

*Efectos interactivos de la radiación ultravioleta  
y de la capa superficial de mezcla en la  
productividad fitoplanctónica marina en  
latitudes medias*

**Tesis doctoral**

**Lic. Elena Susana Barbieri**

**Director: E. Walter Helbling Ph. D.**

**Co-Director: Dr. Horacio E. Zagarese**

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

**2007**

## Índice

<b>Resumen</b> .....	1
<b>Capítulo 1</b>	
<i>Introducción general</i> .....	2
Radiación solar y Fotosíntesis .....	2
Generalidades.....	2
Radiación solar en la atmósfera.....	2
Radiación solar en la columna de agua .....	6
Fotosíntesis .....	8
Fotosíntesis en organismos fitoplanctónicos marinos.....	11
Movimiento del fitoplancton en la columna de agua .....	11
Efecto de la RUV en el fitoplancton .....	12
Efecto combinado entre la radiación y la CSM en el fitoplancton .....	12
Importancia de la RUV en la mezcla vertical .....	13
Otros efectos de la RUV y la CSM en el fitoplancton .....	13
Fundamentos de este trabajo de tesis .....	14
Organización general de la tesis .....	15
<b>Capítulo 2</b>	
<i>Evaluación experimental del efecto de la RUV sobre el fitoplancton marino de latitudes medias expuesto a un régimen de radiación variable</i> .....	18
<b>Capítulo 3</b>	
<i>Dinámica de producción / consumo de oxígeno de especies de fitoplancton marino circulando dentro de una capa superficial de mezcla simulada</i> .....	30
<b>Capítulo 4</b>	
<i>Respuestas fotosintéticas de tres dinoflagelados marinos circulando dentro de un régimen de irradiancia variable</i> .....	42
<b>Capítulo 5</b>	
<i>Aclimatación del fitoplancton del estuario del Río Chubut (Chubut, Argentina) a distintas condiciones de irradiancias</i> .....	60
<b>Capítulo 6</b>	
<i>Conclusiones generales</i> .....	84
<i>Abreviaturas</i> .....	87
<i>Listado de Figuras, Esquemas y Fotos</i> .....	88
<i>Agradecimientos</i> .....	93
<i>Referencias</i> .....	94

## Resumen

En la zona elegida para este estudio (Bahía Engaño 43° S - 65° W, Rawson - Chubut) la comunidad fitoplanctónica está formada por varias poblaciones que presentan una marcada sucesión estacional. Anualmente se evidencian períodos donde la comunidad es dominada por organismos microplanctónicas (blooms de invierno), y otros donde es dominada por organismos nanoplanctónicas (pre y postbloom durante el resto del año). En base a la variabilidad taxonómica observada y en función de los interrogantes planteados por los trabajos realizados sobre el tema se decidió realizar este trabajo de tesis doctoral con el objetivo de estudiar la respuesta fotosintética de organismos fitoplanctónicos marinos.

En el capítulo 1 se realizó una recopilación de información sobre el tema, enfatizando el efecto de la radiación solar en el proceso de fotosíntesis; por esto, los términos y conceptos utilizados se encontrarán explicados en este capítulo. La experimentación comienza en el capítulo 2, en el cual se evaluó el efecto conjunto de la radiación ultravioleta (RUV, 280-400 nm) y la capa superficial de mezcla (CSM) en la fotosíntesis de muestras fitoplanctónicas naturales en distintos períodos de la sucesión anual, midiendo la incorporación de carbono como producto del proceso fotosintético (fase enzimática). En éste se determinó la importancia de la porción de la  $Z_{eu}$  mezclada y la influencia de la RUV en el proceso fotosintético, en relación con la respuesta de organismos de distintos tamaños celulares. Los resultados demostraron que existe una respuesta variable dependiendo de la especie, el tamaño celular y la profundidad de la CSM; asimismo, se observó que las especies microplanctónicas se inhiben más frente a un régimen fluctuante de irradiancias. Estos resultados plantearon la necesidad de utilizar otra técnica que permita cuantificar de manera continua la respuesta fitoplanctónica al cambio de irradiancia. Por lo tanto, en el capítulo 3 se evaluó la evolución de oxígeno (producto de la fase fotoquímica) y la importancia de la dirección de desplazamiento de las células dentro de una CSM simulada (e.g., desde altas a bajas irradiancias y viceversa) en tres especies marinas con igual diámetro celular. Las especies utilizadas fueron: *Dunaliella salina* (Chlorophyceae), *Thalassiosira weissflogii* (Bacillariophyceae) y *Heterocapsa triquetra* (Dinophyceae). Los resultados obtenidos demuestran que estas especies poseen importantes diferencias en la tasa de producción de oxígeno dependiendo de la dirección de desplazamiento vertical en la columna de agua simulada, aún teniendo la misma historia lumínica. En general, se observó que *H. triquetra* fue la especie que más se benefició bajo un régimen fluctuante de irradiancia.

Luego de trabajar con poblaciones naturales (Capítulo 2) y con especies de igual tamaño celular (Capítulo 3), se planteó en el Capítulo 4 trabajar con cultivos mono-específicos de dinoflagelados marinos de distintos tamaños. Se evaluó el efecto conjunto de la radiación y la mezcla vertical en el rendimiento fotoquímico utilizando la fluorescencia de amplitud de pulso (Water-PAM, Walz). El objetivo principal fue evidenciar la influencia del tamaño celular en la respuesta fotosintética, relacionando la misma con la importancia de ciertos compuestos protectores (i.e., carotenos y compuestos que absorben en el rango del UV). Se utilizaron tres dinoflagelados marinos cultivados bajo las mismas condiciones lumínicas previas a la experimentación: *Gymnodinium chlorophorum*, *Heterocapsa triquetra* y *Prorocentrum micans*, cuyos tamaños celulares son de 5, 20 y 50  $\mu\text{m}$ , respectivamente. Los resultados mostraron que existe una respuesta diferencial entre estas especies, siendo la especie más pequeña la que presentó mayores velocidades de respuesta al cambio de radiación y mayor inhibición en su rendimiento fotoquímico. Finalmente, en el capítulo 5 se determinó si el rendimiento fotoquímico respondía de manera similar al efecto conjunto de la RUV y la mezcla vertical, en concordancia con los resultados obtenidos al utilizar otras técnicas. Por un lado, las muestras naturales de fitoplancton fueron expuestas a un régimen variable de irradiancia (i.e., simulando el desplazamiento de las células en la columna de agua), y por otro a condiciones simuladas de irradiancia en superficie durante un ciclo diario. La respuesta fue evaluada en una escala de minutos-hora y se determinaron distintos mecanismos de aclimatación (e.g., disipación de energía en exceso, recuperación en la oscuridad). Los resultados obtenidos demuestran que las células presentan una importante inhibición de la fotosíntesis bajo condiciones de máximo estrés lumínico, siendo las muestras con mayor porcentaje de células microplanctónicas las que presentaron menor inhibición. Por otro lado, se observó que la mezcla simulada favorecía la recuperación del rendimiento fotoquímico en comparación con irradiancias máximas. Asimismo, se observó que los ETR (tasa de transporte electrónico) integrados fueron mayores bajo condiciones de irradiancias fluctuantes. La profundidad de mezcla (i.e., CSM somera y CSM profundas) condicionó la respuesta integrada del fitoplancton, ya que fueron mayores los ETR calculados en CSMs. Como conclusión general de este último capítulo se observó que las células se benefician bajo condiciones de mezcla (mayor rendimiento fotoquímico) en comparación con condiciones de máximo estrés (i.e., condiciones simuladas de irradiancia en superficie).

En el Capítulo 6 se presentan en detalle las conclusiones generales de esta tesis basadas en los trabajos realizados en cada capítulo.

## Introducción general

### Radiación solar y Fotosíntesis

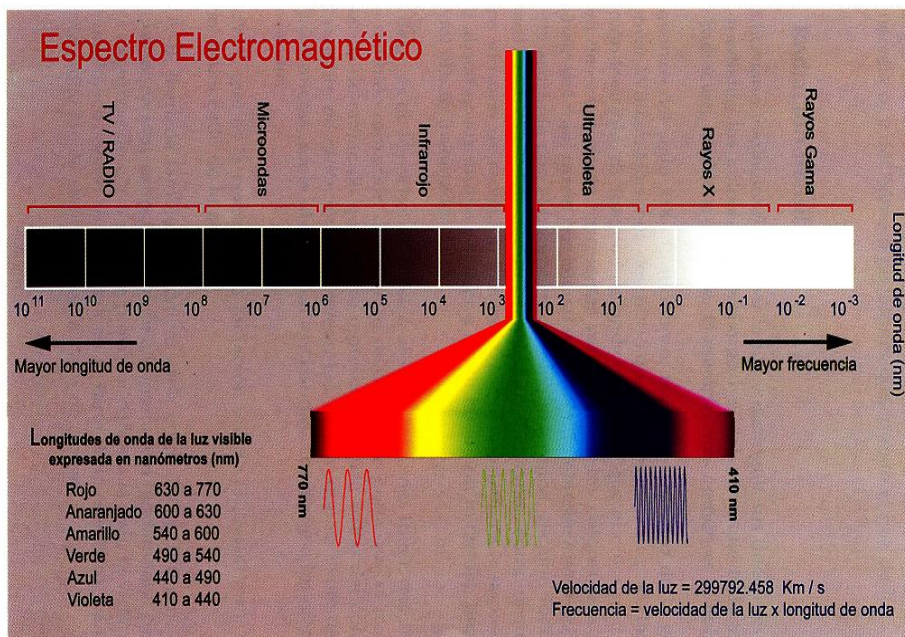
#### Generalidades

La energía solar es la fuente de vida sobre la Tierra que regula los procesos energéticos esenciales en los ecosistemas. Los organismos autótrofos son los encargados de ingresar energía química al sistema transformando la energía lumínica proveniente del Sol. Este proceso se basa en la incorporación del dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) presente en el medio y su transformación, mediante reacciones de óxido-reducción, a materia orgánica (i.e., hidratos de carbono). La materia orgánica producida quedará disponible para ser utilizada por organismos de niveles tróficos superiores.

Si bien la energía solar es utilizada en el proceso fotosintético también puede, en altos niveles, producir daños en los organismos autótrofos. En particular, se ha demostrado que la radiación ultravioleta que alcanza la superficie de la Tierra (RUV, 280-400 nm) es un factor de estrés, incluso en niveles normales, y produce distintos efectos en la fisiología del fitoplancton (Buma et al., 2003; Villafañe et al., 2003). Para comprender en detalle la relación entre la radiación solar y la fotosíntesis de los organismos fitoplanctónicos (objeto de estudio en este trabajo de tesis doctoral) se ampliarán, en primer lugar, algunos conceptos básicos sobre el tema a fin de comprender las técnicas y resultados obtenidos en los capítulos siguientes.

#### Radiación solar en la atmósfera

El Sol es un reactor termonuclear dentro del cual la transformación del hidrógeno en helio produce un exceso de energía, llamada energía electromagnética o también radiación. Esta energía, una vez que alcanza a la superficie del Sol, es irradiada en todas direcciones llegando así a la superficie de la Tierra. El rango completo de ondas electromagnéticas es conocido como espectro electromagnético y se compone de la siguiente manera:



**Esquema 1:** Espectro electromagnético donde se observan las distintas bandas energéticas en función de la longitud de onda (nm). Dentro del rango de la radiación visible (PAR) se observa el color correspondiente a cada longitud de onda. (extraído del libro Naturaleza y efectos de la radiación ultravioleta y la capa de ozono, Capítulo 1 Zaratti Sacchetti, 1997)

El haz de luz presenta un comportamiento dual, ya que a veces se comporta como onda (i.e. difracción) mientras que si se tiene en cuenta el transporte de energía se comporta como si estuviera compuesta por pequeñas partículas llamadas fotones (Zaratti Sacchetti, 1997). Cada fotón transporta una cantidad de energía igual a  $h\nu$  donde  $h$  es la constante de Planck y  $\nu$  la frecuencia. Matemáticamente las relaciones de energía pueden resumirse de la siguiente manera:

$$\lambda \nu = c$$

$\lambda$ : longitud de onda  
 $\nu$ : frecuencia, número de crestas de onda que hay en un segundo.  
 $c$ : velocidad de la luz ( $2,9979 \cdot 10^8 \text{ m s}^{-1}$ )

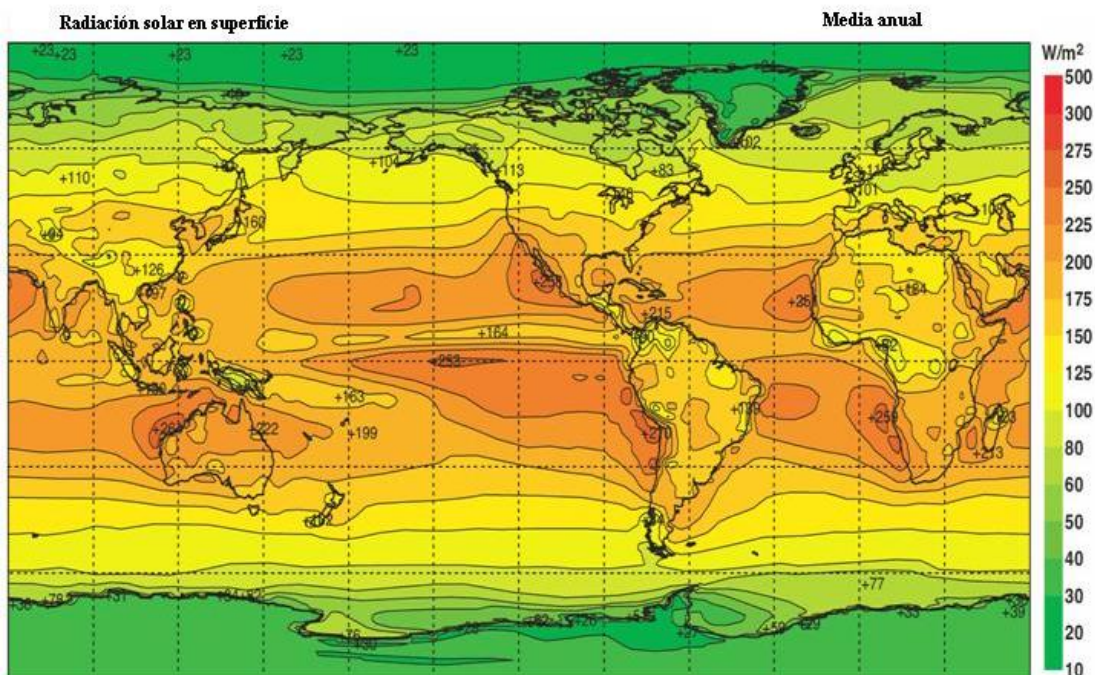
$$E = h \nu = h c * \lambda^{-1}$$

$h$ : constante de Planck ( $6,6262 \cdot 10^{-34} \text{ J}^{-1}$ )

La cantidad de energía por fotón es inversamente proporcional a la longitud de onda, siendo las longitudes de onda menores las más energéticas. Por lo tanto, la RUV (100-400 nm) es más energética que la radiación visible (PAR, Photosynthetically Available Radiation, 400-700 nm) (Esquema 1). El rango de la RUV puede dividirse arbitrariamente en 3 bandas, RUV-C (100-

280 nm, no alcanza la superficie terrestre), RUV-B (280-315 nm) y RUV-A (315-400 nm). Es para destacar que los filtros de corte de la radiación utilizados en la experimentación cortan la banda RUV en 320 nm en lugar de 315 nm (ver detalles de filtros en Figueroa et al., 1997).

La radiación en la superficie terrestre no es homogénea y se atenúa de distinta manera dependiendo de su longitud de onda y de la interacción con ciertos factores, los cuales intervienen en forma diferencial en la misma. Entre estos factores pueden citarse: a) atmosféricos (aerosoles, nubes, concentración de ozono), b) geográficos (latitud y altitud), y c) estacionales (época del año) (Madronich, 1993), los cuales varían de una región a otra. En la Figura 1 se observa la variación latitudinal de la radiación ( $\text{W m}^{-2}$ ), destacándose las mayores irradiancias entre los trópicos (bajas latitudes, color rojo), y las menores en las zonas polares (altas latitudes, color verde).

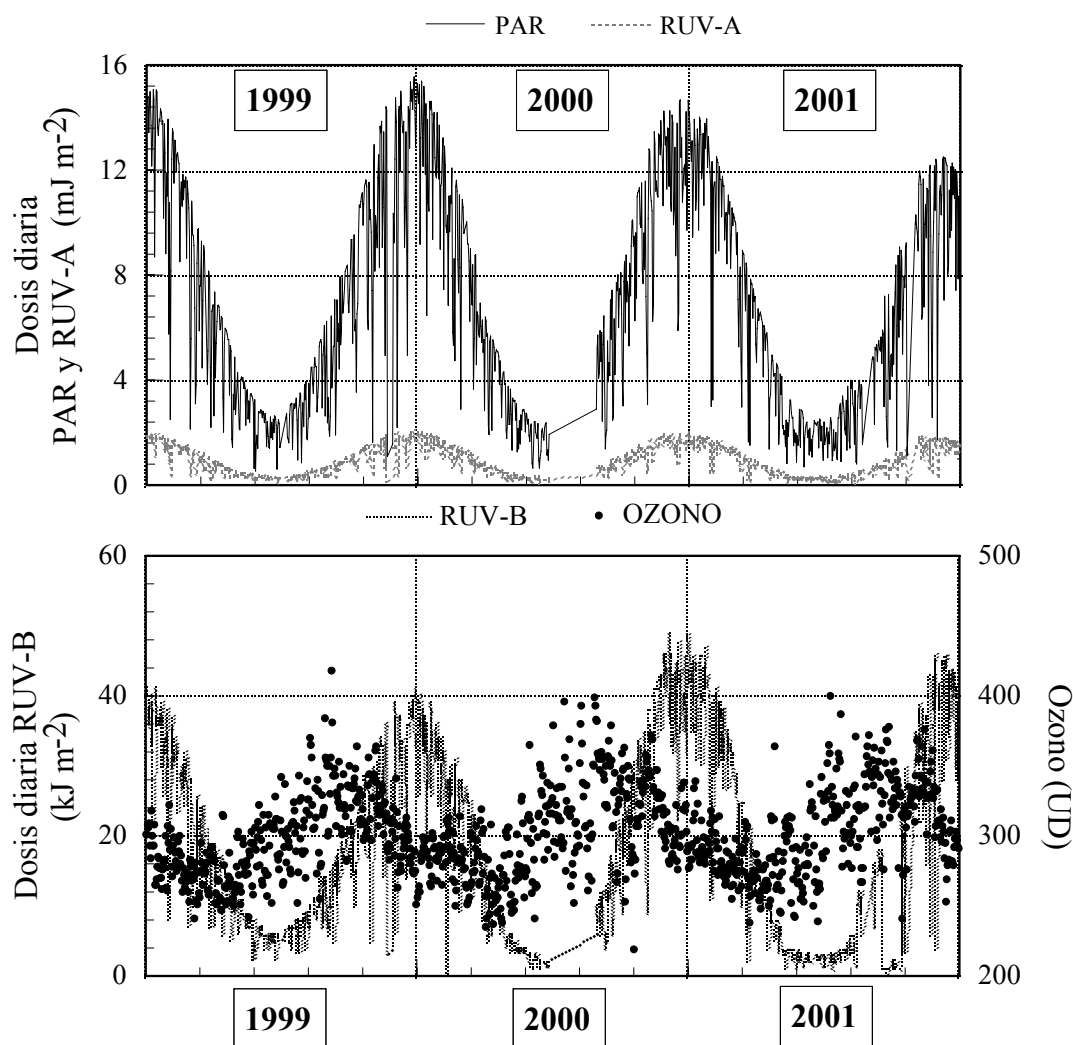


**Figura 1:** Variación latitudinal de la radiación solar ( $\text{W m}^{-2}$ ) que llega a la superficie de la Tierra.

La atenuación de la radiación solar, y especialmente la RUV, comienza en la atmósfera terrestre debido a la interacción de ésta con moléculas de gases (e.g., oxígeno, nitrógeno, ozono y aerosoles), aunque lo hace en diferentes niveles dependiendo de su longitud de onda. Si bien la cantidad de PAR es poco alterada, la RUV sufre una importante disminución, siendo la RUV-C totalmente atenuada (Lubin & Holm-Hansen, 1995; Lubin & Jensen, 1995). El porcentaje relativo de RUV-B (con respecto a RUV), que llega a la superficie de la Tierra es 5%, mientras que para RUV-A es 95% (Zaratti Sacchetti & Forno Gisbert, 2003). La atenuación de la RUV en la atmósfera es producto, principalmente, de su interacción con el ozono ( $\text{O}_3$ ) estratosférico, el cual se encuentra en su mayoría en la estratósfera entre 15 y 50 Km de altura; esta altura depende de la latitud y el régimen meteorológico de la región (Andrade Flores, 2003). El  $\text{O}_3$  se forma y se destruye como consecuencia de su interacción con longitudes de ondas del rango del ultravioleta. En resumen, una molécula de oxígeno ( $\text{O}_2$ ) absorbe radiación a una longitud de onda menor que 240 nm y se disocia; éste oxígeno atómico, en combinación con otras moléculas de  $\text{O}_2$ , forma el  $\text{O}_3$ . El  $\text{O}_3$  absorbe radiación ultravioleta de longitudes de onda  $\leq 320$  nm aunque la absorción no es

uniforme, pudiendo alcanzar parte de esta energía la superficie de la Tierra. La cantidad de  $O_3$  en la atmósfera se mide en Unidades Dobson (UD). En el planeta hay en promedio una cantidad de 300 UD (Andrade Flores, 2003), lo cual significa que si todo el  $O_3$  fuera llevado a nivel del mar, en condiciones normales de presión y temperatura (i.e., 1 atmósfera y 20 °C), ocuparía una capa de 3 milímetros de espesor.

A modo de ejemplo de cómo varía la cantidad de radiación entre estaciones del año, así como también la concentración de  $O_3$ , en la Figura 2 se muestran las dosis diarias para la zona de estudio en este trabajo de tesis (Bahía Engaño, 43° S – 65° O), a lo largo de los años 1999-2001. Por otro lado, se calcularon las dosis medias promedio para la estación verano e invierno, así como la relación entre bandas energéticas (Tabla 1).



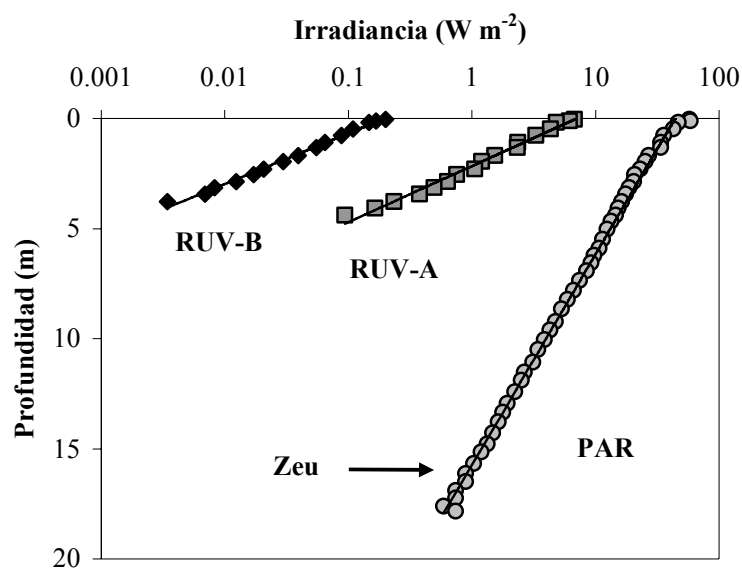
**Figura 2:** Dosis diarias y concentración de ozono (UD) para la zona de Bahía Engaño (43° S – 65° O) durante los años 1999-2001. A) Dosis diarias para PAR (400-700 nm) y RUV-A (315-400 nm), B) Dosis diarias para RUV-B (280-315 nm), y concentración de ozono (UD), en función de los días Julianos.

<i>Estación del año</i>	<i>Porcentaje dosis media</i>			
	<b>PAR</b>	<b>RUV-A</b>	<b>RUV-B</b>	<b>RUV / PAR</b>
<i>Verano</i>	88,25	11,50	0,25	0,133
<i>Invierno</i>	91,32	8,53	0,15	0,095

**Tabla 1** Porcentaje de dosis media para las estaciones de verano e invierno entre los años 1999-2001, para tres bandas energéticas: PAR, 400-700 nm, RUV-A, 320-400 nm; y RUV-B, 280-320 nm. Datos registrados por un radiómetro ELDONET (European Light Dosimeter Network) instalado en la Estación de Fotobiología Playa Unión.

Radiación solar en la columna de agua

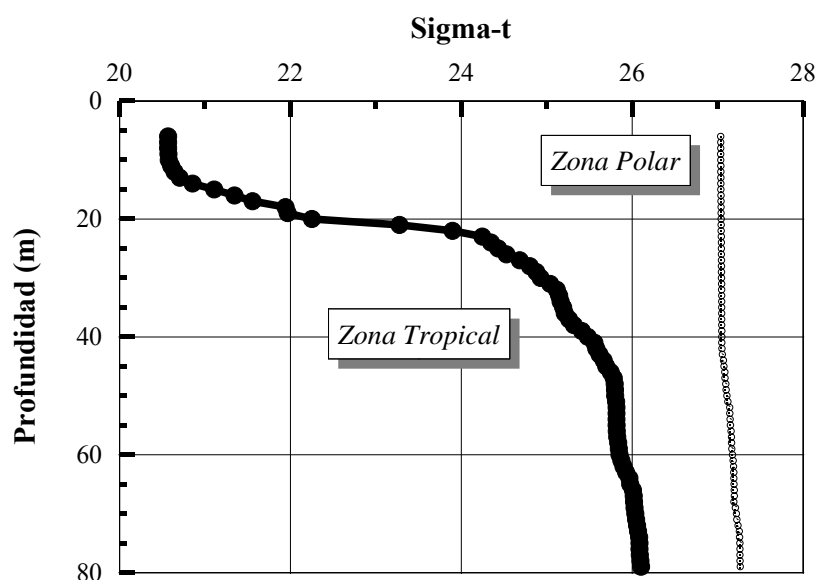
Cuando la radiación solar (filtrada por la atmósfera) llega a la superficie de un cuerpo de agua (en el caso específico de esta tesis, la superficie del mar), el agua y todos los componentes que se encuentran en ella (tanto disueltos, como en suspensión) comienzan a actuar como un filtro natural atenuando exponencialmente la radiación en función de la profundidad (Figura 3). Este proceso de atenuación se da en forma diferencial entre las distintas bandas del espectro electromagnético dependiendo de las características ópticas del cuerpo de agua (Kirk, 1994). La PAR es menos atenuada que la RUV-A y RUV-B y define una zona activa para la fotosíntesis dentro de la columna de agua denominada “zona eufótica” ( $Z_{eu}$ ), cuyo límite inferior se define arbitrariamente como aquella profundidad a la cual se alcanza el 1% de la PAR en superficie.



**Figura 3:** Ejemplo de la atenuación de la radiación en función de la profundidad para una estación de la zona de Bahía Engaño ( $43^{\circ} S - 65^{\circ} W$ ) para el mes de Agosto de 2000.



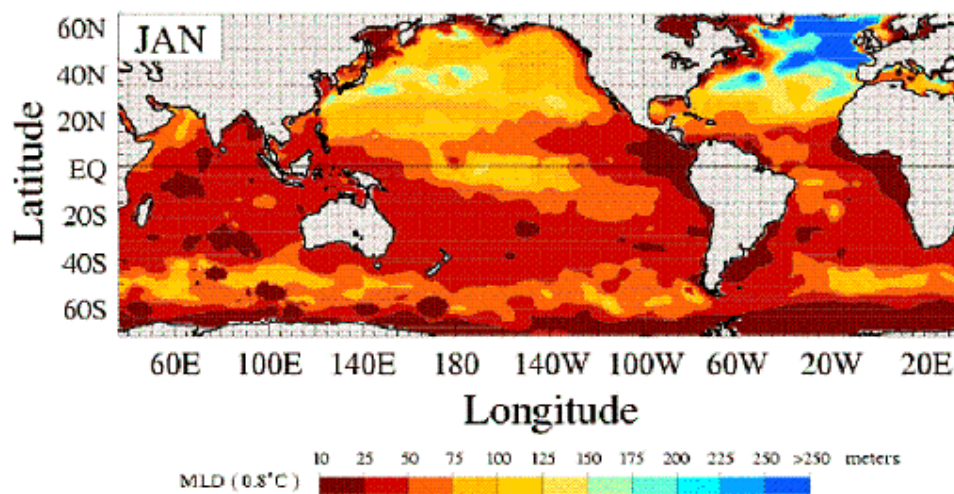
En la primer parte de la columna de agua existe una zona donde la temperatura y la salinidad (por ende la densidad) pueden permanecer homogéneas, dentro de ciertos límites, y se denomina capa superficial de mezcla (CSM). El límite inferior de esta capa superficial (i.e., profundidad de la CSM) se define como el máximo gradiente de cambio dentro del perfil, ya sea tomando la temperatura o la densidad (i.e., Sigma-t) como variable en función de la profundidad. La profundidad de la CSM varía con el tiempo y de un cuerpo de agua a otro dependiendo de varios factores tales como la latitud (i.e., temperatura), la época del año, las condiciones meteorológicas del lugar, etc. En la Figura 4 se observan perfiles de Sigma-t y la variación de la CSM en dos latitudes de características distintas, una zona tropical y una zona polar. Las zonas tropicales presentan un importante calentamiento superficial de la columna de agua, generándose una cálida y poco profunda CSM, mientras que las zonas polares experimentan menores temperaturas y fuertes vientos, lo que da como resultado CSM muy profundas.



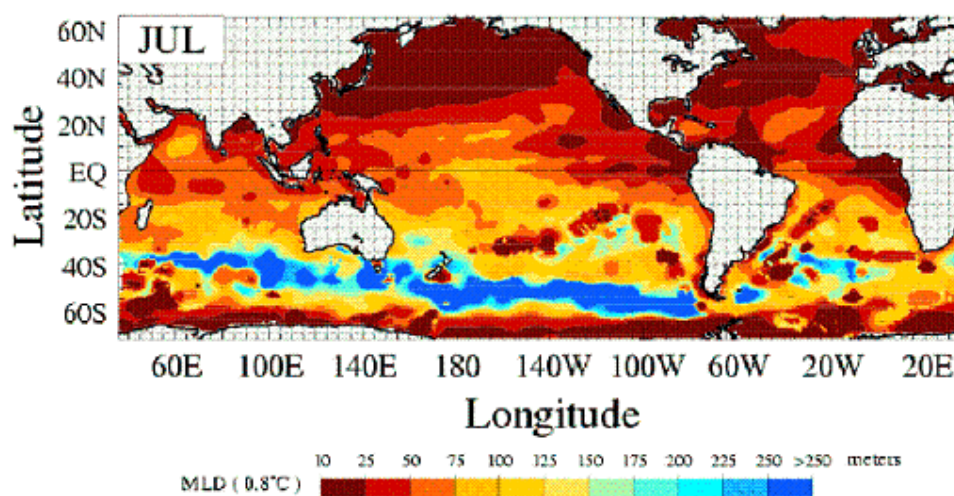
**Figura 4:** Perfil de Sigma-t en función de la profundidad (m) para una zona tropical y una zona polar.

A modo de ejemplo, en la Figura 5 se presentan condiciones globales en la variación de la profundidad de la CSM, representadas como la variación significativa de Sigma-t para los meses de Enero y Julio.

A



B



**Figura 5:** Distribución global de la profundidad de la capa superficial de mezcla (CSM) para los meses de Enero (A) y Julio (B). Figura extraída de <http://www7320.nrlssc.navy.mil> (U.S National Oceanic Atmospheric Administration)

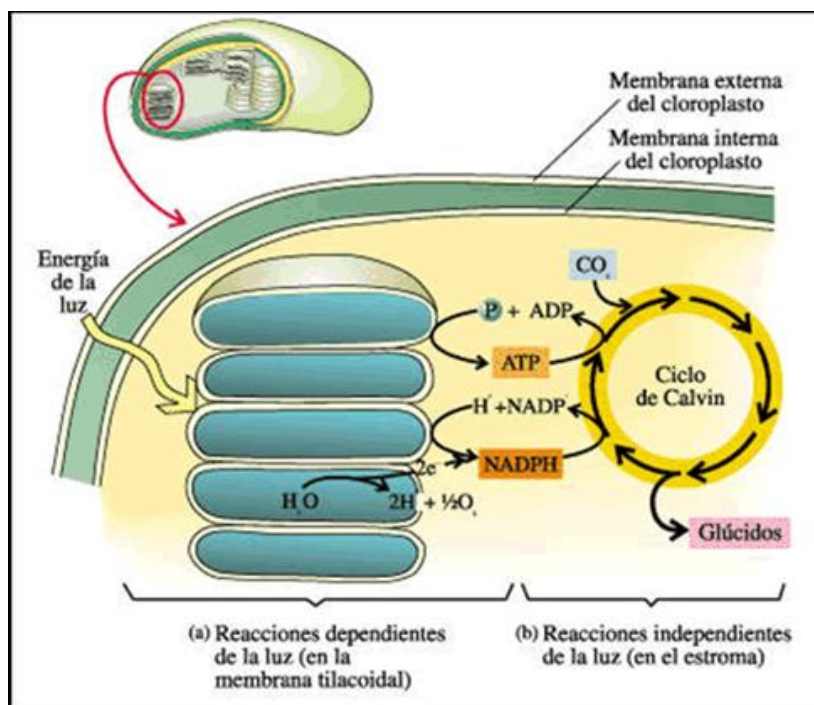
### Fotosíntesis

La radiación puede ser transmitida, reflejada o absorbida en la columna de agua conjuntamente por la materia disuelta y/o en suspensión y por organismos autótrofos presentes en la misma.

Los organismos autótrofos utilizan la energía absorbida para realizar fotosíntesis, pudiendo resumirse todo el proceso a través de la siguiente ecuación:



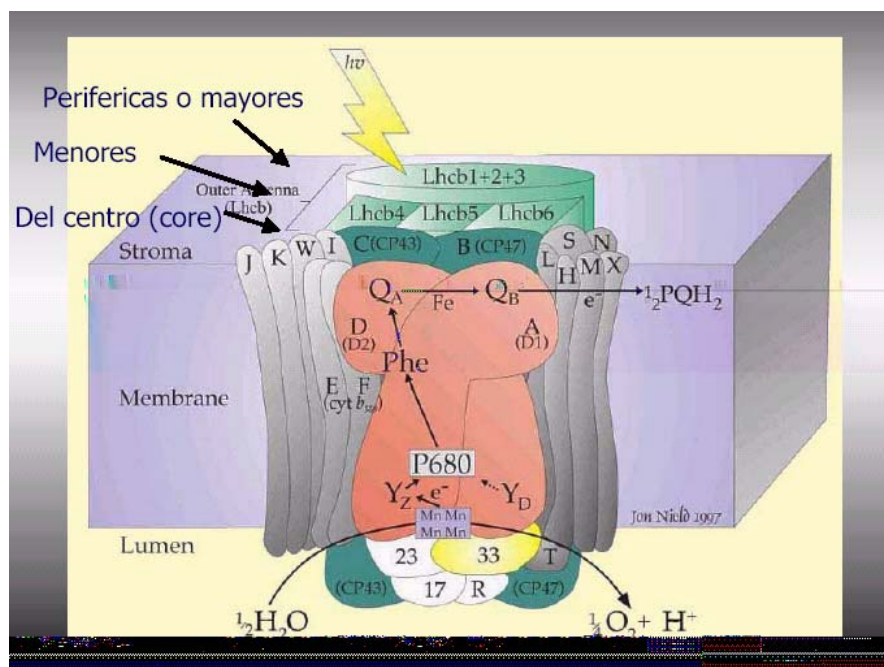
La fotosíntesis consta de dos fases: a) fotoquímica o lumínica: se produce en los tilacoides donde la energía lumínica se convierte en energía química, la cual queda almacenada en enlaces ATP y NADPH, y b) enzimática u oscura (debido a que no se requiere la presencia de luz, aunque algunas enzimas son estimuladas por ésta): se produce en el estroma donde la energía química del ATP y NADPH se utiliza para incorporar carbono en moléculas orgánicas (Esquema 2).



**Esquema 2:** Cloroplasto típico de organismos fotosintéticos. Se diferencian las dos fases del proceso de fotosíntesis: a) la fase fotoquímica en la membrana tilacoidal y b) la fase enzimática en el estroma. Se detallan los productos finales de ambas fases. Fuente: <http://www.virtual.unal.edu.co>

Los cloroplastos capturan la energía proveniente del Sol a través de pigmentos y la convierten en energía química y finalmente en materia orgánica a partir de  $CO_2$  y agua. El agua es quien cede los primeros electrones de la reacción, liberando oxígeno como producto de la misma. Los pigmentos fotosintéticos (e.g., clorofilas, máxima absorbancia a 440 y 665 nm), al igual que pigmentos accesorios (e.g., carotenos, máxima absorbancia a 470 nm) y los complejos enzimáticos necesarios en la fase fotoquímica del proceso de fotosíntesis se encuentran ubicados en las membranas de los tilacoides (Esquema 2). El estroma (fase acuosa encerrada por la membrana interna) contiene la mayoría de las enzimas requeridas para las reacciones de fijación de carbono en la fase enzimática (Esquema 2).

