PAR, UV-A y UV-B, durante el período que duraron los experimentos que abarca desde el 2 de febrero al 20 de marzo de 2005.

**Figura 4.2.2:** Variación diaria de irradiancia PAR (en W m<sup>-2</sup>) durante el período de experimentación (desde el 2 de febrero al 20 de marzo de 2005).

**Tabla 4.2.1:** Tasa de crecimiento ( $\mu$ , en día<sup>-1</sup>) de *C. gracilis* sp, *T. fluviatillis* *P. micans* y *H. triquetra* expuestas a diferentes tratamientos de nutrientes / radiación. Los tratamientos de radiación son indicados por PAB (PAR+UVA+UVB), PA (PAR+UVA), y P (solo PAR). N indica cultivos con nutrientes adicionales. Los asteriscos indican diferencias significativas entre tratamientos de nutrientes dentro del mismo tratamiento de radiación ( $p < 0,05$ ).

**Figura 4.2.3:** Curvas de crecimiento ( $\mu$ g Chl a m<sup>-3</sup>) en función de los días julianos para *C. gracilis*, *T. Fluviatillis*, *P. micans*, y **H. triquetra** durante el período de experimentación.

**Figura 4.2.4:** Rendimiento fotoquímico (Yield) del fotosistema II a las 8, 13 y 17 h en función de los días julianos para a-*C. gracilis*, b-*T. Fluviatillis*, c- *P. micans* y d- *H. triquetra* durante el período de experimentación. Los símbolos indican los diferentes tratamientos nutrientes/radiación impuestos a las muestras: círculo, muestras expuestas a luz PAR + RUV-A; diamantes, muestras expuestas al total de la radiación, (PAR+RUV) y cuadrados, muestras expuestas solamente a luz visible (PAR). Los símbolos abiertos indican muestras sin adición de nutrientes y los rellenos, indican nutrientes agregados.

**Tabla 4.2.2:** Valores promedio de la concentración de NO<sub>3</sub> (y sus desvíos estándares) en función del tiempo para cada tratamiento radiación/nutrientes de la cuatro especies estudiadas en los experimentos.

**Figura 4.2.5:** Inhibición de la fotosíntesis (%) por radiación en función de los días julianos para: a-*C. gracilis*, b-*T. Fluviatillis*, c- *P. micans* y d-*H. triquetra*.

**Figura 4.2.6:** Espectro inicial de absorción para *C. gracilis*, *T. Fluviatillis*, *P. micans* y *H. triquetra* obtenidos a partir de la extracción en metanol absoluto.

**Figura: 4.2.7:** Evolución del pico de absorbancia 334-337 para A- *C.gracilis*, B- *T. Fluviatillis*, C-*P. micans* y D-*H. triquetra* durante el período de experimentación bajo radiación solar.

**Figura: 4.2.8:** Pendiente del porcentaje de inhibición (%) en función de la concentración de MAAs (OD mg Chl-a-1) para las diatomeas a-*C. gracilis* y b- *T. fluviatilis* y los dinoflagelados c-*P. micans* y c- *H. triquetra* en tratamientos sin nutrientes y tratamientos con nutrientes.

**Tabla 5.1:** Recipientes, número de individuos, estadios de desarrollo y condiciones ambientales en donde transcurrieron los experimentos de alimentación. C, indica estadio de copepodito, en *P parvus*. N, indica estadio larval de Nauplio en *A. persimilis* y Z: estadio de larva Zoea en *C. angulatus*

**Figura 5.1:** Curva de crecimiento para *T fluviatilis* bajo dos tratamientos de radiación PAR y PAR + RUV

**Figura 5.2:** Evolución del pico de absorbancia 334 durante la fase exponencial del cultivo semi-continuo de *T.fluviatilis* bajo dos tratamientos de radiación: PAR y PAR +RUV.

**Figura 5.3:** Espectros de Absorbancia durante el crecimiento de *H triquetra* bajo dos tratamientos de radiación.

**Figura 5.4:** Curva de crecimiento para *Ch.gracilis* bajo dos tratamientos de radiación PAR Y PAR + RUV.

**Figura 5.5:** Evolución del pico de absorbancia 334 durante la fase exponencial del cultivo semi-continuo de *Ch. gracilis* bajo dos tratamientos de radiación: PAR y PAR +RUV.

**Figura 5.6:** Curva de crecimiento de *P parvus* alimentado durante 5 días con *T. fluviatilis* y *Nannochloropsis* sp. bajo los tratamientos de radiación A) tratamiento PAB y B) tratamiento PAR.

**Figura 5.7:** Curva del pico de absorción a 334-337 en el copépodo *P .parvus* durante los 5 días de alimentación con *T.fluviatilis* y luego de 2 días de inanición (numero 7). Los primeras cinco puntos correspondes al contenido del tubo digestivo y el ultimo punto (7) a la concentración bioacumulada en los tejidos.

**Figura 5.8:** Evolución del pico de absorción a 334-337 en el copépodo *P .parvus* durante los 5 días de alimentación con *Nannochloropsis* sp. y luego de 2 días de inanición. Los primeras cinco puntos corresponden al contenido digestivo y la ultimo punto (7) a la concentración bioacumulada en los tejidos

**Figura 5.9:** Curva de crecimiento para *Artemia persimilis* durante la alimentación (días 1-7) con cultivos de *H. triquetra* previamente irradiados con PAR y PAR + RUV (PAB) y durante el periodo de ayuno (días 7-10).

**Figura 5.10:** Pico de absorbancia en *A. persimilis* al séptimo día de alimentación con cultivos de *H. triquetra* irradiada con PAR y PAR +RUV.

**Figura 5.11.** Pico de absorbancia en *A. persimilis* luego de 3 días de ayuno de cultivos de *H. triquetra* irradiada con PAR y PAR +RUV.

**Figura 5.12:** Curva de crecimiento para larvas de *C. angulatus* durante el periodo de alimentación con *Ch. gracilis* irradiado con ◊ RUV y ■ PAR.

**Figura 5.13:** Espectros de absorbancia para zoeas IV de *C. angulatus*, alimentadas previamente con *Ch. gracilis* irradiado con PAR y RUV + PAR. Figs. A y B respectivamente.

**Figura 5.14:** Curva de supervivencia para las zoeas alimentadas con *Ch. gracilis* bajo dos tratamientos de radiación ■ -RUV y ▲ -PAR durante 6 días.

**Tabla 5.2:** Tasas de supervivencia en % para los individuos de *P. parvus*, *Artemia persimilis* y *Cyrtograpsus angulatus* luego de un periodo de estrés con lámparas RUV Q-panel 340. Zooplancteres alimentados con **N:** *Nannochloropsis sp.*, **T:** *Thalassiosira fluviatilis*, **H:** *Heterocapsa triquetra* y **Ch:** *Chaetoceros gracilis*.

**Tabla 5.3:** tasas de ingestión de *P. parvus* frente a cuatro géneros fitoplanctónicos diferentes dispuestos como alimento.

## Bibliografía

Adam, 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.

Akselman, R., 1996. Estudios Ecológicos en el Golfo San Jorge y adyacencias (Atlántico sudoccidental). Distribución, abundancia y variación estacional del fitoplancton en relación a factores físico-químicos y a la dinámica hidrográfica. Tesis Doctoral, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires. 234 pp.

Alheit, J, J. Ciechomsky, L. Diurfelt, C. Ebel, M. Ehrlich, J. Elgue, G. Montero, Y. Matsuura, H. Mianzán, W. Nellen, C. Odenbrencht, F. Ramírez, R. Sánchez, G. Shaffer & M. D. Viñas, 1991. SARP studies on the Southwest Atlantic Anchovy, *Engraulis anchoita* off Argentina, Uruguay and Brazil. ICES, Session V, C. M. 1991/L: 46. 32 pp.

Angelelli, I.V., B. Schalamuk & A. Arrospide, 1976. Los yacimientos no metalíferos y rocas de aplicación de la región Patagonia-Comahue. Anales XVII. Ministerio de Economía. Secretaría de Estado de Minería, República Argentina. 147 pp.

Angelelli, I.V., B. Schalamuk & R. Fernández, 1980. Los yacimientos no metalíferos y rocas de aplicación de la región Centro-Cuyo. Anales XIX. Ministerio de Economía. Secretaría de Estado de Minería, República Argentina. 261pp.

Anger, K., E. Spivak, C. Bas, D. Ismael & T. Luppi, 1994. Hatching rhythms and dispersion of decapod crustacean larvae in a brackish coastal lagoon in Argentina. *Helgoländer Meeresunters* 48: 445-466.

Atkinson, R. J., W. A. Matthews, P. A. Newman & R. A. Plumb, 1989. Evidence of the mid-latitude impact of Antarctic ozone depletion. *Nature* 340: 290-294.

Ballaré, C. L., M. C. Rousseaux, P. S. Searles, J. C. Zaller, C. V. Giordano, T. M. Robson, M. M. Caldwell, O. E. Sala & A. L. Scopel, 2001. Impacts of solar ultraviolet-B radiation on terrestrial ecosystems of Tierra del Fuego (southern Argentina). An overview of recent progress. *Journal of Photochemistry and Photobiology, B: Biology* 62: 67-77.

Bamstedt, U., 2000. Life cycle, seasonal vertical distribution and feeding of *Calanus finmarchicus* in Skagerrak coastal water. *Marine Biology* 137: 279-289.

Banaszak, A. T. & P. J. Neale, 2001. Ultraviolet radiation sensitivity of photosynthesis in phytoplankton from an estuarine environment. *Limnology and Oceanography* 46: 592-603.

Banaszak, A. T., 2003. Photoprotective physiological and biochemical responses of aquatic organisms. *In: Helbling, E. W. & H. E. Zagarese (eds.) UV effects in aquatic organisms and ecosystems. The Royal Society of Chemistry, Cambridge: 329-356.*

Banaszak, A. T., M. G. Barba Santos, T. C. La Jeunesse, M. P. Lesser, 2006. The distribution of mycosporine-like amino acids (MAAs) and the phylogenetic identity of symbiotic dinoflagellates in cnidarians hosts from the Mexican Caribbean. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 337: 131-146.

Bandanarayake, W. M., 1998. Mycosporines: are they nature's sunscreens? *Natural Product Report* 15: 159-172.

Bandaranayake, W. M., J. E. Bemis & D. J. Bourne, 1996. Ultraviolet absorbing pigments from the marine sponge *Dysidea herbacea*: Isolation and structure of a new mycosporine. *Comparative Biochemistry and Physiology C-Pharmacology, Toxicology & Endocrinology* 115: 281-286.

Banse, K., 1995. Zooplankton: pivotal role in the control of ocean production. *ICES Journal of Marine Science* 52: 265-277.

Barbieri, E. S., V. E. Villafaña & E. W. Helbling, 2002. Experimental assessment of UV effects upon temperate marine phytoplankton when exposed to variable radiation regimes. *Limnology and Oceanography* 47: 1648-1655.

Bigford, T. E., 1977. Effects of several diets on survival development time and growth of laboratory reared spider crab, *Libinia emarginata*, larvae. *Fisheries Bulletin* 76: 59-64.

Björnberg, T. K. S., 1981. Copepoda. *In*: Boltovskoy, D. (ed.) *Atlas del Zooplankton del Atlántico sudoccidental y métodos de trabajo con el zooplankton marino*. Publ. Esp. INIDEP, Mar del Plata: 587-679.

Böhm, G. A., W. Pfeleiderer, P. Böger & S. Scherer, 1995. Structure of a novel oligosaccharide-mycosporine-amino acid ultraviolet A/B sunscreen pigment from the terrestrial cyanobacterium *Nostoc commune*. *Journal of Biological Chemistry* 270: 8536-8539.

Bothwell, M. L., D. Sherbot, A. C. Roberge & R. J. Daley, 1993. Influence of natural ultraviolet radiation on lotic periphytic diatom community growth, biomass accrual, and species composition: short-term versus long-term effects. *Journal of Phycology* 29: 24-35.

Brick, R. W., 1974. Effects of water quality, antibiotics, phytoplankton and food on survival and development of larvae of *Scylla serrata* (Crustacea: Portunidae). *Aquaculture* 3: 231-244.

Browman, H. I. & B. M. Marcotte, 1987. The effect of zooplankton abundance on feeding behavior and prey size selection in Atlantic salmon, *Salmo salar*, alevines. *Holarctic Ecology* 10: 163-170.

Brown, M. R. & C. L. Farmer, 1994. Riboflavin content of six species of microalgae used in mariculture. *Journal of Applied Phycology* 6: 61-65.

Brown, M. R. & K. A. Miller, 1992. The ascorbic acid content of eleven species of microalgae used in mariculture. *Journal of Applied Phycology* 4: 205-215.

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, B: Biology* 62: 9-18

Buma, A. G. J., P. Boelen & W. H. Jeffrey, 2003. UVR-induced DNA damage in aquatic organisms. *In: Helbling, E. W. & H. E. Zagarese (eds.) UV effects in aquatic organisms and ecosystems. The Royal Society of Chemistry, Cambridge: 291-327.*

Cabrera S., M. Lopez & B. Tartarotti, 1997. Phytoplankton and zooplankton response to ultraviolet radiation in a high altitude Andean lake: short- versus long-term effects. *Journal of Plankton Research* 19:156-158.

Calkins, J. & T. Thordardottir, 1980. The ecological significance of solar UV radiation on aquatic organisms. *Nature* 283: 563-566.

Campos, A. & E. Suárez., 1994. Copépodos pelágicos del Golfo de México y Mar Caribe. I: Biología y Sistemática. CIQRO/CONACYT. México. 359 pp.

Carefoot, T. H., M. Harris, B. E. Taylor, D. Donovan & D. Karentz, 1998. Mycosporine-like amino acids: possible UV protection in eggs of the sea hare *Aplysia dactyomela*. *Marine Biology* 130: 389-396.

Carreto J. I., H. Benavides, R. Negri & P. D. Glorioso, 1986. Toxic red-tide in the Argentine Sea. Phytoplankton distribution and survival of the toxic dinoflagellate *Gonyaulax excavata* in a frontal area. *Journal of Plankton Research* 8: 15-28.

Carreto J. I., R. M. Negri, H. R., Benavides & R. Akselman, 1985. Toxic dinoflagellate blooms in the Argentine Sea. *In: Anderson, D. M., A. W. White & D. G. Baden (eds.) Toxic dinoflagellates. Elsevier, New York: 147-152.*

Carreto, J. I., M. O. Carignan & N. G. Montoya, 2005. A high-resolution reverse-phase liquid chromatography method for the analysis of mycosporine-like amino acids (MAAs) in marine organisms. *Marine Biology* 146: 237-252.

Carroll, A. K. & J. M. Shick, 1996. Dietary accumulation of UV-absorbing mycosporine-like amino acids (MAAs) by the green sea urchin (*Strongylocentrotus droebachiensis*). *Marine Biology* 124: 561-569.