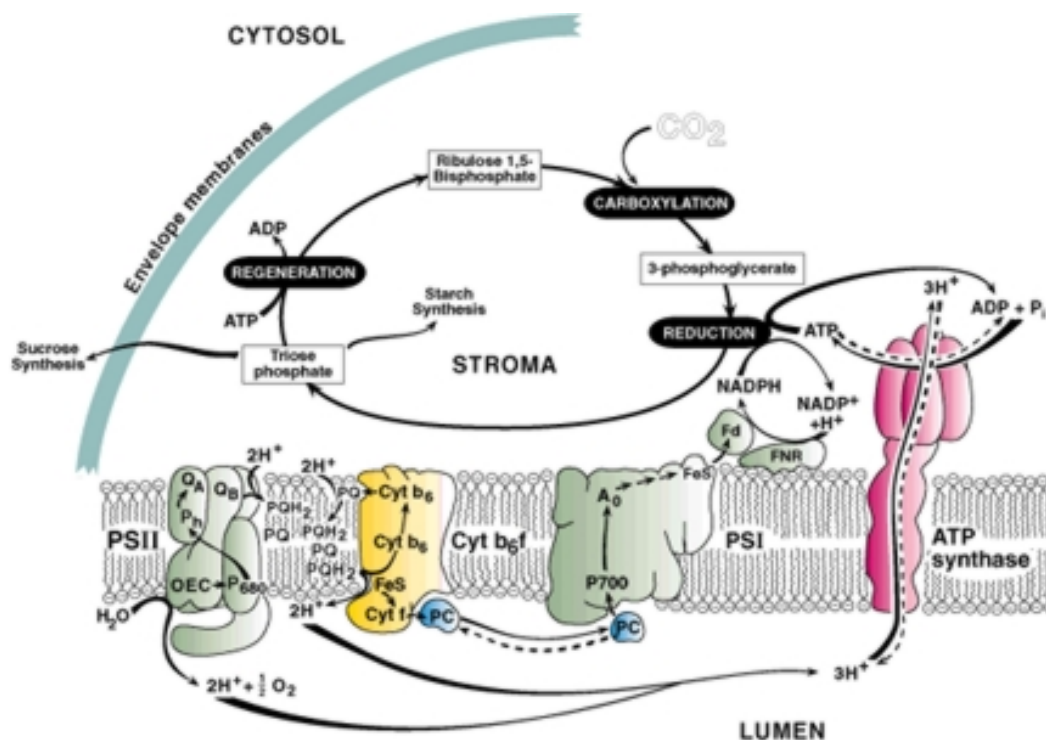
La mayor parte de los pigmentos colectores se unen a proteínas formando un complejo proteína-pigmento cuya función principal es la de coleccionar fotones, dirigir la excitación a los centros de reacción de los fotosistemas y proveer protección bajo altos niveles de energía lumínica. Existen muchos tipos de antenas colectoras de energía (i.e., periféricas y centrales) dependiendo del grupo estudiado (i.e., cianobacterias, fitoplancton). Estos complejos proteína-pigmento son parte estructural de los fotosistemas, lugar donde se encuentra el centro de reacción y donde comienza el transporte electrónico para generar finalmente poder reductor (Esquema 3).



**Esquema 3:** Esquema representativo del fotosistema II (FSII). La zona coloreada en verde es la zona donde se encuentran la mayor cantidad de antenas captadoras de fotones. Fuente: <http://www.virtual.unal.edu.co>

Existen dos fotosistemas en el aparato fotosintético: a) el fotosistema I (FS I), o también llamado **P700** y b) el fotosistema II (FS II) o **P680**. Los fotosistemas se encuentran empaquetados en la membrana tilacoide (al igual que citocromos b6f y ATP sintetasa), con varios cientos de clorofilas antena y pigmentos accesorios rodeando un centro de fotorreacción (Esquema 4). La absorción de un fotón por cualquiera de las clorofilas antena genera la excitación del centro de reacción por transferencia de excitones. Si bien todas las moléculas de pigmento de un fotosistema pueden absorber fotones, sólo unas pocas moléculas de clorofila asociadas al centro de reacción fotoquímico están especializadas en la transferencia de la energía lumínica a energía química.

Los fotones capturados por los fotosistemas generan a través de una cadena redox un transporte de electrones desde el FS II hacia el FS I (llamado Esquema Z, ya que siempre se representa en función del potencial de reducción estándar de cada componente en la cadena de transporte electrónico) y de ahí a la ATP sintetasa para la síntesis de ATP y poder reductor (NADPH). El ATP y el NADPH sintetizados durante la fase fotoquímica se utilizarán en la fase enzimática para reducir el  $\text{CO}_2$  a un azúcar simple, a partir del cual se sintetizarán luego otras moléculas orgánicas (Esquema 4), dependiendo de los requerimientos fisiológicos del organismo. El  $\text{CO}_2$  ingresa al cloroplasto a través de la membrana celular por canales específicos. Las reacciones de fijación de carbono se realizan en el estroma de la célula en un ciclo llamado “Ciclo de Calvin”. Si bien las reacciones que se realizan dentro de éste ciclo no requieren la presencia de luz para llevarse a cabo algunas enzimas son reguladas por ésta. Dentro de este ciclo se sintetiza gliceraldehído fosfato, a partir del cual luego se sintetizará glucosa y otros compuestos orgánicos (i.e., grasas, ácidos grasos, aminoácidos y ácidos orgánicos).



**Esquema 4:** Esquema resumen del proceso fotosintético en organismos autótrofos. Fuente: <http://www.virtual.unal.edu.co>

### *Fotosíntesis en organismos fitoplanctónicos marinos*

El crecimiento y desarrollo de los organismos autótrofos depende básicamente de la incorporación de carbono como resultado final de la fotosíntesis. Si bien la disponibilidad de nutrientes y la temperatura condicionan asimismo a la fotosíntesis, ésta sólo es posible cuando la radiación solar es captada por los organismos. Dentro de los organismos fotosintéticos, el fitoplancton marino (objeto principal de este estudio) se desarrolla y vive dentro de la columna de agua. Por este motivo, la fisiología del fitoplancton se ve condicionada por las características del medio que lo circunda. Estas características engloban tanto parámetros químicos (e.g., concentración de nutrientes), físicos (e.g., turbulencia, temperatura), como ópticos (e.g., atenuación de la radiación en la columna).

### **Movimiento del fitoplancton en la columna de agua**

El fitoplancton se encuentra sujeto a movimientos dentro de la CSM; por lo tanto, las características físicas y ópticas determinan la aclimatación de las células a la radiación solar. Denman y Gargett (1983) han demostrado que partículas con características similares al fitoplancton pueden circular en una CSM con distintas velocidades, las cuales pueden fluctuar desde 0,5 h a semanas en desplazarse verticalmente 10 m. Estos movimientos son producidos por procesos de turbulencia, la cual es generada a su vez por efecto del viento (i.e., variación en la tensión superficial creando movimientos en profundidad) y por variaciones en la temperatura (i.e., hundimiento de masas de agua, mezcla vertical). El desplazamiento del fitoplancton dentro de la columna de agua, sujeto a las condiciones de viento y temperatura en superficie (Neale et al.,



2003), puede ocurrir en un rango de minutos, horas o días (Sverdrup, 1953; Denman & Gargett, 1983). Sujeto a las características del cuerpo de agua, el fitoplancton se encuentra en general limitado a las zonas superficiales (CSM), debido a su dependencia con la energía solar (i.e., PAR) para llevar a cabo el proceso de fotosíntesis. Esto hace que no sólo estén expuestos a la radiación visible, sino también a la RUV.

### **Efecto de la RUV en el fitoplancton**

Existen evidencias que la RUV tiene efectos sobre una gran variedad de moléculas biológicas y componentes celulares y, en particular, se ha demostrado que es un factor de estrés, incluso en niveles normales, que produce distintos efectos en la fisiología del fitoplancton (Buma et al., 2003; Villafañe et al., 2003). En general, el mayor efecto de la RUV en el fitoplancton se refleja en una disminución de la tasa de producción primaria (Smith, 1989; Holm-Hansen et al., 1993; Cullen & Neale, 1994; Villafañe et al., 2003). Sin embargo, se han determinado otros importantes efectos tales como inhibición en la tasa de crecimiento (Jokiel & York, 1984; Villafañe et al., 1995b; Wängberg et al., 1996), daño en el ADN (Buma et al., 1995; 1997; 2003; Helbling et al., 2001c; Villafañe et al., 2004b), degradación de pigmentos (Gerber & Häder, 1995; Maske & Latasa, 1997; Banaszak & Neale, 2001), disminución en la incorporación de nutrientes tales como la inactivación del metabolismo del nitrógeno por RUV-B (Döhler, 1987; 1997) y disminución en la movilidad (Häder & Worrest, 1997). Asimismo, se ha determinado una importante relación en procesos de daño / recuperación al ADN entre RUV-B y la RUV-A (Sancar & Sancar, 1988; Buma et al., 2003). Hasta ahora se han mencionado una serie de efectos causados por la RUV en la fisiología y comportamiento del fitoplancton, y a pesar de que existe una amplia lista de trabajos realizados en esta temática, la mayoría de éstos han sido realizados bajo condiciones de irradiancia fijas (i.e., condiciones constantes de irradiancias, especialmente PAR). Si bien estos trabajos constituyen una invaluable base de conocimientos sobre mecanismos específicos de respuesta, el fitoplancton en su ambiente natural se encuentra expuesto a condiciones variables de radiación (i.e., variación en la profundidad y velocidad de mezcla vertical). Por este motivo, determinar el efecto real de la RUV en el fitoplancton presenta complicaciones metodológicas.

### **Efecto combinado entre la radiación y la CSM sobre el fitoplancton**

Dentro de la CSM, el fitoplancton está expuesto a un régimen variable de irradiancia, tanto en calidad como en cantidad. Una célula dentro de la columna de agua puede recibir el máximo de radiación solar si se encuentra en superficie, o percibir mínimas intensidades por debajo de la  $Z_{eu}$ . Luego de años de investigación con el objetivo de determinar el efecto de la radiación solar en el fitoplancton, entre mediados y fines de los años 70' se comenzó a incorporar en el diseño experimental la movilidad del fitoplancton en la columna de agua y de esta manera investigar el efecto del régimen variable de radiación (hasta ahora solo de PAR) en la productividad primaria. Los resultados de estos primeros experimentos fueron variables dependiendo del sistema y el régimen de irradiancias utilizado en las incubaciones, así como de las escalas de tiempo implementadas (Jewson & Wood, 1975; Marra, 1978; Gallegos & Platt, 1982; Lewis et al., 1984), evidenciándose en general un incremento de la tasa de producción primaria influenciado por la mezcla vertical. Al observarse que la mezcla vertical tenía un efecto en la productividad primaria se incrementaron los estudios sobre esta temática. Trabajos posteriores discreparon sobre los resultados como los realizados por Yoder y Bishop (1985), quienes no encontraron diferencias entre sistemas de irradiancias fijas e irradiancias fluctuantes. Kroon y colaboradores (1992) determinaron que la mezcla vertical producía una disminución en la tasa de producción primaria. Si bien todos los experimentos realizados habían tenido en cuenta el efecto del régimen variable de irradiancia, solo estudiaron el efecto de la PAR en el proceso. Asimismo, se han realizado otros experimentos tendientes a determinar la fotoaclimatación del fitoplancton (Falkowski & Wirick, 1981; Cullen & Lewis, 1988).

### Importancia de la RUV en la mezcla vertical

Entre los años 1985 y 1988, con el descubrimiento del llamado “agujero de ozono” (Farman et al., 1985; Gribbin, 1988) hubo un importante desarrollo de trabajos científicos con el objetivo de determinar el efecto de la RUV en la productividad primaria y la respuesta fisiológica del fitoplancton. Si bien se desarrollaron variados experimentos la mayoría de ellos se realizaron bajo condiciones de irradiancias fijas y solo algunos sugirieron posibles efectos de la RUV cuando las células eran mezcladas por debajo de la  $Z_{eu}$  (Bidigare, 1989; Holm-Hansen et al., 1993). Sin embargo, recién en el año 1994 Helbling y colaboradores realizaron los primeros trabajos tendientes a evaluar el efecto conjunto entre la RUV y la mezcla vertical en la producción primaria del fitoplancton antártico. En estos experimentos se utilizaron distintos tratamientos de radiación y mediante la comparación entre sistemas de irradiancias fijas y fluctuantes se concluyó que bajo la influencia de la RUV la mezcla vertical aumentaba la inhibición de la tasa de producción primaria. Estos resultados se oponían a los obtenidos en trabajos anteriores, lo cual estableció así un nuevo interrogante en la respuesta del fitoplancton cuando se interrelacionaban los efectos entre la RUV y la mezcla vertical. A la luz de estos resultados, y con el objetivo de ampliar el estudio sobre el tema, se comenzaron a realizar otros trabajos en la zona antártica. Entre éstos, se determinó el efecto conjunto entre la disminución de ozono (i.e., aumento de la RUV) y la CSM (Neale et al., 1998b), demostrando que los cambios rápidos en la CSM son más importantes en la inhibición fotosintética que los cambios en la concentración de ozono. Por lo tanto, la inhibición en la productividad primaria fitoplanctónica integrada en la columna de agua puede aumentar o disminuir dependiendo del grado de relación entre ambos factores. En el año 2001, Köhler y colaboradores trabajaron con poblaciones naturales circulando en la columna de agua bajo distintas profundidades, demostrando que el efecto de la RUV depende de la porción de la columna de agua mezclada, encontrándose inhibición en la producción primaria hasta 10 m.

### Otros efectos de la RUV y la CSM sobre el fitoplancton

Hasta aquí se ha considerado el efecto de la RUV y la mezcla vertical sólo en la productividad primaria; sin embargo, se han realizado otros trabajos tendientes a determinar el efecto interactivo de ambas variables, midiendo el daño en el material genético (i.e., formación de dímeros de timina, en inglés cyclobutane pyrimidine dimers, CPDs). Determinar el efecto en el ADN en la columna de agua involucra un balance entre procesos de daño y recuperación, como consecuencia del régimen de irradiancias variables. En perfiles de daño al ADN en función de la profundidad (Huot et al., 2000) se observó que el daño en las muestras expuestas a máxima radiación (superficie) es mayor que el daño a bajas irradiancias (en profundidad). Si se considera que los organismos se encuentran expuestos a un régimen variable de irradiancias, tanto el daño como la reparación del material genético variarán respecto de la mezcla vertical, debido a que ambos son dependientes de la longitud de onda y la intensidad (Buma et al., 2003). Debido a esto y existiendo procesos de reparación dependientes e independientes de la luz (i.e., fotorreparación, y reparación por escisión), el balance neto entre daño y reparación en la columna de agua debe ser evaluado a través de modelos (Huot et al., 2000). En bacterioplancton, el modelo de Hout y colaboradores (2000) en particular, demostró que la profundidad de la CSM determina la cantidad y distribución del daño al ADN en la columna de agua. No se han registrado trabajos de campo tendientes a evaluar el efecto conjunto de daño al ADN y mezcla vertical; sin embargo, Helbling y colaboradores (2006) relacionaron los efectos de la RUV en la producción primaria y en el daño al ADN con la mezcla vertical en trabajos *in situ* realizados en el lago subtropical “La Angostura”. Los resultados demuestran que la mezcla vertical favorece al fitoplancton al transportarlo a profundidades donde se pueden realizar procesos de reparación del daño causado. Por otro lado, la fluctuación en el régimen de irradiancia en ambientes naturales es un factor constante al cual se ve expuesto el fitoplancton, aunque el tema ha sido muy poco estudiado en ambientes naturales. Litchman (1998; 2003) evaluó el efecto del régimen fluctuante de irradiancia en la estructura y dinámica de comunidades fitoplanctónicas de agua dulce y en algunos cultivos monoespecíficos. Los resultados obtenidos demuestran que el régimen de irradiancias puede influir en la estructura

de las comunidades fitoplanctónicas, afectando en forma diferencial el crecimiento y la competencia entre especies. Asimismo, otro trabajo realizado por la misma autora (Litchman, 2000) con cultivos monoespecíficos demostró que la tasa de crecimiento de esas especies dependía tanto de la irradiancia media recibida como de la duración en el régimen de fluctuaciones (i.e., período de las distintas intensidades recibidas).

### Fundamentos de este trabajo de tesis

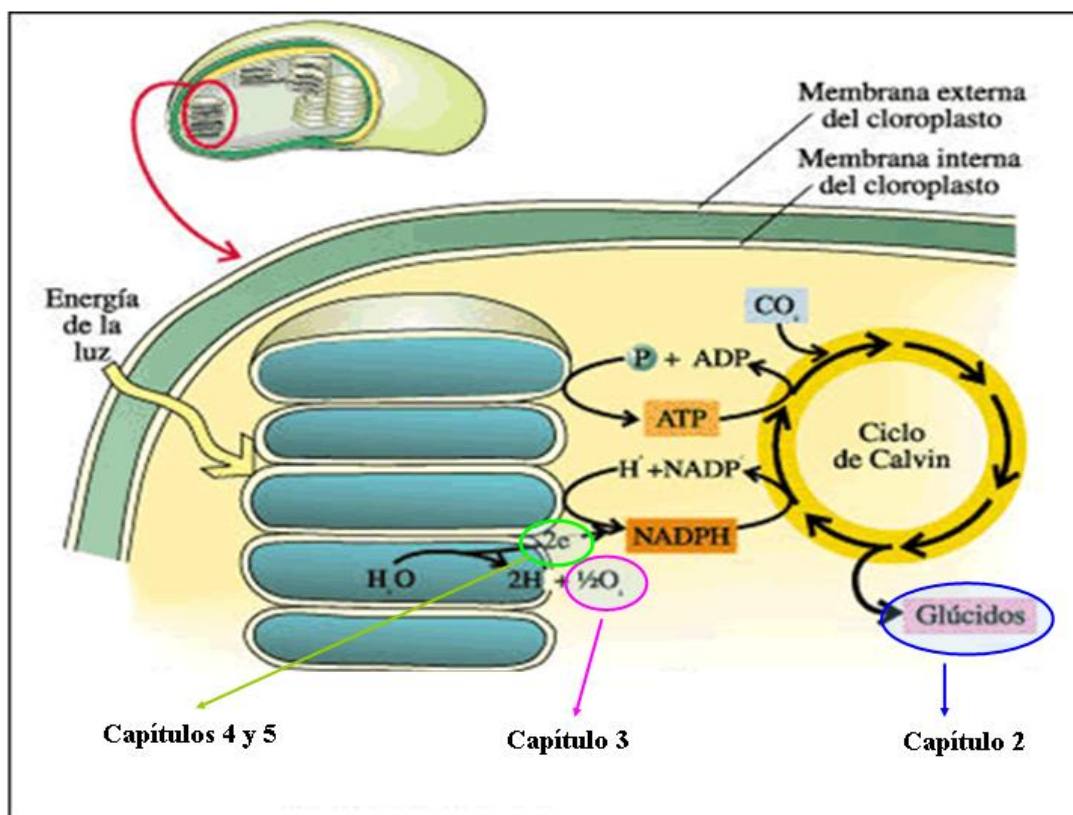
En vista de los resultados obtenidos en las investigaciones realizados hasta el momento se planteó este trabajo doctoral con el fin de estudiar la respuesta de organismos fitoplanctónicos marinos en función del campo lumínico recibido. Una de las razones más importantes para la elección del tema y área de estudio se basó en las características de la zona costera patagónica en Bahía Engaño (Rawson, Chubut – 43° S, 65° W). La importancia de la zona radica en su variabilidad estacional en el régimen de irradiancias y el eventual efecto de la disminución en la concentración de ozono, debido a la proximidad del área a los eventos anuales del “agujero de ozono” (Orce & Helbling, 1997). Asimismo, las características ópticas de la columna de agua se ven influenciadas por la descarga del Río Chubut (i.e., cambio en la atenuación de la radiación con la profundidad), así como también por las variaciones en la velocidad del viento y la temperatura a lo largo del año (Villafañe et al., 2004a), las cuales varían la profundidad y características de la CSM. Por otro lado, la zona costera patagónica es una zona económicamente muy importante ya que sustenta una significativa actividad pesquera, lo cual enfatiza el estudio y comprensión del desarrollo de niveles tróficos primarios en la zona. Además, sólo existen algunos trabajos que han enfocado su estudio en la respuesta de los organismos fitoplanctónicos marinos bajo un régimen variable de irradiancias en presencia de RUV. En estos trabajos se ha observado que las respuestas de los organismos fitoplanctónicos marinos dependen de varios factores, entre los cuales pueden citarse: a) historia lumínica, b) tamaño celular, c) grupo taxonómico y d) la velocidad de respuesta fisiológica (i.e., aclimatación). La zona elegida para este estudio presenta otra importante condición para ser seleccionada, ya que se ha observado una interesante variabilidad estacional en su composición taxonómica (Barbieri et al., 2000), lo cual permite trabajar con células de distintos tamaños y distintas historias lumínicas, permitiendo abordar algunos interrogantes planteados en los trabajos mencionados. Si bien se trabajará con poblaciones naturales, también se utilizarán cultivos monoespecíficos a fin de estudiar en detalle algunos mecanismos de respuesta específicos de ciertas especies.

En función de lo expuesto, se ha planteado como objetivo principal de esta tesis “determinar los efectos interactivos entre la RUV y la CSM en la productividad primaria fitoplanctónica marina de latitudes medias (Patagonia), teniendo en cuenta la capacidad de aclimatación del fitoplancton”. A continuación se presenta un resumen general de la organización del trabajo realizado en esta tesis doctoral.



## Organización general de la tesis

En la zona elegida para este estudio (Bahía Engaño 43° S - 65° W) la comunidad fitoplanctónica está formada por varias poblaciones que presentan sucesión estacional. Anualmente se evidencian períodos donde la comunidad es dominada por organismos microplañctónicas (i.e., blooms de invierno), y otros donde es dominada por organismos nanoplañctónicas (i.e., pre y postbloom durante el resto del año). En base a la variabilidad taxonómica observada y en función de los interrogantes planteados por los trabajos realizados hasta el momento sobre el tema (**Capítulo 1**), se planteó estudiar la respuesta de estos organismos en la fase fotoquímica y en la fase enzimática de la fotosíntesis (Esquema 5).



**Esquema 5:** Cloroplasto típico de organismos fotosintéticos. Se destacaron los 3 puntos a estudiar en el marco de esta tesis doctoral: 1) Fase enzimática: a) incorporación de Carbono marcado en la síntesis de hidratos de carbono (Capítulo 2); 2) Fase fotoquímica: a) producción de Oxígeno (Capítulo 3) y b) transporte electrónico (Capítulos 4 y 5).

Se comenzó evaluando el efecto conjunto de la RUV y la CSM en la fotosíntesis de muestras fitoplanctónicas naturales en distintos períodos de la sucesión anual, midiendo la incorporación de carbono (i.e., fase enzimática, Esquema 5) como producto del proceso fotosintético (**Capítulo 2**). En este Capítulo se determinó la importancia de la porción de la  $Z_{eu}$  mezclada y la influencia de la RUV en el proceso fotosintético, en relación con la respuesta de organismos de distintos tamaños celulares. La respuesta fotosintética del fitoplancton se cuantificó luego de un recorrido completo dentro de la CSM simulada (i.e., 5 horas). Al utilizar esta técnica

se puede cuantificar la respuesta fotosintética del fitoplancton luego de un período determinado de tiempo (i.e., horas) pudiendo establecer la respuesta fisiológica final del proceso como producto del cambio de irradiancia al cual se exponen las células. Los resultados obtenidos en este Capítulo demuestran que existe una respuesta variable dependiendo de la especie, el tamaño celular y la profundidad de la CSM; asimismo, se observó que las especies microplanctónicas se inhiben más frente a un régimen fluctuante de irradiancias. Los resultados observados en este trabajo plantearon la necesidad de buscar otra técnica que permita cuantificar de manera continua la respuesta fitoplanctónica al cambio de irradiancia, con el fin de poder medir la respuesta en otros puntos del proceso. Por lo tanto, se planteó emplear la evolución de oxígeno (i.e., producto de la fase fotoquímica, Esquema 5) a fin de realizar una evaluación continua en la respuesta del fitoplancton frente al cambio de radiación (**Capítulo 3**). En este Capítulo se evaluó la respuesta fotosintética del fitoplancton así como también la importancia de la dirección de desplazamiento de las células dentro de una CSM simulada (e.g., desde altas a bajas irradiancias y viceversa). En base a los resultados obtenidos en el Capítulo 2, se propuso trabajar con especies marinas de distintos grupos taxonómicos de la colección de cepas de la Estación de Fotobiología Playa Unión (EFPU). Las especies utilizadas poseían el mismo tamaño celular (i.e., diámetro de 20 a 25  $\mu\text{m}$ ) y la misma historia lumínica, por lo cual se pudo enfocar el estudio directamente en la velocidad de respuesta y la importancia del desplazamiento de las especies estudiadas, expuestas a un régimen de irradiancias fluctuantes. Los resultados obtenidos en este trabajo demuestran que las especies utilizadas (*Dunaliella salina* (Chlorophyceae), *Thalassiosira weissflogii* (Bacillariophyceae) y *Heterocapsa triquetra* (Dinophyceae), poseen importantes diferencias en la tasa de producción de oxígeno dependiendo de la dirección de desplazamiento vertical en la columna de agua simulada, aún teniendo la misma historia lumínica. En general, se observó que *H. triquetra* fue la especie que más se benefició bajo un régimen fluctuante de irradiancia.

El fitoplancton posee distintos mecanismos de respuesta a la cantidad y calidad de radiación dentro de la columna de agua. Los dinoflagelados presentan mecanismos específicos de protección a la RUV, siendo la síntesis de compuestos protectores a esta banda energética uno de los más evidentes (Carreto, et al., 1990). Los resultados obtenidos indican que existe una sensibilidad diferencial a la radiación solar dependiendo de la historia lumínica y del tamaño celular, entre otras. Luego de trabajar con poblaciones naturales (Capítulo 2) y con especies de igual tamaño celular (Capítulo 3), se planteó en el **Capítulo 4** trabajar con cultivos mono-específicos de dinoflagelados marinos de distintos tamaños, midiendo el efecto conjunto de la radiación y la mezcla vertical en el rendimiento fotoquímico (i.e., fase fotoquímica, Esquema 5), utilizando fluorescencia de amplitud de pulso (Water-PAM, Walz). El objetivo principal de este Capítulo fue evidenciar la influencia del tamaño celular en la respuesta fotosintética, relacionando la misma con la importancia de ciertos compuestos protectores (i.e., carotenos y compuestos que absorben en el rango del UV), en tres dinoflagelados marinos cultivados bajo las mismas condiciones lumínicas previas a la experimentación. Los resultados obtenidos mostraron que existe una respuesta diferencial entre estas especies, siendo la especie más pequeña la que presentó mayores velocidades de respuesta al cambio de radiación y mayor inhibición en su rendimiento fotoquímico.

En vista de los resultados obtenidos, y como cierre en la experimentación de esta tesis, se planteó trabajar nuevamente con poblaciones naturales (**Capítulo 5**). El objetivo general de este trabajo fue evidenciar si el rendimiento fotoquímico (i.e., medido a través de la fluorescencia de amplitud de pulso) respondía de manera similar al efecto conjunto de la RUV y la mezcla vertical, en concordancia con los resultados obtenidos al utilizar otras técnicas. Las muestras de poblaciones naturales fueron expuestas a dos condiciones de irradiancias (i.e., variaciones en la cantidad de radiación), exponiendo el fitoplancton a distintas condiciones espectrales de radiación (i.e., distintos tratamientos de radiación). Por un lado el fitoplancton fue expuesto a un régimen variable de irradiancia (i.e., simulando el desplazamiento de las células en la columna de agua, experimentación similar al Capítulo 4), y por otro a condiciones simuladas de irradiancia en superficie durante un ciclo diario (i.e., la máxima radiación que el fitoplancton puede recibir

simulando que se encuentre en superficie). La respuesta fotosintética para ambas condiciones fue evaluada en una escala de minutos-hora y se determinaron distintos mecanismos de aclimatación (e.g., disipación de energía en exceso, recuperación en la oscuridad). Los resultados obtenidos demuestran que las células presentan una importante inhibición de la fotosíntesis bajo condiciones de máximo estrés lumínico (i.e., máxima irradiancia), siendo las muestras con mayor porcentaje de células microplanctónicas (i.e., mayores a 20  $\mu\text{m}$ ) las que presentaron menor inhibición en su rendimiento fotoquímico en comparación con otras muestras con menor porcentaje de células grandes. Por otro lado, se observó que la mezcla simulada favorecía la recuperación del rendimiento fotoquímico en comparación con irradiancias máximas. Asimismo, se observó que los ETR (i.e., tasa de transporte electrónico) integrados fueron mayores bajo condiciones de irradiancias fluctuantes al ser comparados con condiciones de máxima irradiancia. La profundidad de mezcla (i.e., CSM somera y CSM profundas) condicionó la respuesta integrada del fitoplancton, ya que fueron mayores los ETR calculados en CSMs. Como conclusión general de este último Capítulo se observa que el rendimiento fotoquímico es beneficiado por la mezcla vertical simulada, en comparación con condiciones de máximo estrés (i.e., condiciones simuladas de irradiancia en superficie).

Finalmente, en el **Capítulo 6** se presentan las conclusiones generales de esta tesis basadas en los trabajos realizados en cada Capítulo.

## Evaluación experimental del efecto de la RUV sobre el fitoplancton marino de latitudes medias expuesto a un régimen de radiación variable

### Resumen

Se colectaron muestras de organismos fitoplanctónicos en Bahía Engaño, Rawson, Chubut, Argentina (43° S – 65° O) en diferentes épocas del año a fin de evaluar el efecto combinado de la radiación ultravioleta (RUV, 280-400 nm) y la mezcla vertical (i.e., la profundidad de la capa superficial de mezcla, CSM) en la fotosíntesis. Las muestras fueron expuestas a regimenes de radiación fluctuantes y fijos en una cámara a 15 °C iluminada (Photosynthetic Available Radiation, PAR = 66 W m<sup>-2</sup>; RUV-A = 15,3 W m<sup>-2</sup>, RUV-B = 0,7 m<sup>-2</sup>), recibiendo PAR + RUV, y solo PAR. La comparación entre sistema fijo y rotativo mostró que cuando  $Z_{CSM} / Z_{Eu} = 0,6$  (i.e., 60 % de la zona eufótica ( $E_u$ ) mezclada), solo las muestras del post-bloom (dominadas por flagelados y diatomeas [*Chaetoceros* spp.]) fueron afectadas significativamente por la RUV. Los valores integrados de carbono fijado durante el pre y post-bloom fueron mayores bajo condiciones de mezcla en comparación con los obtenidos a irradiancias fijas. Sin embargo, durante el bloom (dominado por la diatomea microplactónica *Odontella aurita*), el fitoplancton expuesto a regimenes variables de radiación presentó menores valores integrados de carbono fijado. Cuando las muestras del post-bloom fueron expuestas a diferentes condiciones de mezcla, la inhibición inducida por RUV redujo la fijación integrada de carbono entre 11-13 % cuando la  $Z_{CSM} / Z_{Eu} = 0,6$ , mientras que cuando la  $Z_{CSM} / Z_{Eu} = 0,91$  la fijación se incrementó entre 7-12 %. Las diferencias observadas entre muestras provenientes del pre-bloom, bloom, y post-bloom pueden atribuirse a numerosos factores, tales como la historia lumínica de las células, la composición taxonómica, el tamaño celular de la comunidad y más probablemente, a las diferentes velocidades de inhibición de las muestras.

### Introducción

El fitoplancton se encuentra normalmente expuesto a fluctuaciones de radiación en su ambiente natural. En una región geográfica específica, los niveles de radiación que alcanzan la superficie terrestre, tanto de radiación visible (PAR, Photosynthetic Available Radiation, 400 – 700 nm) como de radiación ultravioleta (RUV, 280 – 400 nm), varían a través del año principalmente debido a cambios en el ángulo cenital (Madronich, 1993). Las variaciones naturales de radiación también ocurren a distintas escalas temporales, en el rango de días a minutos a causa de cambios en la nubosidad y variaciones en la concentración de ozono (Lubin & Jensen, 1995), así como también por la profundidad de la capa de mezcla (Denman & Gargett, 1983); estos cambios potencialmente afectan a los organismos de distintas formas. El fitoplancton, cuyo movimiento en la columna de agua se encuentra sujeto mayormente a movimientos de turbulencia, experimenta fluctuaciones significativas en el régimen de radiación debido a cambios en la profundidad de la capa superficial de mezcla (CSM), que es el resultado de variaciones en las condiciones climáticas, tales como el calentamiento solar, efecto del viento, o por la actividad de tormentas (Neale et al., 2003).

Los efectos más evidentes de la fluctuación en el régimen de radiación incluyen cambios en la fotoaclimatación del fitoplancton (Falkowski & Wirick, 1981; Cullen & Lewis, 1988), con variaciones asociadas en los parámetros P-E, campo de fluorescencia o en la composición química celular (Marra, 1978; Denman & Gargett, 1983; Cullen & Lewis, 1988). Aunque muchos de estos estudios han considerado las respuestas de estos organismos bajo regimenes de radiación PAR, es hoy reconocido que las variaciones en los niveles de RUV, tales como los producidos por procesos de mezcla vertical, pueden afectar el funcionamiento y la aptitud de estos organismos acuáticos (Helbling et al., 1994; Neale et al., 1998a,b; Zagarese et al., 1998; Huot et al., 2000; Xenopoulos et

al., 2000; Köhler et al., 2001). Solo algunos estudios han evaluado el efecto combinado entre variaciones en los niveles de RUV y la mezcla vertical en la fotosíntesis (Helbling et al., 1994; Neale et al., 1998a,b; Köhler et al., 2001).

En la costa Atlántica sólo algunos estudios han determinado la productividad *in situ* de los organismos fitoplanctónicos (Charpy & Charpy-Roubaud, 1980; Buma et al., 2001; Helbling et al., 2001a). En la costa patagónica se han comenzado a realizar investigaciones para evaluar el efecto de la RUV (Villafañe et al., 2001) en la fotosíntesis y en el material genético (Buma et al., 2001; Helbling et al., 2001a); sin embargo, ninguno de estos estudios ha determinado específicamente el resultado de las variaciones del cambio de radiación en dichos procesos. Estos estudios son de gran importancia para esta región donde los organismos acuáticos están normalmente expuestos a cambios de radiación, generados especialmente por la alternancia de períodos de fuertes vientos y períodos de calma los cuales afectan la profundidad de la CSM. En esta zona se desarrollan densas floraciones de organismos fitoplanctónicos durante el invierno, caracterizados por la dominancia de la diatomea *Odontella aurita* la cual sostiene una rica pesquería costera (Villafañe et al., 1991). Por estas razones, el objetivo de este estudio es determinar los efectos de la variabilidad de la RUV y PAR en la productividad primaria integrada de las poblaciones fitoplanctónicas características de las aguas costeras patagónicas.

### **Materiales y Métodos**

**Sitio de muestreo:** Los estudios fueron llevados a cabo con poblaciones fitoplanctónicas naturales colectadas en la zona de Bahía Engaño, Chubut, Argentina (43° S, 65° O) desde Marzo a Diciembre del año 2000 en la estación costera llamada “EGI”. Esta estación, localizada en la boca del estuario del río Chubut, posee una alta variabilidad en sus características físicas y químicas (Villafañe et al., 1991; Helbling et al., 1992a); por este motivo, se realizó un monitoreo continuo de la composición taxonómica fitoplanctónica, clorofila a (Clor-a), compuestos que absorben RUV, temperatura superficial, y conductividad cada 10-20 días desde el año 1999. Asimismo, se obtuvieron perfiles verticales de temperatura e irradiancia durante distintas campañas utilizando un radiómetro sumergible ELDONET (Real Time Computers Inc.) con sensores para RUV-B, RUV-A, PAR, temperatura y profundidad. Los datos de estos perfiles fueron utilizados para calcular los coeficientes de atenuación de la radiación y para estimar la profundidad de la CSM (i.e.,  $Z_{CSM}$ ) basados en los datos de temperatura obtenidos con el radiómetro y los de conductividad obtenidos con una sonda Horiba. Los experimentos para determinar los efectos de la RUV en la fotosíntesis del fitoplancton bajo un campo de radiación variable fueron llevados a cabo durante condiciones de pre-bloom, bloom y post-bloom. Las muestras fueron colectadas de superficie en marea alta con un bidón limpio con ácido (1 N HCl) y llevadas de inmediato al laboratorio de la Estación de Fotobiología Playa Unión (EFPU) donde se realizaron los experimentos que se detallan más adelante.

**Experimentación:** Debido a que el área es altamente variable en términos de la velocidad y duración del viento (las cuales condicionan la profundidad de la CSM), se implementaron dos condiciones diferentes de radiación para estudiar el efecto combinado de la RUV y la mezcla vertical en la fotosíntesis del fitoplancton. En los primeros tipos de experimentos las muestras colectadas en distintos períodos del año fueron expuestas a campos variables de radiación, simulando que el 60% de la zona eufótica ( $Z_{Eu}$ ) estuviera mezclada (i.e.,  $Z_{CSM} / Z_{Eu} = 0,6$ ). En estos experimentos se deseaba establecer un nivel común de comparación (i.e., similar mezcla y condiciones de irradiancia) para muestras fitoplanctónicas con diferentes historias lumínicas y aclimatación a la radiación solar. Estos experimentos fueron realizados durante Marzo (pre-bloom), Junio (bloom) y Diciembre (post-bloom) del año 2000. En otro grupo de experimentos las muestras con la misma historia lumínica y aclimatación (i.e., la misma comunidad fitoplanctónica) fueron expuestas a distintos niveles de mezcla vertical (i.e.,  $Z_{CSM} / Z_{Eu} = 0,6, 0,76$  y  $0,91$ ), simulando una profundización de la CSM. Estos experimentos fueron llevados a cabo durante la

primavera (primeros días de Diciembre de 2000) la cual es una estación ventosa para esta zona de estudio.

Un sistema experimental similar al descrito por Helbling y colaboradores (1994) con dos sistemas, uno fijo y uno rotativo, fue utilizado para estos experimentos. Ambos sistemas tenían varias capas de mallas de densidad neutra que permiten la atenuación de la radiación incidente (desde el 100 hasta el 6, 3 y el 1,5 %), simulando así aproximadamente el campo de irradiancia recibido por las células en diferentes porciones de la zona eufótica (aunque éstas no simulan la atenuación diferencial de la RUV y PAR en la columna de agua). Ambos sistemas fueron colocados dentro de una cámara iluminada artificialmente; las muestras en el sistema fijo fueron incubadas a los mismos niveles de irradiancia durante todo el período de incubación mientras que las muestras en el sistema rotativo fueron gradualmente movidas al paso siguiente de irradiancia cada 30 minutos. Los experimentos con  $Z_{CSM} / Z_{Eu} = 0,6$  tardaron 5 horas en completar un rotación completa (5 niveles de irradiancia), y los experimentos con  $Z_{CSM} / Z_{Eu}$  de 0,76 y 0,91 tardaron 6 y 7 horas (6 y 7 niveles de radiación, respectivamente). Las muestras en cada nivel de irradiancia fueron expuestas a RUV + PAR (muestras en tubos de cuarzo) o solo a PAR (muestras en tubos de cuarzo recubiertos con Ultraphan UV Opak, Digefra, 50% de transmisión a 395 nm). Un total de 4 tubos (tratamientos de radiación por duplicado) fueron expuestos en cada nivel de irradiancia en cada sistema.