- Chalker-Scott, L., 1995. Survival and sex ratios of the intertidal copepod, *Tigrjopus californicus*, following ultraviolet-B (290-320 nm) radiation exposure. *Marine Biology* 123: 799-804.
- Chu, F. E. & K. L. Webb, 1984. Polyunsaturated fatty acids and neutral lipids in developing larvae of the oyster *Crassostrea virginica*. *Lipids* 19: 815-820.
- Cloern, J. E., 2001. Our evolving conceptual model of the coastal eutrophication problem. *Marine Ecology Progress Series* 210: 223-253.
- Cockell C. S. & J. Knowland, 1999. Ultraviolet radiation screening compounds. *Biological Review* 74: 311-345.
- Cohen, R. G., F. Amat, F. Hontoria & J. C. Navarro, 1999. Preliminary characterization of some Argentinean populations of the brine shrimp *Artemia* (Crustacea, Branchiopoda, Anostraca). Provinces of La Pampa and Buenos Aires. *International Journal of Salt Lake Research* 8: 329-340.
- Coutteau, P. & P. Sorgeloos, 1992. The use of algal substitutes and the requirement for live algae in the hatchery and nursery rearing of bivalve mollusks: an international survey. *Journal of Shellfish Research* 11: 467-476.
- Cullen J. J. & M. P. Lesser, 1991. Inhibition of photosynthesis by ultraviolet radiation as a function of dose and dosage rate: results for marine diatom. *Marine Biology* 111: 183-190.
- Damkaer, D. M., D. B. Dey & G. A. Heron, 1980. Effects of UV-B radiation on near-surface zooplankton of Puget Sound. *Ecology* 44: 149-158.
- Davidson, A. T., H. J. Marchant & W. K. de la Mare, 1996. Natural UVB exposure changes the species composition of Antarctic phytoplankton in a mixed culture. *Aquatic Microbial Ecology* 10: 299-305.
- De Lange, P. J., P. B. Heenan, D. R. Given, D. A. Norton, C. C. Ogle, P. N. Johnson & E. K. Cameron, 1999. Threatened and uncommon plants of New Zealand. *New Zealand Journal of Botany* 37: 603-628.
- Donaghay, P. L. & L. F. Small, 1979. Food selection capabilities of the estuarine copepod *Acartia clausii*. *Marine Biology* 52: 137-146.
- Donaghay, P. L. & L. F. Small, 1979. Long-term food modification by *Acartia clausii*: a preliminary view. *Marine Biology* 52: 129-136.
- Dunlap, W. C. & J. M. Shick, 1998. UV radiation absorbing mycosporine-like amino acids in coral reef organisms: a biochemical and environmental perspective. *Journal of Phycology* 34: 418-430.

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., G. A. Rae, E. W. Helbling, V. E. Villafañe & O. Holm-Hansen, 1995. Ultraviolet-absorbing compounds in natural assemblages of Antarctic phytoplankton, *Antarctic Journal of the United States* 30: 323-326.

Dunlap, W. C., A. Fujisawa, Y. Yamamoto, T. J. Moylan, B. D. Sidell, 2002. Notothenioid fish, krill and phytoplankton from Antarctica contain a vitamin E constituent (alpha-tococomonoenol) functionally associated with cold-water adaptation. *Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology* 133: 299-305.

Ekelund N. G. A., 1990. Effects of UV-B radiation on growth and motility of four phytoplankton species. *Physiologia Plantarum* 78: 590-594.

Esteves, J. L., N. Santinelli, V. Sastre, R. Díaz & O. Rivas, 1992. A toxic dinoflagellate bloom and PSP production associated with upwelling in Golfo Nuevo, Patagonia, Argentina. *Hydrobiologia* 242: 115-122.

Estevez, M. S., G. Malanga, S. Puntarulo, 2001. UV-B effects on Antarctic *Chlorella* sp. cells. *Journal of Photochemistry and Photobiology, B: Biology* 62: 19-25.

F.A.O., 1996. Manual on the production and use of live food for aquaculture. F.A.O. Fisheries Technical Paper 361: 265-281.

Falkowski, P. G., 1981. Light-shade adaptation and assimilation numbers. *Journal of Plankton Research* 3: 203-216.

Farman, J. C., B. G. Gardiner & J. D. Shanklin, 1985. Large loss of total ozone in Antarctica reveal seasonal ClOx / NOx interaction. *Nature* 315: 207-210.

Favre-Bonvin, J., N. Arpin & C. Brevard, 1976. Structure de la mycosporine (P-310) *Canadian Journal of Chemistry* 54: 1105-1113.

Favre-Bonvin, J., N. Arpin & C. Brevard, 1987. Biosynthesis of mycosporines: mycosporine glutaminol in *Trichthecium roseum*. *Photochemistry* 26: 2509-2514.

Fernández Aráoz, N. C., 1994. Estudios sobre la biomasa de Copepoda (Crustacea) con especial énfasis en Calanoidea, del Atlántico Sudoccidental. Tesis Doctoral, Universidad Nacional de Mar del Plata, Mar del Plata. 202 pp.

Figuroa, F. L., S. Salles, J. Aguilera, C. Jimenez, J. Mercado, B. Viñeglas, A. Flores-Moya, & M. Altamirano, 1997. Effects of solar radiation on photoinhibition and

pigmentation in the red alga *Porphyra leucosticta*. Marine Ecology Progress Series 151: 81-90.

García-Pichel, F., 1994. A model for internal self-shading in planktonic organisms and its implications for the usefulness of ultraviolet sunscreens. Limnology and Oceanography 39: 1704-1717.

García-Pichel, F., C. E. Wingard & R. W. Castenholz, 1993. Evidence regarding the UV sunscreen role of a mycosporine-like compound in the cyanobacterium *Gloecapsa* sp. Applied Environmental Microbiology 59: 170-176.

Gayoso, A. M. & V. K. Fulco, 2006. Occurrence patterns of *Alexandrium tamarense* (Lebour) Balech populations in the Golfo Nuevo (Patagonia, Argentina), with observations on ventral pore occurrence in natural and cultured cells. Harmful Algae 5: 233-241.

Gayoso, A. M., 2001. Observations on *Alexandrium tamarense* (Lebour) Balech and other dinoflagellate populations in Golfo Nuevo, Patagonia (Argentina). Journal of Plankton Research 23: 463-468.

Gayoso, A. M., S. Dover, S. Morton, M. Busman, P. Moeller, V. K. Fulco & L. Maranda, 2002. Diarrhetic shellfish poisoning associated with *Prorocentrum lima* (Dinophyceae) in Patagonian Gulfs (Argentina). Journal of Shellfish Research 21: 461-463.

Genty, B., J. M. Briantais & N. R. Baker, 1989. The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron-transport and quenching of chlorophyll fluorescence. Biochimica et Biophysica Acta 990: 87-92.

Gil, M. N., M. A. Harvey & J. L. Esteves, 1999. Heavy metals in intertidal sediments from Patagonian coast, Argentina. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology 63: 52-58.

Gleason, D. F., 1993. Differential effects of ultraviolet radiation on green and brown morphs of the Caribbean coral *Porites astreoides*. Limnology and Oceanography 38: 1452-1463.

Godínez, D. E., A. Hernández, J. Orozco & E. M. Godínez, 2003. Valoración entre la tasa de ingestión y la supervivencia de larvas de camarón azul *Litopenaeus stylirostris* (Stimpson, 1871) nutridas con diferentes concentraciones de *Chaetoceros calcitrans* (Paulsen). Zootecnia Tropical 21: 133-147.

Goes, J. I., N. Hands, K. Suzuki, S. Taguchi & T. Hama, 1997. Ultraviolet radiation induced changes in the production of organic compounds in Antarctic marine phytoplankton. NIPR Symposium on Polar Biology, Tokyo, National Institute of Polar Research: 25-38.

Gonçalves, R. J., V. E. Villafaña & E. W. Helbling, 2002. Photorepair activity and protective compounds in two freshwater zooplankton species (*Daphnia menucoensis* and *Metacyclops mendocinus*) from Patagonia, Argentina. *Photochemical & Photobiological Sciences* 1: 996-1000.

Grant, P. T., C. Middleton, P. A. Planck & R. H. Thomson, 1985. The isolation of four aminocyclohexenimines (mycosporines) and a structurally related derivative of cyclohexane-1,3-dione (gadusol) from the brine shrimp *Artemia*. *Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology* 80: 755-759.

Grasshoff, K., M. Erhardt & K. Kremling, 1983. *Methods of seawater analysis*, 2nd revised and extended edition. Verlag Chemie, Weinheim. 419 pp.