Para todos los experimentos, las muestras de fitoplancton obtenidas de superficie fueron colocadas en tubos de cuarzo de 50 ml, inoculadas con bicarbonato de sodio marcado con  $^{14}C$  e incubadas a 15 °C en una cámara iluminada (Sanyo modelo MLR 350) con 5 tubos Q-Panel UVA 340 y 10 tubos fluorescentes Phillips luz día) bajo irradiancias de 66, 15,3 y 0,7 W m<sup>-2</sup> de PAR RUV-A y RUV-B, respectivamente. En nuestro sistema experimental estas irradiancias representan el nivel de 100%.

**Análisis y mediciones:** La tasa de fotosíntesis (F) en cada tratamiento fue determinada usando la técnica descrita por Holm-Hansen y Helbling (1995). En resumen, las muestras fueron incubadas con 5 µCi de NaH<sup>14</sup>CO<sub>3</sub> (0,185 MBq) y después del período de incubación fueron filtradas en un filtro Whatman GF/F (25 mm), puestas en viales de centelleo de 7 ml y expuestas a vapores de HCl durante la noche. Luego, las muestras fueron secadas y contadas usando técnicas estándares de centelleo líquido.

Para los análisis de Clor-a, una alícuota de 100 ml de muestra fue filtrada en filtros Whatman GF/F (25 mm) y los compuestos fotosintéticos extraídos en metanol absoluto (Holm-Hansen & Riemann, 1978). Las determinaciones de Clor-a fueron realizadas por métodos fluorométricos (Holm-Hansen et al., 1965). La concentración de Clor-a en la fracción del picoplancton (células con diámetro < 20 µm) fueron determinadas tal como se detalló anteriormente, excepto que fueron prefiltradas a través de una malla Nitex<sup>®</sup> de 20 µm de poro. La fluorescencia del extracto metanólico fue medida en un fluorómetro Turner Designs (modelo TD 700) antes y después de acidificar la muestra, y la concentración de Clor-a fue calculada utilizando estos valores. El fluorómetro fue calibrado usando clorofila pura de *Anacystis nidulans* (Sigma C6144). Asimismo, se determinó la presencia de compuestos protectores de RUV. Para este análisis, una alícuota de entre 500 y 1000 ml de muestra fue filtrada en filtros Whatman GF/F (47 mm), y tanto los compuestos fotosintéticos como los compuestos protectores fueron extraídos durante toda la noche a 4 °C en 7 ml de metanol absoluto. La estimación de la concentración de los compuestos protectores (Helbling et al., 1996a) fue realizada por análisis de picos de los espectros (250 – 750 nm) realizados con un espectrofotómetro Hewlett Packard (modelo 8453 E).

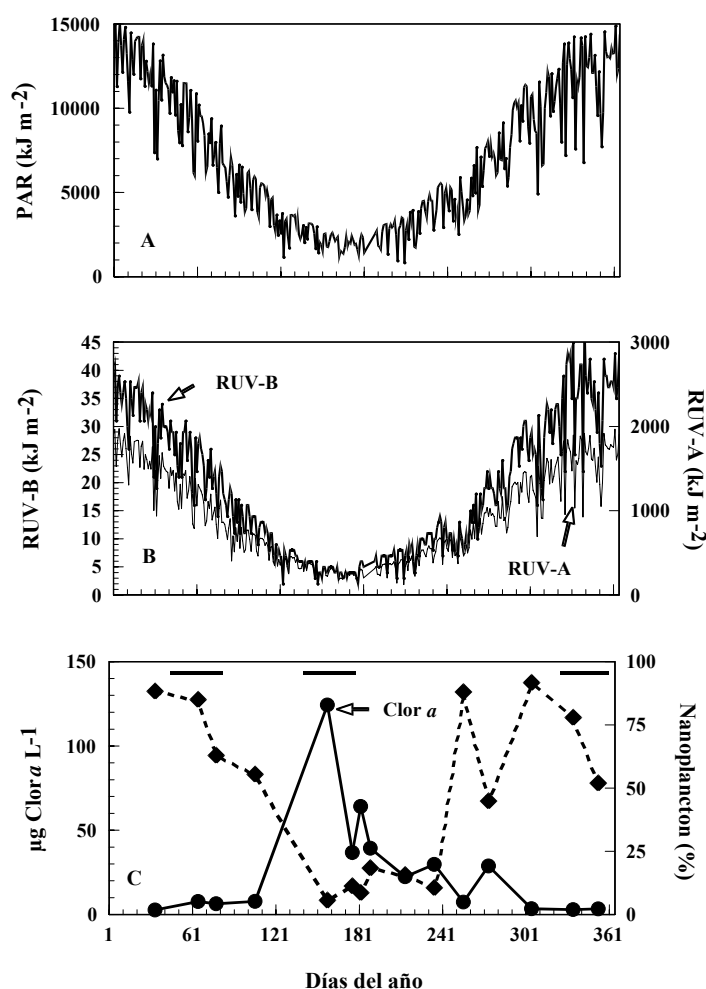
Los análisis taxonómicos fueron realizados con muestras fitoplanctónicas fijadas con formalina en medio buffer (concentración final en la muestra 0,4 %). Las muestras fueron

decantadas durante toda la noche en cámaras de sedimentación cilíndricas de volumen de 10 y 25 ml; los análisis cuantitativos y cualitativos fueron realizados utilizando un microscopio invertido.

Los niveles de radiación en la cámara fueron medidos utilizando un sensor cosenoidal portátil Grobel (modelo GMBH) el cual fue previamente intercalibrado con un radiómetro ELDONET terrestre (Real Time Computers Inc.). Este último instrumento, el cual se encuentra instalado permanentemente en el techo de la EFPU, colecta datos de radiación solar incidente en las bandas PAR, RUV-A y RUV-B con una frecuencia de un dato por minuto (Villafañe et al., 2001).

## Resultados

Las condiciones generales (radiación solar, concentración de Clor-a) de la zona de estudio son presentadas en la Figura 1.



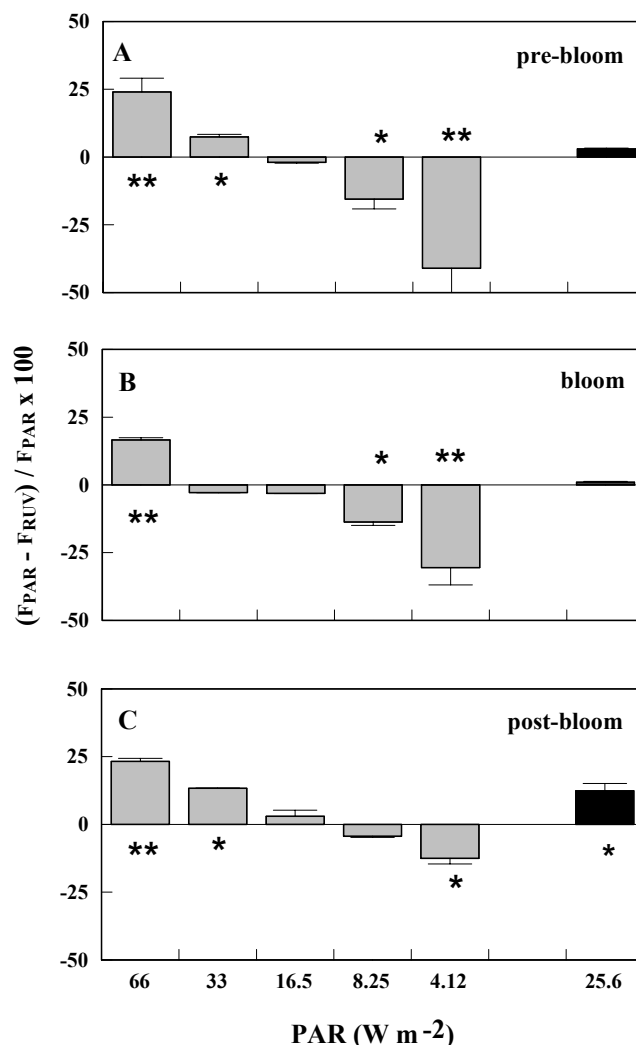
**Figura 1:** Características generales de la zona de estudio durante el año 2000 en función de la época del año (días del año). A) Dosis diarias de PAR (400-700 nm); B) Dosis diarias de RUV-A (315-400 nm) y RUV-B (280-315 nm); C) Concentración de fitoplancton estimado por Clor-a ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) y porcentaje de células nanoplantónicas. Las 3 líneas horizontales indican los periodos de muestreo de pre-bloom, bloom y post-bloom.

La radiación solar incidente a lo largo del año (Figura 1 A, B) tuvo una alta variabilidad diaria debido a los cambios en la nubosidad. La dosis diaria para PAR (Figura 1 A) varió entre

15000 kJ m<sup>-2</sup> y 1500 kJ m<sup>-2</sup> para los meses de verano e invierno, respectivamente. Las dosis diarias para RUV tuvieron un patrón similar con altos valores durante el verano y bajos durante el invierno, con rangos de RUV-A entre 2000 y 250 KJ m<sup>-2</sup> (Figura 1 B) y de RUV-B entre ~ 45 y 5 kJ m<sup>-2</sup> (Figura 1 B). La abundancia fitoplanctónica, estimada como concentración de clorofila, también varió estacionalmente (Figura 1 C) con altos valores (~ 125 µg Clor-a l<sup>-1</sup>) durante el invierno y bajos durante el verano (<5 µg Clor-a l<sup>-1</sup>). Se encontró una relación inversa exponencial de primer orden ( $r^2=0,82$ ) entre la concentración total de Clor-a y la correspondiente a la fracción del pico-nanoplancton (< 20 µm), por lo que las muestras colectadas durante el invierno (con altas concentraciones de Clor-a durante las condiciones de bloom) fueron dominadas por células microplanctónicas (> 20 µm) mientras que las muestras con baja concentración de Clor-a (condiciones de pre- y post-bloom) fueron dominadas por células pico y nanoplanctónicas. Los análisis taxonómicos establecieron un patrón general de dominancia de diatomeas microplantónicas, siendo *Odontella aurita* la más importante de las especies, registrando aproximadamente el 82% del total de las células durante el bloom de invierno (media = 4.625 células totales ml<sup>-1</sup>). Las muestras dominadas por células pequeñas fueron generalmente caracterizadas por la presencia de monadoides y flagelados durante el período de pre-bloom, mientras que aquellas colectadas en Diciembre (post-bloom) también tuvieron una importante contribución de diatomeas nanoplanctónicas (~ 39% de las células totales) del género *Chaetoceros* (media = 2.236 células totales ml<sup>-1</sup>).

Se comparó el efecto combinado de la RUV y la mezcla de estas poblaciones fitoplanctónicas (pre-bloom, bloom post-bloom) al ser expuestas a las mismas condiciones de irradiancia, simulando  $Z_{CSM} / Z_{Eu} = 0,6$  (Figura 2).



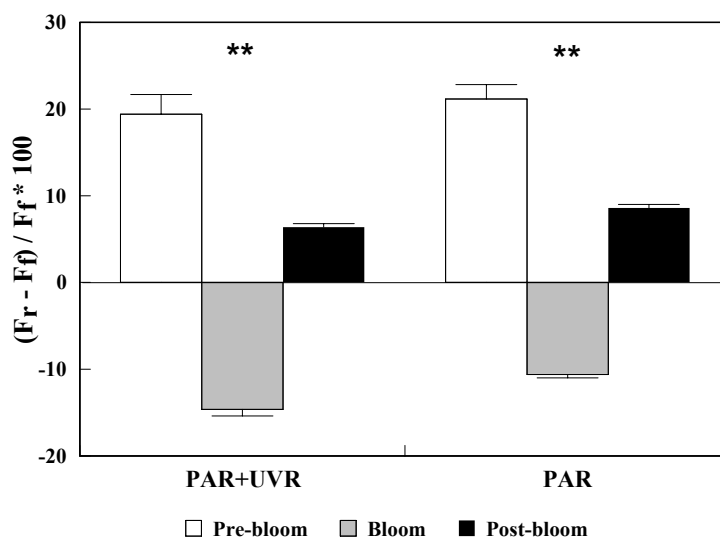


**Figura 2:** Valores de inhibición por RUV en función de la radiación (calculado como  $[(F_{PAR} - F_{RUV}) / F_{PAR} * 100]$  para diferentes muestras fitoplanctónicas. A) Muestras del pre-bloom colectadas durante Marzo de 2000; B) Muestras del bloom colectadas durante Junio de 2000; C) Muestras del post-bloom colectadas durante Diciembre de 2000. Las barras grises representan muestras incubadas en sistemas fijos a distintas irradiancias, y las barras negras representan muestras en sistemas rotativos. Kruskal-Wallis \* $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ .

En el sistema fijo, la inhibición inducida por RUV (calculado como  $[(F_{PAR} - F_{RUV}) / F_{PAR} * 100]$ ) dependió de los niveles de irradiancias recibidas por las células, por lo que relativamente a altas irradiancias (i.e.,  $66 \text{ W m}^{-2}$ ) las muestras del pre- y post-bloom (Figura 2 A, C, respectivamente) fueron significativamente inhibidas en un 25%, mientras que aquellas colectadas durante el bloom fueron inhibidas en un 16% (Figura 2 B). Este efecto inhibitor disminuyó conforme los niveles de irradiancias disminuyeron, por lo que en aquellas muestras que recibieron  $4,12 \text{ W m}^{-2}$  (i.e., la menor irradiancia utilizada en estos experimentos) el efecto fue reversible e incluso se registraron valores negativos, indicando de esta manera una mayor incorporación de carbono cuando las células recibieron RUV. Esta mayor incorporación de carbono en muestras expuestas a la RUV + PAR, a irradiancias menores a  $15,6 \text{ W m}^{-2}$ , fue significativamente evidente ( $p < 0,005$ ) en muestras del pre-bloom colectadas en Marzo (16 y 41% a  $8,25$  y  $4,12 \text{ W m}^{-2}$  niveles de irradiancia respectivamente, Figura 2 A). Las muestras colectadas en Diciembre (post-bloom) y

expuestas a la RUV + PAR tuvieron un incremento en la incorporación de carbono del 13% a irradiancias de  $4,12 \text{ W m}^{-2}$  (Figura 2 C), en comparación con las muestras que recibieron solo PAR, mientras que las muestras del bloom tuvieron un aumento del 13 y 30 % para  $8,25$  y  $4,12 \text{ W m}^{-2}$ , respectivamente (Figura 2 B). Por otro lado, las muestras incubadas bajo un campo de irradiancias variable (i.e., sistema rotativo) que recibieron una irradiancia media de  $25,6 \text{ W m}^{-2}$  no fueron significativamente inhibidas por la RUV (Figura 2 A, B), excepto las muestras del post-bloom que presentaron una inhibición significativa de aproximadamente 10% (Figura 2 C). La máxima tasa fotosintética durante el pre-bloom, bloom y post-bloom fue de  $27, 210$  y  $32 \text{ mg C m}^{-3} \text{ h}^{-1}$ , respectivamente.

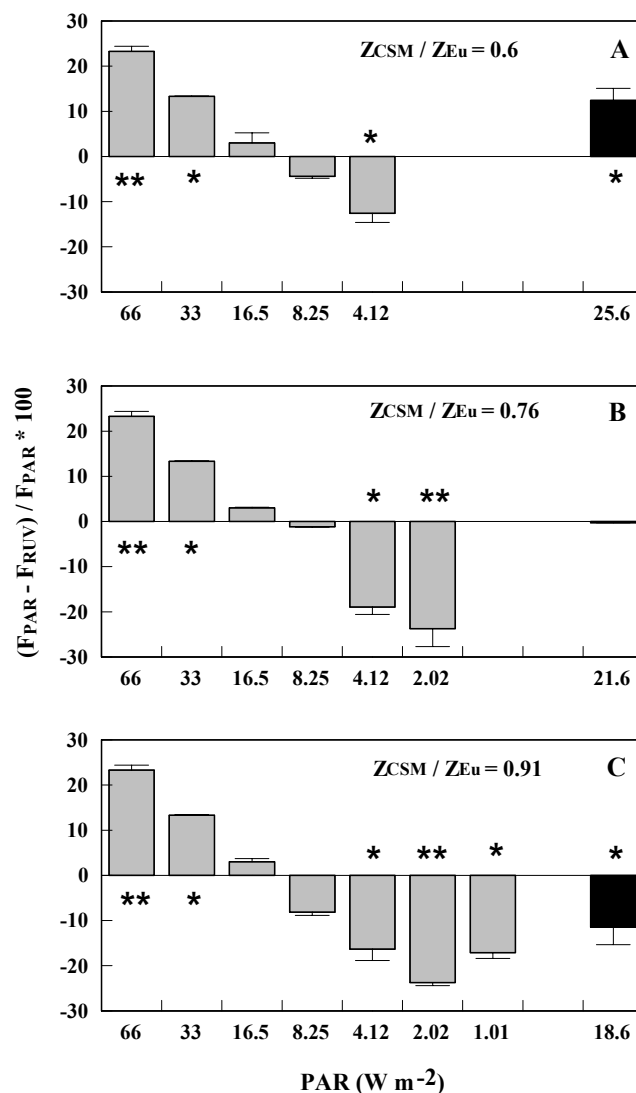
Los datos de estos experimentos (i.e., con una relación  $Z_{\text{CSM}} / Z_{\text{Eu}}$  simulada de 0,6) fueron utilizados para calcular los efectos de irradiancias variables (i.e., mezcla) en la fotosíntesis integrada en la zona que comprende el 60% de la zona eufótica (Figura 3).



**Figura 3:** Comparación de la fotosíntesis integrada entre sistema fijo y rotativo (calculado como  $[(F_r - F_f) / F_f * 100]$ ), para los tratamientos de radiación de PAR + RUV y solo PAR. Kruskal-Wallis: \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ .

Esta simulación del 60% de la zona eufótica correspondió a una profundidad aproximada de 12 m, con un coeficiente de atenuación de  $K_{\text{PAR}} = 0,24 \text{ m}^{-1}$  para condiciones de pre-bloom y post-bloom. Se encontraron diferencias significativas entre muestras del pre-bloom y del post-bloom, con mayores valores de carbono fijado en las muestras expuestas a un campo de irradiancias variable. Las muestras del bloom, en cambio, presentaron menores valores de fotosíntesis integrada cuando se expusieron a condiciones de mezcla simulada, al ser comparadas con aquellas del sistema fijo. La fijación integrada de carbono (i.e., 60% de la zona eufótica) para las muestras expuestas a RUV + PAR fue de  $715$  y  $838 \text{ mg C m}^{-2} \text{ h}^{-1}$  para el sistema rotativo y fijo, respectivamente. También se encontraron variaciones entre las muestras expuestas a la RUV + PAR y solo PAR, con diferencias relativas entre sistemas (i.e.,  $F_r - F_f$ ) siendo menores en las muestras del pre y post-bloom y levemente mayores durante el bloom.

Las muestras fitoplanctónicas colectadas durante el post-bloom (i.e., Diciembre) fueron expuestas a un campo de irradiancia simulando un incremento en la relación  $Z_{CSM} / Z_{Eu}$  desde 0,6 a 0,91 (Figura 4).

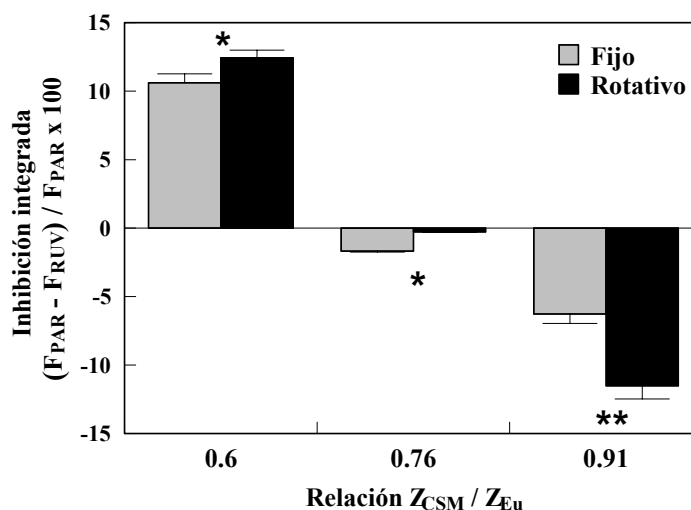


**Figura 4:** Valores de inhibición de la tasa de fotosíntesis por RUV en función de la irradiancia recibida (calculada como  $[(F_{PAR} - F_{RUV}) / F_{PAR}] * 100$ ), para muestras fitoplanctónicas del post-bloom, expuestas a distintas condiciones de mezcla. A)  $Z_{CSM} / Z_{Eu} = 0,6$ , B)  $Z_{CSM} / Z_{Eu} = 0,76$ , y C)  $Z_{CSM} / Z_{Eu} = 0,91$ . Las barras grises representan las muestras incubadas en sistemas fijos, mientras que las barras negras representan las muestras incubadas en el sistema rotativo. Kruskal-Wallis: \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ .

Todas las muestras incubadas bajo irradiancias fijas presentaron una inhibición significativa inducida por la RUV (~ 13 – 25 %) a niveles de irradiancia mayores a 16,5  $W m^{-2}$ . Las muestras que recibieron irradiancias intermedias no presentaron una inhibición significativa debida a la RUV, mientras que las muestras expuestas a bajas irradiancias ( $\leq 4,12 W m^{-2}$ ) presentaron valores negativos significativos (25% en muestras que recibieron aproximadamente 2  $W m^{-2}$ , Figura 4 B, C). En las muestras expuestas a campos de irradiancia variable, la RUV inhibió o incrementó la fijación de carbono acorde con la porción de la zona eufótica que había sido mezclada (i.e., dependiendo de la relación  $Z_{CSM} / Z_{Eu}$ ). Se determinó una fotoinhibición

significativa inducida por la RUV del 13% (Figura 4 a) cuando las muestras estuvieron en una relación simulada  $Z_{CSM} / Z_{Eu} = 0,6$  (i.e., mezcla poco profunda). La fotoinhibición no fue significativamente diferente de cero cuando la relación  $Z_{CSM} / Z_{Eu}$  aumentó a 0,76 (Figura 4 B); sin embargo, la fijación de carbono aumentó significativamente (12 %) en las muestras expuestas a RUV + PAR (valores negativos en la Figura 4 C) cuando la relación  $Z_{CSM} / Z_{Eu}$  se incrementó a 0,91.

La inhibición integrada en las muestras del post-bloom para las 3 condiciones de mezcla vertical se muestra en la Figura 5. La inhibición integrada debido a la RUV varió desde efectos positivos (i.e., inhibición de la fotosíntesis) bajo condiciones de mezcla poco profunda hasta efectos negativos (i.e., aumento en la fotosíntesis) cuando la relación  $Z_{CSM} / Z_{Eu}$  fue de 0,91. Aunque esto fue observado en ambos sistemas (fijo y rotativo) se encontraron diferencias significativas entre ambos, con un mayor efecto (positivo o negativo) en aquellas muestras expuestas a un campo de radiación variable. La diferencia máxima entre los dos sistemas fue ~ -5% en condiciones de mezcla profunda (i.e.,  $Z_{CSM} / Z_{Eu} = 0,91$ ).



**Figura 5:** Comparación entre la inhibición integrada de la fotosíntesis (calculada como  $[(F_{PAR} - F_{RUV}) / F_{PAR} * 100]$ , cuando las muestras fueron expuestas a distintas condiciones de mezcla. Las barras grises representan muestras incubadas en sistemas fijos, mientras que las barras negras representan muestras en sistema rotativos. Kruskal-Wallis: \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ .

## Discusión

La radiación solar, especialmente la RUV, es una variable ambiental muy importante que afecta la fotosíntesis de los organismos autótrofos inhibiendo o incluso aumentando la fijación de carbono por las células (Villafañe et al., 2003 y las referencias que allí se encuentran). Los niveles de radiación recibidos por los organismos acuáticos dependen de factores variados tales como la concentración de partículas, la materia orgánica disuelta y el material inorgánico (Kirk, 1994). La mezcla vertical es también especialmente importante, considerando que, bajo la misma radiación incidente y la concentración de partículas, las células moviéndose dentro de una  $Z_{CSM}$  poco profunda serán expuestas a una mayor irradiancia media que aquellas dentro de una  $Z_{CSM}$  profunda (Helbling et al., 1994; Neale et al., 2003). Numerosos estudios han considerado la relación entre los regímenes variables de radiación (como producto de la mezcla) y la productividad primaria

acuática. Por ejemplo, los trabajos pioneros de Sverdrup (1953) resaltaron la importancia no sólo de la mezcla vertical de por sí, sino también de la porción de la zona eufótica que había sido mezclada. Los primeros estudios de Marra (1978) demostraron que la mezcla vertical aumenta la productividad primaria en la columna de agua. Mas aún, Mitchell y Holm-Hansen (1991) concluyeron que la profundidad de la CSM es un factor clave en la iniciación de los blooms en Antártida, por lo que con  $Z_{CSM}$  poco profundas ( $< 25$  m) pueden desarrollarse los blooms. Helbling y colaboradores (1994) consideraron los efectos combinados de la RUV solar y la mezcla vertical en la fotosíntesis del fitoplancton antártico, demostrando por primera vez que la  $Z_{CSM}$  es muy importante en condicionar la inhibición producida por la RUV. En sus estudios se demostró que a corto plazo, con CSM someras, la RUV aumenta significativamente la fotoinhibición en comparación a muestras expuestas a condiciones de  $Z_{CSM}$  profundas. Neale y colaboradores (1998 a y b), trabajando con muestras de fitoplancton de la confluencia de Weddell Scotia, demostraron el efecto combinado de la mezcla y la concentración de ozono obteniendo resultados similares a aquellos encontrados por Helbling y colaboradores (1994).

En este trabajo hemos demostrado que la fotoinhibición inducida por la RUV depende de varios factores, siendo la composición de la comunidad, el período de muestreo y consecuentemente la historia lumínica de las células (Figura 1) especialmente importantes. Las respuestas diferenciales a la RUV que se encontraron entre estaciones fueron esperables, en parte debido a la diferencia en la composición taxonómica y la estructura de tamaño celular entre las muestras. El bloom consistió en células microplanctónicas (i.e., diatomeas centrales) mientras que el pre-bloom estuvo dominado por monadoides y flagelados nanoplanctónicos (Figura 1 C); las muestras del post-bloom, por su parte, estuvieron co-dominadas por flagelados nanoplanctónicos y diatomeas del género *Chaetoceros*. Muchos estudios han demostrado la sensibilidad diferencial del fitoplancton a la RUV. Por ejemplo, los estudios llevados a cabo con muestras de Antártida han demostrado que en general, los dinoflagelados son más vulnerables que las diatomeas (Villafañe et al., 1995b). Los estudios realizados por Kopczynska (1992) y Villafañe y colaboradores (1995a) han determinado la presencia de flagelados en áreas de mezcla profunda. Por esta razón, es esperable que estos organismos sean más sensibles a la RUV debido a su historia lumínica de aclimatación a bajas irradiancias medias. También se ha visto que la diatomea *Chaetoceros* es especialmente vulnerable a la radiación solar (Helbling et al., 1992b), siendo las longitudes de onda dentro de la RUV las responsables de inducir la formación de esporas de resistencia. Es interesante notar que los blooms fueron dominados por la diatomea central *Odontella aurita* y que el espectro de absorción de estas muestras mostró solo un pequeño “hombro” de compuestos protectores de RUV (datos no presentados). Por eso, la presencia de estos compuestos, los cuales podrían explicar las variaciones en los valores de inhibición debido a sus características protectoras (Roy, 2000), pueden no jugar un rol significativo en las muestras aquí estudiadas. Uno debería tener en cuenta, sin embargo, que en este trabajo al menos dos factores son importantes de considerar con respecto a la síntesis y la presencia de compuestos protectores: 1) los blooms ocurren durante el invierno, cuando la radiación solar incidente es baja (Figura 1), y 2) la metodología que utilizamos y que estima la presencia de compuestos protectores no es tan sensible como la cromatografía líquida de alta presión (HPLC), por lo tanto es posible que algunos compuestos estuvieran presentes en las muestra pero no en altas concentraciones. Las variaciones en los valores de fotoinhibición entre diferentes tipos de muestras estarían probablemente más relacionadas con una diferencia en la vulnerabilidad al daño en el ADN. Los estudios llevados a cabo en un área cercana (Buma et al., 2001; Helbling et al., 2001a) han demostrado un número relativamente alto de dímeros de timina (i.e., cyclobutane pyrimidine dimers, CPDs) en muestras del post-bloom.

Parte de la variabilidad puede también ser atribuida a diferencias en la velocidad de respuesta a la RUV por parte de muestras dominadas por células microplanctónicas y nanoplanctónicas. Por ejemplo, en estudios llevados a cabo en lagos andino patagónicos (Helbling et al., 2001b) se encontró que las células pequeñas presentaron mayor velocidad de inhibición en comparación con las células grandes debido a su diferencia en la relación superficie / volumen y,

consecuentemente, en su utilización de la radiación solar. La variación en la sensibilidad a la RUV de las muestras fitoplanctónicas puede estar también atribuida a diferencias en la concentración de nutrientes, como se ha visto en estudio realizados por Litchman y colaboradores (2002) quienes demostraron que la sensibilidad a la RUV aumenta en cultivos de dinoflagelados con déficit de nutrientes. De hecho, debido a que estas muestras fueron colectadas en diferentes épocas del año, se puede esperar una diferencia en el nivel nutricional (i.e., merma de nutrientes durante el post-bloom) entre las mismas.

El sistema de irradiancias variables incluye una nueva complicación en la determinación de la sensibilidad a la RUV de las muestras de fitoplancton. Cuando se considera la fotoinhibición inducida por la RUV, las muestra del pre-bloom y bloom sujetas a un campo de irradiancia fluctuante no mostraron inhibición significativa cuando se expusieron a la relación  $Z_{CSM} / Z_{Eu} = 0,6$  (Figura 2 A, B), mientras que aquellas del período post-bloom tuvieron una significativa inhibición debida a la RUV (Figura 2 C). Sin embargo, una visión diferente pero complementaria se observa cuando se determinó el efecto de la RUV en la productividad integrada (Figura 3). Se encontró que para las poblaciones nanoplanctónicas del pre y post-bloom la mezcla tuvo un mayor efecto positivo (i.e., un incremento en la producción integrada comparada con las condiciones de irradiancias fijas) pero presentó un efecto negativo (i.e., disminución de la producción integrada) en células microplanctónicas, las cuales caracterizan el período de post-bloom (Figuras 1 C, 3). Estas diferencias en la producción integrada parecen estar más relacionadas con la radiación PAR y, en menor grado, con la RUV (i.e., diferencia entre ambos tratamientos). Las células grandes, características del período de bloom con relativamente baja relación superficie / volumen, probablemente tienen una menor velocidad de respuesta a variaciones en la irradiancia, lo cual resulta en una menor producción integrada que las muestras en un régimen más estable de radiación que tuvieron un largo período de aclimatación a la condición de irradiancia.

Una profundidad variable de la CSM, tal como fue considerada en este estudio, es una característica usual debido a las variaciones en el calentamiento solar y condiciones climáticas, tales como las producidas por cambios en la velocidad y dirección del viento (revisión de Neale et al., 2003). Asimismo, un importante punto que se ha considerado está relacionado con la proporción de mezcla a la cual se expusieron las muestras. Denman & Gargett (1983) estimaron que un desplazamiento vertical de 10 m podría ocurrir en un período que va desde minutos a cientos de horas. Las proporciones de mezcla para el área de Patagonia (Helbling et al., datos no publicados) fueron estimadas a partir de mediciones previas de profundidad de la CSM y de la velocidad del viento. Basados en estos valores, se ha elegido un período de 5 horas para completar una rotación si  $Z_{CSM} / Z_{Eu} = 0,6$ . Otros estudios, sin embargo, han utilizado una velocidad mayor de rotación, como por ejemplo los llevados a cabo en los lagos de los Alpes (Köhler et al., 2001), donde una rotación de 4 minutos se relacionó con un desplazamiento de 2 m. En este trabajo la elección de  $Z_{CSM} / Z_{Eu} = 0,6$  utilizada para comparar las respuestas del fitoplancton durante diferentes estaciones representa un desplazamiento de aproximadamente 12 m para las condiciones del pre y post-bloom ( $K_{PAR} = 0,24 \text{ m}^{-1}$ ) y mucho menor durante el bloom. Esta velocidad de rotación sin embargo, puede ser demasiado baja en períodos de viento (condiciones de post-bloom) cuando las células están probablemente moviéndose a una mayor proporción de mezcla en la columna de agua. Sin embargo, en períodos de calma con muy poco viento y un fuerte calentamiento solar tal como ocurre durante Diciembre puede reducir la circulación de las células en la columna de agua. Se ha decidido utilizar la misma velocidad de rotación para poder comparar el efecto de la RUV durante diferentes estaciones. En este caso, la mezcla vertical puede revertir completamente el efecto debido a la RUV, aunque si bien la mezcla aumentó la inhibición por RUV cuando la  $Z_{CSM} / Z_{Eu} = 0,6$  (Figuras 2 c, 4 a), este efecto disminuyó y fue reversible cuando la profundidad de la CSM aumentó. Por otra parte, un incremento en la fotosíntesis (i.e., una inhibición integrada negativa) fue encontrada cuando la  $Z_{CSM} / Z_{Eu} = 0,91$  (Figura 5). Esta mayor fijación de carbono en las muestras expuestas a la RUV + PAR, en comparación con aquellas expuestas a solo PAR, sugiere que las células fitoplanctónicas podrían estar limitadas por luz; por esto, las células podrían haber utilizado la RUV como una fuente de energía para la

fotosíntesis, como se ha visto también en estudios realizados por Prézelin y colaboradores (com. pers.) quienes mostraron que las longitudes de onda de la RUV pueden, de hecho, aumentar la fotosíntesis del fitoplancton.

Nuestros datos recalcan la importancia de la proporción en la relación  $Z_{\text{CSM}} / Z_{\text{Eu}}$  al momento de condicionar no solo el efecto de la RUV sino también la diferencia en la fijación integrada de carbono entre muestras expuestas a un sistema variable de irradiancias frente a otro sistema de irradiancias fijas. Un continuo incremento de la RUV solar debido a una disminución de ozono durante la primavera-verano austral tendría entonces un mayor efecto en las muestras del post-bloom las cuales están en CSM relativamente poco profundas. Sin embargo, el efecto combinado de la RUV y la mezcla vertical probablemente depende también del tamaño celular, la historia lumínica (i.e., procesos de aclimatación), y la disponibilidad de nutrientes. No se sabe, sin embargo, cómo las distintas velocidades de rotación, combinadas con la  $Z_{\text{CSM}} / Z_{\text{Eu}}$  y la RUV podrían afectar al fitoplancton del área, y si podrían ser una variable que permita el desarrollo de los blooms durante el invierno. Futuros estudios deberán concentrarse en estos puntos y establecer el efecto general de la RUV en el fitoplancton de la costa patagónica.

## Dinámica de producción / consumo de oxígeno de especies de fitoplancton marino circulando dentro de una capa superficial de mezcla simulada

### Resumen

Se determinó experimentalmente la dinámica de oxígeno en tres especies fitoplanctónicas (20-25  $\mu\text{m}$  de diámetro efectivo) – *Dunaliella salina* (Chlorophyceae), *Thalassiosira weissflogii* (Bacillariophyceae) y *Heterocapsa triquetra* (Dinophyceae) – cuando las células circularon dentro de una capa superficial de mezcla (CSM) simulada. Las muestras fueron expuestas a tres tratamientos de radiación recibiendo: a) Toda la radiación solar (PAB, 280–700 nm), b) PAR+RUV-A (PA, 320–700 nm), y c) Sólo PAR (P, 400–700 nm). Se simularon dos recorridos (i.e., como si las células circularan desde la superficie o desde la base de la CSM): 1) Circulación “Hacia abajo” (i.e., desde el 100% al 9% de la irradiancia y nuevamente al 100%), y 2) Circulación “Hacia arriba” (i.e., desde el 9% al 100% de la irradiancia y nuevamente al 9%). No se encontraron diferencias significativas entre tratamientos de radiación ( $p < 0,05$ ) y la inhibición fotosintética sólo se debió a PAR. Se encontraron importantes diferencias inter-específicas en las tasas de oxígeno cuando las células circularon dentro de la CSM simulada: *D. salina* fue afectada tanto por altas como por bajas irradiancias, mientras que *T. weissflogii* sólo fue inhibida por altas irradiancias. En cambio, *H. triquetra* mostró la menor variabilidad y se benefició por los regímenes fluctuantes de irradiancia. Asimismo, se determinaron diferencias en la producción de  $\text{O}_2$  integrada en profundidad cuando las especies realizaron una rotación completa dentro de la CSM simulada, con los valores más altos en *H. triquetra* y los más bajos en *D. salina*. Los resultados obtenidos en este trabajo pueden tener importantes implicancias en la determinación de la productividad primaria en áreas expuestas a condiciones meteorológicas cambiantes durante el año, y consecuentemente con CSMs variables.

### Introducción

Es conocido el hecho de que las fluctuaciones en los factores físicos afectan significativamente a los organismos acuáticos (Steele, 1985); en particular, las variaciones en el campo de radiación tienen un importante efecto en el fitoplancton. Estas variaciones en la irradiancia ocurren por cambios en la profundidad de la capa superficial de mezcla (CSM), una capa de características homogéneas generalmente producida por el viento y por el calentamiento del sol (Neale et al., 2003). Los procesos de mezcla causan que los organismos fitoplanctónicos se desplacen en la columna de agua alterando su exposición a la radiación solar, con importantes consecuencias en los procesos fisiológicos, tales como las tasas de fotosíntesis y de respiración (Marra, 1978; Kroon et al., 1992; Yoder & Bishop, 1985), el crecimiento (Litchman, 2000; Ibelings et al., 1994) y la incorporación de nutrientes (Litchman et al., 2004). Más aún, las fluctuaciones en la radiación pueden estimular el crecimiento de diferentes especies potenciando así cambios en la composición taxonómica de la comunidad fitoplanctónica (Litchman, 1998).