Gregg, W. W. & M. E. Conkright, 2002. Decadal changes in global ocean chlorophyll. *Geophysical Research Letters* 29: 1730.

Gröniger, A., R.P. Sinha, M. Klisch & D.-P. Häder, 2000. Photoprotective compounds in cyanobacteria, phytoplankton and macroalgae - a database. *Journal of Photochemistry and Photobiology, B: Biology* 58: 115-122.

Gucinski, H., D. Marks & D. P. Turner (eds.), 1990. *Biospheric feedbacks to climate change: The sensitivity of regional trace gas emissions, evapotranspiration and energy balance to vegetation redistribution. Status of ongoing research.* U.S. EPA 600/3-90/078.

Guillard, R. R. L. & J. H. Ryther, 1962. Studies of marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* (Hustedt) and *Detonula confervacea* (Cleve). *Canadian Journal of Microbiology* 8: 229-239.

Gurney, R., 1942. Larvae of decapod crustacea. *The Ray Society of London* 129: 68-71.

Häder, D.-P., H. D. Kumar, R. C. Smith & R. C. Worrest, 2003. Aquatic ecosystems: effects of solar ultraviolet radiation and interactions with other climate change factors. *Photochemical & Photobiological Sciences* 2: 39-50.

Häder, D.-P., R. C. Worrest, H. D. Kumar & R. C. Smith, 1995. Effects of increased solar ultraviolet radiation on aquatic ecosystems. *Ambio* 24: 174-180.

Halac, F., L. Camarero, S. Sommaruga-Wögrath, R. Psenner, J. Catalan & R. Sommaruga, 1997. An *in situ* enclosure experiment to test the solar UVB impact on plankton in a high-altitude mountain lake. I. Lack of effect on phytoplankton species composition and growth. *Journal of Plankton Research* 19: 1671-1686.

Hannach, G. & A. C Sigleo, 1998. Photoinduction of UV-absorbing compounds in six species of marine phytoplankton. *Marine Ecology Progress Series* 174: 207-222.

- Hardy, E. R. & A. Duncan, 1994. Food concentration and temperature effects on life cycle characteristics of tropical Cladocera (*Daphnia gessneri* (Herbst), *Diaphanosoma sarsi* (Richard), *Moina reticulata* (Daday)): I. Development time. *Acta Amazonica* 24: 119-134.
- Harris, M. L., L. Chora, C. A. Bishop & J. P. Bogart, 2000. Species- and age-related differences in susceptibility to pesticide exposure for two amphibians, *Rana pipiens*, and *Bufo americanus*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 64: 263-270.
- Harris, R., P. Wiebe, J. Lenz, Skjoldal H.-R. & M. Huntley (eds.), 2000. ICES Zooplankton Methodology Manual. Academic Press, London. 684 pp.
- Helbling E. W., V. E. Villafañe, M. 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. & H. E. Zagarese, 2003. UV effects in aquatic organisms and ecosystems. The Royal Society of Chemistry, Cambridge. 576 pp.
- Helbling, E. W., A. G. J. Buma, M. K. de Boer & V. E. Villafañe, 2001. *In situ* impact of solar ultraviolet radiation on photosynthesis and DNA in temperate marine phytoplankton. *Marine Ecology Progress Series* 211: 43-49.
- 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., 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., F. Zaratti, L. O. Sala, E. R. Palenque, C. F. Menchi & V. E. Villafañe, 2002. Mycosporine-like amino acids protect the copepod *Boeckella titicacae* against high levels of solar UVR. *Journal of Plankton Research* 24: 225-234.
- Helbling, E. W., K. Gao, R. J. Gonçalves, H. Wu & V. E. Villafañe, 2003. Utilization of solar UV radiation by coastal phytoplankton assemblages off SE China when exposed to fast mixing. *Marine Ecology Progress Series* 259: 59-66.
- Helbling, E. W., V. E. Villafañe., A. G. Buma, M. Andrade & F. Zaratti, 2001. DNA damage and photosynthetic inhibition induced by solar UVR in tropical phytoplankton (Lake Titicaca, Bolivia). *European Journal of Phycology* 36: 157-166.
- Hernando, M. P. & G. A. Ferreira, 2005. The effects of UV radiation on photosynthesis in an Antarctic diatom (*Thalassiosira* sp.): does vertical mixing matter? *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 325: 35-45.

Hessen, D. O., 2002. UV radiation and Arctic ecosystems. Springer-Verlag, New York. 321 pp.

Hessen, D. O., 1994. *Daphnia* responses to UV-light. Archiv für Hydrobiologie Beiheft. Ergebnisse der Limnologie 43: 185-195.

Hill D. R., S. L. Hladun, S. Scherer & M. Potts, 1994. Water stress proteins of *Nostoc commune* (Cyanobacteria) are secreted with UV-A/B-absorbing pigments and associate with 1, 4- $\beta$ -D-xylanxylanohydrolase activity. Journal of Biological Chemistry 269: 7726-7734.

Holm-Hansen, O. & B. Riemann, 1978. Chlorophyll *a* determination: improvements in methodology. Oikos 30: 438-447.

Holm-Hansen, O., C. J. Lorenzen, R. W. Holmes & J. D. H. Strickland, 1965. Fluorometric determination of chlorophyll. Journal du Conseil/Conseil Permanent International pour l'Exploration de la Mer 30: 3-15.

Houghton, R. A. & G. M. Woodwell, 1989. Global climatic change. Scientific American 260: 36-44.

Hovel, K. A. & S. G. Morgan, 1999. Vulnerability of estuarine crab larvae to ultraviolet radiation. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 237: 89-106.

Hunter, K. A. & P. S. Liss, 1982. Organic matter and the surface charge of suspended particles in estuarine waters. Limnology and Oceanography 27: 322-335.

Ianora, A., J. T. Turner, F. Esposito, G. d'Ippolito, G. Romano, C. Guisande, Y. Carotenuto & A. Miralto, 2004. Copepod egg hatching success is reduced by maternal diets of a non-neurotoxic strain of the dinoflagellate *Alexandrium tamarense*. Marine Ecology Progress Series 280: 199-210.

Isiordia-Pérez, E., A. C. Puello-Cruz & S. Gómez-Noguera, 2006. Efecto de diferentes dietas de microalgas sobre la supervivencia y crecimiento de *Apocyclops aff. panamensis* (Marsh, 1913) (Copépodo: Cyclopoida) cultivado bajo condiciones controladas de laboratorio. Revista Electrónica de Veterinaria, REDVET 7: 1-9.

Jeffrey, S. W., H. S. MacTavish, W. C. Dunlap, M. Vesik & K. Groenewoud, 1999. Occurrence of UVA- and UVB-absorbing compounds in 152 species (206 strains) of marine microalgae. Marine Ecology Progress Series 189: 35-51.

Johnson, M. W. & J. B. Olson, 1948. The life history and biology of a marine harpacticoid copepod, *Tisbe furcata* (Baird). Biological Bulletin 95: 320-332.

- Jokiel, P. L. & R. H. York, 1982. Solar ultraviolet photobiology of the reef coral *Pocillopora damicornis* and symbiotic zooxanthellae. *Bulletin of Marine Science* 32: 301-315.
- Jory, D. E., 1997. Penaeid shrimp hatcheries: Part III. Larval rearing. *Aquaculture Magazine* (Jan./Feb.): 67-75.
- Karanas, J. J., R. C. Worrest, H. Van Dyke, 1981. Impact of UV-B radiation on the fecundity of the copepod *Acartia clausii*. *Marine Biology* 65:125-133.
- Karentz, D., F. S. McEuen, M. C. Land & W. C. Dunlap, 1991b. Survey of mycosporine-like amino acid compounds in Antarctic marine organisms: potential protection from ultraviolet exposure. *Marine Biology* 108: 157-166.
- Karentz, D., J. E. Cleaver & D. L. Mitchel, 1991a. Cell survival characteristics and molecular responses of Antarctic phytoplankton to ultraviolet-B radiation. *Journal of Phycology* 27: 326-341.
- Karsten, U. & C. Wiencke, 1999. Factors controlling the formation of UV-absorbing mycosporine-like amino acids in the marine red alga *Palmaria palmata* from Spitsbergen (Norway). *Journal of Plant Physiology* 155: 407-415.
- Karsten, U., K. Bischof, D. Hanelt, H. Tüg & C. Wiencke, 1999. The effect of ultraviolet radiation on photosynthesis and ultraviolet-absorbing substances in the endemic Arctic macroalga *Devaleraea ramentacea* (Rhodophyta). *Physiologia Plantarum* 105: 58-66.
- Kim, D.-S. & Y. Watanabe, 1994. Inhibition of growth and photosynthesis of freshwater phytoplankton by ultraviolet A (UVA) radiation and subsequent recovery from stress. *Journal of Plankton Research* 16: 1645-1654.
- Klisch, M., P. S. Rajeshwar, E. W. Helbling and D.-P. Häder, 2005. Induction of thymine dimers by solar radiation in natural freshwater phytoplankton assemblages in Patagonia, Argentina. *Aquatic Sciences* 67: 72-78.
- Kopczynska, E. E., 1992. Dominance of microflagellates over diatoms in the Antarctic areas of deep vertical mixing and krill concentrations. *Journal of Plankton Research* 14: 1031-1054.
- Korbee, N., F. L. Figueroa & J. Aguilera, 2006. Acumulación de aminoácidos tipo micosporina (MAAs): biosíntesis, fotocontrol y funciones ecofisiológicas. *Revista Chilena de Historia Natural* 79: 119-132.
- Korbee Peinado, 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.

- Kouwenberg, J. H. M., H. I. Browman, J. A. Runge, J. J. Cullen, R. F. Davis, J. F. St.-Pierre, 1999. Biological weighting of ultraviolet (280-400 nm) induced mortality in marine zooplankton and fish. II. *Calanus finmarchicus* (Copepoda) eggs. *Marine Biology* 134: 269-284.
- Kovala, P. E. & J. P. Larrance, 1966. Computation of phytoplankton cell numbers, cell volume, cell surface area and plasma volume per litre, from microscopical counts. Special Report, University of Washington, Seattle, 38: 1-91.
- Laurion, I. & W. F. Vincent, 1998. Cell size *versus* taxonomic composition as determinants of UV-sensitivity in natural phytoplankton communities. *Limnology and Oceanography* 43: 1774-1779.
- Lavens, P. & P. Sorgeloos, 2000. The history, present status and prospects of the availability of *Artemia* cysts for aquaculture. *Aquaculture* 181: 397-403
- Leach, C. M., 1965. Ultraviolet-absorbing substances associated with light-induced sporulation in fungi. *Canadian Journal of Botany* 43: 185-200.
- Lebour, M. V., 1924. The Euphausiidae in the neighbourhood of Plymouth and their importance as herring food. *Journal of the Marine Biological Association of the U.K.* 13: 402-432.
- Lesser, M. P., 1996a. Acclimation of phytoplankton to UV-B radiation: oxidative stress and photoinhibition of photosynthesis are not prevented by UV-absorbing compounds in the dinoflagellate *Prorocentrum micans*. *Marine Ecology Progress Series* 132: 287-297.
- Lesser, M. P., 1996b. Elevated temperatures and ultraviolet radiation cause oxidative stress and inhibit photosynthesis in symbiotic dinoflagellates. *Limnology and Oceanography* 41: 271-283.
- Litchman, E., P. J. Neale & A. T. Banaszak, 2002. Increased sensitivity to ultraviolet radiation in nitrogen-limited dinoflagellates: photoprotection and repair. *Limnology and Oceanography* 47: 86-94.
- Luppi, T. A., C. C. Bas, E. D. Spivak & K. Anger, 1997. Fecundity of two grapsid crab species in the Laguna Mar Chiquita, Argentina. *Archive of Fishery and Marine Research* 45: 149-166
- Madronich, S., 1993. Trends and predictions in global UV. *In*: Chanin, M.L. (ed.) *The role of the stratosphere in global change*. NATO ASI Series I: Global Environmental Change, Springer-Verlag, Berlin: 463-471.

Mallo, J. C. & J. L. Fenucci, 2004. Feeding of protozoal stages of the shrimp *Pleoticus muelleri* Bate with different microencapsulated food and microalgae species. *Revista de Biología Marina y Oceanografía* 39: 13-19.

Malloy, K. D., M. A. Holman, D. Mitchell & H. W. Detrich, 1997. Solar UVB-induced DNA damage and photoenzymatic DNA repair in Antarctic zooplankton. *Proceedings of the National Academy of Sciences, U.S.A.* 94: 1258-1263.

Manzi, J. J., M. B. Maddox & P. A. Sandifer, 1977. Algal supplement enhancement of *Macrobrachium rosenbergui* (de Man) larviculture. *Proceedings of the World Mariculture Society* 7: 677-678.

Marcoval, M. A., V. E. Villafañe & E. W. Helbling, 2007. Interactive effects of ultraviolet radiation and nutrient addition on growth and photosynthesis performance of four species of marine phytoplankton. *Journal of Photochemistry and Photobiology, B: Biology* 89: 78-87.

Marcoval, M. A., V. E. Villafañe & E. W. Helbling, 2008. Combined effects of solar ultraviolet radiation and nutrients addition on growth, biomass and taxonomic composition of coastal marine phytoplankton communities of Patagonia. *Journal of Photochemistry and Photobiology, B: Biology*, en prensa.

Marcus, N. H., 2005. Calanoid copepods, resting eggs, and aquaculture. *In: Lee, C.-S., P. J. O'Bryen & N. H. Marcus (eds.) Copepods in aquaculture.* Blackwell Publishing, Ames: 3-10.

Margalef, R., 1956. Temporal succession and spatial heterogeneity in phytoplankton. *In: Buzzali-Traverso, A. A. (ed.) Perspectives in Marine Biology.* University of California Press, Berkeley: 323-349.

Margalef, R., 1997a. Our Biosphere. *In: O. Kinne, (ed.) Excellence in Ecology Series.* Ecology Institute, Oldendorf, Germany.

Margalef, R., 1997b. Turbulence and marine life. *Scientia Marina* 61: 109-123.

Marshall, S. M. & A. P. Orr, 1955. The biology of a marine copepod *Calanus finmarchicus* (Gunnerus). Oliver & Boyd, Edinburgh. 188 pp.

Martínez, G., 2000. Feeding behaviour of *Daphnia ambigua* (Scourfield 1947), *Moina micrura* (Kurz 1874) and *Ceriodaphnia dubia* (Richard 1895) (Cladocera) under a food concentration gradient. *Revista Chilena de Historia Natural* 73: 47-54.

Mauchline, J., 1998. The biology of calanoid copepods. *Advances in Marine Biology* Vol. 33. Elsevier Academic Press, New York. 701 pp.