Se han reportado variados efectos en relación a la influencia de la mezcla en la tasa de fotosíntesis. Por ejemplo, Marra (1978) ha demostrado que la mezcla vertical aumenta la productividad primaria, en tanto que Kroon y colaboradores (1992) han encontrado que las tasas de fotosíntesis disminuyen bajo condiciones fluctuantes de radiación; contrariamente, Yoder y Bishop (1985) y Modenutti y colaboradores (2005) no encontraron diferencias significativas en la tasa de fotosíntesis cuando se las compararon con sistemas de irradiancia fijas, aún analizando los últimos la respuesta del mixotrófico *Stentor araucanus*. Por otro lado, se conoce que el efecto combinado de mezcla y radiación ultravioleta afecta la productividad primaria del fitoplancton (Helbling et al., 1994; Neale et al., 1998b; Köhler et al., 2001; Capítulo 2). Más aún, las velocidades de mezcla también afectan fuertemente la tasa de fotosíntesis (Neale et al., 1998b;



Helbling et al., 2003). Por ejemplo, Helbling y colaboradores (2003) encontraron que la mezcla rápida favorece la utilización de la RUV como fuente de energía para la fotosíntesis en organismos fitoplanctónicos tropicales, mientras que la mezcla lenta causa un fuerte efecto inhibitorio inducido por la RUV. Por otro lado, Helbling y colaboradores (1994) y Neale y colaboradores (1998b) trabajando con organismos fitoplanctónicos antárticos encontraron altas inhibiciones con una mezcla rápida, lo cual demuestra que los efectos interactivos de la RUV y la mezcla vertical son fuertemente dependientes de la sensibilidad específica de las especies fitoplanctónicas utilizadas y de la respuesta a la exposición (i.e., irradiancia / dosis).

A pesar de que se han realizado muchos avances para comprender las respuestas de los organismos fitoplanctónicos al ser expuestos a regímenes fluctuantes de irradiancia, no se conoce ningún trabajo que haya considerado en su estudio la diferencia de aclimatación de las células a la radiación (como por ejemplo, cuando las células circulan desde bajas hacia altas irradiancias o viceversa) en la evaluación de la productividad primaria de ambientes mezclados. En este trabajo se ha simulado la rotación de las células fitoplanctónicas dentro de una CSM bajo dos condiciones o recorridos extremos. En unos de esos recorridos, las células que estaban en el fondo de la CSM (a bajas irradiancias) circularon hacia altas irradiancias (superficie) y luego nuevamente hacia el fondo. En el otro recorrido, las células que estaban en la superficie, a altas irradiancias, circularon hacia bajas irradiancias y nuevamente hacia la superficie. Se ha estudiado específicamente la respuesta a la radiación solar de tres especies fitoplanctónicas – *Dunaliella salina* (Chlorophyceae), *Thalassiosira weissflogii* (Bacillariophyceae) y *Heterocapsa triquetra* (Dinophyceae) al ser expuestas a estos dos movimientos de mezcla vertical. Como el tamaño celular juega un rol muy importante en la aclimatación y en la respuesta a la radiación solar (Helbling et al., 2001a) se han simplificado las comparaciones inter-específicas utilizando organismos con un diámetro celular efectivo similar (20-25  $\mu\text{m}$ ). Por este motivo, esta investigación presenta importantes implicancias en la evaluación de la productividad primaria en áreas expuestas a cambios en las condiciones meteorológicas (i.e., con alternancia de períodos de fuertes vientos y épocas de calma) y por ende con CSMs variables durante el año.

## **Materiales y métodos**

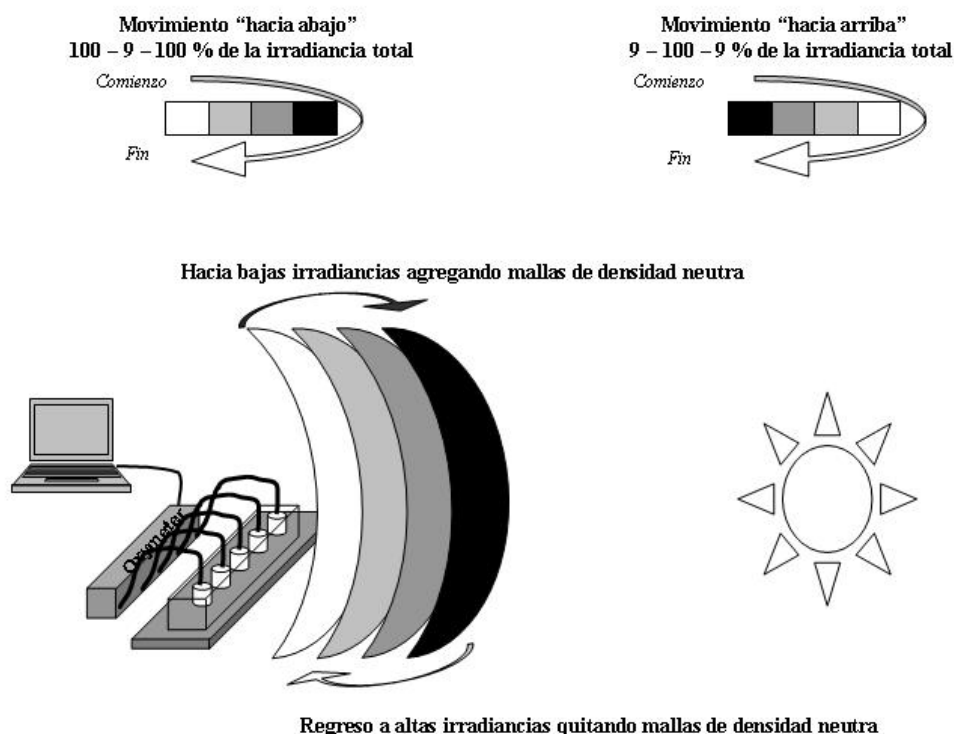
### **Cultivos**

En la experimentación se utilizaron tres especies de fitoplancton marino (i.e., 20-25  $\mu\text{m}$  en el diámetro efectivo celular): *Dunaliella salina* (Dunal) Teodoresco (Chlorophyceae), *Thalassiosira weissflogii* (Grunow) G. Fryxell et Hasle (Bacillariophyceae) y *Heterocapsa triquetra* (Ehrenberg) Stein (Dinophyceae). Los organismos fueron cedidos amablemente por el Institut für Botanik und Pharmazeutische Biologie (Friedrich Alexander Universität, Alemania) y por la Estación de Fotobiología Playa Unión (EFPU). Las células se cultivaron en medio marino enriquecido f/2 (Guillard & Ryther, 1962) bajo condiciones de temperatura controlada (20 °C) dentro de una cámara de incubación iluminada (12h:12h, período de luz:oscuridad), recibiendo una irradiancia PAR de 37 W m<sup>-2</sup>, provista por 10 tubos fluorescentes (lámparas Philips luz día).

### **Experimentación**

Cuando los cultivos alcanzaron la fase exponencial de crecimiento se colocaron en un oxímetro (Real Time Computer Inc., modelo Oxym 5), el cual tiene cinco tubos de cuarzo de 20 ml dentro de una cámara de acrílico transparente a la RUV provista por un sistema de agua corriente para mantener la temperatura constante (Figura 1). Cinco microelectrodos de oxígeno (Yellow Spring Instruments Co., modelo 5331) fueron adosados a los tubos de cuarzo. Para evaluar el efecto de las distintas bandas de radiación solar en la fotosíntesis del fitoplancton se colocaron las muestras bajo tres tratamientos: a) Tratamiento PAB – muestras expuestas a RUV + PAR (280 – 700 nm) tubos sin filtros de corte de radiación, b) Tratamiento PA – muestras expuestas a RUV-

A + PAR (320 – 700 nm) – tubos cubiertos con filtro de corte de radiación a 320 nm (Montagefolie, Folex, Dreieich, Germany, 50% de transmisión a 320 nm) y c) Tratamiento P – muestras expuestas sólo a PAR (400 – 700 nm) – tubos cubiertos con Ultraphan 395 nm (UV Opak, Digefra, Munich, Germany, 50% de transmisión a 395nm). Los espectros de filtros y materiales fueron publicados por Figueroa y colaboradores (1997). El oxímetro conteniendo las muestras se expuso a la radiación natural y los datos de los cinco sensores de oxígeno, junto con los de temperatura y de la irradiancia PAR, fueron colectados cada dos segundos y guardados en una computadora portátil.



**Figura 1:** Esquema general de la organización de los experimentos, detallando la simulación de los dos caminos recorridos por los organismos fitoplanctónicos. Ver detalles en el texto.

Las condiciones de mezcla fueron simuladas en base a condiciones ambientales reales para la costa Patagónica (Villafañe et al., 2004a) utilizando distintas combinaciones de mallas de densidad neutra (Helbling et al., 1994; Capítulo 2) (Figura 1), siendo la profundidad de la CSM simulada de 10 m ( $Z_{CSM} = 10$  m, Capítulo 2). Las condiciones de mezcla impuestas en este trabajo, junto con la irradiancia a la cual las células fueron creciendo antes de ser utilizadas para la experimentación -  $37 \text{ W m}^{-2}$  - fueron elegidas a fin de establecer el peor escenario, ya que estos valores de irradiancia representan aproximadamente el fondo de la CSM simulada, utilizando un coeficiente de atenuación ( $K_{PAR}$ ) de  $0,3 \text{ m}^{-1}$  y la irradiancia recibida en superficie (Capítulo 2). Para cada especie se realizaron dos tipos de experimentos (i.e., como si las células circularan en dos formas distintas dentro de la CSM). En un grupo de experimentos – “hacia abajo”, superficie/fondo/superficie - las células fueron transportadas desde el 100% al 9% de irradiancia y nuevamente al 100%. En el otro grupo de experimentos – “hacia arriba”, fondo/superficie/fondo – las células fueron transportadas desde el 9% al 100% de irradiancia y nuevamente llevadas al 9%. Estos movimientos se simularon en 4 pasos discretos de irradiancia (i.e., 100%, 85%, 47% y 9%)

en la CSM agregando y quitando mallas de densidad neutra cada 20 minutos, con lo cual la duración total de cada experimento (i.e., una rotación dentro de la CSM simulada) fue de 160 minutos. Aunque la simulación de ambas circulaciones (i.e., “hacia abajo” y “hacia arriba”) fue realizada en diferentes días (i.e., para mantener el período de experimentación centrado en el mediodía local), éstas fueron hechas bajo condiciones similares de irradiancia PAR (i.e., irradiancia media de 313, 348 y 364 W m<sup>-2</sup> para los experimentos realizados con *D. salina*, *T. weissflogii* y *H. triquetra*, respectivamente). Todos los experimentos fueron realizados en la Estación de Fotobiología Playa Unión (EFPU) durante el verano austral, en el período Diciembre 2003 – Enero 2004.

### **Cálculo de la tasa y producción integrada de oxígeno**

La evolución de oxígeno (en mg O<sub>2</sub> l<sup>-1</sup>) fue graficada en función del tiempo para cada tratamiento de radiación. Los datos de cada intervalo de 20 minutos de todos los tratamientos de radiación fueron ajustados a una función lineal de manera tal que la pendiente representa la tasa de producción de O<sub>2</sub> (en mg O<sub>2</sub> l<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup>). La producción de oxígeno fue integrada en el tiempo (i.e., entre 0 y 160 min) así como en profundidad (desde 0 a 10 m, i.e., profundidad de la CSM simulada). Finalmente, y para comparar la producción integrada de *D. salina*, *T. weissflogii* y *H. triquetra*, la producción de O<sub>2</sub> fue normalizada por la concentración celular. Entonces, la producción integrada de O<sub>2</sub> en la CSM simulada fue calculada como:

$$\text{Producción Integrada de O}_2 = \frac{\left( \int_0^{10} \int_0^{160} \text{Tasa O}_2 \, dt \, dz \right)}{\text{Concentración de células}}$$

### **Análisis y mediciones**

**Clorofila a (Clor-a) y compuestos que absorben RUV:** Las muestras para Clor-a fueron tomadas al comienzo y al final de cada experimento, mientras que aquellas para la determinación de las características espectrales fueron sólo tomadas al comienzo de la experimentación. Una alícuota de 15-50 ml de muestra fue filtrada en un filtro Whatman GF/F (25 mm) y se extrajeron los pigmentos en 7 ml de metanol absoluto durante toda la noche a 4 °C (Holm-Hansen & Riemann, 1978). Después de este período, las muestras fueron centrifugadas y el sobrenadante escaneado entre 250 y 750 nm utilizando un espectrofotómetro Hewlett Packard (modelo HP-8453E). La altura del pico a 334 nm fue utilizada como estimación de los compuestos que absorben RUV (Dunlap et al., 1995). La misma muestra fue utilizada para determinar la concentración de Clor-a a partir de las lecturas tomadas antes y después de la acidificación utilizando un fluorómetro Turner Designs modelo TD 700 (Holm-Hansen et al., 1965).

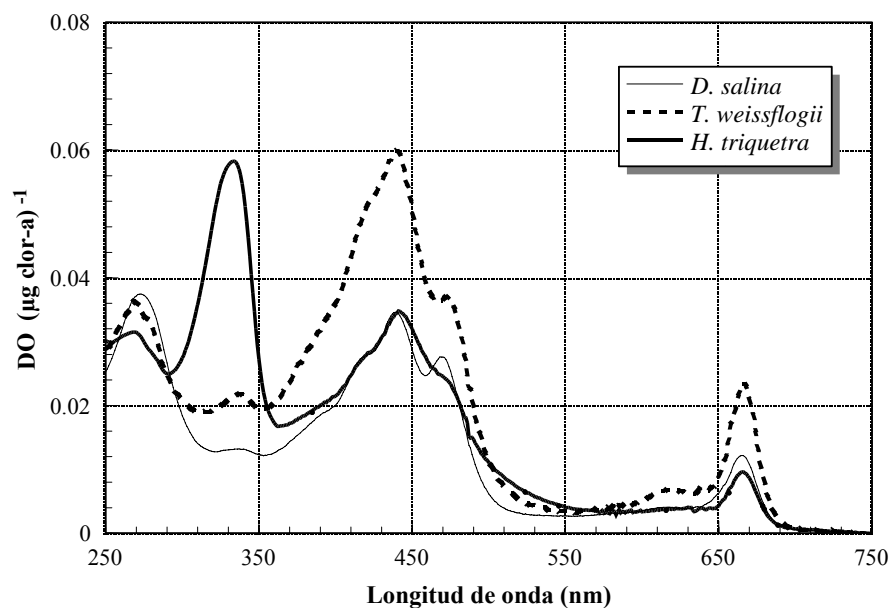
**Cuantificación de células:** Las muestras de fitoplancton fueron tomadas al comienzo y al final de cada experimento y fijadas con formalina en medio buffer (concentración final en la muestra 0,4 %). El análisis cuantitativo fue realizado utilizando una cámara Sedwick-Rafter siguiendo las técnicas descritas por Villafañe y Reid (1995).

**Mediciones de radiación solar:** Los niveles de irradiancias durante los experimentos fueron monitoreados utilizando un radiómetro de banda ancha (ELDONET, Real Time Computer Inc.) instalado de forma permanente en el techo de la Estación de Fotobiología Playa Unión (detalles en capítulos anteriores).

**Estadística:** Los tratamientos PAB y P fueron realizados por duplicado, sin embargo, y debido a que el oxímetro posee 5 canales, sólo una muestra fue incubada bajo el tratamiento PA. El test no paramétrico de Kruskal Wallis (Zar, 1984) fue utilizado para establecer las diferencias significativas entre los tratamientos de radiación a cada nivel de irradiancia (nivel de confianza = 0,05) así como también para la producción integrada. En las tres especies estudiadas no se encontraron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) entre los tratamientos de radiación (i.e., PAB, PA y P) a ningún nivel de irradiancia. Por lo tanto, se combinaron y se presentaron las medias entre las tasas de producción de  $O_2$  obtenidas en los 5 canales del oxímetro y su desviación estándar.

## Resultados

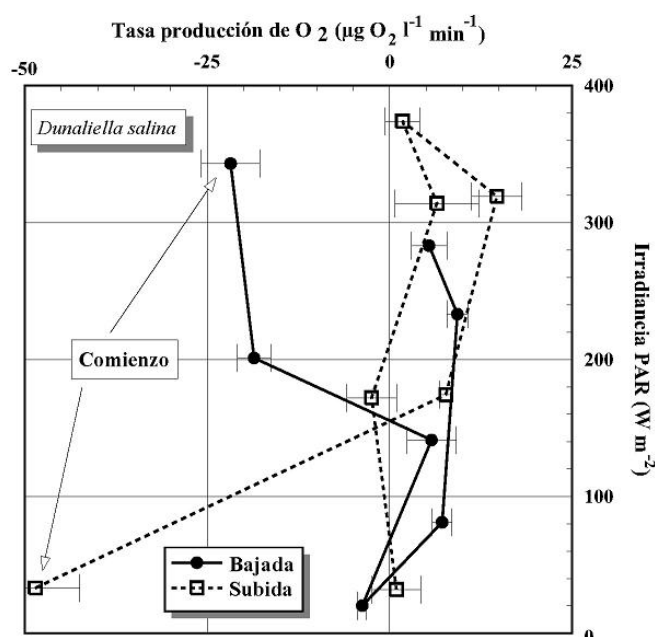
Las características de absorción (i.e., densidad óptica (D.O.) normalizada por la concentración de Clor-a) de *D. salina*, *T. weissflogii* y *H. triquetra* se representan en la Figura 2. Las tres especies muestran los característicos picos de Clor-a a 440 y 665 nm; los carotenoides (i.e.,  $\lambda_{max} = 470$  nm) fueron notables en *D. salina* y *T. weissflogii* mientras que *H. triquetra* sólo presentó una pequeña cantidad para este compuesto. Por otro lado, esta última especie presentó un claro pico de compuestos que absorben RUV (i.e.,  $\lambda_{max} = 334$  nm), mientras que en *T. weissflogii* la cantidad de este compuesto fue muy pequeña y ausente en *D. salina*. En todos los experimentos la concentración de células fue comparable y varió entre 1800 y 2200 cel  $ml^{-1}$ .



**Figura 2:** Espectro de absorción normalizado por la concentración de clorofila (D.O. [ $\mu\text{g Clor-a}$ ] $^{-1}$ ) a tiempo inicial en función de la longitud de onda (nm) para *D. salina*, *T. weissflogii* y *H. triquetra*.

En *D. salina* (Figura 3), la tasa de producción de  $O_2$  al comienzo del experimento fue negativa (i.e., consumo de  $O_2$ ) en cualquiera de los dos movimientos (i.e., “Hacia abajo” o “Hacia arriba”). Al comienzo del movimiento “Hacia arriba”, la tasa de producción de  $O_2$  se incrementó significativamente ( $p < 0,001$ ) tan pronto como las células se movían hacia altos niveles de

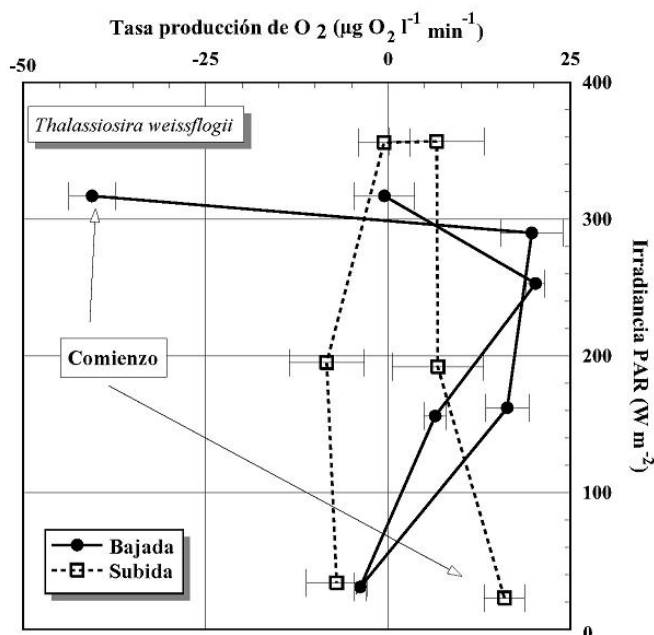
irradiancia, presentando valores positivos durante todo el camino hacia las máximas irradiancias determinadas en el experimento ( $374 \text{ W m}^{-2}$ ), como así también durante el camino de regreso hacia bajas irradiancias ( $32 \text{ W m}^{-2}$ ). Se determinó un leve valor negativo de  $-2,5 \mu\text{g O}_2 \text{ l}^{-1} \text{ min}^{-1}$  cuando las células fueron expuestas a  $172 \text{ W m}^{-2}$ ; este valor, sin embargo, no fue significativamente diferente ( $p > 0,05$ ) comparado con el de  $0,93 \mu\text{g O}_2 \text{ l}^{-1} \text{ min}^{-1}$  medido a las más bajas irradiancias al final del movimiento “Hacia arriba”. Cuando las células circularon “Hacia abajo” a bajas irradiancias se determinó un consumo de  $\text{O}_2$  en los dos primeros pasos de esta CSM simulada (a  $343$  y  $201 \text{ W m}^{-2}$ ) así como también en las más bajas irradiancias ( $20 \text{ W m}^{-2}$ ); durante el resto del experimento, sin embargo, el balance fue positivo. La máxima tasa de producción de  $\text{O}_2$  fue determinada durante el movimiento “Hacia arriba” ( $14,7 \mu\text{g O}_2 \text{ l}^{-1} \text{ min}^{-1}$  a  $319 \text{ W m}^{-2}$ ). En el movimiento “Hacia abajo” sin embargo, los máximos valores de producción fueron significativamente menores ( $p < 0,05$ ) – i.e.,  $9,3 \mu\text{g O}_2 \text{ l}^{-1} \text{ min}^{-1}$  a  $233 \text{ W m}^{-2}$  – que los determinados durante el movimiento “Hacia abajo”.



**Figura 3:** Tasa de producción media de  $\text{O}_2$  ( $\mu\text{g O}_2 \text{ l}^{-1} \text{ min}^{-1}$ ) para *D. salina* en función de la irradiancia PAR ( $\text{W m}^{-2}$ ) durante el movimiento “Hacia arriba” (cuadrados blancos) y el movimiento “Hacia abajo” (círculos negros). Las líneas horizontales indican la desviación estándar y las flechas representan los puntos de comienzo de los movimientos.

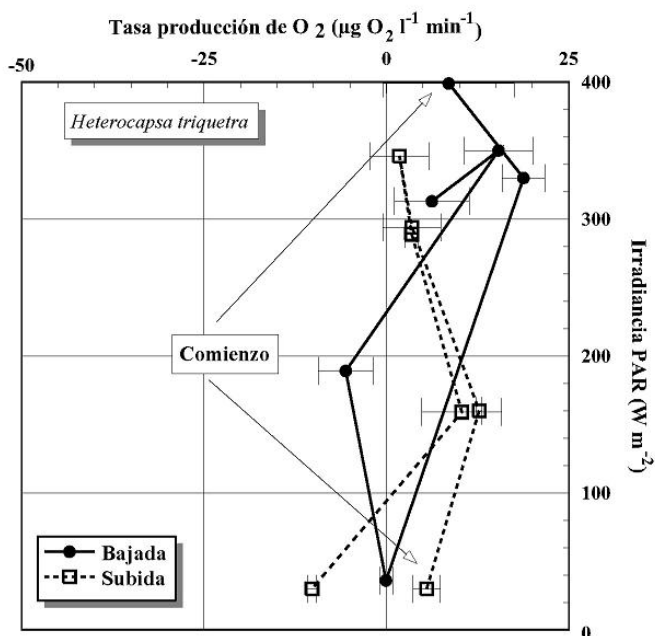
En *T. weissflogii* (Figura 4), las tasas de producción de  $\text{O}_2$  presentaron un valor relativamente alto de  $15,95 \mu\text{g O}_2 \text{ l}^{-1} \text{ min}^{-1}$  al comienzo del movimiento “Hacia arriba” (i.e.,  $23 \text{ W m}^{-2}$ ) pero éste disminuyó a medida que fue aumentando la irradiancia. A la máxima irradiancia ( $357 \text{ W m}^{-2}$ ) las tasas de producción de  $\text{O}_2$  al final de la primera mitad del experimento ( $6,68 \mu\text{g O}_2 \text{ l}^{-1} \text{ min}^{-1}$ ) no fueron significativamente distintas ( $p > 0,05$ ) de aquellas del comienzo de la segunda parte ( $-0,55 \mu\text{g O}_2 \text{ l}^{-1} \text{ min}^{-1}$ ). Cuando las muestras regresaron a bajas irradiancias, sin embargo, las tasas de  $\text{O}_2$  fueron siempre negativas ( $\sim -8,40$  y  $-7,03 \mu\text{g O}_2 \text{ l}^{-1} \text{ min}^{-1}$ ). Las muestras de *T. weissflogii* durante el movimiento “Hacia abajo” presentaron inicialmente tasas de consumo de  $\text{O}_2$  muy altas – i.e.,  $-40,57 \mu\text{g O}_2 \text{ l}^{-1} \text{ min}^{-1}$  a  $317 \text{ W m}^{-2}$ . Asimismo, cuando la irradiancia comenzó a disminuir, las tasas de producción de  $\text{O}_2$  fueron altas ( $20,23 \mu\text{g O}_2 \text{ l}^{-1} \text{ min}^{-1}$  a  $253 \text{ W m}^{-2}$ ). A irradiancias medias las tasas de producción de  $\text{O}_2$  fueron también relativamente altas (i.e.,  $16 - 19$

$\mu\text{g O}_2 \text{ l}^{-1} \text{ min}^{-1}$ ); sin embargo, se determinaron leves consumos de  $\text{O}_2$  en las más bajas irradiancias (i.e.,  $31 \text{ W m}^{-2}$ ), pero las tasas de  $\text{O}_2$  aumentaron nuevamente hacia el final del experimento.



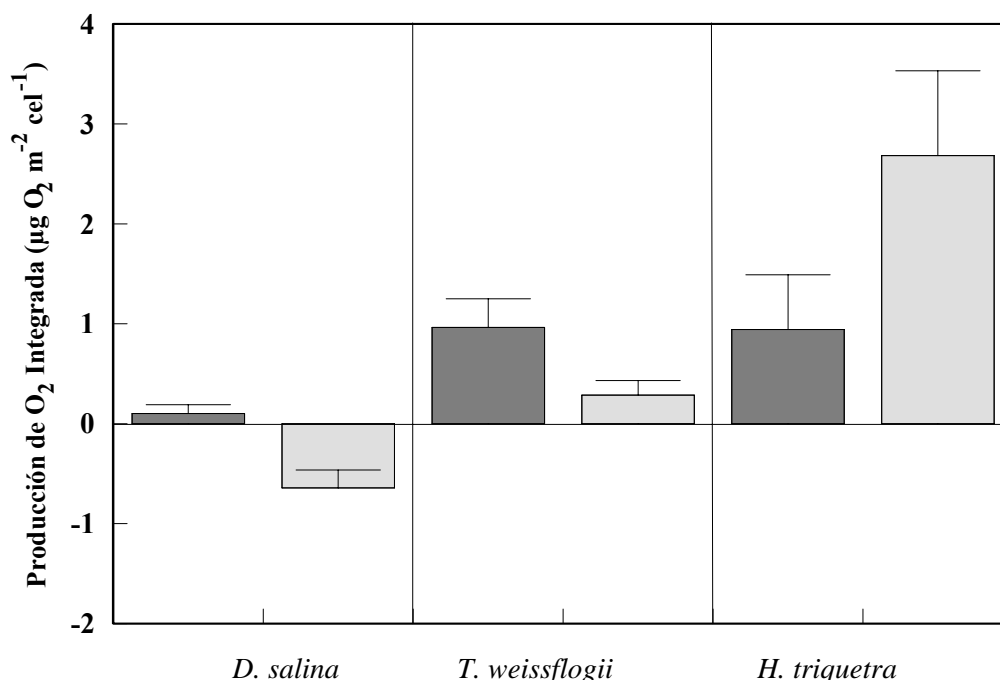
**Figura 4:** Tasa de producción media de  $\text{O}_2$  ( $\mu\text{g O}_2 \text{ l}^{-1} \text{ min}^{-1}$ ) para *T. weissflogii* en función de la irradiancia PAR ( $\text{W m}^{-2}$ ) durante el movimiento “Hacia arriba” (cuadrados blancos) y el movimiento “Hacia abajo” (círculos negros). Las líneas horizontales indican la desviación estándar y las flechas representan los puntos de comienzo de los movimientos.

Finalmente, las muestras de *H. triquetra* (Figura 5) moviéndose desde bajas hacia altas irradiancias presentaron tasas de producción de  $\text{O}_2$  positivas durante casi todo el experimento, con valores máximos de producción de  $12,7 \mu\text{g O}_2 \text{ l}^{-1} \text{ min}^{-1}$  a  $160 \text{ W m}^{-2}$ . Un valor mínimo de  $-10,20 \mu\text{g O}_2 \text{ l}^{-1} \text{ min}^{-1}$  se registró al final del movimiento “Hacia arriba” (i.e., a  $30 \text{ W m}^{-2}$ ). Durante el movimiento “Hacia abajo”, las muestras de *H. triquetra* presentaron valores positivos en las tasas de producción de  $\text{O}_2$  durante la primera mitad del experimento (i.e., cuando circulaban hacia bajas irradiancias). Sin embargo, el oxígeno fue levemente consumido a irradiancias intermedias (i.e.,  $189 \text{ W m}^{-2}$ ), recuperándose a  $15,36 \mu\text{g O}_2 \text{ l}^{-1} \text{ min}^{-1}$  a  $350 \text{ W m}^{-2}$ .



**Figura 5:** Tasa de producción media de O<sub>2</sub> (µg O<sub>2</sub> l<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup>) para *H. triquetra* en función de la irradiancia PAR (W m<sup>-2</sup>) durante el movimiento “Hacia arriba” (cuadrados blancos) y el movimiento “Hacia abajo” (círculos negros). Las líneas horizontales indican la desviación estándar y las flechas representan los puntos de comienzo de los movimientos.

Para comparar el rendimiento fotosintético (i.e., consumo / producción de O<sub>2</sub>) de cada especie se calculó la producción integrada durante una circulación completa dentro de la CSM simulada (Figura 6). Todas las especies produjeron O<sub>2</sub> durante el movimiento “Hacia abajo”. En este tipo de circulación no se encontraron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) en la tasa de producción de O<sub>2</sub> entre *T. weissflogii* y *H. triquetra*; sin embargo, la producción de O<sub>2</sub> en *D. salina* fue significativamente menor ( $p < 0,05$ ). Cuando la mezcla comenzó desde bajas a altas irradiancias, las tres especies presentaron diferencias significativas en la producción integrada ( $p < 0,05$ ). *H. triquetra* presentó la mayor producción integrada (i.e., 2,68 µg O<sub>2</sub> l<sup>-1</sup> m<sup>-2</sup> cel<sup>-1</sup>) mientras que *D. salina* la más baja (i.e., consumo de O<sub>2</sub> de -0,64 µg O<sub>2</sub> l<sup>-1</sup> m<sup>-2</sup> cel<sup>-1</sup>); *T. weissflogii* produjo O<sub>2</sub> en valores de 0,29 µg O<sub>2</sub> l<sup>-1</sup> m<sup>-2</sup> cel<sup>-1</sup>. Finalmente, se determinaron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) cuando se compararon las producciones integradas dentro de cada especie. *D. salina* y *T. weissflogii* tuvieron la mayor producción de O<sub>2</sub> en el movimiento “Hacia abajo” comparado con el movimiento “Hacia arriba”; en cambio, en *H. triquetra*, la producción integrada durante el movimiento “Hacia abajo” fue menos de la mitad de aquella en el movimiento “Hacia arriba”.



**Figura 6:** Producción integrada de O<sub>2</sub> para *D. salina*, *T. weissflogii* y *H. triquetra* durante el movimiento “Hacia arriba” (barras claras) y el movimiento “Hacia abajo” (barras oscuras) circulando dentro de una CSM simulada ( $Z_{CSM} = 10$  m). Las líneas sobre las barras representan las desviaciones estándar. La explicación completa se encuentra en el texto.

## **Discusión**

### **Ausencia de fotoinhibición inducida por la RUV**

Las tasas de fotosíntesis están claramente asociadas a la calidad de radiación a la cual las células son expuestas, siendo PAR la mayor responsable de la fotosíntesis, mientras que la RUV es generalmente considerada un factor de estrés en este proceso (ver la revisión de Villafañe et al., 2003 y las referencias que allí aparecen citadas). Sin embargo, se encuentra un amplio rango de respuestas a la RUV. Mientras algunas especies son muy resistentes, como aquellas características de los ambientes tropicales (Helbling et al., 1992b; 2001c) otras, por ejemplo aquellas de las zonas polares, son especialmente sensibles aún en bajos niveles de RUV (Helbling et al., 1992b; 1996b). Otros estudios han demostrado también la utilización de RUV (especialmente de la RUV-A) cuando los organismos son expuestos a relativamente bajos niveles de PAR (Capítulo 2) o cuando las células se mezclan rápido dentro de una CSM (Helbling et al., 2003). En este trabajo, no se han encontrado efectos significativos de la RUV solar cuando las especies fueron expuestas a una condición de mezcla. Esto pudo estar relacionado con el hecho de que cuando las células cambiaron su irradiancia, desde irradiancias relativamente bajas durante las condiciones de cultivo a  $37 \text{ W m}^{-2}$  a las experimentales bajo irradiancia solar natural, fueron inhibidas por PAR con lo cual la contribución de la RUV a la inhibición no fue significativa. Como se mencionó anteriormente, las condiciones de irradiancia a las cuales los cultivos se mantuvieron fueron similares a aquellas recibidas por las células en el fondo de la CSM. La relativamente alta inhibición inducida por PAR, tal como se determinó en este trabajo (Figuras 3-5) se relaciona con otros estudios llevados a cabo en Patagonia (Villafañe et al., 2004a) en los cuales los organismos fitoplanctónicos fueron expuestos a niveles similares de radiación. En aquellos estudios, los autores encontraron que la contribución de la RUV a la fotoinhibición fue relativamente alta solo



en invierno cuando los niveles de PAR fueron bajos (Villafañe et al., 2004a). Sin embargo, la relativamente alta fotoinhibición inducida por PAR comparada con aquella producida por la RUV parece ser una característica general del fitoplancton expuesto a niveles de radiación tales como los recibidos en la zona patagónica, donde la relación PAR / RUV varía entre 6,9 y 8 entre verano e invierno, respectivamente.

### Efecto de la mezcla vertical en la tasa de O<sub>2</sub>: Diferencias inter-específicas en la producción de O<sub>2</sub>

Aún bajo similares condiciones experimentales se determinó un importante grado de variabilidad en la respuesta de las tres especies fitoplanctónicas circulando dentro de una CMS simulada. Esta variabilidad inter-específica es probablemente debida a uno o varios procesos (Litchman, 2000 y las referencias que ahí se citan) incluyendo diferencias en la sensibilidad entre taxas (Richardson et al., 1983), variaciones en las tasas de respiración que dependen de la irradiancia (Falkowski & Raven, 1997), o variaciones en la localización de recursos para proteger a las células (Raven, 1994). Por ejemplo, las tasas de producción de O<sub>2</sub> en *D. salina* fueron fuertemente inhibidas tanto por bajas como altas irradiancias al comenzar el movimiento (Figura 3), pero luego aumentaron nuevamente aunque sin alcanzar una producción muy alta. Por otro lado, las tasas de producción de O<sub>2</sub> en *T. weissflogii* (Figura 4) fueron inhibidas solo por altas irradiancias en la circulación “Hacia abajo”, mientras que aquellas en *H. triquetra* (Figura 5) fueron similares a través de los cambios de irradiancias simulados en los experimentos.

La inhibición significativa en las tasas de producción de O<sub>2</sub> observadas en *D. salina* (Figura 3) y *T. weissflogii* (Figura 4) durante el movimiento “Hacia abajo” era esperado ya que las células fueron transferidas desde bajas irradiancias (i.e., 37 W m<sup>-2</sup>, condiciones de cultivo) a altas irradiancias de PAR (> 300 W m<sup>-2</sup>, condiciones experimentales). Aunque este cambio de irradiancias es alto, se han observado cambios similares en la zona de estudio no solo producidos por la intensa mezcla vertical debida al viento (Villafañe et al., 2004a) sino también debido a condiciones de nubosidad variables que resultan en cambios de la irradiancia en un orden de magnitud los cuales suceden en cuestión de minutos (Helbling et al., 2005). Estas condiciones cambiantes obviamente tuvieron un alto costo energético en la aclimatación del aparato fotosintético a una condición de irradiancia variable (Kiefer, 1973) y en el caso de los experimentos, se reflejó en una reducción de la tasa de producción de O<sub>2</sub>. Sin embargo, los datos sugieren una inhibición fotosintética dinámica más que crónica en las tres especies estudiadas. El mecanismo de inhibición crónica es la fotodegradación de la proteína D1 del fotosistema II (FS II) lo cual genera una disminución en el transporte electrónico fotosintético (Osmond, 1994) y así el aparato fotosintético se protege de un exceso de energía lumínica. En cambio, la inhibición dinámica está basada en el ciclo de las xantofilas identificado en plantas superiores y en algunas macroalgas (Häder & Figueroa, 1997) y por lo tanto, cuando las células son expuestas a niveles excesivos de radiación solar, la eficiencia fotosintética del FS II decrece y la energía de excitación es disipada en forma de calor. En *D. salina*, la inhibición fotosintética durante el movimiento “Hacia abajo” duró más (i.e., dos pasos en la rotación, Figura 3) en comparación con las otras dos especies sugiriendo que, aunque la irradiancia disminuyó aproximadamente 60% del valor inicial, la PAR todavía inhibió la fotosíntesis. Por lo tanto, aunque la tasa de fotosíntesis se recuperó, este proceso tomó más tiempo que en las otras especies. Por otro lado, la mayor eficiencia fotosintética de *T. weissflogii* comparada a la de *D. salina* pudo haber estado relacionada con sus características de absorción (Figura 2) y su estructura silíceo, la cual puede prevenir que la radiación solar alcance puntos vitales dentro de la célula (i.e., fotosistemas, ADN, etc.), actuando como un escudo pasivo. De hecho, esta especie se recuperó mucho más rápido al primer cambio de irradiancias, desde condiciones de irradiancia de laboratorio a las condiciones experimentales bajo radiación solar. Por ejemplo, durante el movimiento “Hacia abajo” el pequeño cambio en irradiancias desde 320 a 290 W m<sup>-2</sup>, que ocurrió en un intervalo de 20 minutos, fue suficiente para aclimatar e incrementar significativamente la tasa de producción de O<sub>2</sub> desde aproximadamente -40 µg O<sub>2</sub> l<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup> a un máximo de 20 µg O<sub>2</sub> l<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup>.

Las respuestas a la mezcla de *H. triquetra* (Figura 5) fueron distintas comparadas con las de las otras dos especies, ya que ésta no mostró gran variabilidad en la tasa de producción de O<sub>2</sub> en ambos movimientos. A primera vista, se podría pensar que la respuesta está relacionada con las características de absorción de esta especie (Figura 2) comparada con la de *D. salina* y *T. weissflogii*. Estas últimas dos especies no presentan cantidades significativas de compuestos que absorben RUV como es normalmente el caso de muchas clorófitas y especies de diatomeas (Banaszak, 2003). En cambio, *H. triquetra* presentó una alta concentración de compuestos que absorben RUV lo cual caracteriza a muchas especies de dinoflagelados (Banaszak, 2003) y las protege ante un estrés de RUV. Como fue mencionado anteriormente, no se encontraron diferencias significativas entre especies expuestas y no expuestas a la RUV siendo PAR la irradiancia que más contribuyó a la fotoinhibición. Por eso, estos compuestos que absorben RUV aparentemente no son los responsables de los bajos valores de inhibición observados en *H. triquetra*, a menos que estos compuestos estuvieran involucrados en otros procesos que solo previenen que la RUV alcance partes vitales de la célula. De hecho, se han sugerido varias funciones adicionales de estos compuestos (ver revisión de Bandaranayake, 1998) y al menos en uno de ellos, mycosporine-glycine, se ha comprobado que tiene capacidad de actuar como antioxidante al “secuestrar” radicales libres (Dunlap & Yamamoto, 1995). Aunque en este trabajo no se detalla el rol de estos compuestos, en *H. triquetra* no se puede descartar la posibilidad de que puedan estar involucrados en otros procesos metabólicos dentro de la célula que resultan en una mejor y más rápida aclimatación a condiciones de irradiancias fluctuantes. En general, parece que la eficiencia diferencial de las especies se traduce en importantes diferencias inter-específicas en la producción integrada (Figura 6); la mayor tasa de producción fue determinada en *H. triquetra*, mientras los valores más bajos (i.e., consumo de O<sub>2</sub>) fueron registrados en *D. salina*. Además, se determinaron grandes diferencias de acuerdo a los movimientos seguidos por cada una de las especies: *D. salina* y *T. weissflogii* presentaron altas tasas de producción de O<sub>2</sub> cuando la circulación comenzó en altas irradiancias, mientras que lo opuesto ocurrió en *H. triquetra* (Figura 6).

### Implicancias ecológicas

Estos resultados tienen importantes implicancias ecológicas en comunidades fitoplanctónicas naturales de áreas geográficas expuestas a condiciones atmosféricas y climatológicas variables, tales como las que se desarrollan en la zona patagónica (Villafañe et al., 2004a). En este estudio, se ha comparado la respuesta de tres especies microplanctónicas y se ha demostrado que presentan un comportamiento diferencial en relación con la mezcla vertical, siendo *H. triquetra* la especie que obtuvo mayores beneficios de las condiciones de irradiancias fluctuantes, en tanto que *D. salina* sería la más afectada en tales condiciones (Figura 6). Los cambios en la irradiancia tales como los utilizados en nuestras condiciones experimentales podrían ser encontrados, por ejemplo, en nuestra zona de estudio en la región Patagónica, en la cual la máxima frecuencia en la velocidad del viento está en el rango de 12 a 16 Km h<sup>-1</sup> durante la primavera y verano; en cambio se encuentran períodos relativamente calmos durante el invierno (Villafañe et al., 2004a). En estos experimentos no se ha simulado la atenuación diferencial de la energía solar dentro de la CSM, lo que significa que las proporciones de energía utilizadas (cortas versus largas) son máximas, representando así el peor caso. Sin embargo, como se mencionó anteriormente, no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos de radiación, aún con estas altas relaciones de energía. Que el fitoplancton se aclimate *in situ* a estos regímenes variables de radiación dependerá de los niveles fluctuantes de irradiancia así como también de otras variables como los niveles de nutrientes, tamaño celular y de factores de origen intrínseco (i.e., sensibilidad específica). En Patagonia se han registrado floraciones de organismos fitoplanctónicos (dominados principalmente por diatomeas microplanctónicas) durante el invierno (Villafañe et al., 2004a). Sin embargo, y basándonos en los resultados obtenidos en este trabajo y si las respuestas de *H. triquetra* son representativas del grupo de dinoflagelados, su productividad debería ser favorecida bajo condiciones de viento. De hecho, estudios llevados a cabo en Patagonia por Gayoso (2001) y por Villafañe y colaboradores (2004a) han establecido

concentraciones relativamente altas de dinoflagelados durante la estación de viento (i.e., primavera – verano), incluyendo dinoflagelados tóxicos tales como *Alexandrium tamarense*. Sin embargo, durante esta estación la biomasa fitoplanctónica es relativamente baja (Villafañe et al., 2004a), siendo aparentemente la disponibilidad de nutrientes el factor más importante en la limitación del crecimiento (Helbling et al., 2005).

De estos resultados se concluye que al momento de establecer la aclimatación de los organismos fitoplanctónicos a la radiación solar no sólo los cambios en irradiancia son importantes sino también la dirección en la cual ocurren estos cambios (i.e., de bajas a altas irradiancias o viceversa). Bajo condiciones de mezcla en la columna de agua, en la cual co-existen varias especies, las respuestas inter-específicas llevarían a una dominancia de los más aptos en términos de adaptación a cambios en la irradiancias lo cual, como en nuestro caso, significa que la mezcla favorecería el desarrollo y crecimiento de los dinoflagelados frente a las otras dos especies.

## Respuestas fotosintéticas de tres dinoflagelados marinos circulando dentro de un régimen de irradiancia variable

### Resumen

En este trabajo se evaluó la velocidad de respuesta al cambio de radiación de tres dinoflagelados de distintos tamaños celulares expuestos a diferentes tratamientos de radiación. Los dinoflagelados marinos utilizados para la experimentación fueron: *Gymnodinium chlorophorum*, *Heterocapsa triquetra* y *Prorocentrum micans*, cuyos tamaños celulares son de 5, 20 y 50  $\mu\text{m}$ , respectivamente. Las especies fueron expuestas a distintas condiciones de radiación, bajo un régimen fluctuante de irradiancias en el que se establecieron dos profundidades de mezcla: i) CSM somera =  $Z_{\text{CSM}} / Z_{\text{Eu}} = 0,6$  y ii) CSM profunda =  $Z_{\text{CSM}} / Z_{\text{Eu}} = 0,91$ . Para cada régimen variable de irradiancia se simularon dos movimientos iguales de mezcla: 1) muestras que comenzaban en superficie a máxima irradiancia (“Superficie”) y 2) muestras que comenzaban a bajas irradiancias (“Fondo”). Las condiciones fluctuantes de irradiancias se lograron utilizando mallas de densidad neutra a fin de alcanzar la atenuación deseada en cada profundidad de mezcla. En cada experimento, asimismo, se implementaron tres tratamientos de radiación: PAB (RUV + PAR, 280-700nm), PA (RUV-A + PAR, 320-700) y P (sólo PAR, 400-700 nm). La variable analizada para ambas condiciones de mezcla simulada fue el rendimiento fotoquímico, medido a través de la fluorescencia de amplitud de pulso (Water-PAM, Walz). Los resultados obtenidos muestran que estos tres dinoflagelados marinos presentan distintas velocidades de aclimatación al cambio de radiación, siendo *G. chlorophorum* la especie que más rápido responde al cambio de radiación. Sin embargo, esta especie presentó mayor tasa de inhibición en su rendimiento fotoquímico que las otras dos especies. En general, los resultados obtenidos en este Capítulo sugieren que la especie más pequeña podría ser la mejor aclimatada a un ambiente lumínico de irradiancias fluctuantes.

### Introducción

Dentro de la columna de agua los organismos fitoplanctónicos están sujetos a un régimen de irradiancia fluctuantes como consecuencia de procesos físicos tales como mezcla vertical o estratificación por temperatura (Neale et al., 2003). La mezcla vertical genera que los organismos se desplacen en la columna de agua, alterando de esta manera la exposición a la radiación solar (i.e., desde altas a bajas irradiancias y viceversa). Sumado a las variaciones en la región del visible (PAR, 400-700 nm), la mezcla expone a los organismos a variaciones en el rango del ultravioleta (RUV, 280-400). La RUV es un importante factor de estrés en los organismos fitoplanctónicos debido a que afecta puntos vitales tales como la molécula de ADN (Buma et al., 2003) y procesos fisiológicos (i.e., fotosíntesis y crecimiento; Villafañe et al., 2003). La interacción entre la RUV y la mezcla ha sido estudiada en varios trabajos los cuales han demostrado respuestas muy variables. La tasa de fotosíntesis en el fitoplancton puede ser aumentada (Capítulo 2; Helbling et al., 2003) o reducida (Neale et al., 1998b); sin embargo, en otros experimentos no se ha observado efecto de la combinación de estos dos factores en la tasa de fotosíntesis (Hernando & Ferreyra, 2005). Las variaciones en las respuestas de los organismos dependen de varios factores, los cuales incluyen la sensibilidad específica de los organismos, así como también su habilidad de aclimatación a diferentes condiciones de PAR y RUV.

En los últimos años, los trabajos realizados en el campo de fluorescencia variable se han convertido en una importante herramienta en el estudio de la fotosíntesis del fitoplancton (Falkowski & Kolber, 1993; Oliver & Whittington, 1998), incluyendo aplicaciones en las investigaciones sobre procesos de fotoinhibición inducidos por RUV (Lesser et al., 1994; Marwood et al., 2000). Algunos trabajos han determinado una significativa reducción del

rendimiento fotoquímico cuando los organismos fitoplanctónicos han sido expuestos a la radiación solar. Sin embargo, mucha de la inhibición observada es producida por altos niveles de PAR, tal como ocurre durante las horas del mediodía local (i.e., altas irradiancias); aún en relación con la tasa UVR/PAR y la sensibilidad de las especies, la RUV puede también producir una porción significativa en la inhibición de la fotosíntesis (Villafañe et al., 2004). Hay evidencias que la respuesta fotosintética del fitoplancton, y particularmente el rendimiento fotoquímico, son fuertemente influenciados por procesos de mezcla vertical (Oliver et al., 2003). Esto es debido a que las reacciones fotoquímicas dependen no solo de los niveles de radiación sino también de la dinámica de los cambios que normalmente ocurren en la columna de agua, así como de los mecanismos de disipación de la energía excedente que llega a los centros de reacción.

El efecto de la radiación solar en organismos fitoplanctónicos es el resultado de un balance entre el foto-daño y la capacidad inherente de los organismos de foto-protección y / o reparación del daño. De hecho, los organismos fitoplanctónicos han desarrollado mecanismos para minimizar el daño producido (Roy, 2000); entre estos, uno de los más importantes se da a través de la presencia de mecanismos de fotoprotección. Los mecanismos de fotoprotección incluyen la síntesis de compuestos que absorben efectivamente en la región del visible (i.e., xantofilas) y en la región del ultravioleta (i.e., micosporinas, en inglés mycosporine like aminoacids, MAAs) (Carreto et al., 1990; Roy, 2000), los cuales permitirían que estas longitudes de onda no afecten blancos vitales en la célula. En este trabajo se evaluó el rendimiento fotoquímico y la capacidad de aclimatación a través de la disipación de la energía excedente en tres dinoflagelados marinos con características espectrales distintas, expuestos a distintas condiciones de radiación (i.e., tanto cantidad como calidad). Se evaluó particularmente las posibles variaciones en el rendimiento fotoquímico dependientes del tamaño celular ya que esta variable, según lo expuesto anteriormente, condiciona fuertemente la respuesta de los organismos fitoplanctónicos bajo condiciones de estrés lumínico –e.g., células pequeñas son más vulnerables a la RUV cuando se evalúa el daño al ADN pero más resistentes cuando se evalúa la inhibición fotosintética (Helbling et al., 2001c; Buma et al., 2003).

### **Materiales y métodos**

**Organismos y condiciones de cultivo:** Los dinoflagelados marinos utilizados para la experimentación fueron: *Gymnodinium chlorophorum*, Elbrächter et Schnepf (diámetro celular medio 5  $\mu\text{m}$ ), *Heterocapsa triquetra* (Ehrenberg) Stein (diámetro celular medio 20  $\mu\text{m}$ ) y *Prorocentrum micans* (Ehrenberg) (diámetro celular medio 50  $\mu\text{m}$ ). Estos organismos fueron cultivados a 20 °C dentro de una cámara Sanyo ML 350, con un fotoperíodo 12h:12h luz:oscuridad e irradiancias de 66 W m<sup>-2</sup> para PAR. Una vez que los organismos alcanzaron la fase exponencial en su crecimiento fueron utilizados para la experimentación como se describe en los párrafos siguientes. Los experimentos fueron llevados a cabo en la Estación de Fotobiología Playa Unión (EFPU, 43° S, 65° W), durante los meses de Febrero-Marzo de 2005.

**Organización de los experimentos:** Estos experimentos fueron diseñados con el objetivo de determinar la respuesta y la aclimatación a corto plazo de tres dinoflagelados marinos de distintos tamaños celulares, al ser expuestos a condiciones variables de irradiancia. La variabilidad en el régimen de irradiancias puede ser consecuencia de dos fenómenos como la mezcla vertical dentro de la capa superficial de mezcla (CSM) en la columna de agua, o una alta frecuencia de nubes lo cual modifica ampliamente la radiación incidente. La primera de ellas involucra cambios en las distintas longitudes de onda (i.e., RUV-B, RUV-A y PAR) debido a la atenuación diferencial de la radiación con la profundidad en la columna de agua, mientras que en presencia de nubes cada longitud de onda responde más o menos de manera similar, dentro de un cierto rango, y se puede entonces asumir una atenuación similar (ver Lubin & Jensen, 1995).

Con el objetivo de organizar e implementar los efectos mencionados anteriormente, se simularon cambios abruptos en el régimen de irradiancia los cuales reflejan un intenso proceso de mezcla vertical como consecuencia de fuertes vientos, situación que se puede observar en primavera en la zona de estudio. Esta simulación también reproduce la variabilidad característica de la nubosidad propia de esta zona (Villafañe et al., 2004a). El régimen experimental de irradiancia se organizó en función de las irradiancias máximas y mínimas utilizadas en cada condición de mezcla simulada: a) 100 y 6 % de irradiancia en superficie (i.e., capa superficial de mezcla somera, CSMs), y b) 100 y 1,5 % de irradiancia en superficie (i.e., capa superficial de mezcla profunda, CSMp). La primera condición (CSMs) simula una mezcla vertical logrando una profundidad óptica de 2,8 (profundidad óptica se define como  $K_d * Z$ , donde  $K_d$  es el coeficiente de atenuación y  $Z$  la profundidad), mientras que la segunda condición (CSMp) simula una mezcla en profundidad de 4,2 profundidades ópticas, implicando una mezcla vertical de aproximadamente toda la zona eufótica (ver capítulo 1). Estas dos condiciones asimismo reflejan los distintos patrones de nubosidad registrados en la zona patagónica (Villafañe et al., 2004a; Helbling et al., 2005). Dentro de cada condición de radiación se consideraron dos tipos de variaciones en el campo lumínico y se definieron dos muestras, dependiendo del recorrido lumínico que hayan realizado durante la experimentación: i) *Superficie*: los organismos se expusieron comenzando en altas irradiancias (i.e., 100%) pasando luego a bajas (i.e., 6 y 1,5 % para CSMs y CSMp, respectivamente), para culminar en altas irradiancias (i.e., 100%), y ii) *Fondo*: los organismos se expusieron comenzando en bajas irradiancias (i.e., 6 y 1,5 % de la irradiancia máxima para CSMs y CSMp, respectivamente) pasando luego a altas (i.e., 100 %), para culminar en bajas irradiancias (i.e., 6 y 1,5 % igual que al comienzo del movimiento). Esta organización experimental permite no solo estudiar el efecto de los cambios de irradiancia en el rendimiento fotoquímico y la aclimatación de éstos organismos, sino también determinar si la dirección del desplazamiento produce algún efecto en este rendimiento. Los cambios en irradiancia se lograron utilizando diferentes combinaciones de mallas de densidad neutra. El intervalo discreto de cada paso fue de 30 minutos por lo que el tiempo total de cada experimento fue de 90 minutos (alta-baja-alta irradiancia y viceversa). La utilización de mallas de densidad neutra no representa la atenuación diferencial de la radiación en la columna de agua, por lo que los resultados obtenidos deberían ser considerados como un límite superior de impacto ya que los organismos recibieron mayor cantidad y calidad de irradiancia de la que habría a 2,8 y 4,2 profundidades ópticas.

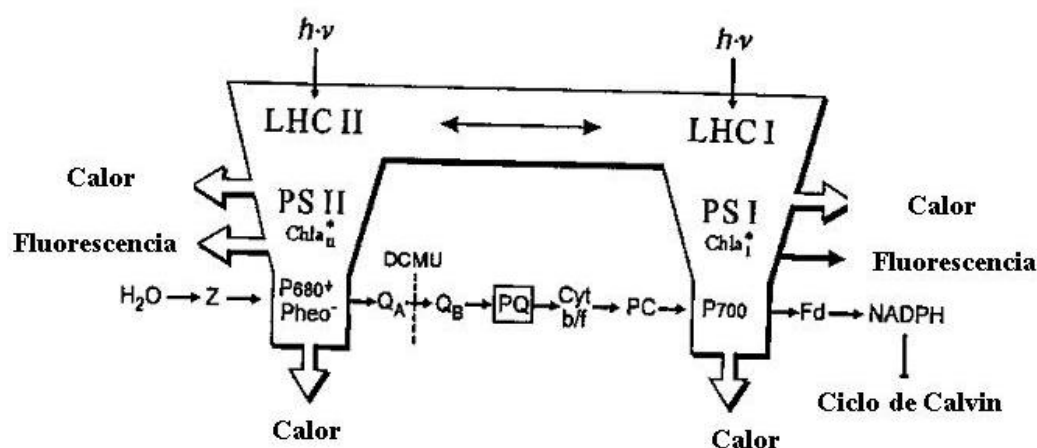
Para cada condición y cambio de irradiancia mencionada en el párrafo anterior, los organismos se organizaron en tubos de cuarzo de 50 ml expuestos a tres tratamientos de radiación (por duplicado): a) **PAB**, b) **PA**, y c) **P**. Una vez organizadas las muestras como se detalló anteriormente, los tubos fueron colocados en una bandeja de aluminio anodizado dentro de un baño de agua (a fin de mantener la temperatura controlada), y expuestos a la radiación solar natural. A fin de comparar altas-bajas-altas y bajas-altas-bajas intensidades lumínicas bajo las mismas condiciones y especies, estos experimentos fueron realizados en conjunto durante el mismo día, centrados todos al mediodía local. Al menos dos experimentos independientes fueron realizados con cada especie para cada condición de radiación. Sin embargo, se ha graficado solo un experimento representativo para cada especie, a fin de evidenciar claramente la respuesta de los organismos expuestos a un régimen de irradiancias fluctuantes.

### Mediciones y análisis

**Parámetros fotosintéticos:** El rendimiento fotoquímico se determinó utilizando un fluorómetro de amplitud de pulso (Water-PAM, Walz). Se explicarán en los siguientes párrafos los principios básicos de fluorescencia y la metodología utilizada en la experimentación.

Como se detalló en el Capítulo 1, el proceso fotosintético es un proceso que básicamente se divide en dos fases: a) fase fotoquímica, y b) fase enzimática. Las técnicas de fluorometría, desarrolladas en la última década, permiten estudiar detalladamente la fase fotoquímica de la fotosíntesis pudiendo establecer no solo las variaciones rápidas en la cadena de transporte electrónico, sino también el daño indirecto en los fotosistemas y la disipación de energía excedente a través de otras vías (i.e., NPQ, non-photochemical quenching).

En el siguiente Esquema (manual Water-PAM, Walz 1999) se muestra la organización del aparato fotosintético. Se observa que la energía que llega a ambos fotosistemas (FS I y II) puede ser absorbida o disipada en forma de calor y fluorescencia. La energía absorbida activa la cadena de electrones desde el FSII al FSI generando como producto final poder reductor (NADPH), el cual entrará posteriormente al ciclo de Calvin (detalles del proceso en el Capítulo 1).



**Esquema 1:** Esquema del aparato fotosintético, indicando captación de energía y flujo de electrones entre fotosistemas. PS II: fotosistema II (FS II), PS I: fotosistema I (FSI).

En general, el fluorómetro mencionado se utiliza en la excitación de los fotosistemas a través de un pulso saturante y la posterior medición de la respuesta de los organismos según la aclimatación de su aparato fotosintético. La fluorescencia es una consecuencia de la reducción de aceptores de electrones (particularmente la plastoquinona A,  $Q_A$ ) en la ruta desde el fotosistema II (FS II) hacia el fotosistema I (FS I). El pulso saturante entrega energía a los fotosistemas (FS I y II). Si bien los dos fotosistemas generan una respuesta en forma de fluorescencia, la mayor corresponde al FSII (Krause & Weis, 1991), por lo cual siempre se habla del efecto en el FSII cuando se utiliza esta técnica. Una vez que el fotosistema absorbe energía se excita y si hay disponibilidad de electrones generados por la ruptura de la molécula de  $H_2O$ , comienza el transporte electrónico del FS II al FS I. El transporte posee varios puntos claves los cuales regulan e indican cuánta energía puede ser convertida en energía de excitación. Cuando la plastoquinona ( $Q_A$ ) ha aceptado un electrón el centro de reacción se cierra ya que  $Q_A$  no puede aceptar otro electrón hasta no haber transferido el primero al siguiente aceptor de la cadena de electrones ( $Q_B$ ). Como consecuencia, el excedente de energía recibida sobre el FS II es re-emitida en forma de fluorescencia o calor, expresándose la proporción de centros de reacción cerrados en una disminución del rendimiento fotoquímico y por consiguiente un incremento en la producción de fluorescencia (Blankenship, 2001).

En los primeros estudios experimentales (alrededor del año 1960) se observó que la producción de fluorescencia es variable. Esto se concluyó al observar que al transferir material fotosintético adaptado a la oscuridad hacia la luz, la fluorescencia se incrementaba en 1 segundo, lo cual se debe a que los centros de reacción se van cerrando progresivamente y durante ese segundo se alcanza la mayor producción de fluorescencia. Luego de ese tiempo, la fluorescencia disminuye debido a la activación de ciertas enzimas relacionadas con el metabolismo del carbono y a la activación de mecanismos de disipación de energía como calor (i.e., mecanismos no fotoquímicos). Al primer mecanismo se lo denomina disipador fotoquímico (photochemical quenching, qP) y al segundo disipador no fotoquímico (non-photochemical quenching, NPQ) (Maxwell & Johnson, 2000).

La fluorescencia inicial o mínima,  $F_o$ , se determina cuando todos los centros de reacción se encuentran abiertos (i.e., todos los aceptores primarios ( $Q_A$ ) se encuentran totalmente oxidados), siendo en este punto mínima la disipación de calor. La fluorescencia máxima,  $F_m$ , se determina en cambio cuando todos los centros de reacción se encuentran cerrados (i.e.,  $Q_A$  totalmente reducida). La fluorescencia variable,  $F_v$ , se puede inducir a través de un pulso saturante de luz blanca, calculándose a través de la siguiente ecuación:

$$F_v = F_m - F_o$$

El rendimiento efectivo ( $F'_v / F'_m$ ) se determina midiendo la fluorescencia máxima instantánea ( $F'_m$ ) y la fluorescencia en estado estacionario acorde con las fórmulas de Weis y Berry (1987) y Genty y colaboradores (1989).

$$Y \text{ (ó RF)} = F'_v / F'_m = (F'_m - F_t) / F'_m = F'_v / F'_m$$

La fluorescencia máxima es reducida a través de dos procesos paralelos: a) disipador fotoquímico (Photochemical quenching, qP) y b) disipador no-fotoquímico (NPQ, non-photochemical quenching, qN). El qP, a raíz de la utilización de la energía por el aparato fotosintético, es un disipador por gasto de energía en fotosíntesis, y se define matemáticamente como:

$$qP = (F'_m - F_t) / (F'_m - F'_o)$$

El qN es una forma que desarrolla el organismo a fin de disipar la energía en exceso y se define matemáticamente como:

$$qN = (F_m - F'_m) / (F_m - F_o)$$

El NPQ se define a través de la siguiente ecuación:

$$NPQ = (F_m - F'_m) / F'_m$$

Los valores de qP y qN pueden variar entre 0 y 1, mientras que NPQ puede alcanzar valores entre 0 y 10. Si bien qN y NPQ representan la respuesta no-fotoquímica de la fotosíntesis,



los resultados serán representados solo por el valor de NPQ ya que, a diferencia de  $q_N$ , éste parámetro refleja la disipación por calor de la energía de excitación del sistema.

A partir de los valores del Yield (llamado rendimiento fotoquímico a lo largo de esta tesis, RF) se puede calcular otro parámetro llamado ETR o Tasa de Transporte Electrónico. Los valores de ETR expresan el flujo de electrones a través de la cadena de transporte electrónico y es indicativo de la tasa de fotosíntesis. Este parámetro se calcula de la siguiente manera:

$$\text{ETR } [\mu\text{mol (m}^{-2} \text{ s}^{-1})] = \text{RF} * \text{Absortancia} * \text{Irradiancia PAR} * 0,5$$

**ETR integrado:** Los valores de ETR se presentan integrados en función de la dosis diaria y mensual. Los valores de ETR fueron calculados en relación a la dosis recibida en cada paso (i.e., cantidad de irradiancia recibida) para cada condición experimental realizada. Los valores de ETR fueron integrados en el tiempo y normalizados por la concentración de clorofila inicial ( $\mu\text{g l}^{-1}$ ), tal cual lo expresa la siguiente fórmula:

$$\text{ETR exp} = \frac{\left[ \int_0^{90} \text{RF} * \text{I} * 0.5 * \text{absortancia} \text{ dt} \right]}{\mu\text{g Clor l}^{-1}}$$

La absorptancia fue calculada según la técnica utilizada por Rodríguez-Román e Iglesias-Prieto (2005). La radiación absorbida por las células fue estimada utilizando la atenuación de distintas intensidades de luz (i.e., curvas P vs. I, WATER-PAM) al pasar a través de la misma cubeta utilizada en la experimentación. En primer lugar se midió la atenuación de la irradiancia del medio de cultivo y finalmente se midió la atenuación de las tres especies fitoplanctónicas utilizadas en la experimentación para cuatro concentraciones de clorofila. Se determinó un valor de absorptancia para cada concentración de clorofila con respecto a la absorptancia del medio de cultivo sin células; luego, este valor se plotó en función de la concentración de clorofila. De la relación resultante se ajustaron los datos utilizando una función matemática. Una vez obtenida la función, se estimó la absorptancia para la concentración de clorofila utilizada en la experimentación. El valor de absorptancia para las distintas especies fue 0,005 para *G. chlorophorum*, 0,01 para *H. triquetra* y 0,044 para *P. micans*.

Luego de estos cálculos, los valores de ETR integrados en el experimento fueron utilizados para estimar el ETR diario utilizando la dosis diaria a fin de comparar los resultados obtenidos bajo las distintas condiciones experimentales implementadas dentro de un régimen de irradiancias fluctuantes. Finalmente, los valores de ETR diarios fueron utilizados para estimar el ETR diario medio mensual, a fin de comparar los resultados obtenidos tanto en los experimentos bajo condiciones de radiación fluctuantes, como en los ciclos diarios del capítulo 5.

Debido a que la respuesta de organismos fitoplanctónicos es muy rápida, el fluorómetro se colocó cercano al tanque de experimentación (3 m de distancia), a fin de evitar demoras entre la toma de muestras y la medición correspondiente. En los experimentos utilizando esta técnica se tomó una muestra de 4 ml proveniente de cada tratamiento de radiación y se la colocó dentro del fluorómetro donde se le aplicó un pulso saturante, registrando en la lectura todos los parámetros fotosintéticos de la muestra. Los valores obtenidos fueron registrados en un archivo y guardados en una computadora portátil para luego ser analizados. Asimismo, se separaron muestras para los

experimentos de irradiancias fijas con el fin de evaluar la recuperación en la oscuridad del fitoplancton al mediodía local (13:00 h) y al finalizar el experimento (17:00 h).

**Recuento de células:** El número de células de cada cultivo se determinó al comienzo de cada experimento, siguiendo las técnicas descriptas en Villafañe y Reid (1995). Una alícuota de cada muestra fue fijada con buffer formalina (concentración final en la muestra 0,4 % de formaldehído). Los recuentos se realizaron con una cámara Sedwick-Rafter (i.e., volumen de muestra 1 ml) utilizando un microscopio invertido Leica DM IL.

**Clorofila-a y compuestos que absorben RUV:** A fin de determinar la concentración de clorofila-a (clor-a), 100 ml de cultivo se filtraron utilizando filtros de fibra de vidrio Whatman GF/F (25 mm de diámetro). La extracción se realizó utilizando 7 ml de metanol absoluto durante un período no menor a 2 h en oscuridad a 4 °C (Holm-Hansen & Riemann, 1978). Luego la muestra se centrifugó (i.e., 10 minutos a 3000 rpm) y la concentración de clor-a del sobrenadante se determinó fluorométricamente siguiendo las técnicas descripta en Holm-Hansen y colaboradores (1965), utilizando un fluorómetro Turner Designs TD 700. La fluorescencia del extracto metanólico se midió antes y después de acidificar y la concentración de clor-a se calculó utilizando ambas lecturas. El fluorómetro fue calibrado previamente utilizando clorofila pura de *Anacystis nidulans* (Sigma # C 6144). Los compuestos que absorben RUV fueron estimados utilizando la misma muestra en la cual se determinó la concentración de clor-a (antes de acidificar), realizando un barrido desde 250 a 750 nm utilizando un espectrofotómetro Hewlett Packard 8453E. La concentración de compuestos que absorben RUV fue estimada a partir de los espectros realizados a través de un análisis de picos, empleando las técnicas descriptas por Dunlap y colaboradores (1995).

**Radiación solar:** La radiación solar incidente se monitoreó de forma continua utilizando un radiómetro de banda ancha ELDONET (Real Time Computers Inc., Alemania), el cual se encuentra instalado en lo alto de la Estación de Fotobiología Playa Unión (EFPU) desde el año 1997. Todos los datos fueron registrados a una frecuencia de un dato por minuto, los cuales fueron guardados automáticamente en una computadora (ver detalles en los capítulos anteriores).

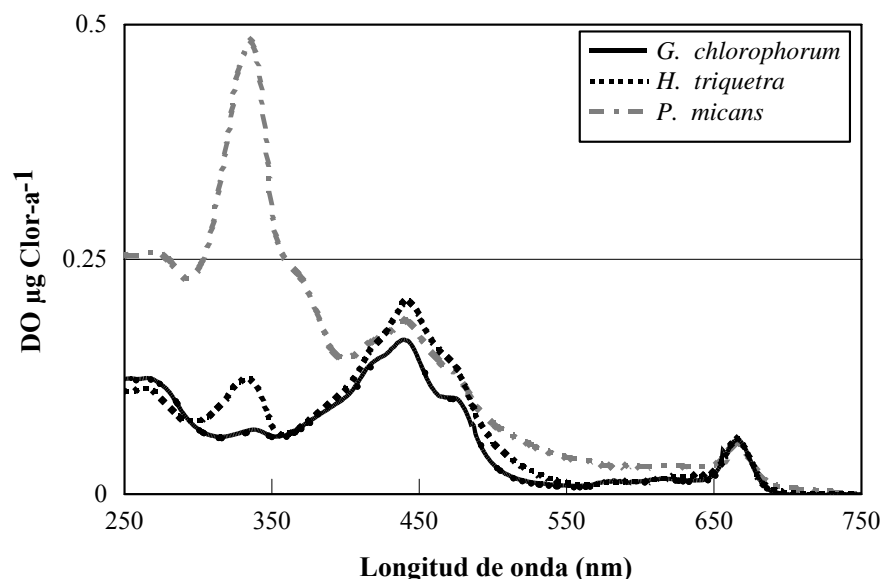
**Análisis estadístico:** Todos los datos de fluorescencia se graficaron como las medias, con sus respectivas desviaciones estándar. Para estas mediciones se utilizaron 4 mediciones por duplicado. A fin de determinar diferencias significativas entre experimentos y tratamientos de radiación, se realizaron análisis estadísticos no paramétricos (i.e., Kruskal Wallis, nivel de confianza = 0,05), y contrastes a posteriori cuando se encontraron diferencias significativas (Zar, 1984).

## **Resultados**

Las condiciones de radiación fueron similares a lo largo del período experimental, y la irradiancia media durante todas las incubaciones varió de la siguiente manera: PAR, 161-170 W m<sup>-2</sup>; RUV-A, 21-23 W m<sup>-2</sup> y RUV-B, 0,44-0,50 W m<sup>-2</sup>. La variabilidad en los niveles de radiación fue mayormente causada por cambios en la nubosidad. Durante el mes de Febrero la concentración de ozono varió entre 255 y 269 unidades Dobson (datos obtenidos de <http://jwocky.gsfc.nasa.gov>).

La composición espectral (Densidad Óptica [ $\mu\text{g clor-a}$ ]<sup>-1</sup>) de las tres especies de dinoflagelados utilizadas para la experimentación se observa en la Figura 1. Los tres dinoflagelados presentan los picos correspondientes a la clorofila a 440 y 665 nm, los picos de carotenos a 470 nm y los picos de los compuestos que absorben RUV entre 310 y 360 nm. En estos últimos se observan diferencias significativas entre especies: *P. micans* presentó la

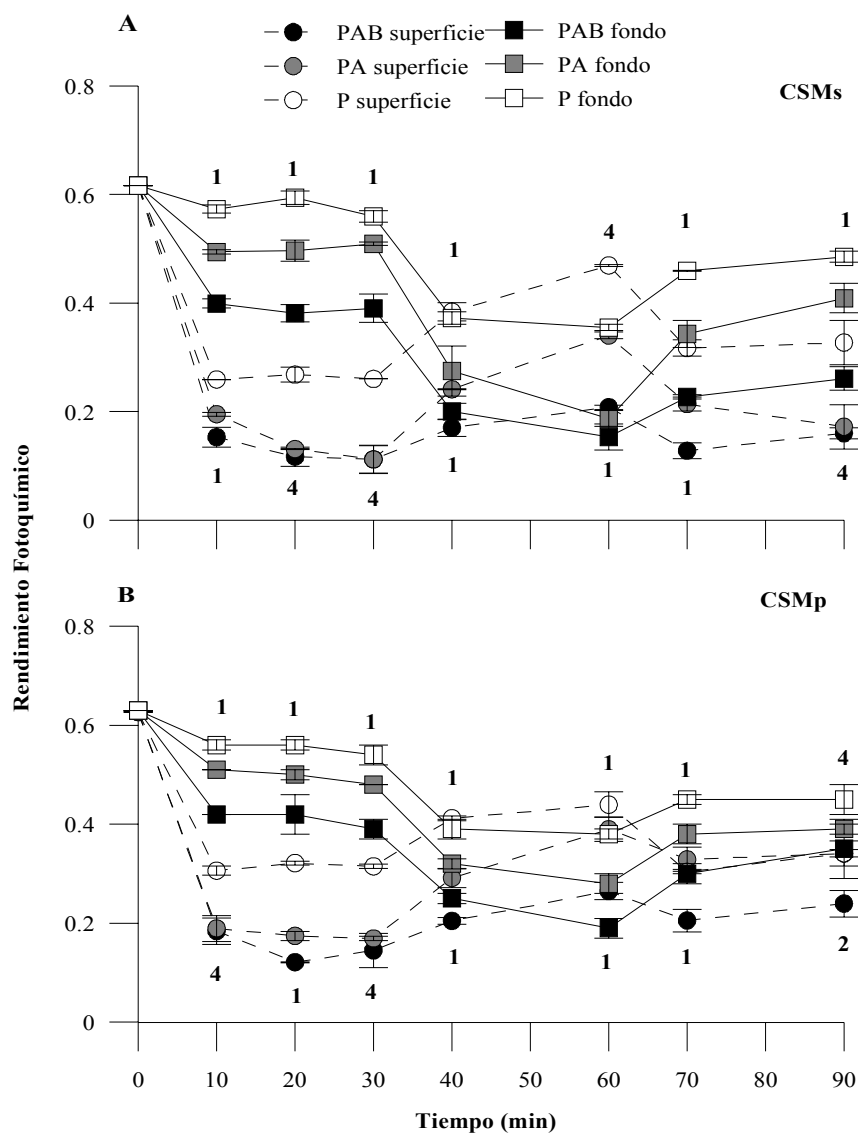
concentración más elevada de estos compuestos (altura de pico = 0,29). Por otro lado, *H. triquetra* presentó un pico dentro de este rango de longitud de onda pero de menor altura (altura de pico = 0,06), mientras que *G. chlorophorum* sólo presentó un pequeño pico (altura de pico = 0,008) lo cual estaría indicando la presencia de una muy baja concentración de estos compuestos potencialmente protectores en esta pequeña especie.



**Figura 1:** Espectro de absorción (DO [ $\mu\text{g clor-a}^{-1}$ ]) para las tres especies de dinoflagelados (*G. chlorophorum*, *H. triquetra* y *P. micans*) utilizados en la experimentación.