- McClintock, J. B. & D. Karentz, 1997. Mycosporine-like amino acids in 38 species of subtidal marine organisms from McMurdo Sound, Antarctica. *Antarctic Science* 9: 392-398.
- McConaughy, J. R., 1985. Larval nutrition and growth. *In: A. M. Wenner (ed.) Crustacean Issues Vol. 2: Growth.* Balkama Press, Rotterdam: 123-152.
- Mianzán, H. W. & R. A. Guerrero, 2000. Environmental patterns and biomass distribution of gelatinous macrozooplankton. Three study cases in the South-western Atlantic Ocean. *Scientia Marina* 64: 215-224.
- Moorhead, D. L., R. L. Sinsabaugh, A. E. Linkins & J. F. Reynolds, 1996. Decomposition processes: modelling approaches and applications. *Science of the Total Environment* 183: 137-149.
- Mostajir, B., S. Demers, S. de Mora, C. Belzile, J.-P. Chanut, M. Gosselin, S. Roy, P. Z. Villegas, J. Fauchot & J. Buchard, D. Bird, P. Monfort & M. Levasseur, 1999. Experimental test of the effect of ultraviolet-B radiation in a planktonic community. *Limnology and Oceanography* 44: 586-596.
- Mouzo, F. H., M. L. Garza, J. F. Izquierdo & R. O. Zibecchi, 1978. Rasgos de la geología submarina del Golfo Nuevo (Chubut). *Acta Geográfica Argentina* 2: 69-91.
- Nanton, D. A. & J. D. Castell, 1999. The effects of temperature and dietary fatty acids on the fatty acid composition of harpacticoid copepods, for use as a live food for marine fish larvae. *Aquaculture* 175: 167-181.
- Navarro, J. C. L., R. J. Henderson, L. A. McEvoy, M. V. Bell & F. Amat, 1999. Lipid conversions during enrichment of *Artemia*. *Aquaculture* 174: 155-166.
- Neale, P. J., A. T. Banaszak & C. R. Jarriel, 1998. Ultraviolet sunscreens in *Gymnodinium sanguineum* (Dinophyceae): mycosporine-like amino acids protect against inhibition of photosynthesis. *Journal of Phycology* 34: 928-938.
- Newman, S.T., W. C. Dunlap, S. Nicol & D. Ritz, 2000. Antarctic krill (*Euphausia superba*) acquires a UV-absorbing mycosporine-like amino acid from dietary algae. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 255: 93-110.
- Nisbet, E. G. & N. H. Sleep, 2001. The habitat and nature of early life. *Nature* 409: 1083-1091.
- Nixon, S. W., 1988. Physical energy inputs and the comparative ecology of lake and marine ecosystems. *Limnology and Oceanography* 33: 1005-1025.
- Odum, E. P., 1963. *Ecology.* Holt, Rinehart and Winston, New York. 152 pp.

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.

Osburn, C. L. & D. P. Morris, 2003. Photochemistry of chromophoric dissolved organic matter in natural waters. *In: Helbling, E. W. & H. E. Zagarese (eds.) UV effects in aquatic organisms and ecosystems. The Royal Society of Chemistry, Cambridge: 185-217.*

Piccinelli, M. & T. Prosdocimi, 1968. Descrizione tassonomica delle due specie *Artemia salina* L. e *Artemia persimilis* n. sp. *Rediconti dell'Istituto Lombardo, Classe Scienze* 102: 113-118.

Porra, R. J., W. A. Thompson & P. E. Kriedemann, 1989. Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls *a* and *b* extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta* 975: 384-394.

Prèzelin, B. B., N. P. Boucher & R. C. Smith, 1994. Marine primary production under the influence of the Antarctic ozone hole: Icecolors '90. *In: Weiler, C. S. & P. A. Penhale (eds.) Ultraviolet radiation in Antarctica: Measurements and biological effects. American Geophysical Union, Antarctic Research Series Vol. 62. Washington: 159-186.*

Przeslawski, R., 2005. Combined effects of solar radiation and desiccation on the mortality and development of encapsulated embryos of rocky shore gastropods. *Marine Ecology Progress Series* 298: 169-177.

Quesada, A., W. F. Vincent & D. R. S. Lean, 1999. Community and pigment structure of Arctic cyanobacterial assemblages: the occurrence and distribution of UV-absorbing compounds. *FEMS Microbial Ecology* 28: 315-323.

Ringelberg, J., A. L. Keyser & B. J. G. Flik, 1984. The mortality effect of ultraviolet radiation in a translucent and in a red morph of *Acanthodiaptornus denticornis* (Crustacea, Copepoda) and its possible ecological relevance. *Hydrobiologia* 112: 217-222.

Rivas, A. L. & E. J. Beier, 1990. Temperature and salinity fields in the Northpatagonic gulfs. *Oceanologica Acta* 13: 15-20.

Roberts, M. H. Jr., 1974. Larval development of *Pagurus longicarpus* Say reared in the laboratory V. Effect of diet on survival and molting. *Biological Bulletin* 146: 67-77.

Rothschild, L. J. & R. L. Mancinelli, 2001. Life in extreme environments. *Nature* 409: 1092-1101.

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. *In: de Mora, S. J., S. Demers & M. Vernet (eds.) The effects of UV radiation in the marine environment.* Cambridge University Press, Cambridge: 177-205.

Rozema, J. B., L. O. van Geel, L. O. Bjorn, J. Lean & S. Madronich, 2002. Toward solving the UV puzzle. *Science* 296: 1621-1622.

Sabatini, M. & P. Martos, 2002. Mesozooplankton features in a frontal area off northern Patagonia (Argentina) during spring 1995 and 1998. *Scientia Marina* 66: 215-232.

Sabatini, M. E., 2004. Características ambientales, reproducción y alimentación de la merluza (*Merluccius hubbsi*) y la anchoíta (*Engraulis anchoita*) en su habitat reproductivo patagónico. Síntesis y perspectivas. *Revista de Investigación y Desarrollo Pesquero* 16: 5-25.

Sandifer, P. A., 1972. Effects of diet on larval development of *Thor floridanus* (Decapoda, Caridea) in the laboratory. *Virginia Journal of Sciences* 23: 5-8.

Sandoz, M. & R. Rogers, 1944. The effects on environmental factors on hatchings, molting and survival of zoea larvae of the blue crab *Callinectes sapidus* Rathbun. *Ecology* 25: 216-228.

Santinelli, N. & J. L. Esteves, 1993. Características químicas y fitoplanctónicas del estuario del Río Chubut (Patagonia, Argentina). *Naturalia Patagonica, Ciencias Biológicas* 1: 22-34.

Santos, B. A. & F. C. Ramírez, 1995. Distribución y abundancia de copépodos en el sistema frontal de Península Valdés, durante florecimientos fitoplanctónicos. *Thalassas* 11: 133-142.

Santos, B. A., 1993. Zooplankton as potential food in the spawning ground of Patagonian anchovy and hake. Fifth IOC Workshop on Sardine/Anchovy Recruitment Project (SARP) in Southwest Atlantic, Buenos Aires.

Schalamuk, I., M. Blanco, D. Marchioni, S. Romero & C. Cábana, 1999. Salinas y sulfateras de la región Pampeana, Buenos Aires y La Pampa. Recursos Minerales de la República Argentina. Secretaría de Minería. República Argentina 35: 1947-1962.

Schalamuk, I., R. Fernández & R. Etcheverry, 1983. Los yacimientos de minerales no metalíferos y rocas de aplicación de la región NOA. Anales XX. Ministerio de Economía. Secretaría de Estado de Minería, República Argentina. 208 pp.

Schlesinger, W. H., 2000. Biogeoquímica: un análisis del cambio global. Ariel, Barcelona. 577 pp.

Schreiber, U., U. Schliwa & W. Bilger, 1986. Continuous recording of photochemical and non-photochemical chlorophyll fluorescence quenching with a new type of modulation fluorometer. *Photosynthesis Research* 10: 51-62.

Searles, P. S., S. D. Flint, S. Diaz, M. C. Rousseaux, C. L. Ballaré & M. M. Caldwell, 1999. Solar ultraviolet-B radiation influence on *Sphagnum* bog and *Carex* fen ecosystems: first field season findings in Tierra del Fuego, Argentina. *Global Change Biology* 5: 223-228.

Shelly, K., S. Roberts, P. Heraud & J. Beardall, 2005. Interactions between UV-B exposure and phosphorus nutrition. I. Effects on growth, phosphate uptake, and chlorophyll fluorescence. *Journal of Phycology* 41: 1204-1211.

Shick, J. M., M. P. Lesser & P. L. Jokiel, 1996. Effects of ultraviolet radiation on corals and other coral reef organisms. *Global Change Biology* 2: 527-545.