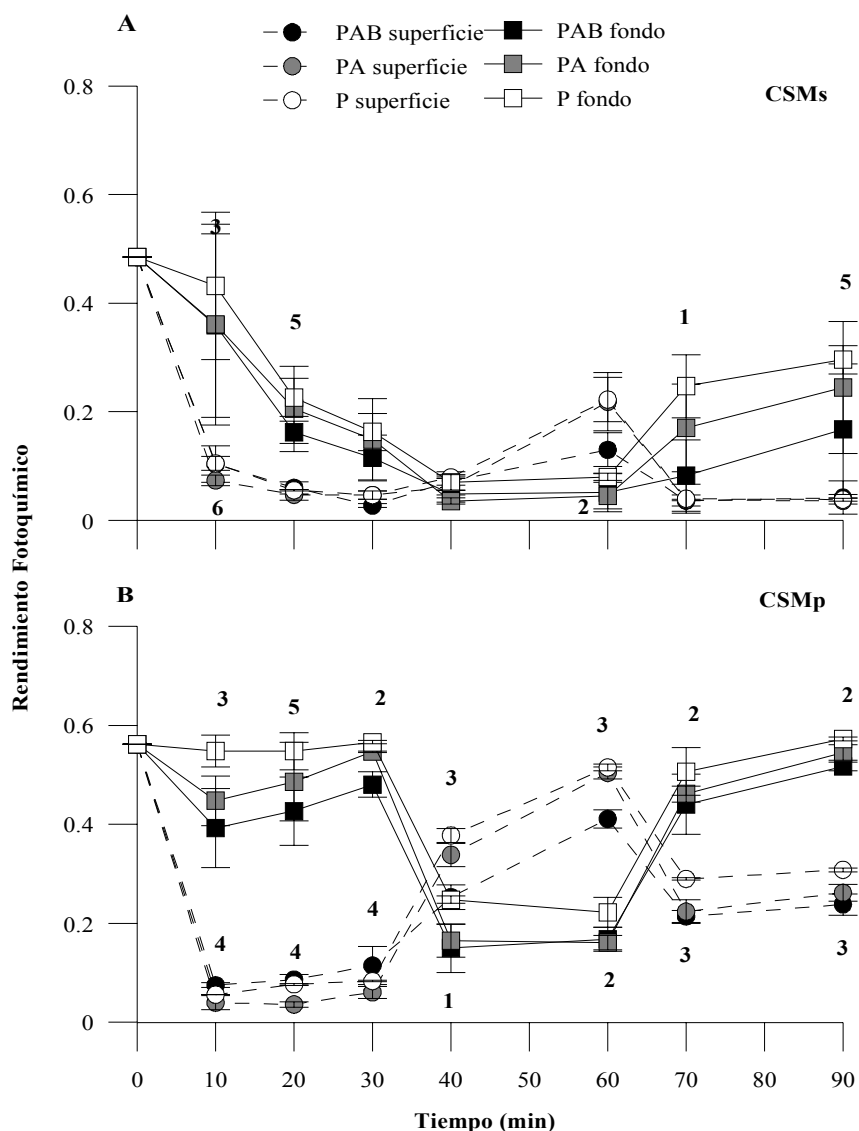
Las variaciones en el rendimiento fotoquímico (RF) en función del tiempo en *G. chlorophorum* se observan en la Figura 2. Durante los primeros 10 minutos se observó una significativa disminución en el RF, luego de que los organismos fueron expuestos desde la cámara de incubación a la radiación solar. Sin embargo, el RF se mantuvo aproximadamente constante durante los siguientes 20 minutos (Figura 2 A y B). Como se esperaba, la disminución fue más evidente en las muestras de superficie (círculos) que en las de profundidad (cuadrados). Luego de los 30 minutos de exposición, las mallas se invirtieron observándose una consiguiente respuesta de las células tanto aumentando como disminuyendo los valores del RF, seguidos de los cambios hacia bajas o altas irradiancias durante los 30-60 minutos (mitad del camino). Durante este período se observó una significativa recuperación en las muestras de superficie (círculos); sin embargo, ésta recuperación no fue completa y los valores del RF registrados se encontraron aún por debajo de los valores iniciales en 34, 55 y 76 % para CSMs y en 42, 62 y 70 % para CSMp para los tratamientos de radiación P, PA y PAB, respectivamente. Las muestras de fondo (cuadrados) presentaron una significativa inhibición comparando con los valores del RF registrados durante los primeros 30 minutos. Sin embargo, la disminución en los valores del RF fue significativamente menor durante los primeros 10 minutos comparado con los primeros 10 minutos de las muestras de superficie (círculos). Finalmente, durante los últimos 30 minutos de exposición (i.e., último paso del experimento) las muestras de fondo se recuperaron parcialmente, mientras que el RF en las de superficie presentó una pequeña disminución. Durante la exposición a la radiación solar se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos de radiación (i.e., PAB, PA y P) siendo los valores de RF significativamente menores en las muestras de PAB y PA en comparación con las muestras bajo el tratamiento P (ver símbolos en la Figura 2). El

comportamiento del RF, en general, fue similar en CSMs (Figura 2 A) y en CSMp (Figura 2 B); sin embargo, el efecto relativo de las distintas longitudes de onda (RUV-A y RUV-B) fue mayor en las CSMs (i.e., irradiancia mínima del 6 %) en comparación con las CSMp (i.e., irradiancias mínimas del 1,5 %), evidenciando de esta manera una alta foto-inhibición.



**Figura 2:** Valores medios de rendimiento fotoquímico, RF, (con su desviación estándar) en función del tiempo para *G. chlorophorum* bajo distintas condiciones de irradiancia: A) CSMs; B) CSMp. Las muestras de superficie están representadas por círculos y las muestras de fondo por cuadrados. Los porcentajes de irradiancias se cambiaron cada 30 minutos. Las líneas verticales representan el error estándar entre duplicados del mismo tratamiento. Los números sobre los símbolos se corresponden con las diferencias significativas encontradas entre tratamientos de radiación ( $p < 0.05$ ): 1) PAB-PA-P, 2) PAB-PA//PAB-P; 3) PAB-PA//PA-P; 4) PAB-P//PA-P; 5) PAB-P y 6) PA-P.

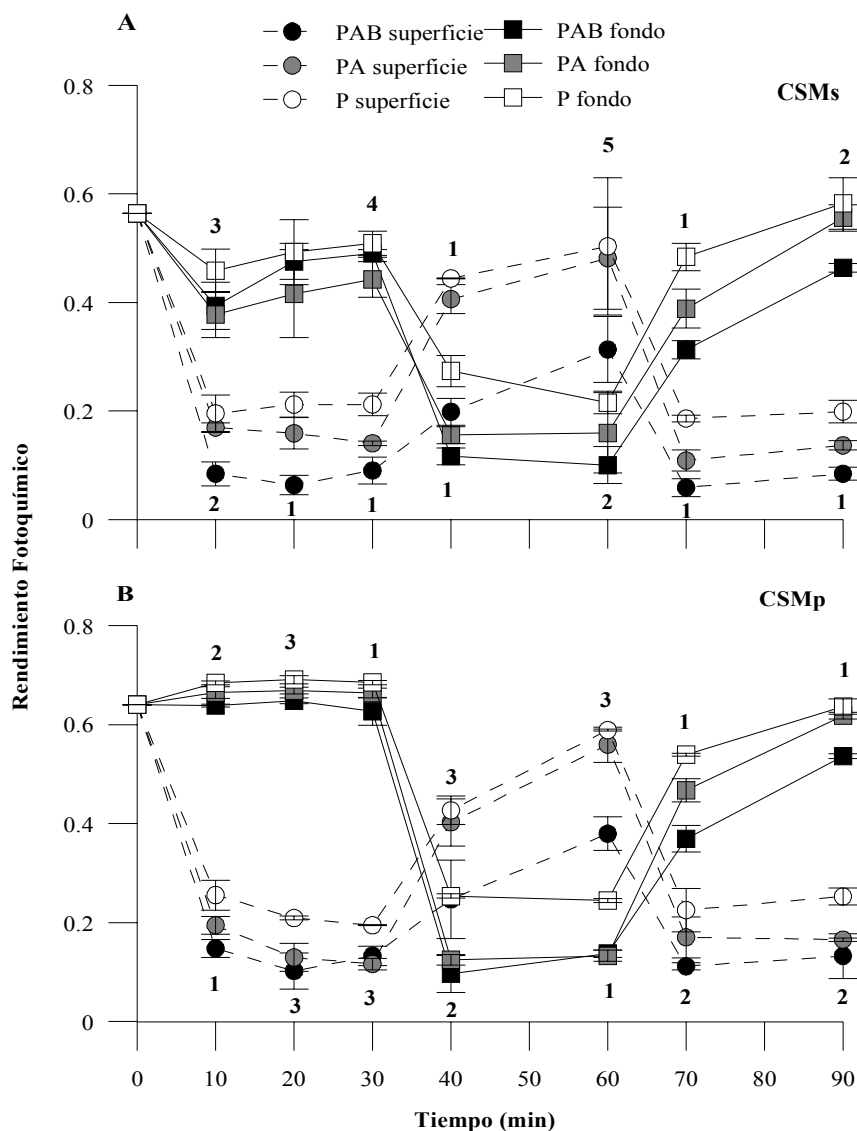
El RF para *H. triquetra* fue significativamente inhibido bajo condiciones simuladas de CSMs (Figura 3 A) durante los primeros 30 minutos de exposición; esta inhibición, sin embargo, fue más evidente en las muestras de superficie (círculos) en comparación con las de fondo (cuadrados). Los valores del RF registrados fueron muy bajos durante los siguientes 30 minutos (i.e., mitad del recorrido), aunque hubo un significativo aumento al final de este período en las muestras de superficie para los tratamientos P y PA. Una significativa disminución en el RF fue observada nuevamente en las muestras de superficie (círculos) al final del período de exposición, mientras que se registró una recuperación significativa, aunque no completa, en las muestras de fondo (cuadrados). El comportamiento de las muestras expuestas a CSMp (Figura 3 B) fue, sin embargo, significativamente diferente que lo observado en CSMs. Aunque la inhibición inicial de muestras de superficie fue equivalente a lo observado en CSMs (Figure 3 A), la recuperación durante el paso medio de la circulación fue significativamente mayor, alcanzando valores del RF cercanos a 0,4. Asimismo, durante el paso final del experimento, aunque se observó una disminución en los valores del RF, éstos fueron comparativamente mayores y cercanos a 0,3. En las muestras de fondo (cuadrados) sólo las expuestas a la RUV presentaron una disminución significativa del RF durante los primeros 10 minutos de exposición (Figura 3 B). Durante el paso medio del experimento se observó una disminución de los valores del RF, pero los organismos se recuperaron completamente a finales del período, alcanzando valores cercanos a 0,6, los cuales no fueron significativamente diferentes del tiempo inicial ( $t_{p0}$ ). El efecto relativo de las distintas longitudes de onda en el ultravioleta fue despreciable durante los experimentos para esta especie, siendo solo significativo en ciertos puntos a lo largo del experimento (ver símbolos en la Figura 3).



**Figura 3:** Valores medio de rendimiento fotoquímico, RF, (con sus desviaciones estándar) en función del tiempo para *H. triquetra* bajo distintas condiciones de irradiancia: A) CSMs; B) CSMp. Las muestras de superficie están representadas por círculos y las muestras de fondo están representadas por cuadrados. Los porcentajes de irradiancias se cambiaron cada 30 minutos. Las líneas verticales representan el error estándar entre duplicados del mismo tratamiento. Los números sobre los símbolos se corresponden con las diferencias significativas encontradas entre tratamientos de radiación ( $p < 0.05$ ): 1) PAB-PA-P, 2) PAB-PA//PAB-P; 3) PAB-PA//PA-P; 4) PAB-P//PA-P; 5) PAB-P y 6) PA-P.

*P. micans* presentó tendencias similares para ambas condiciones de mezcla (i.e., profundas y poco profundas) (Figura 4), con valores del RF relativamente altos y bajos vinculados a la posición dentro de la CSM simulada. En ambas condiciones de mezcla, y durante los primeros 30 minutos de experimentación, las muestras de fondo no presentaron diferencias significativas entre tratamientos de radiación. Sin embargo, las muestras de superficie fueron significativamente inhibidas por PAR y adicionalmente por RUV-A y RUV. Se encontraron diferencias significativas entre todos los tratamientos de radiación en CSMs durante la primera mitad del experimento. Entre los primeros 30-60 minutos de exposición, las muestras de fondo fueron significativamente

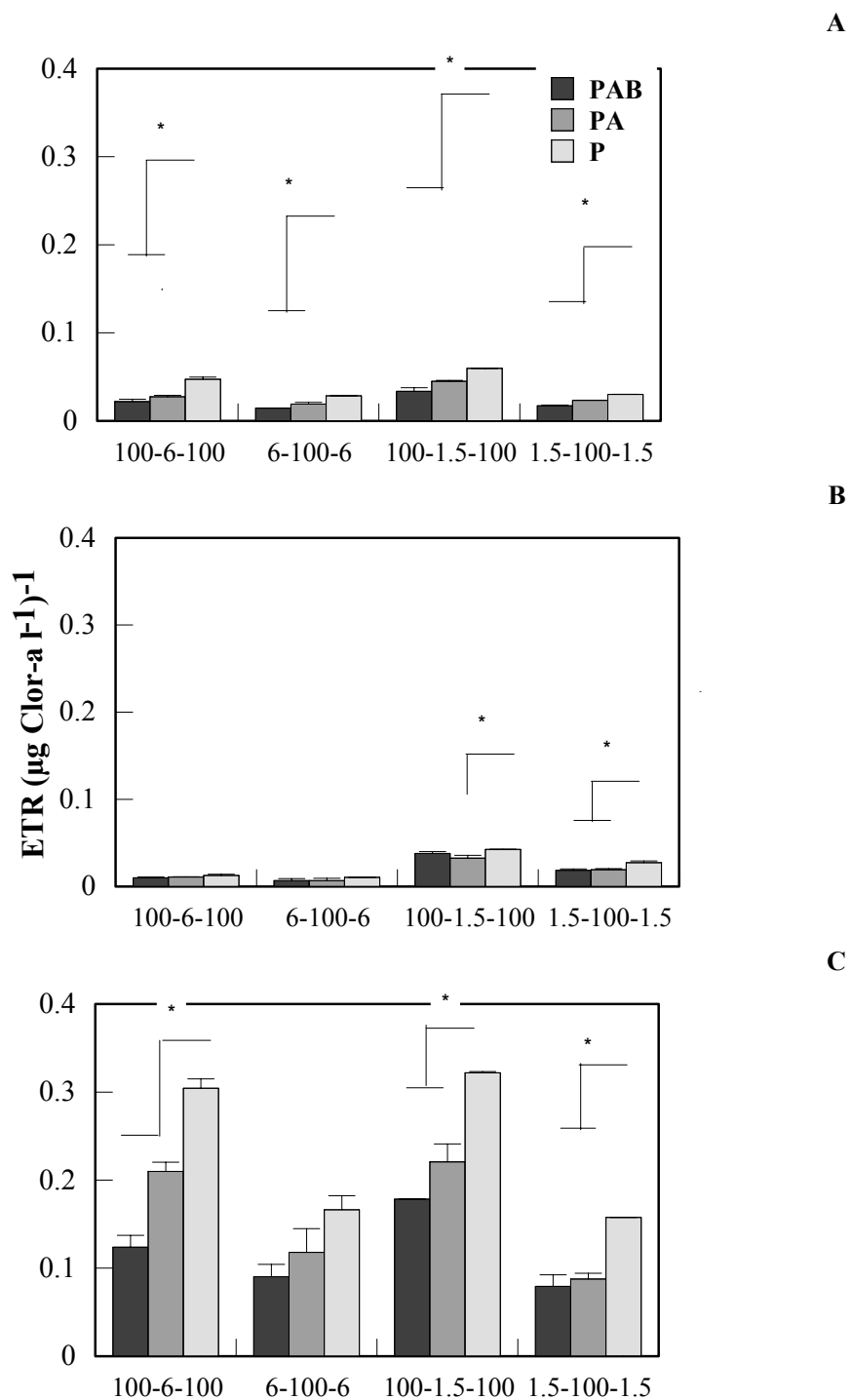
por altas irradiancias. Estas muestras, sin embargo, se recuperaron durante los últimos 30 minutos de exposición alcanzando valores de RF similares a los iniciales. Las muestras de superficie se recuperaron al ser expuestas a bajas irradiancias pero fueron inhibidas nuevamente los últimos 30 minutos de experimentación, en altas irradiancias. La inhibición fue similar a la observada luego de los 10 minutos de exposición, lo que sugiere que las células no presentaron una aclimatación significativa durante el experimento.



**Figura 4:** Valores medio de rendimiento fotoquímico, RF, (con su desviación estándar) en función del tiempo para *P. micans* bajo distintas condiciones de irradiancia: A) CSMs; B) CSMp. Las muestras de superficie están representadas por círculos y las muestras de fondo por cuadrados. Los porcentajes de irradiancias se cambiaron cada 30 minutos. Las líneas verticales representan el error estándar entre duplicados del mismo tratamiento. Los números sobre los símbolos se corresponden con las diferencias significativas encontradas entre tratamientos de radiación ( $p < 0.05$ ): 1) PAB-PA-P, 2) PAB-PA//PAB-P; 3) PAB-PA//PA-P; 4) PAB-P//PA-P; 5) PAB-P y 6) PA-P.

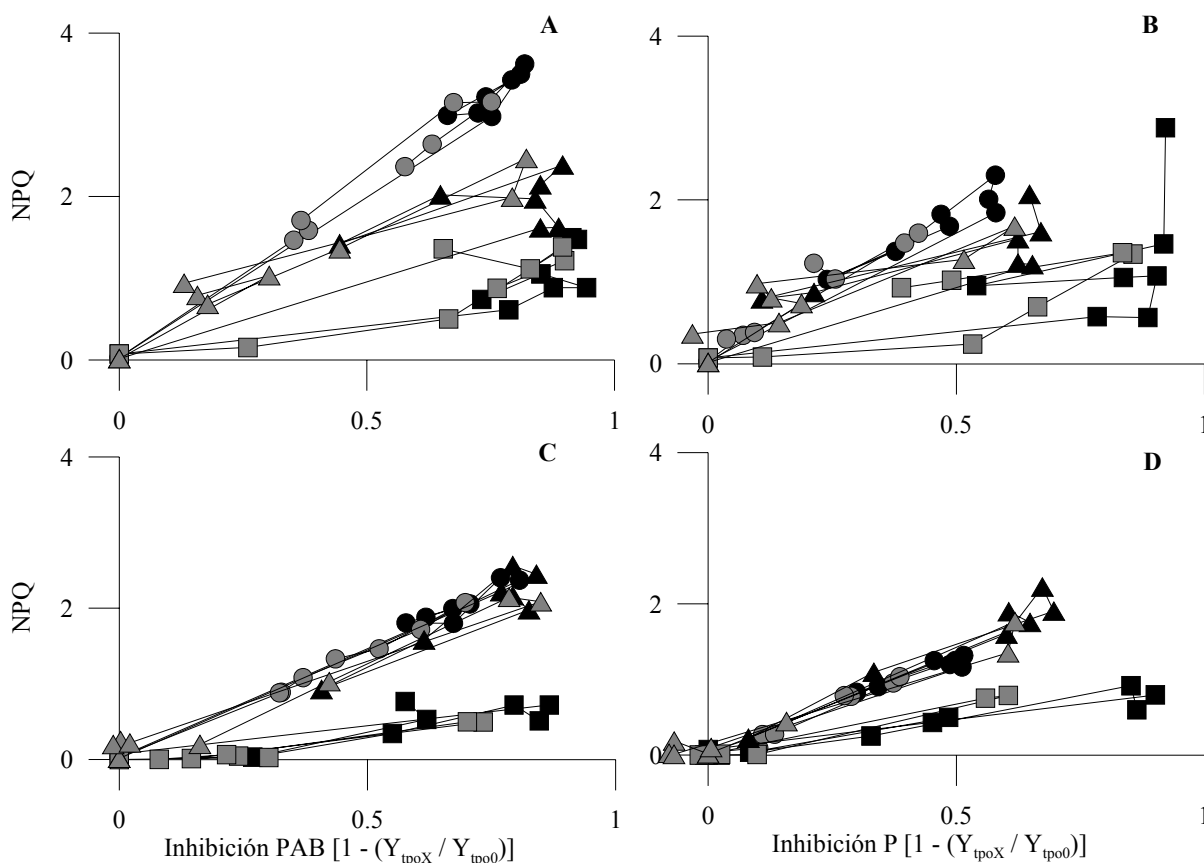
Durante los recorridos, las especies aclimataron el RF a fin de optimizar el rendimiento de su aparato fotosintético. Por tal motivo, se comparó el ETR integrado, normalizado por la concentración de clor-a (Figura 5) para cada especie, durante cada condición de mezcla simulada. *G. chlorophorum* presentó valores intermedios de ETR integrado en comparación con las otras dos especies (Figura 5 A); asimismo, las muestras de superficie presentaron los mayores valores de ETR integrado, y dentro de éstas, los mayores valores registrados se observaron dentro de CSMP. Por otro lado, *H. triquetra* presentó valores mínimos de ETR integrado, siendo los menores en las muestras que han circulado dentro de CSMPs en comparación de la CSMP (Figura 5 B). Finalmente, se observó que *P. micans* presentó valores máximos de ETR integrados (Figura 5 C), en comparación con las otras dos especies. Se encontraron diferencias significativas entre los valores de ETR integrados entre tratamientos de radiación dentro de cada situación de mezcla para *G. chlorophorum* (Figura 5 A) y *P. micans* (Figura 5 C), observándose que la mayor inhibición del RF es causada por la RUV-A. En *H. triquetra*, el mayor efecto en el rendimiento fotoquímico fue inducida por PAR, que inhibe casi todo el ETR en CSMPs (i.e., irradiancia mínima del 6%).





**Figura 5:** Valores de tasa de transporte electrónico (ETR) integrados normalizados por la dosis y la concentración inicial de clor-a ( $\mu\text{g clor-a l}^{-1}$ ) para las 3 especies: A) *G. chlorophorum*, B) *H. triquetra* y C) *P. micans* en cada tratamiento de radiación. Las líneas verticales corresponden a la desviación estándar para cada tratamiento. Las líneas y asteriscos sobre las barras representan diferencias significativas entre tratamientos de radiación.

La disipación de la energía excedente, expresada como disipador no fotoquímico, en función de la inhibición con respecto al tiempo cero bajo distintas longitudes de onda (toda la radiación “PAB” y solo PAR) está presentada en la Figura 6. Al comparar el NPQ con la inhibición en cada punto respecto al tiempo inicial [ $1 - (Y_{tpox} / Y_{tpo0})$ ], bajo los tratamientos PAB (Figura 6 A, C) y P (Figura 6 B, D), se observó diferencias en la relación entre ambas variables (i.e., distintas tasas de vinculación entre variables). Las mayores tasas se obtuvieron para las muestras que se movieron en CSMs bajo el tratamiento PAB luego de haber sido calculadas las correspondientes regresiones lineales (Tabla 1). Dentro de CSMs (Figura 6, A y B), se observa que *G. chlorophorum* presentó las mayores relaciones tanto para muestras de superficie (círculos negros) como para las muestras de fondo (círculos grises). *P. micans* presentó, por otro lado, tasas intermedias para ambas condiciones de mezcla (Figura 6, A y B, triángulos), mientras que *H. triquetra* registró las menores tasas para ambas condiciones (Figura 6, A y B, cuadrados), destacándose asimismo, que esta especie presenta los mayores porcentajes de inhibición. Para las condiciones de mezcla profunda (Figura 6, C y D), se observó que *G. chlorophorum* y *P. micans* presentaron tasas similares tanto para muestras de superficie como de profundidad, siendo mayores tanto los valores de NPQ como el porcentaje de inhibición registrados para *P. micans*. Por otro lado, *H. triquetra* presentó las menores tasas entre ambas variables aún presentando los mayores porcentajes de inhibición durante ambos procesos (Figura 6, A y B, cuadrados).



**Figura 6:** Tasas medias de Non-photochemical quenching (NPQ) en relación a la inhibición de cada punto con respecto al tiempo inicial [ $1 - (Y_{tpox} / Y_{tpo0})$ ], registrada bajo los tratamientos PAB (Figura A y C) y P (Figura B y D). A) CSMs bajo tratamiento PAB, B) CSMs bajo el tratamiento P, C) CSMp bajo el tratamiento PAB, D) CSMp bajo el tratamiento P. Los símbolos negros representan muestras de superficie, mientras que los colores grises representan muestras de fondo. Los círculos corresponden a *G. chlorophorum*, los cuadrados a *H. triquetra* y los triángulos a *P. micans*.

Al calcular las tasas entre el NPQ y la inhibición (Tabla 1) para estos dos tratamientos de radiación (i.e., P y PAB) se observó que *H. triquetra* fue la especie que presentó las menores tasas en todos los casos, siendo mayores bajo el tratamiento P. Por otro lado, *P. micans* no presentó diferencias evidentes tanto entre tratamientos como entre movimientos y finalmente, *G. chlorophorum* presentó las mayores tasas cuando se expuso al tratamiento PAB.

		Tratamientos					
		P			PAB		
		Especies					
Tipo de CSM simulada	Tipo de muestra	<i>G. chlorophorum</i>	<i>P. micans</i>	<i>H. triquetra</i>	<i>G. chlorophorum</i>	<i>P. micans</i>	<i>H. triquetra</i>
CSM somera	Superficie	3,6	2,4	1,5	4,3	2,4	1,2
	Fondo	4	2,9	1,5	4,3	2,9	1,36
CSM profunda	Superficie	2,5	2,9	0,9	3	2,77	0,8
	Fondo	2,6	2,5	1,3	2,9	2,54	0,6

**Tabla 1:** Tasas entre el NPQ y la inhibición en cada muestreo respecto al tiempo inicial [ $1-(Y_{\text{tpox}} / Y_{\text{tpo0}})$ ] bajo dos tratamientos de radiación (P y PAB) para las tres especies utilizadas en la experimentación.

## Discusión

En este trabajo se evaluó el rendimiento fotoquímico de tres dinoflagelados marinos - *Gymnodinium chlorophorum*, *Heterocapsa triquetra* y *Prorocentrum micans*- circulando dentro de una capa superficial de mezcla simulada (CSM). Las condiciones experimentales implementadas tenían el objetivo de simular cambios abruptos en el régimen de irradiancias (i.e., calidad y cantidad), los cuales usualmente ocurren de manera similar en la zona costera Patagónica debido a la presencia de nubes y eventos de intensa mezcla vertical producida por fuertes vientos seguidos de momentos de calma (Helbling et al., 2005). Este tipo de estudios, los cuales incluyen los efectos de la radiación solar, especialmente la radiación ultravioleta (RUV) en ambientes de alta mezcla, son muy escasos (ver revisión Neale et al., 2003), por lo cual los datos presentados en este trabajo no son solo importantes a escala regional, sino que también proveen nuevos resultados sobre los efectos y aclimatación de especies fitoplanctónicas a la RUV cuando son expuestas a regimenes de irradiancia fluctuante. En los siguientes párrafos se discutirán los factores que pueden influir en las respuestas observadas, así como también las potenciales implicancias ecológicas para el área de estudio.

La reducción de la tasa de fotosíntesis, (i.e., proceso de fotoinhibición, Osmond, 1994) es un mecanismo que se observa comúnmente en la mayoría de los organismos autótrofos –plantas terrestres superiores (Caldwell et al., 1995), macroalgas (Hanelt, 1996) y en el fitoplancton (Marwood et al., 2000). La fotoinhibición es mayormente causada por altos niveles de PAR, pero sin embargo en algunos casos (e.g., si los niveles de PAR son bajos), la RUV puede reducir significativamente la tasa fotosintética. Existen dos tipos de procesos de fotoinhibición: fotoinhibición crónica, debido a la degradación de la proteína D1, componente estructural de los fotosistemas, y la inhibición dinámica, un mecanismo protector a través del cual los organismos disipan el exceso de energía a fin de prevenir el fotodaño (Hanelt, 1996). En general, el grado de fotoinhibición depende de varias variables, incluyendo la sensibilidad diferencial de las especies, así como también los niveles de radiación que reciben las células. Los resultados de este trabajo se

realizaron bajo condiciones de irradiancias comparables, por lo cual se focalizó en los factores de respuesta específicos de estas tres especies de dinoflagelados marinos.

Un factor importante que afecta la respuesta diferencial de las especies es el tamaño celular, el cual tiene variadas implicancias ecológicas para el fitoplancton. Por ejemplo, los efectos de la RUV son dependientes del tamaño celular y afecta diferencialmente el aparato fotosintético y la molécula de ADN (Helbling et al., 2001a). Las células pequeñas son más vulnerables a la RUV cuando se evalúa el daño en el ADN, pero, sin embargo, son más resistentes cuando se estudia la inhibición fotosintética (Helbling et al., 2001a, b, c; Buma et al., 2003). En los resultados de este Capítulo se encontró que el rendimiento fotoquímico de la pequeña especie *G. chlorophorum* (5  $\mu\text{m}$ ) fue significativamente inhibido por la RUV bajo las distintas condiciones de mezcla simulada (Figura 2). Más aún, la inhibición fue la máxima registrada (i.e., aproximadamente del 40 % debido a RUV) cuando se comparó con las otras dos especies; sin embargo, esta inhibición disminuyó cuando la mezcla simulada se profundizó. *G. chlorophorum* presentó una muy rápida recuperación, la cual se relacionó con los mecanismos de disipación de energía (i.e., NPQ), ya que éste aumentaba a medida que se incrementaba la inhibición del RF (Figura 4). Estas respuestas a corto tiempo coinciden con otros resultados obtenidos previamente en lagos de la zona cordillerana patagónica (Helbling et al., 2001b), los cuales demuestran una rápida respuesta en la aclimatación de células nanoplanctónicas (i.e., menores a 20  $\mu\text{m}$ ). Por otro lado, la especie más grande *P. micans* (50  $\mu\text{m}$ ), presentó una inhibición por RUV de alrededor del 25%, la cual fue relativamente constante a pesar de las distintas condiciones de mezcla simuladas (Figura 4). En contraste con los mecanismos de disipación de energía de *G. chlorophorum*, las estrategias de *P. micans* aparentemente podrían haber estado relacionadas más con la síntesis de compuestos que absorben en la región de RUV –como se observa comparativamente en sus características espectrales (Figura 1)- en comparación con la disipación de la energía excedente, ya que el NPQ fue relativamente constante y pequeño (Figura 6). La presencia de compuestos que absorben en la región del ultravioleta en especies microplanctónicas ha sido estudiada ampliamente (García-Pichel, 1994). Sin embargo, es importante destacar que otros estudios realizados con *P. micans* (Lesser 1996) han demostrado que aunque posee relativamente altas concentraciones de compuestos protectores, ésta no fue suficiente para prevenir el daño por RUV en las células, ya que fueron afectadas significativamente por estrés oxidativo. Por tal motivo, futuros estudios deberían realizarse con el objetivo de evaluar la importancia y condiciones bajo las cuales estos compuestos son sintetizados y utilizados por las células, a fin de prevenir el daño inducido por RUV.

*H. triquetra* (20  $\mu\text{m}$ ), presentó concentraciones intermedias de compuestos que absorben en la región de RUV (Figura 1). Sin embargo, fue la especie que registró los menores efectos por RUV, aunque tuvo la mayor inhibición por PAR (92%) en el RF (Figura 3 y 5). Estos resultados se encuentran relacionados con estudios previos, los cuales han demostrado una importante relación inversa entre una alta inhibición por PAR y el efecto de RUV, por lo cual cuando las células fueron expuestas a altos niveles de PAR la contribución de RUV en la inhibición fue relativamente pequeña (Villafañe et al., 2004). Asimismo, esta especie presentó las relaciones más pequeñas entre NPQ vs. inhibición (Figura 6), sugiriendo que este mecanismo no es el más utilizado por esta especie en la disipación de energía en un ambiente de irradiancia fluctuante. Esta especie presentó cierta inhibición crónica cuando fue expuesta dentro de CSMs, pero se recuperó significativamente en CSMp.

En resumen, los resultados de este Capítulo sugieren que tanto *G. chlorophorum* como *P. micans* podrían sobreponerse a los cambios en el régimen de irradiancia, tanto en CSMs como CSMp. Por otro lado, *H. triquetra* presentó un mejor rendimiento fotoquímico bajo condiciones de mezcla profunda, sugiriendo no sólo su alta sensibilidad sino también sus aparentemente limitados mecanismos de disipación de la irradiancia en exceso. Asimismo, las diferencias en el proceso de aclimatación encontradas entre estas especies podrían dar indicios que dentro de un

ambiente lumínico fluctuante las especies más pequeñas podrían responder más rápidamente al cambio de irradiancias. En la zona de Bahía Engaño se observa la presencia de pequeños dinoflagelados durante la época de mayor radiación (Villafañe et al., 2004a; Helbling et al., 2005). Este trabajo podría sugerir que si las especies pequeñas dominan la comunidad fitoplanctónica en verano es porque podrían poseer algún mecanismo de disipación y / o reparación del daño mucho más efectivo que especies más grandes (i.e., microplanctónicas).

*Aclimatación del fitoplancton del estuario del Río Chubut (Chubut, Argentina) a distintas condiciones de irradiancias*

**Resumen**

El objetivo de este trabajo fue evaluar la variación en la eficiencia fotosintética del fitoplancton marino del estuario del río Chubut (Rawson, Chubut, Argentina; 43° S – 65° O). Las muestras fueron colectadas durante el periodo comprendido entre Abril y Agosto de 2005 con una frecuencia de aproximadamente 15 días entre muestreos. Las muestras fueron expuestas a distintas condiciones de radiación: a) *Régimen de irradiancia fija*: exposición a la máxima radiación solar, simulando condiciones en superficie, desde las 9 a las 17 horas, y b) *Régimen de irradiancia variable*: se establecieron dos profundidades de mezcla: i) Capa superficial de mezcla somera,  $CSMs = Z_{CSM} / Z_{Eu} = 0,6$ , y ii) Capa superficial de mezcla profunda  $CSMp = Z_{CSM} / Z_{Eu} = 0,91$ . Dentro del régimen variable de irradiancia se simularon dos movimientos de mezcla: 1) muestras que comenzaban en superficie a máxima irradiancia (“Superficie”), y 2) muestras que comenzaban a bajas irradiancias (“Fondo”). Las condiciones fluctuantes de irradiancias se lograron utilizando mallas de densidad neutra, a fin de alcanzar la atenuación deseada en cada profundidad de mezcla. Para ambos experimentos, no sólo se estudió el efecto de la cantidad de radiación recibida sino también de la calidad, para lo cual se utilizaron tres tratamientos de radiación: PAB (RUV + PAR, 280-700nm); PA (RUV-A + PAR, 320-700) y P (solo PAR, 400-700 nm). La eficiencia fotosintética se midió como rendimiento fotoquímico a través de la fluorescencia de amplitud de pulso (Water-PAM, Walz). Los resultados obtenidos muestran que el fitoplancton de la zona presentó una respuesta diferencial a las condiciones de radiación. Las muestras dominadas en su mayoría por células microplantónicas presentaron menor inhibición en su rendimiento fotoquímico en condiciones extremas de radiación, en comparación con muestras con mayor porcentaje de células nanoplantónicas. Bajo condiciones de radiación fluctuante no se encontraron diferencias significativas entre muestras de superficie y profundidad dentro de una misma CSM, cuando se compararon los valores de ETR integrado por la dosis diaria; sin embargo, sí se observaron diferencias significativas al comparar CSM (i.e., poco profundas y profundas), siendo mayores los ETR para muestras de CSMs. Al comparar los ETR integrados entre una condición de irradiancia fija y las distintas condiciones de irradiancias fluctuantes, se observó que para los tres tratamientos de radiación (i.e., PAB, PA y P), los ETR de irradiancias fijas fueron menores que los calculados bajo irradiancias fluctuantes. De estos resultados se puede sugerir que condiciones de irradiancias fluctuantes favorecen el rendimiento fotoquímico del fitoplancton, permitiendo la recuperación de su aparato fotosintético a bajas irradiancias reflejándose en un mayor su rendimiento fotosintético integrado.

**Introducción**

El rendimiento fotosintético del fitoplancton es afectado significativamente por el régimen de irradiancias al cual se encuentra expuesto (Helbling & Zagarese, 2003). Debido a sus requerimientos fisiológicos ligados con la energía solar el fitoplancton se encuentra confinado a la primera capa de la columna de agua, una zona de temperatura y salinidad homogéneas llamada capa superficial de mezcla (CSM). El proceso de mezcla vertical generado por la intensidad del viento y la temperatura en superficie (Neale et al., 2003) provoca un desplazamiento del fitoplancton en la columna de agua en distintas direcciones y velocidades, alterando su exposición a la radiación solar (i.e., periodos de calma y periodos de turbulencia). En la columna de agua, las fluctuaciones en los parámetros físicos como la mezcla vertical (i.e., variaciones en la profundidad de la CSM), y ópticos (i.e., atenuación de la radiación con la profundidad), determinan la cantidad y calidad de radiación que recibe un organismo en su ambiente natural. El efecto combinado entre la mezcla vertical y la radiación solar, especialmente la RUV, afecta la producción primaria del

fitoplancton (Helbling et al., 1994; Neale et al., 1998; Köhler et al., 2001; Capítulo 2), siendo la velocidad de mezcla vertical un importante factor al determinar la tasa de fotosíntesis (Helbling et al., 2003).

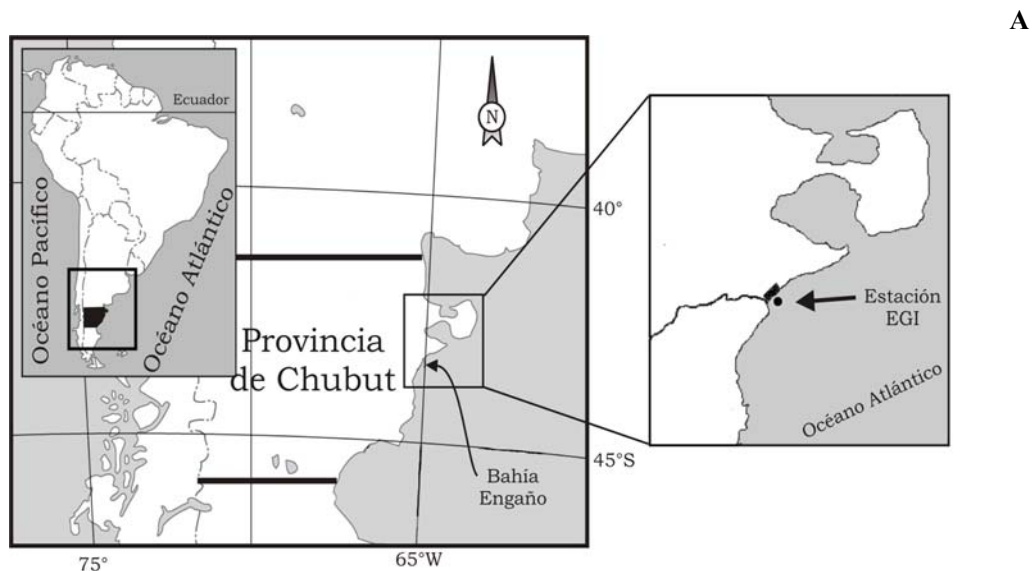
Estudios previos han demostrado que la sensibilidad de poblaciones fitoplanctónicas varía a lo largo del año (Banaszak y Neale, 2001; Villafañe et al., 2004 a,c; Helbling et al., 2005), evidenciándose que la RUV puede afectar procesos fisiológicos, contribuyendo así a cambios en la comunidad fitoplanctónica (Bothwell et al., 1994). Esta sensibilidad diferencial a lo largo del año está relacionada con las variaciones estacionales en los parámetros atmosféricos, los cuales alteran principalmente las condiciones de radiación a las cuales se expone el fitoplancton. En particular, la zona de estudio (Rawson – Chubut, 43° S – 65° O) se caracteriza por presentar un escenario muy variable e interesante en trabajos de fotobiología (Villafañe et al., 2001; Helbling et al., 2005). El fitoplancton de la zona se ve expuesto a distintas condiciones de RUV, ya que las concentraciones de ozono estratosférico varían por ser una zona afectada indirectamente por el agujero de ozono, debido a su cercanía geográfica (Orce et al., 1997; Villafañe et al., 2001; Helbling et al., 2005). Por otro lado, y como consecuencia de la desembocadura del río Chubut en Bahía Engaño, las características ópticas de la columna de agua fluctúan de acuerdo a la carga de sedimentos que son vertidos en su desembocadura (i.e., variación en la atenuación de la radiación solar con respecto a la profundidad). Por lo tanto, es una zona que presenta una alta variabilidad en las características climatológicas, presentando variaciones en la cobertura de nubes y períodos de fuertes vientos (i.e., primavera), variando de esta manera la profundidad de la CSM y el campo lumínico al cual es expuesto el fitoplancton. En cuanto a las características biológicas, el fitoplancton de la zona, presenta un ciclo anual característico, con floraciones durante el invierno de hasta 124  $\mu\text{g}$  clor  $\text{l}^{-1}$  (Capítulo 2; Villafañe et al., 2004a), dominadas por la diatomea microplantónica *Odontella aurita*. En relación con esta variabilidad, la sensibilidad del fitoplancton a la radiación solar también varía a lo largo del año (Capítulo 2; Villafañe et al., 2004; Helbling et al., 2005). En los trabajos realizados por Villafañe y colaboradores (2004a,c) se ha observado que las floraciones microplantónicas de invierno son las que presentaron menor inhibición absoluta de la fotosíntesis aunque estas células fueron más sensibles a la RUV, especialmente a la RUV-B, en comparación con células del pre y post-bloom. Por estas razones, la zona se presenta como un interesante escenario de estudio de respuestas rápidas de aclimatación del aparato fotosintético frente a cambios en las condiciones de radiación solar.

Si bien se ha estudiado el efecto de la radiación solar en la fotosíntesis del fitoplancton, en este Capítulo se propuso estudiar específicamente la respuesta de la fase fotoquímica (e.g. variaciones en el rendimiento fotoquímico), comparando muestras fitoplanctónicas con distintas características (i.e., Abril-Agosto). El objetivo principal fue determinar la influencia del régimen de irradiancia en el rendimiento fotoquímico y los mecanismos de aclimatación del fitoplancton de la zona de Bahía Engaño.

### **Materiales y métodos**

En la zona de estudio, tanto en el estuario como en la bahía, se han realizado algunas investigaciones enfocadas en el estudio de las características físicas, principalmente dentro del estuario (Perillo et al., 1987; 1989; Helbling et al., 1992a), como así también de la dinámica del fitoplancton y su relación con las condiciones ambientales (i.e. parámetros físicos, químicos y atmosféricos) (Orfila et al., 1987; Villafañe et al., 1991; Helbling et al., 1992a; Santinelli & Esteves, 1993; Ayestarán & Sastre, 1995; Sastre et al., 1998). Los estudios que determinaron el ciclo anual del fitoplancton dentro del estuario del Río Chubut se han realizado periódicamente desde el año 1999 hasta el 2002, momento en el cual se comenzó en la zona de estudio una reestructuración y ampliación del Puerto de Rawson, siendo el lugar de muestreo afectado por dicha construcción.

Las muestras utilizadas para la experimentación desarrollada en este Capítulo fueron colectadas quincenalmente en el estuario del Río Chubut desde la escollera vieja (Foto 1). Si bien se colectaron muestras quincenalmente, se realizaron dos tipos de experimentos (ver sección experimentación), por lo cual se observará que existen muestras de dos días consecutivos cada 15 días.



**Foto 1:** A) Mapa indicando la estación de muestreo “EGI” y la zona de experimentación, donde se llevaron a cabo los trabajos (Bahía Engaño, Rawson – Chubut, 43° S – 65° O). B) Foto en la que se observa la desembocadura del Río Chubut y la escollera norte que canaliza, junto a la escollera sur (la cual no se logra observar en la fotografía), la salida del río al mar. Entre ambas escolleras se encuentra la escollera vieja, sobre la cual se halla la estación de muestreo EGI.



Durante el período fines de Abril - principio de Agosto de 2005 se tomaron muestras de superficie en la zona de muestreo para ser utilizadas en los experimentos que se detallan a continuación, como así también para determinar las variaciones en la composición taxonómica y características de absorción (ver sección mediciones y determinaciones), registrándose al momento del muestreo la temperatura superficial. Las muestras fueron colectadas en marea alta el día anterior a cada uno de los experimentos utilizando un bidón previamente lavado con ácido clorhídrico (1 N HCl). Es importante aclarar que se eligieron las mareas cuya pleamar fuera alrededor de las 21-23 horas, con el fin de mantener la historia lumínica del fitoplancton previo a la experimentación. Las muestras fueron llevadas inmediatamente al laboratorio de la Estación de Fotobiología Playa Unión (EFPU, distante 5 minutos desde el lugar de muestreo), donde se mantuvieron a temperatura constante dentro de una cámara de incubación a 18 °C, y en oscuridad hasta el momento de la experimentación.

### **Experimentación:**

La respuesta fotosintética del fitoplancton de Bahía Engaño fue evaluada utilizando técnicas de fluorescencia de amplitud de pulso (ver detalles en Capítulo 4), determinando la tendencia en la respuesta bajo dos condiciones de irradiancia. Las condiciones experimentales implementadas fueron: A) Irradiancias fijas: las muestras se expusieron a condiciones de máxima irradiancia, simulando condiciones de superficie en la columna de agua, y B) Irradiancias fluctuantes: las muestras se expusieron a un régimen de irradiancias variables simulando (i.e., con la utilización de mallas de densidad neutra) un rápido desplazamiento del fitoplancton en la columna de agua. Asimismo, se determinó la influencia de las distintas bandas energéticas en el rendimiento fotoquímico en ambos experimentos.

#### *A) Irradiancias fijas:*

Las muestras fueron colocadas en tubos de cuarzo de 50 ml y expuestas a la radiación solar bajo tres tratamientos de radiación, realizados por duplicado: a) **PAB**: RUV + PAR (280-700 nm), b) **PA**: RUV-A + PAR (320-700 nm) y c) **P**: solo PAR (400-700 nm). Los tratamientos de radiación fueron logrados como se detalla en los Capítulos anteriores. Las muestras fueron colocadas en una bandeja de aluminio anodizado y expuestas a la radiación solar desde las 9:00 hasta las 17:00 h. en un baño de agua, a fin de mantener la temperatura constante y similar a la del ambiente durante todo el período de experimentación. Se tomaron muestras cada hora para cada tratamiento de radiación con el objetivo de determinar la variación en el rendimiento fotoquímico, como se detalla en la sección de análisis y determinaciones. Asimismo, las muestras de las 13:00 y de las 17:00 h. fueron colocadas en la oscuridad y su recuperación (RF) fue medido cada hora.

#### *B) Irradiancias fluctuantes:*

Con el objetivo de determinar la respuesta y la capacidad de aclimatación al cambio rápido de irradiancia se realizaron experimentos en los que se simuló un régimen de irradiancias fluctuantes. Para lograr este régimen se utilizaron distintas atenuaciones de la irradiancia: a) máxima irradiancia (i.e., 100% de radiación), y b) dos porcentajes de irradiancias mínimas (i.e., 6 y 1,5% de la irradiancia máxima en superficie). Utilizando éstas intensidades máximas y mínimas se establecieron dos CSM: a) Capa Superficial de Mezcla somera (CSMs), en la cual las intensidades fueron de 100-6-100 % de irradiancia (llamadas “superficie”; CSMss) y 6-100-6 % de irradiancia (llamadas “fondo”, CSMsf), y b) Capa Superficial de Mezcla profunda (CSMp), en la cual las intensidades fueron de 100-1,5-100 % de irradiancia (llamadas “superficie”, CSMps) y 1,5-100-1,5 % de irradiancia (llamadas “fondo”, CSMpf). La CSMs simula una mezcla vertical en profundidad de 2,8 profundidades ópticas (i.e., profundidad óptica se define como  $(K_d * Z)$ , donde  $K_d$  es el coeficiente de atenuación y Z la profundidad), mientras que la CSMp simula una mezcla vertical en profundidad de 4,2 profundidades óptica, estableciendo aproximadamente una mezcla vertical de toda la zona eufótica.

Los movimientos dentro de cada CSM simulada fueron los siguientes: en CSMs, el fitoplancton se expuso comenzando al 100 % o al 6 % de irradiancia, durante 30 minutos (i.e., cada tratamiento de calidad de radiación, por duplicado, recibió ambas intensidades). Luego de este tiempo se invirtieron las irradiancias (i.e., el fitoplancton que estaba recibiendo el 100 % de irradiancia comenzó a recibir el 6 %, mientras que el que estaba recibiendo el 6 % comenzó a recibir el 100 % de irradiancia), durante otros 30 minutos. Finalmente, se invirtieron nuevamente las irradiancias llegando a los porcentajes de irradiancia iniciales, durante otros 30 minutos. Este mismo movimiento se realizó para CSMp, siendo la intensidad mínima en este caso de 1,5 %. Los cambios en la intensidad de irradiancia se lograron utilizando diferentes capas de mallas de densidad neutra y el intervalo discreto de cada paso fue de 30 minutos, por lo que el tiempo total de cada experimento fue de 90 minutos (alta-baja-alta irradiancia y viceversa).

### **Análisis y determinaciones:**

**Mediciones fluorométricas:** Los parámetros fluorométricos se determinaron utilizando un fluorómetro de pulso (Water-PAM, Walz), como se explicó en detalle en el Capítulo 4. Las mediciones ( $n = 4$ ) se realizaron al comienzo ( $t_{p0}$ ) y cada hora para los experimentos A y cada 10 minutos para experimentos B. Sin embargo, la única diferencia entre las mediciones realizadas en este Capítulo con respecto al Capítulo 4 reside en que en éstas no se pudo determinar la absorbancia de las muestras naturales ya que al tener una mezcla de especies de tamaños celulares distintos es difícil determinar cuánto absorben las distintas porciones de tamaños.

**Daño crónico:** Es el daño fisiológico irreparable causado en la célula por la radiación solar. El daño crónico (DC) se calculó luego del período de oscuridad para las muestras de las 17:00 horas en comparación con el tiempo inicial, utilizando la siguiente fórmula:  $[(Y_0 - Y_{osc17})/Y_0] * 100$ .

**Pigmentos:** Las muestras de volumen variable, dependiendo de la biomasa y cantidad de sedimentos en suspensión, se filtraron (10 mm Hg) en filtros de fibra de vidrio Whatman GF/F de 25 mm de diámetro. Se tomaron muestras para determinar pigmentos de la fracción total de la comunidad, como así también para determinar el aporte independiente de la fracción menor a 20  $\mu\text{m}$  (utilizando una malla Nitex®). El filtro conteniendo la muestra de fitoplancton se colocó en un tubo de policarbonato de 15 ml y se le agregó 7 ml de metanol absoluto para realizar la extracción de pigmentos (Holm-Hansen & Riemann, 1978). Los tubos conteniendo las muestras fueron sonicados durante 20 minutos y dejados en la oscuridad (a 4 °C) durante toda la noche. A la mañana siguiente, las muestras se centrifugaron a 3000 rpm y se realizó un barrido entre 250 y 750 nm utilizando un espectrofotómetro Hewlett-Packard 8453E. Después de esta lectura, a la misma muestra se le midió la fluorescencia utilizando un fluorómetro Turner Designs 700, antes y después de acidificar (HCl 1 N) (Holm-Hansen et al., 1965).

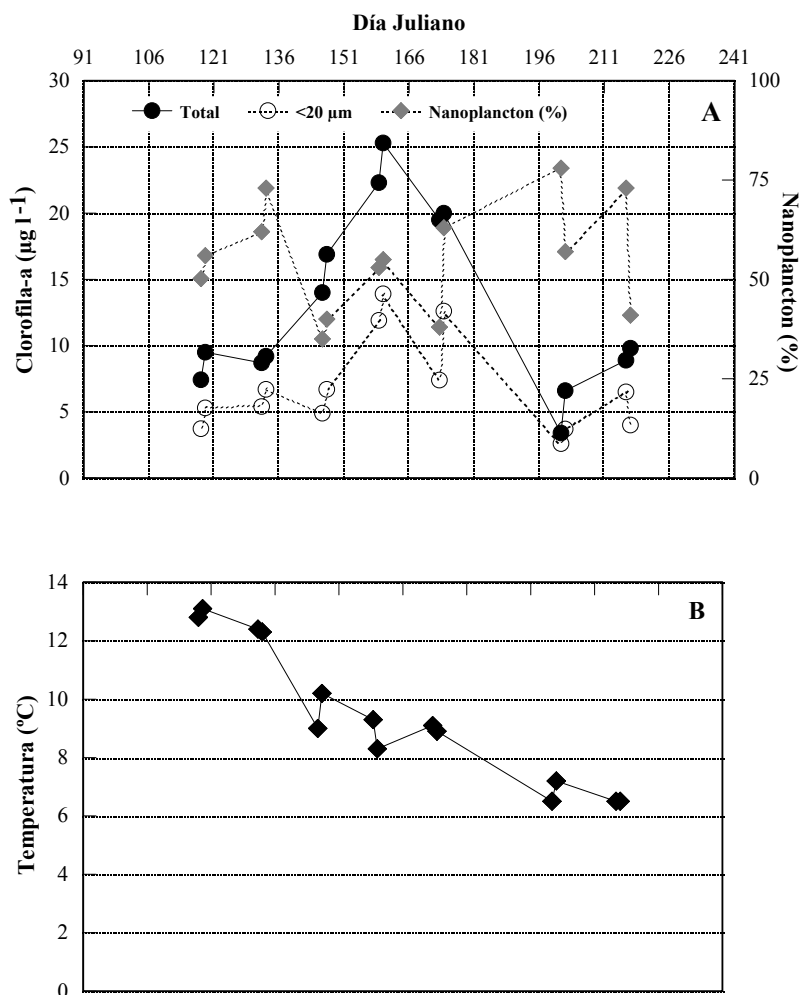
**Composición taxonómica:** A tiempo inicial se tomó una muestra y se la fijó con formaldehído al 20 % (concentración final en la muestra 0,4 %). Las muestras se decantaron luego en cámaras de sedimentación coloreándolas previamente con Rosa de Bengala (Villafañe & Reid, 1995b). Los recuentos y determinaciones correspondientes se realizaron utilizando un microscopio invertido Leica DM IL.

**Análisis estadístico:** Los valores de rendimiento fotoquímico se presentan como las medias en los tratamientos de radiación con sus respectivas desviaciones estándar (4 mediciones para cada tratamiento). Para determinar diferencias significativas entre las muestras se utilizó el test estadístico no paramétrico de Kruskal Wallis (Zar, 1984), utilizando una significación de 0,05. Asimismo, se realizaron ajustes de las distintas curvas, utilizando programas gráficos específicos y determinando su nivel de significación a través de un análisis ANOVA.

**Radiación solar y temperatura:** La energía recibida por el fitoplancton durante la experimentación se monitoreó con un radiómetro de banda ancha ELDONET (Real Time Computer Inc.), cuyas características se detallan en los capítulos anteriores. Se registró cada hora la irradiancia PAR recibida directamente en el tanque de experimentación con un sensor de mano Lutron LX-107 (Digital Instruments), así como también la temperatura a lo largo del experimento.

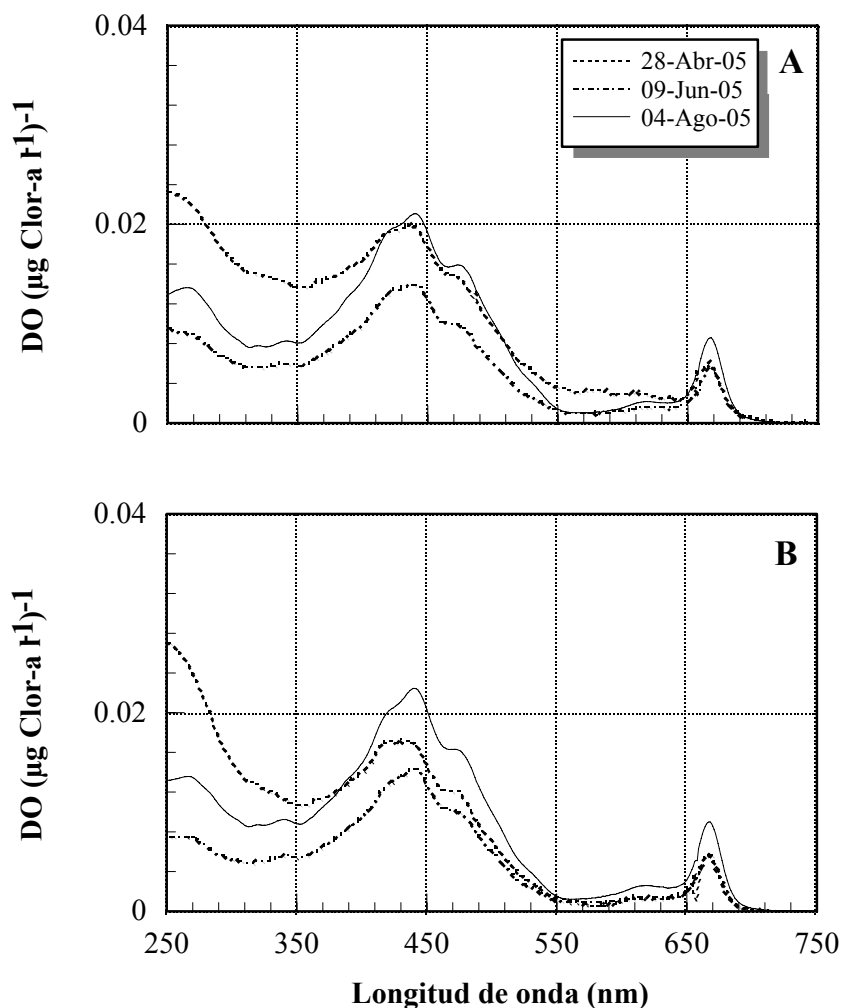
## **Resultados**

Durante todo el período de experimentación se observaron variaciones en la concentración de clorofila (Figura 1 A), destacándose un período de alta concentración (i.e., fin de Mayo – fin de Junio), con valores máximos de  $25,3 \mu\text{g clor-a l}^{-1}$ , y períodos de bajas concentraciones con valores mínimos de  $3,4 \mu\text{g Clor-a l}^{-1}$ . Las muestras de mayores concentraciones de clorofila (i.e., 26 de Mayo - 23 de Junio) estuvieron dominadas por la diatomea *Odontella aurita*. Es interesante destacar que si bien la estructura en la dinámica de la comunidad presentó una tendencia con períodos de pre-bloom, bloom y post-bloom, las concentraciones de clorofila registradas en el 2005 fueron inferiores a las concentraciones de años anteriores, las cuales presentaron valores máximos de  $124 \mu\text{g Clor-a l}^{-1}$  durante el bloom (capítulo 2). Sin embargo, al igual que años anteriores, el posible bloom de invierno estuvo representado en su totalidad por la diatomea microplanctónica *Odontella aurita*. La temperatura superficial registrada al momento del muestreo varió de  $15 \text{ }^\circ\text{C}$  en Marzo a valores mínimos de  $6,5 \text{ }^\circ\text{C}$  en Agosto (Figura 1 B).



**Figura 1:** A) Concentración de clorofila-a ( $\mu\text{g l}^{-1}$ ) en función de los días Julianos tanto para la fracción total de la muestra (círculos negros), como para la fracción menor a  $20 \mu\text{m}$  (círculos blancos), y porcentaje de nanoplancton (rombos grises). B) Temperatura superficial en función de los días Julianos al momento de cada muestreo.

En cuanto a las características espectrales de las muestras tomadas durante el período Abril-Agosto (Figura 2), se observa una variación en la composición pigmentaria entre las distintas muestras, tanto para la fracción total (Figura 2 A) como para la menor a  $20 \mu\text{m}$  (Figura 2 B). Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en la relación carotenos / clorofila (i.e.,  $470 / 665 \text{ nm}$ ), a lo largo del período de experimentación para ninguna de las dos fracciones de tamaño utilizadas (i.e., total y menor de 20 micras).

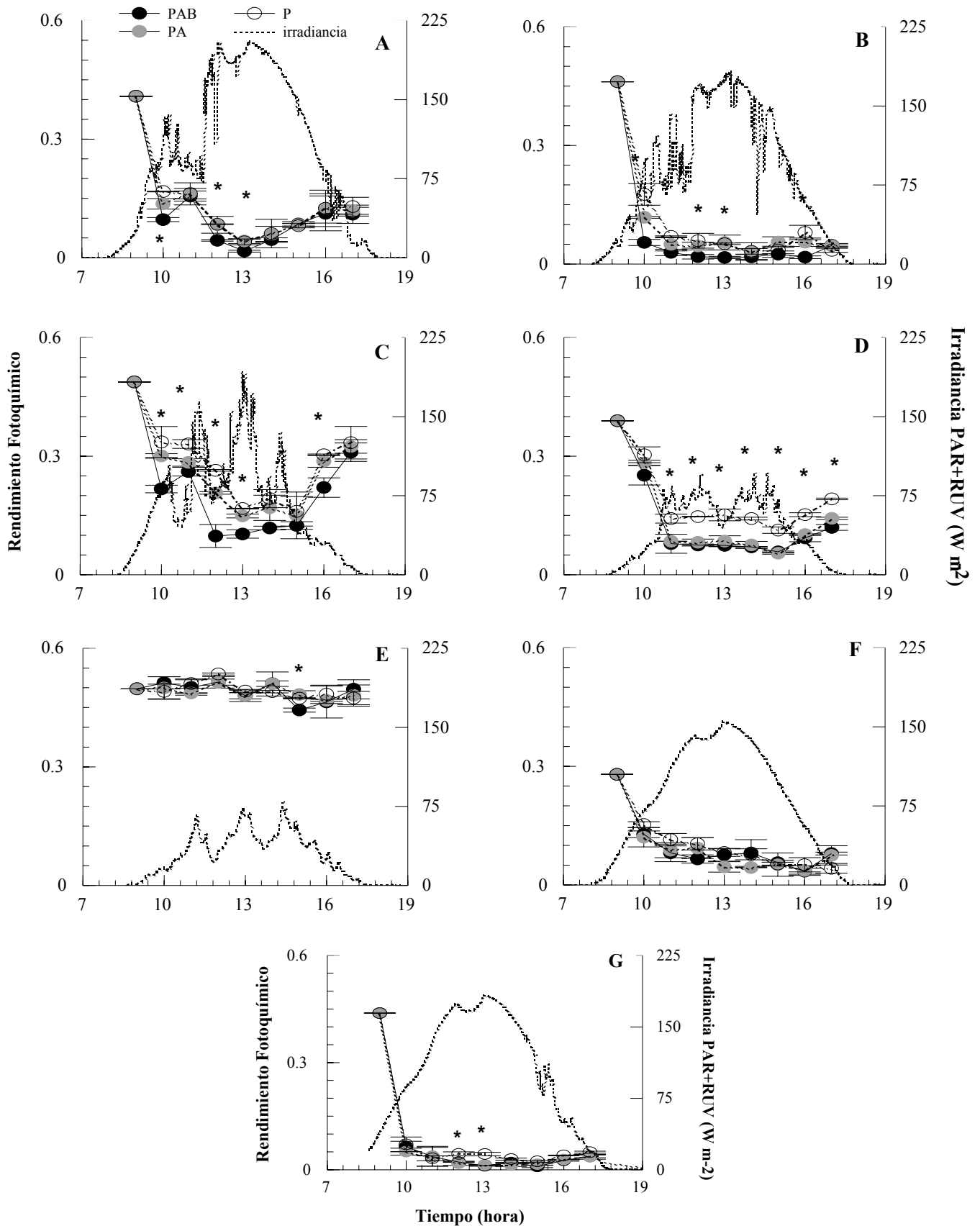


**Figura 2:** Espectros de absorción normalizados por la concentración de clorofila ( $\mu\text{g Chlor } l^{-1}$ ) de la fracción total para tres muestras, 28 de Abril, 09 de Junio y 04 de Agosto de 2005. A) Espectros para la porción total de las muestras, y B) Espectros de absorción para la fracción menor a 20  $\mu\text{m}$ .

En los siguientes párrafos y secuencias de figuras se presentan las variaciones en el rendimiento fotoquímico (RF), tanto para irradiancias fijas (i.e., máxima radiación en superficie), como irradiancia fluctuantes (i.e., movimiento en la columna de agua, superficie y profundidad).

*A) Irradiancias fijas:*

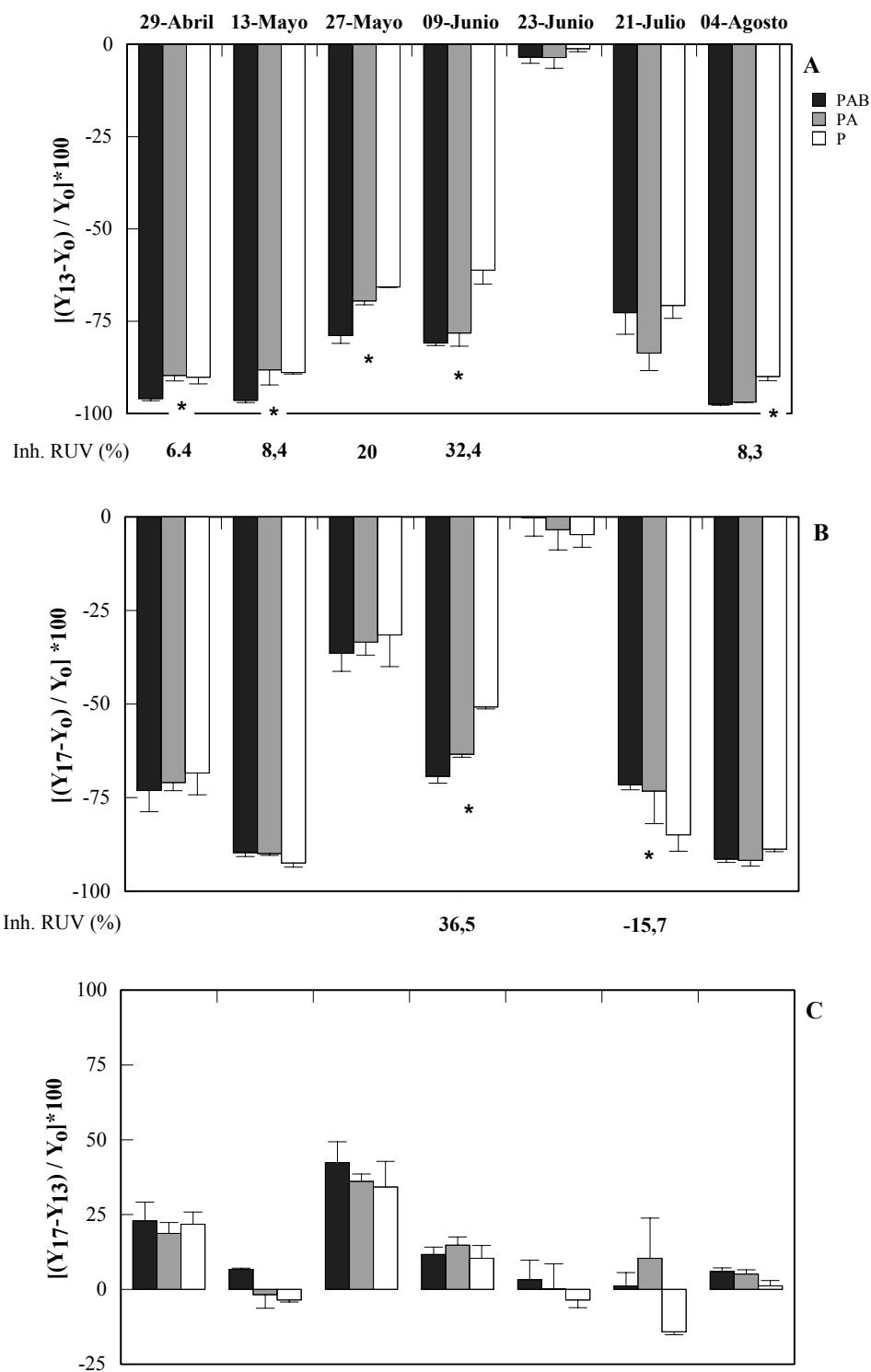
Durante los experimentos bajo condiciones de irradiancias fijas el RF inicial durante los ciclos diarios fue en promedio de 0,45 para todas las muestras, excepto para la muestra del 21 de Julio donde se registró un RF inicial de 0,28 (Figura 3).



**Figura 3:** Rendimiento fotoquímico durante un ciclo diario para muestras colectadas durante: A) 29 de abril, B) 13 de Mayo, C) 27 de Mayo, D) 09 Junio, E) 23 de Junio, F) 21 de Julio y G) 04 de agosto de 2005. En líneas punteadas se observa la irradiancia (PAR + RUV) para cada día de experimentación. Los símbolos negros representan los tratamientos de radiación PAB, los grises PA y los blancos P. Las líneas verticales representan las desviaciones estándar para cada punto. Los asteriscos representan diferencias significativas entre tratamientos de radiación (\* p<0.05).

Durante los ciclos diarios (i.e., irradiancias fijas, Figura 3) se observó que el RF del fitoplancton disminuye a medida que aumenta la irradiancia al mediodía local (~13:00 h.) para todas las muestras excepto el 23 de Junio (Figura 3 E), donde no se observaron diferencias significativas en el RF a lo largo del día, manteniéndose siempre un valor similar al inicial (~0,49). Hacia la tarde, cuando la irradiancia comenzó a disminuir, se observó una recuperación en el RF en casi todas las muestras (~17:00 h). En general se observó que durante cada ciclo diario el RF fue mayormente condicionado por PAR (círculos blancos), en comparación con la RUV, no observándose en general diferencias significativas entre tratamientos de radiación, excepto en días con variaciones en el régimen de irradiancia por las fluctuaciones en la cobertura de nubes (Figura 3 A, B, C y D). En estos días nublados se observó una mayor recuperación del RF bajo el tratamiento P (i.e., solo PAR), en aquellas muestras que habían presentado inhibición del RF luego de un período de alta irradiancia, observándose diferencias significativas entre tratamientos de radiación (Figura 3 D; Kw,  $p < 0,005$ ). Las dosis diarias recibidas durante el período de experimentación fueron bajas en días nublados (Figura 3 E, 23 de Junio), con valores de 902, 155 y 1,6  $\text{KJ m}^{-2}$ , para PAR, RUV-A y RUV-B, respectivamente, siendo las más altas de 2504, 317 y 3,8  $\text{KJ m}^{-2}$ , para PAR, RUV-A y RUV-B, respectivamente, para el día más despejado (Figura 3 F, 21 de Julio).

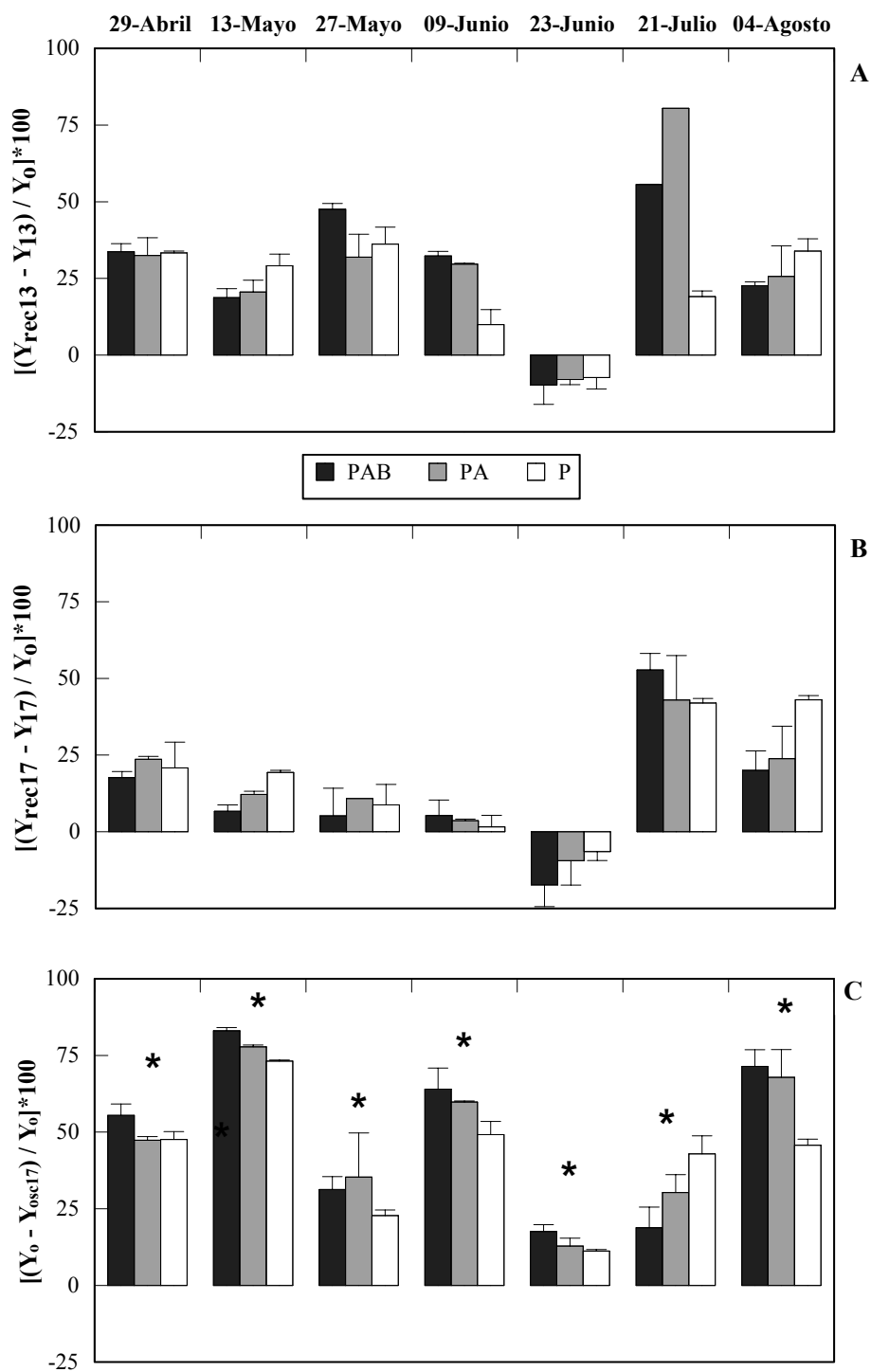
En la Figura 4 se presentan los porcentajes de inhibición y recuperación del RF al mediodía local y al finalizar la tarde con respecto al tiempo inicial (Figura 4 A y B), así como el porcentaje de recuperación durante la tarde para las muestras del mediodía que permanecieron bajo condiciones de luz (i.e.,  $[(Y_{17}-Y_{13})/Y_0]*100$ ), normalizadas por el tiempo inicial (Figura 4 C). Al pie de cada gráfico se observa la inhibición (%) del RF por RUV, en las muestras que presentaron diferencias significativas entre tratamientos (i.e., \* KW,  $p < 0,05$ ). De estos resultados, se observó que las muestras de los posibles períodos de pre y post-bloom son las que presentaron mayor inhibición en comparación con las muestras con mayor porcentaje de células microplanctónicas (i.e., bloom), tanto al mediodía (Figura 4 A) como a la tarde (Figura 4 B). Es importante aclarar que el porcentaje de inhibición en este Capítulo ha sido expresado con sus respectivos valores negativos, a fin de graficar la disminución del RF a distintas horas del día. Asimismo, se observó que el porcentaje de inhibición al mediodía fue mayor en comparación con el porcentaje a las 17:00 h., evidenciando una recuperación del RF durante las horas de la tarde (Figura 4 C). Si bien todos los tratamientos presentaron las mismas tendencias, se observa que las muestras que recibieron solo PAR (i.e., tratamiento P, barras blancas) presentaron valores de inhibición menores que las muestras que recibieron RUV, tanto al mediodía como a última hora de la tarde (i.e., tratamiento PA, barras grises y barras negras para el tratamiento PAB). Asimismo, se encontraron diferencias significativas entre los distintos tratamientos de radiación para todas las muestras (i.e., Kw,  $p < 0,05$ ). En general, se observó una recuperación del RF en presencia de luz, aunque los porcentajes registrados fueron menores en general al 13 % para el tratamiento PAB, el cual presentó la mayor recuperación. Se observó que el 27 de Mayo (i.e., período de bloom) presentó los más altos porcentajes de recuperación en comparación con los otros días de experimentación (~42, 36 y 32%, para los tratamientos PAB, PA y P, respectivamente). Se destacó, por otro lado, que el porcentaje de recuperación observado durante la tarde estuvo relacionado con las condiciones de radiación recibidas (Figura 3), siendo las muestras que presentaron mayor recuperación la de las tardes con mayores fluctuaciones en el régimen de irradiancia (i.e., mayor nubosidad).



**Figura 4:** A) Porcentaje de inhibición del RF al mediodía local con respecto al tiempo inicial ( $[(Y_{13}-Y_0)/Y_0]*100$ ), B) Porcentaje de inhibición del RF a las 17:00 h. con respecto al tiempo inicial ( $[(Y_{17}-Y_0)/Y_0]*100$ ), C) Porcentaje de recuperación del RF durante la tarde ( $[(Y_{17}-Y_{13})/Y_0]*100$ ). Las barras negras corresponden al tratamiento PAB, las barras grises al tratamiento PA y las barras blancas al tratamiento P. Las líneas verticales representan las desviaciones estándar para cada tratamiento. Al pie de los gráficos A y B se observa la inhibición (%) del RF por RUV en las muestras que presentaron diferencias significativas entre tratamientos (i.e., \* KW,  $p < 0,05$ ). Los asteriscos (\*) representan diferencias significativas (\*  $p < 0,05$ ).