Shick, J. M., S. D. Romaine-Lioud, C. Ferrier-Pages & J. P. Gattuso, 1999. Ultraviolet-B radiation stimulates shikimate pathway-dependent accumulation of mycosporine-like aminoacids in the coral *Stylophora pistillata* despite decreases in its population of symbiotic dinoflagellates. *Limnology and Oceanography* 44: 1667-1682.

Shields, R. J., T. Kotani, A. Molnar, K. Marion, J. Kabashigawa & L. Tang, 2005. Intensive cultivation of a subtropical paracalanid copepod, *Parvocalanus* sp., as prey for small marine fish larvae. *In*: Lee, C.-S., P. J. O'Bryen & N. H. Marcus (eds.) *Copepods in aquaculture*. Blackwell Publishing, Ames: 209-223.

Siebeck, O. & U. Böhm, 1987. Untersuchungen zur Wirkung der UV-B-Strahlung auf kleine Wassertiere. BPT Bericht, Gesellschaft für Strahlen- und Umweltforschung, München.

Siegenthaler, U. & J. L. Sarmiento, 1993. Atmospheric carbon dioxide and the ocean. *Nature* 365: 119-125.

Sinha, R. P., S. P. Singh & D.-P. Häder, 2007. Database on mycosporines and mycosporine-like amino acids (MAAs) in fungi, cyanobacteria, macroalgae, phytoplankton and animals. *Journal of Photochemistry and Photobiology, B: Biology* 89: 29-35.

Smith, R. C. & K. S. Baker, 1989. Stratospheric ozone, middle ultraviolet radiation and phytoplankton productivity. *Oceanography* 2: 4-10.

Sobrinho, C., P. J. Neale & L. M. Lubián, 2005. Interaction of UV radiation and inorganic carbon supply in the inhibition of photosynthesis: spectral and temporal responses of two marine picoplankters. *Photochemistry and Photobiology* 81: 384-393.

Sokal, R. R. & F. J. Rohlf, 1979. *Biometría*. Blume Ediciones. 832 pp.

Sommaruga, R., 2003. UVR and its effects on species interactions. *In*: Helbling, E. W. & Zagarese H. E. (eds.) *UV effects in aquatic organisms and ecosystems*. The Royal Society of Chemistry, Cambridge: 485-508.

Stochaj, W. R., W. C. Dunlap & J. M. Shick, 1994. Two new UV-absorbing mycosporine-like amino acids from the sea anemone *Anthopleura elegantissima* and the effects of zooxanthellae and spectral irradiance on chemical composition and content. *Marine Biology* 118: 149-156.

Stoecker, D. K. & G. T. Evans, 1985. Effect of protozoan herbivory and carnivory in a microplankton food web. *Marine Ecology Progress Series* 25: 159-167.

Strathmann, R. R., 1967. Estimating the organic carbon content of phytoplankton from cell volume or plasma volume. *Limnology and Oceanography* 12: 411-418.

Sulkin, S. D., 1975. The significance of diet on the growth and development of larvae of the blue crab, *Callinectes sapidus* Rathbun, under laboratory conditions. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 20: 119-135.

Sverdrup, H. U., 1953. On conditions for the vernal blooming of phytoplankton. *Journal du Conseil/Conseil Permanent International pour l' Exploration de la Mer* 18: 287-295.

Takano, S., D. Uemura & Y. Hirata, 1978a. Isolation and structure of a new amino acid, palythine, from the zoanthid *Palythoa tuberculosa*. *Tetrahedron Letters* 26: 2299-2300.

Takano, S., D. Uemura & Y. Hirata, 1978b. Isolation and structure of two new amino acids, palythanol and palythene, from the zoanthid *Palythoa tuberculosa*. *Tetrahedron Letters* 26: 4909-4912.

Tartarotti, B. & R. Sommaruga, 2002. The effect of different methanol concentrations and temperatures on the extraction of mycosporine-like amino acids (MAAs) in algae and zooplankton. *Archiv für Hydrobiologie* 154: 691-703.

Thorson, G., 1950. Reproductive and larval ecology of marine bottom invertebrates *Biological Review* 25: 1-45.

Tsujino, I. & T. Saito, 1961. Studies on the compounds specific for each group of marine alga. I. Presence of characteristic ultraviolet absorbing material in Rhodophyceae. *Bulletin of the Faculty of Fish, Hokkaido University (Japón)* 12: 49-58.

Tsujino, I., K. Yabe & I. Sekekawa, 1980. Isolation and structure of a new amino acid, shinorine, from the red alga *Chondrus yendoi* Yamada et Mikami. *Botanica Marina* 23: 65-68.

Turner, M. F. & R. J. Gowen, 1984. Some aspects of the nutrition and taxonomy of fourteen small green and yellow-green algae. *Botanica Marina* 27: 249-255.

Underwood, G. J. C., C. Nilsson, K. Sundbäck & A. Wulff, 1999. Short-term effects of UVB radiation on chlorophyll fluorescence, biomass, pigments, and carbohydrate fractions in a benthic diatom mat. *Journal of Phycology* 35: 656-666.

USEPA, 1987. An assessment of the effects of ultraviolet-B radiation on aquatic organisms. *In: Assessing the risks of trace gases that can modify the stratosphere*, EPA 400/1-87/001C: 1-33.

Utermöhl, H., 1958. Zur Vervollkommnung der quantitativen Phytoplankton-Methodik. *Internationale Vereinigung für Theoretische und Angewandte Limnologie* 9: 1-38.

Uye, S. I. & T. Yamaoka, 1990. Vertical and horizontal distribution of copepod nauplii as food for anchovy larvae (*Engraulis japonica*) in Hiroshima Bay. *Bulletin of the Japanese Society of Fisheries Oceanography* 55: 341-351.

Vargas, C. A. & H. E. González, 2004. Plankton community structure and carbon cycling in a coastal upwelling system. I. Diet of copepods and appendicularians. *Aquatic Microbial Ecology* 34: 165-180.

Varotsos, C., 2004. Atmospheric pollution and remote sensing: an implication for the Southern Hemisphere ozone hole split in 2002, and the northern mid-latitude ozone trend. *Advances in Space Research* 33: 249-253.

Verity, P. & V. Smetacek, 1996. Organism life cycles, predation, and the structure of marine pelagic ecosystems. *Marine Ecology Progress Series* 130: 277-293.

Villafañe, V. E., E. S. Barbieri & E. W. Helbling, 2004a. Annual patterns of ultraviolet radiation effects on temperate marine phytoplankton off Patagonia, Argentina. *Journal of Plankton Research* 26: 167-174.

Villafañe, V. E., E. W. Helbling & J. Santamarina, 1991. Phytoplankton blooms in the Chubut River Estuary (Argentina): Influence of stratification and salinity. *Revista de Biología Marina* 26: 1-20.

Villafañe, V. E., E. W. Helbling & O. Holm-Hansen, 1995a. Spatial and temporal variability of phytoplankton biomass and taxonomic composition around Elephant Island, Antarctica, during the summers of 1990-1993. *Marine Biology* 123: 677-686.

- Villafañe, V. E., E. W. Helbling, O. Holm-Hansen & B. E. Chalker, 1995b. Acclimatization of Antarctic natural phytoplankton assemblages when exposed to solar ultraviolet radiation. *Journal of Plankton Research* 17: 2295-2306.
- Villafañe, V. E., E. W. Helbling & H. E. Zagarese, 2001. Solar ultraviolet radiation and its impact on aquatic systems of Patagonia, South America. *Ambio* 30: 112-117.
- Villafañe, V. E., K. Sundbäck, F. L. Figueroa & E. W. Helbling, 2003. Photosynthesis in the aquatic environment as affected by UVR. *In*: Helbling, E. W. & H. E. Zagarese (eds.) *UV effects in aquatic organisms and ecosystems*. The Royal Society of Chemistry, Cambridge: 357-397.
- Villafañe, V. E., M. A. Marcoval & E. W. Helbling, 2004b. Photosynthesis *versus* irradiance characteristics in phytoplankton assemblages off Patagonia (Argentina): temporal variability and solar UVR effects. *Marine Ecology Progress Series* 284: 23-34.
- Viñas, M. D. & B. A. Santos, 2000. First-feeding of hake (*Merluccius hubbsi*) larvae and prey availability in the North Patagonian spawning area. Comparison with anchovy. *Archive of Fishery and Marine Research* 48: 242-254.
- Viñas, M. D. & F. C. Ramírez, 1995. Gut analysis of first feeding anchovy larvae from Patagonian spawning areas in relation to food availability. *Archive of Fishery and Marine Research* 43: 231-256.
- Viñas, M. D., F. C. Ramírez, B. A. Santos & G. M. Pérez Seijas, 1992. Zooplankton distribuído en el área de desove y de crianza norpatagónica de la merluza (*Merluccius hubbsi*). *Frente marítimo* 11: 105-113.
- Vincent, W. F. & S. Roy, 1993. Solar ultraviolet-B radiation and aquatic primary production: damage, protection, and recovery. *Environmental Reviews* 1: 1-12.
- Vinebrook, R. D. & P. R. Leavitt, 1999. Differential responses of littoral communities to ultraviolet radiation in an alpine lake. *Ecology* 80: 223-237.
- Wängberg, S. A., J. A. Selmer & K. Gustavson, 1996. Effects of UV-B radiation on biomass and composition in marine phytoplankton communities. *Scientia Marina* 60: 81-88.
- Weiler, C. S. & P. A. Penhale (eds.), 1994. *Ultraviolet radiation in Antarctica: Measurements and biological effects*. American Geophysical Union, Antarctic Research Series Vol. 62. Washington. 257 pp.
- Weis, E. & J. A. Berry, 1987. Quantum efficiency of photosystem-II in relation to energy-dependent quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochimica et Biophysica Acta* 894: 198-208.

- Whitehead, K. & M. Vernet, 2000. Influence of mycosporine-like amino acids (MAAs) on UV absorption by particulate and dissolved organic matter in La Jolla Bay. *Limnology and Oceanography* 45: 1788-1796.
- Whitehead, K., D. Karentz & J. I. Hedges, 2001. Mycosporine-like amino acids (MAAs) in phytoplankton, a herbivorous pteropod (*Limacina helicina*), and its pteropod predator (*Clione antarctica*) in McMurdo Bay, Antarctica. *Marine Biology* 139: 1013-1019.
- Williamson, C. E., H. E. Zagarese, P. C. Schulze, B. R. Hargreaves & J. Seva, 1994. The impact of short-term exposure to UV-B radiation on zooplankton communities in north temperate lakes. *Journal of Plankton Research* 16: 205-218.
- Worrest, R. C., 1983. Impact of solar ultraviolet-B radiation (290-320 nm) upon marine microalgae. *Physiologia Plantarum* 58: 428-434
- Wu Won, J. J., B. E. Chalker & J. A. Rideout, 1997. Two new UV-absorbing compounds from *Stylophora pistillata*: sulfate esters of mycosporine-like amino acids. *Tetrahedron Letters* 38: 2525-2526.
- Wu Won, J. J., J. Rideout & B. Chalker, 1995. Isolation and structure of a novel mycosporine-like amino acid from the reef-building corals *Pocillopora damicornis* and *Stylophora pistillata*. *Tetrahedron Letters* 36: 5255-5256.
- Xenopoulos, M. A. & D. W. Schindler, 2001. Physical factors determining ultraviolet radiation flux into ecosystems. *In*: Cockell, C. S. & A. R. Blaustein (eds.) *Ecosystems, evolution and ultraviolet radiation*. Springer-Verlag, Berlin: 36-62.
- Yazdandoust, 1985. Bioaccumulation of paralytic shellfish poisons by cancer crab larvae fed on the toxic dinoflagellate *Gonyaulax catenella*. *Marine Technology Society Journal* 19: 41-45.
- Zagarese, H. E., M. Feldman & C. E. Williamson, 1997. UV-B induced damage and photoreactivation in three species of *Boeckella* (Copepoda, Calanoida). *Journal of Plankton Research* 19: 357-367.
- Zagarese, H. E., M. Cravero, P. Gonzalez & F. Pedrozo, 1998. Copepod mortality induced by fluctuating levels of natural ultraviolet radiation simulating vertical water mixing. *Limnology and Oceanography* 43: 169-174.
- Zar, H. J., 1984. *Biostatistical Analysis*, Second edition. Prentice-Hall, Englewood Cliffs. 718 pp.
- Zudaire, L. & S. Roy, 2001. Photoprotection and long-term acclimation to UV radiation in the marine diatom *Thalassiosira weissflogii*. *Journal of Photochemistry and Photobiology, B: Biology* 62: 26-34.

## Agradecimientos

Tengo un especial agradecimiento a toda la gente que hizo posible que llegara a esta meta, son muchos y no quisiera olvidarme de nadie, en especial a mi mamá, Susana Wallis, quién estuvo en cada unos de mis logros y fracasos siempre y durante toda ésta etapa de mi carrera; al amor de mi vida, **Jerónimo Pan**, quien me acompañó a los largo de estos años (de una manera muy particular), no permitió que bajara los brazos, fue mi guía en todo momento y en especial en las etapas críticas. A toda la gente de **Playa Unión** con quienes empecé esta locura científica del plancton marino y la RUV, quienes confiaron en mí y si no fuera por ellos no estaría hoy acá: Walter Helbling quien me dirigió como pudo o como yo le permití hacerlo, Virginia Villafañe que como hada madrina hizo malabares para que salga adelante, Elena Barbieri (Elenuchis) con quien compartí momentos inolvidables y nunca será suficiente el tiempo para pedirle perdón. Rodri, Regy y Klau, que me acompañaron con sus charlas. A Cristian y Nini por sus aportes en los experimentos. Peter Ritcher y Donat Hader. A la familia Villafañe, Tomy, Leo (Leader Price). A la gente de **Mar del Plata**: Dr Fenucci, que creyó y confió en mí dándome un lugar en la Estación Nágera, Marité por los matecitos y la compañía, a Esteban Ricci,( técnico de lujo), Susana Velurtas , Maria Delia Viñas y a los integrantes del grupo Acuicultura de la UNMdP. A la gente del **CRUB**: Fernando Pedrozo, quien me ayudó especialmente en esta última etapa, Gustavo Baffico y Patricia Gagliotti. A la gente de **La Plata**: Romi y Marito, dos grandes amigos que creyeron en mí y que esto era posible. Los compañeros de la cátedra de Química Orgánica de La Facultad de Ciencias Naturales y Museo, que fueron muy tolerantes!.,

No puedo dejar de nombrar a Christopher Gobler de la Universidad de Stony Brook, NY por el entrenamiento en técnicas fitoplanctónicas y análisis de nutrientes, durante todo el último año de la carrera y Alexa Fournier por su aporte en la edición del manuscrito.

Para finalizar, agradezco a mis hermanos: Susi, Silvi y Matute, Tios, Grannie, cuñataï, sobrinos, primas y ahijados que hicieron todo más llevadero, a mi nueva familia: Coyita y Jorge y Lucas, que pusieron más que un granito de arena y a toda la gente del Rápido Argentino, Rápido del Sur, TAC y Vía Bariloche, y las Aerolíneas, porque sinceramente gran parte de mi Doctorado la pasé de un lado a otro sobre un micro o un avión. Sobretudo agradezco a DIOS que me permitió llegar a cada destino.

Gracias a todos por la paciencia !!!!!, Esto recién empieza.....

Parte de este proyecto de tesis estuvo financiado por La Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica, (PICT2000- 07-08184), Consejo Nacional de Investigaciones científicas y técnicas (CONICET) y la UNMdP.