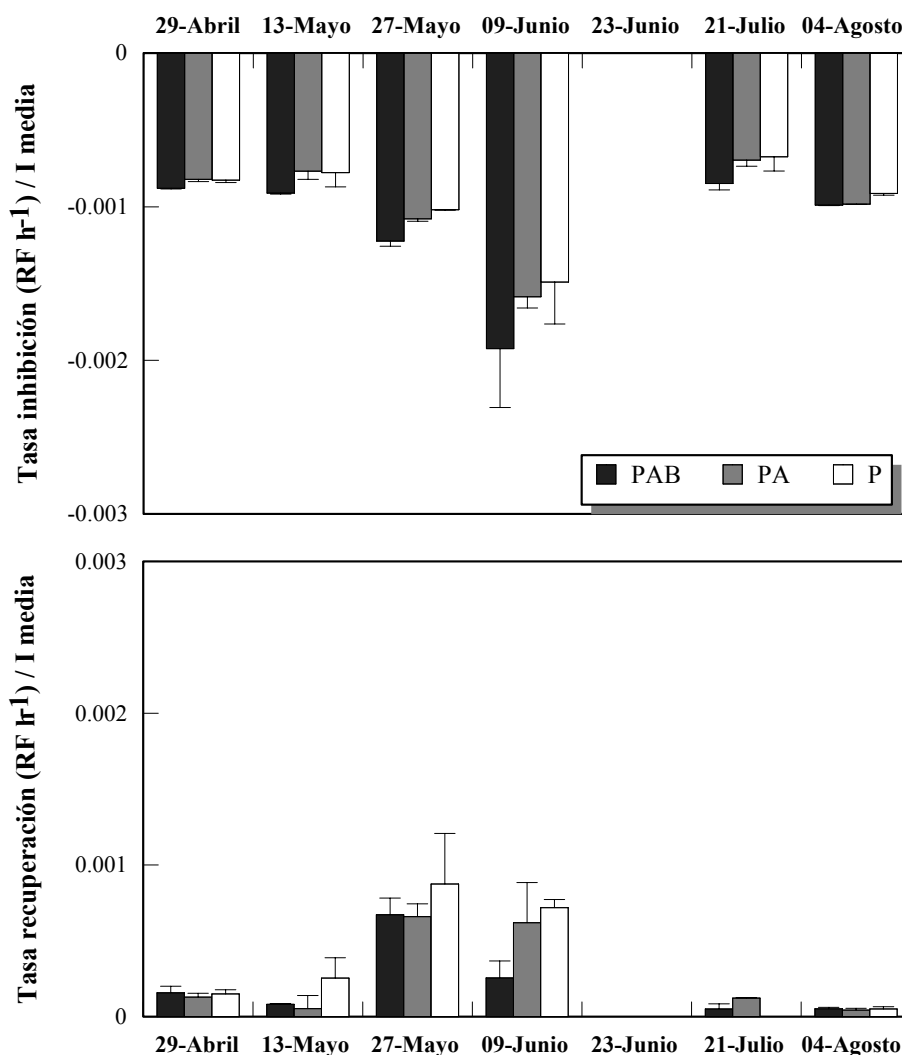


En la Figura 5 se observa el porcentaje de recuperación del RF luego del período de oscuridad para las muestras del mediodía local  $[(Y_{rec13}-Y_{13})/Y_0]*100$  (Figura 5 A), y para las muestras de la tarde  $[(Y_{rec17}-Y_{17})/Y_0]*100$  (Figura 5 B); asimismo, se observa en la Figura 5 C el daño crónico (DC) luego del período de oscuridad para las muestras de las 17:00 h. con respecto al valor inicial. Al evaluar la recuperación en oscuridad se observó un mayor porcentaje de recuperación en las muestras del mediodía en comparación con las de la tarde. Se observó que la recuperación del RF para las muestras del mediodía fue similar durante la sucesión anual (i.e., pre-bloom, bloom y post-bloom) (Figura 5 B), exceptuando la respuesta del día 23 de Junio en el cual no se observó inhibición alguna en el RF durante la experimentación. Sin embargo, en la recuperación del RF en oscuridad para las muestras de la tarde (Figura 5 B) las del bloom presentaron un menor porcentaje (incluso fue negativo el día 23 de Junio) en comparación con las del pre y post-bloom, las cuales presentaron porcentajes de recuperación intermedios y máximos, respectivamente. Por otro lado, al considerar el DC luego del período de oscuridad para las muestras de las 17:00 h. con respecto al valor inicial (Figura 5 C), se observó que el porcentaje de DC del aparato fotosintético se corresponde con los valores de inhibición calculados para las muestras de las 17:00 h., siendo más inhibidas las que presentaron mayor DC. Por otro lado, es interesante mencionar que si bien la muestra del 23 de Junio no presentó inhibición a lo largo de la experimentación, el RF fue levemente menor que el inicial al calcular el DC luego del período de oscuridad. Asimismo, es de destacar que se observó mayor DC bajo el tratamiento P en comparación con los otros dos (i.e., PA y PAB) en las muestras del 21 de Julio.



**Figura 5:** A) Porcentaje de recuperación del RF luego del período de oscuridad para las muestras del mediodía  $[(Y_{rec13} - Y_0) / Y_0] * 100$ , B) Porcentaje de recuperación del RF luego de un período de oscuridad para las muestras de la tarde  $[(Y_{rec17} - Y_{17}) / Y_0] * 100$ , C) Porcentaje de DC, luego del período de oscuridad para las muestras de las 17 horas en comparación con el tiempo inicial  $[(Y_0 - Y_{osc17}) / Y_0] * 100$ . Las barras negras corresponden al tratamiento PAB, las barras grises al tratamiento PA y las barras blancas al tratamiento P. Los asteriscos representan diferencias significativas entre tratamientos (\*  $p < 0.05$ ).

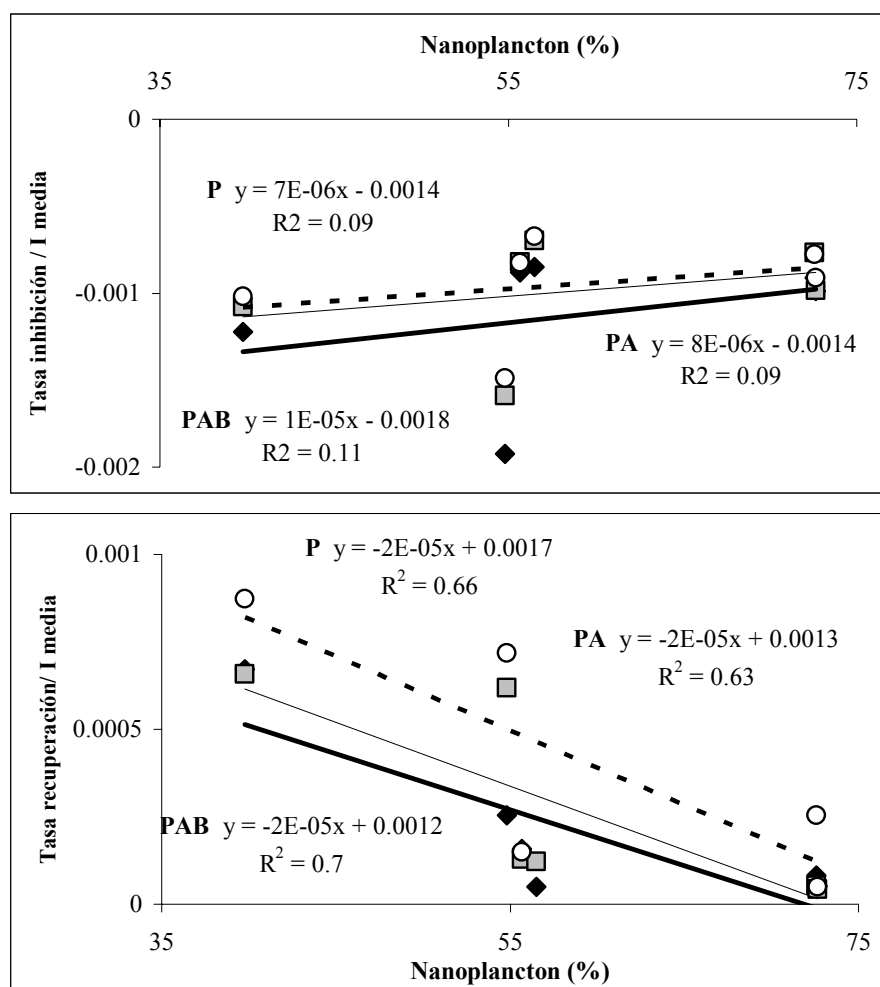
Al observarse diferencias entre los porcentajes de inhibición y recuperación para los distintos períodos de muestreo, se calcularon las tasas de inhibición (Figura 6 A) y las tasa de recuperación (Figura 6 B), normalizadas por la irradiancia media recibida. De estos cálculos se observó que las tasas de inhibición en períodos del bloom fueron mayores que durante períodos de pre y post-bloom (Figura 6 A), registrándose las mayores tasas bajo el tratamiento PAB ( $K_w$ ,  $p < 0,05$ ), excepto en las muestra del 4 de Agosto ( $K_w$ ,  $p > 0,05$ ). Por otro lado, las tasas de recuperación fueron mayores en las muestras del bloom (Figura 6 B), pero en este caso no se encontraron diferencias significativas entre tratamientos de radiación ( $K_w$ ,  $p > 0,05$ ).



**Figura 6:** A) Tasa de inhibición ( $RF\ h^{-1}$ ), normalizada por la irradiancia recibida para las distintas muestras, B) Tasa de recuperación ( $RF\ h^{-1}$ ), normalizada por la irradiancia media recibida para las distintas muestras estudiadas. Las barras negras corresponden al tratamiento PAB, las barras grises al tratamiento PA y las barras blancas al tratamiento P. Las líneas perpendiculares representan el error estándar. Los asteriscos representan diferencias significativas entre tratamientos ( $*\ p < 0,05$ ).

Al comparar las tasas de inhibición y recuperación en función del porcentaje de nanoplancton (Figura 7) se observó que no existe relación alguna entre variables cuando se tiene

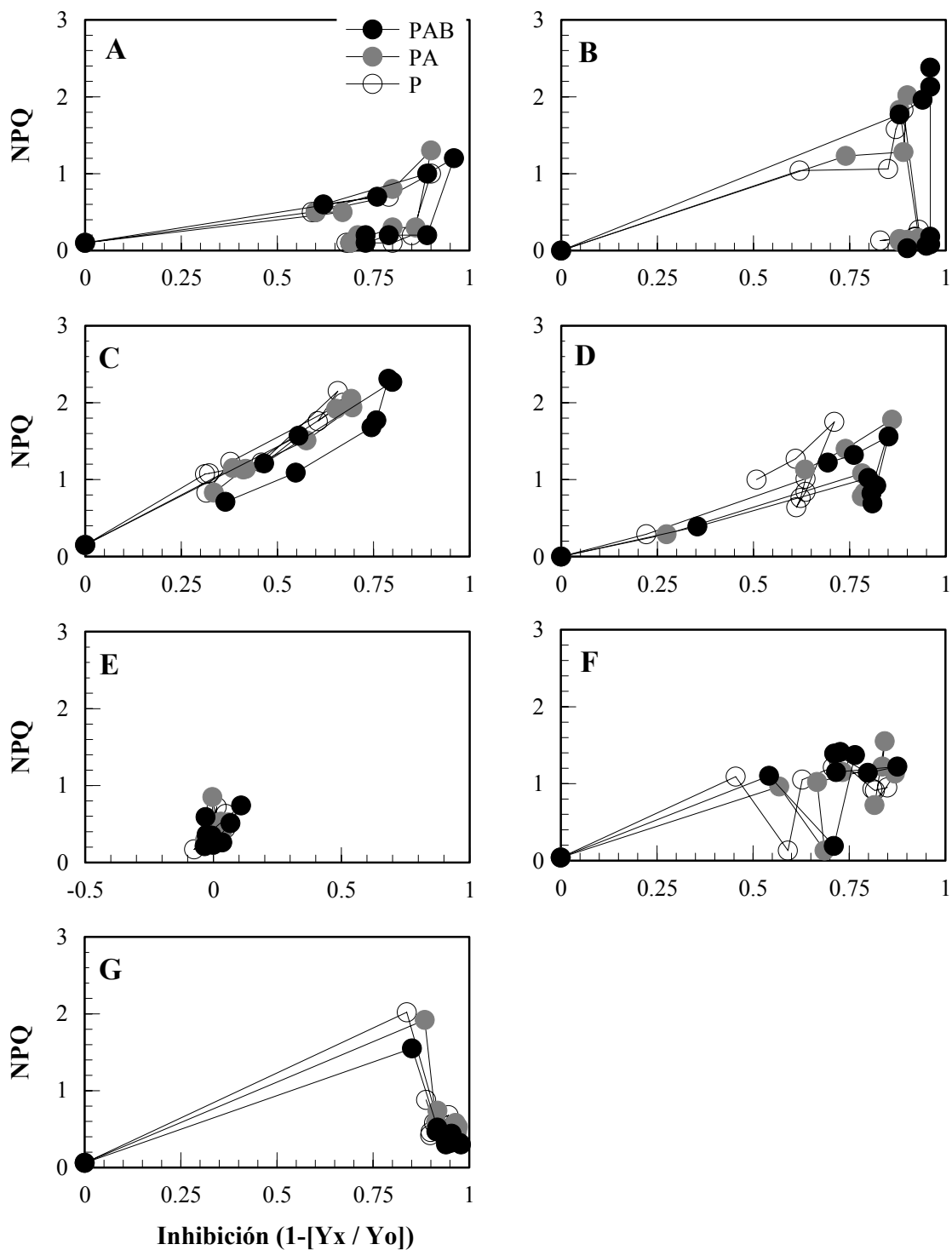
en cuenta la tasa de inhibición (Figura 7 A); sin embargo, cuando se comparó la tasa de recuperación con el porcentaje de nanoplancton (Figura 7 B), se observó una relación lineal negativa para todos los tratamientos de radiación (i.e., PAB, PA y P), siendo las muestras con mayores porcentajes de nanoplancton las que presentan tasas de recuperación más bajas. Por otro lado, se observa que las muestras con similares porcentajes de células grandes y pequeñas presentan tasas variables, evidenciando más aún esta respuesta en la tasa de recuperación (Figura 7 B).



**Figura 7:** A) Tasa de inhibición normalizada por la irradiancia media recibida, en función del porcentaje de nanoplancton, B) Tasa de recuperación normalizada por la irradiancia media recibida, en función del porcentaje de nanoplancton. Los símbolos negros corresponden al tratamiento PAB, los grises al tratamiento PA y los blancos al tratamiento P. En línea negra gruesa se observa el ajuste para el tratamiento PAB, en línea fina el ajuste para el tratamiento PA y en línea punteada el ajuste lineal para el tratamiento P.

En cuanto a los mecanismos de disipación, el fitoplancton utiliza una vía de disipación de energía excedente a través de mecanismos no fotoquímicos (i.e., NPQ). Al comparar esta vía de disipación de energía con la inhibición observada durante el experimento (Figura 8), se observó que la relación entre ambas variables varió dependiendo de la muestra. Las muestras del bloom (exceptuando la muestra del 23 de Junio, que no presentó inhibición en el RF a lo largo del día), presentaron una relación casi lineal entre ambas variables (Figura 8 C, D y F), mientras que para

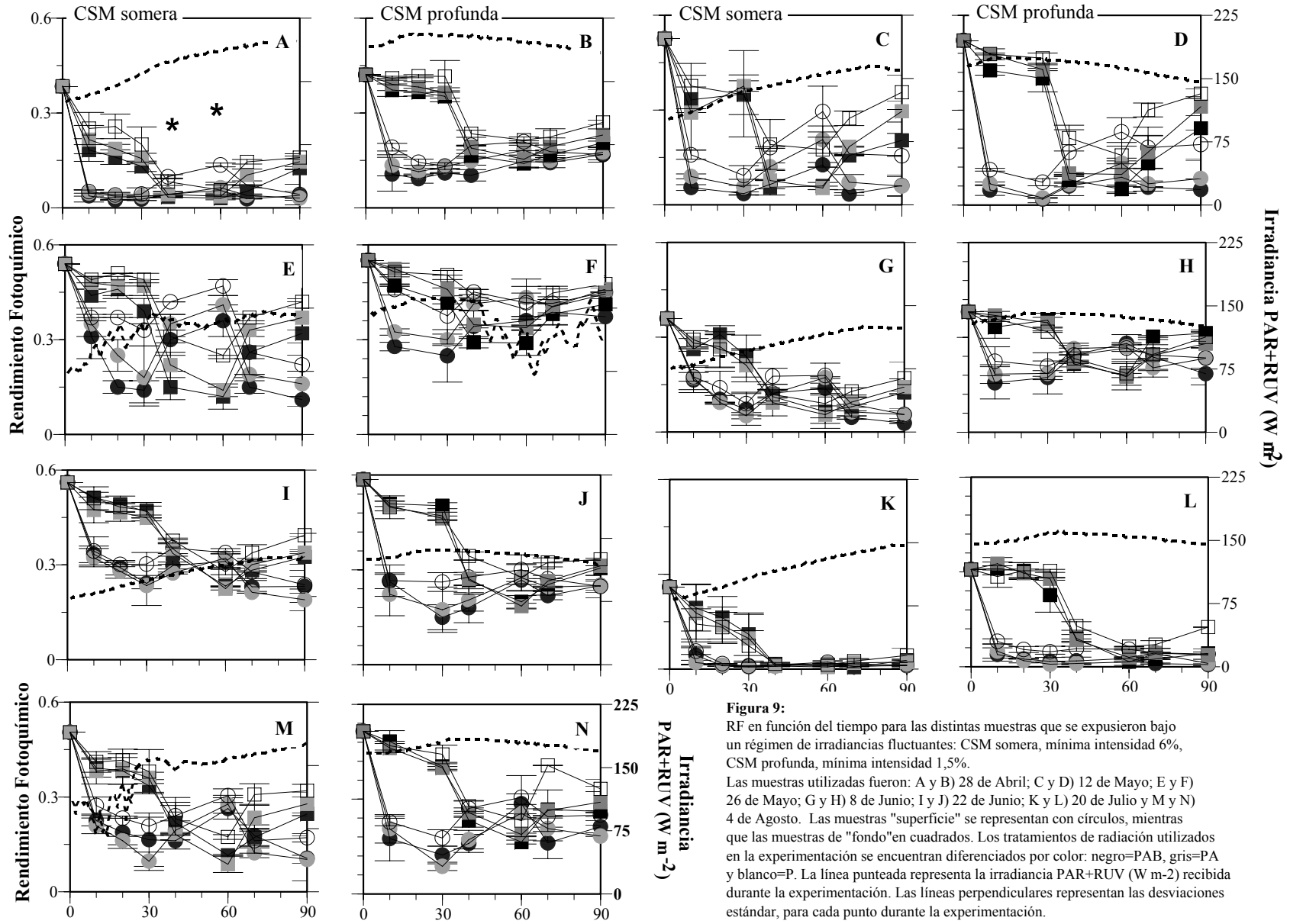
los otros períodos de muestreo la relación fue variable. Por ejemplo, en las muestras del pre-bloom (Figura 8 A y B) se observó que la relación fue lineal hasta la máxima inhibición (mediodía local), y que luego el NPQ disminuyó hasta alcanzar valores cercanos a 0, pero la inhibición siguió siendo cercana a 1 disminuyendo luego lentamente. Para la muestra del 4 de Agosto (Figura 8 G), la inhibición aumentó rápidamente durante la primera hora, al igual que el NPQ; sin embargo, luego de este punto el NPQ disminuyó pero la inhibición siguió cercana a 1 durante el tiempo restante del experimento.



**Figura 8:** Relación entre el mecanismos de disipación no fotoquímico (NPQ) y la inhibición para cada uno de los puntos del experimento a lo largo del día y para los tres tratamientos espectrales (PAB, PA y P). A) 29 de abril, B) 13 de Mayo, C) 27 de Mayo, D) 09 Junio, E) 23 de Junio, F) 21 de Julio y G) 04 de agosto de 2005.

### B) Irradiancias fluctuantes:

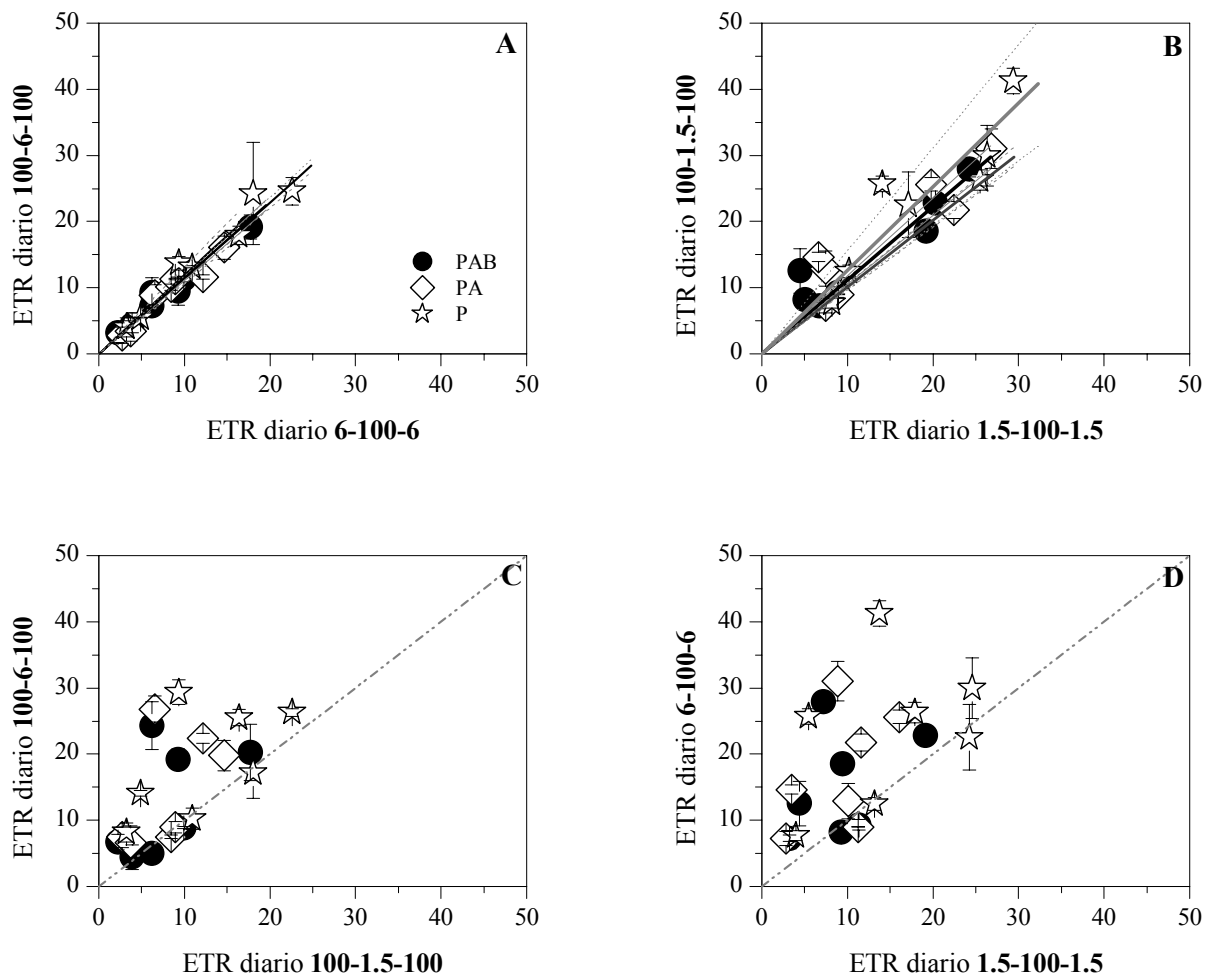
Cuando muestras para los mismos períodos de tiempo que la sección anterior se expusieron a condiciones de radiación fluctuantes (Figura 9), se observó en general que las variaciones en el RF dependían de las condiciones de irradiancia durante cada movimiento de mezcla vertical simulada. Tanto para la capa superficial de mezcla somera (CSMs) como para la capa superficial de mezcla profunda (CSMp), el fitoplancton presentó una importante inhibición en su RF con respecto al tiempo inicial en muestras de “superficie”. Durante el bloom (Figura 9, E-J) se registró inhibición en el RF sucesivamente a lo largo de los 30 primeros minutos, en cambio para las otras dos condiciones de la sucesión anual (i.e., pre- y post-bloom), la mayor inhibición se observó casi totalmente en los 10 primeros minutos de cada experimento (Figura 9, A-D, K-L). Una vez que las muestras de superficie fueron expuestas a bajas irradiancias (i.e., 6% CSMp y 1,5% CSMp), se observó una recuperación en todas las muestras, excepto el día 20 de Julio (Figura 9, K y L), donde los valores de RF permanecieron cercanos a cero durante el resto de la experimentación. Finalmente, al regresar a las condiciones iniciales durante los 30 últimos minutos del experimento (i.e., 100% de irradiancia en superficie), se observó nuevamente una disminución en el RF, siendo menor en aquellas muestras de CSMp. Por otro lado, las muestras de “fondo”, tanto en CSMs como en CSMp, presentaron una leve inhibición en el RF al comenzar el experimento durante la experimentación (i.e., bajas irradiancias), siendo mayor en CSMs. Una vez que se invirtió la irradiancia, luego de los primeros 30 minutos, el RF disminuyó en todas las muestras, alcanzando valores cercanos a cero en muchas de éstas. Finalmente, al invertirse nuevamente la irradiancia, el RF se recuperó alcanzando valores cercano a los iniciales en la mayoría de las muestras.





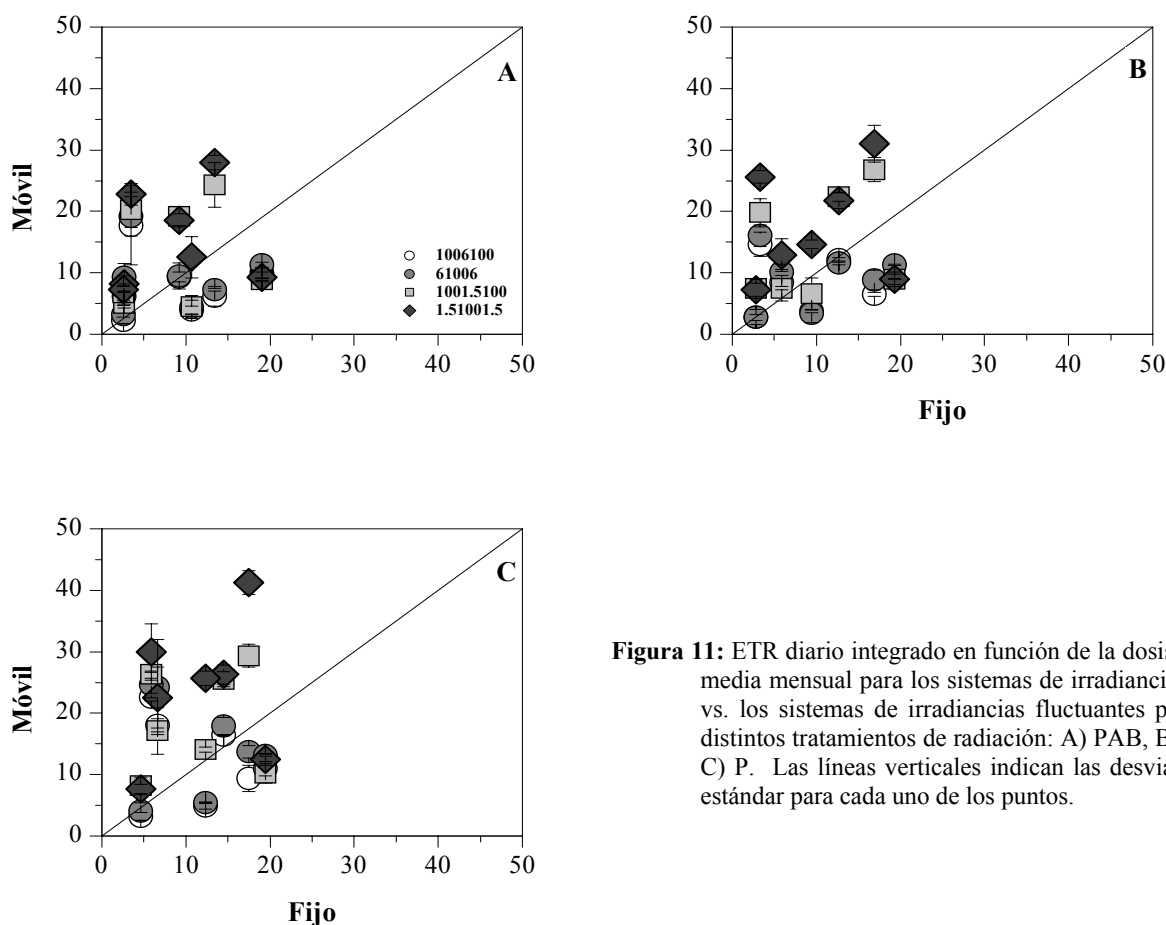
C) Comparación entre experimentos a irradiancia fija (A) e irradiancias fluctuantes (B):

Con el objetivo de evidenciar el efecto integrado en el proceso de fotosíntesis entre las distintas condiciones de mezcla implementadas se compararon los ETR integrados en el día (i.e., ETR diario) en los movimientos dentro de una misma CSM (Figura 10 A y B) y dentro de distintas CSM (Figura 10 C y D). De estas comparaciones se observó que, para una misma condición de mezcla pero distintas muestras (i.e., superficie y fondo), ambos movimientos siguen una relación lineal (CSMs  $R^2=0.99$ ,  $p<0.0001$  para todos los tratamientos de radiación; CSMp  $R^2= 0.98, 0.82$  y  $0.9$  con  $p<0.05$  para PAB, PA y P, respectivamente). Sin embargo, al comparar las 2 condiciones de mezcla entre sí para muestras similares (Figura 10 C y D), se observó que los valores de ETR diarios no presentaron la misma relación lineal. En ambas Figuras, se graficó la relación 1:1 entre ambas variables. Se observó que los valores de ETR diarios son mayores en CSMs en comparación con los calculados para CSMp, tanto para las muestras de superficie (Figura 10 C), como para las muestras de fondo (Figura 10 D).



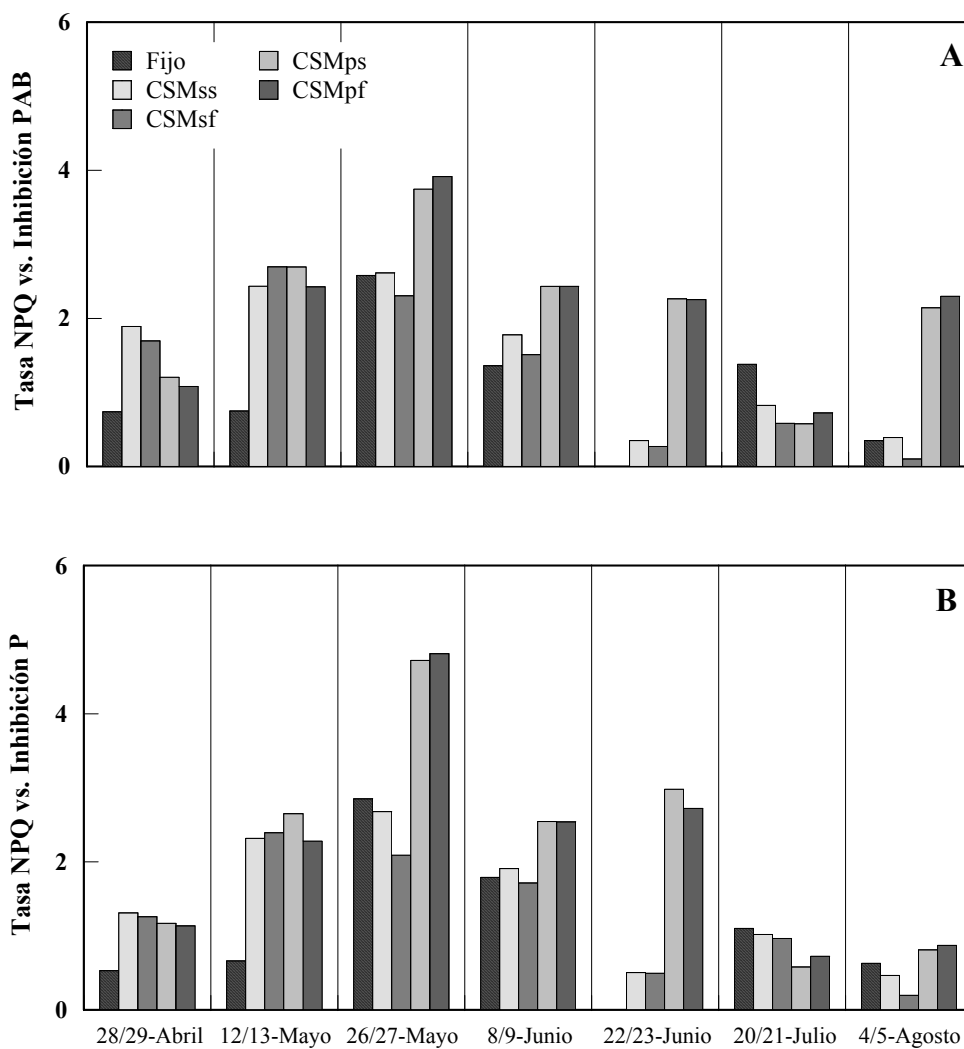
**Figura 10:** ETR diario para las distintas condiciones de mezcla utilizadas en la experimentación. A) ETR diario para CSMs. B) ETR diario para CSMp. C) Comparación de los ETR diario para CSMs y CSMp para muestras de superficie D) Comparación de los ETR diario para CSMs y CSMp para muestras de fondo. Las líneas verticales representan las desviaciones estándar para cada punto.

Con el fin de comparar los dos tipos de experimentos (i.e., irradiancias fijas y fluctuantes) se utilizaron los ETR diarios en función de la dosis para cada condición experimental (Figura 11); en cada Figura se graficó asimismo la relación 1:1 entre ambas variables. Utilizando esta relación como la máxima posible se observó que tanto para el tratamiento PAB (Figura 11 A) como para PA (Figura 11 B) y P (Figura 11 C), la mayoría de los valores fueron mayores para el sistema de irradiancias fluctuantes, en comparación con el sistema de irradiancias fijas. Los ETR integrados para ambas condiciones de radiación fueron mayores bajo el tratamiento P (Figura 11 C), en comparación con los tratamientos PA (Figura 11 B) y PAB (Figura 11 A); sin embargo, se observó que los ETR calculados bajo un régimen de irradiancia fluctuante fueron mayores en comparación con los calculados para los sistemas de irradiancias fijas.



**Figura 11:** ETR diario integrado en función de la dosis diaria media mensual para los sistemas de irradiancias fijas vs. los sistemas de irradiancias fluctuantes para los distintos tratamientos de radiación: A) PAB, B) PA y C) P. Las líneas verticales indican las desviaciones estándar para cada uno de los puntos.

La tasa de respuesta entre la inhibición del RF observada en cada punto (i.e.,  $[1 - (Y_{tpox}/Y_{tpo0})]$ ) y el valor de NPQ (Figura 12) indica que las relaciones entre ambas variables fueron mayores en las muestras del bloom, y dentro de éstas las mayores tasas se registraron bajo el tratamiento P (Figura 13 B). Asimismo, se observa que las tasas para el sistema fijo fueron menores en comparación con los sistemas de irradiancias fluctuantes; dentro de estos últimos, en muestras del bloom, se observó que hay diferencias entre CSMs y CSMp, siendo las tasas para CSMp mayores para este período.



**Figura 12:** Tasa resultante de la relación entre el NPQ y la inhibición del RF en cada punto a lo largo del experimento, con respecto al tiempo inicial bajo los tratamientos P (A) y PAB (B), para las distintas condiciones experimentales.

## Discusión

Desde el año 1999, en los comienzos de la serie de tiempo en la estación de muestreo EGI (Bahía Engaño, Rawson, Chubut), se ha observado que las poblaciones fitoplanctónicas de la zona presentan floraciones de microplancton en su dinámica poblacional durante los meses de invierno. Luego de finalizada la obra de remodelación del puerto de Rawson se reanudaron los muestreos en la zona a principio de Abril de 2005. Si bien se continuó muestreando en el mismo sitio geográfico, las condiciones del estuario del río Chubut han cambiado, siendo la salida del mismo al mar más cerrada (Foto 1). Al comparar la dinámica del fitoplancton con los años anteriores (Capítulo 2; Villafañe et al., 2004; Helbling et al., 2005), se observó que los valores máximos de clorofila total registrados durante el 2005 fueron inferiores (i.e., 25,3  $\mu\text{g Clor-a l}^{-1}$ ) a los observados en años anteriores (i.e., 124  $\mu\text{g Clor-a l}^{-1}$ ). A semejanza de años anteriores, sin embargo, la dinámica poblacional presentó los mismos patrones, con un bloom de invierno dominado por células microplanctónicas, en su mayoría por la diatomea *Odontella aurita*. Por otro lado, se observó que el porcentaje de nanoplancton (Figura 1) no fue, durante el período de muestreo, inferior al 35 %, cuando años anteriores llegaban a valores mínimos de hasta 6 % (Capítulo 2). Se analizaron para cada muestra las características espectrales a lo largo del período de muestreo (Figura 2), aunque esta técnica no es tan efectiva como el análisis por cromatografía líquida de alta performance. En el análisis espectrofotométrico no se encontraron diferencias de compuestos protectores a la RUV, siendo el pico de éstos (i.e.,  $\lambda$  310-360 nm) casi inexistente durante el período de estudio. Sin embargo, se encontraron variaciones en la concentración de carotenos (i.e.,  $\lambda=470$  nm), pero al realizar la relación entre éstos compuestos accesorios y la concentración de clorofila-a (datos no graficados), esta relación permaneció relativamente constante, a excepción de las muestras del día 20 de Julio y 4 de Agosto, que presentaron las mayores relaciones (i.e., post-bloom).

La radiación solar, tanto PAR como RUV, es una de las variables ambientales que determina el rendimiento fotosintético de organismos autótrofos. El régimen de irradiancias bajo el cual se desarrollan los organismos depende del medio donde se encuentren. En la columna de agua, el fitoplancton se encuentra sujeto a las condiciones físicas (i.e., mezcla vertical) y ópticas (i.e., atenuación de la radiación), las cuales en conjunto, determinan la energía que llega a las células y por ende su rendimiento fotosintético. La máxima energía que un organismo puede recibir en la columna de agua es cuando se encuentra en superficie, por eso al realizar los ciclos diarios, el fitoplancton se expuso a éstas condiciones máximas a fin de evaluar su rendimiento fotosintético a lo largo del día. En estos experimentos bajo máximas condiciones de irradiancias fijas (Figura 3) se observó que la dinámica en el RF del fitoplancton depende de la irradiancia recibida a lo largo del día, y dentro de las bandas energéticas, PAR fue la energía que reguló en su mayoría este proceso. Cuando la irradiancia disminuyó, en algún momento del día a causa de la nubosidad, se observó que los valores de RF aumentaban dependiendo asimismo del tratamiento bajo el cual estaban siendo incubados, ya que la recuperación del tratamiento P fue siempre mayor en comparación con los tratamientos PA y PAB. Por otro lado, se observó que la respuesta fotosintética del fitoplancton se relacionó con la proporción de células pequeñas y grandes que componían la muestra. Las muestras del bloom (i.e., células microplanctónicas), fueron las menos inhibidas, tanto al mediodía local como al finalizar el experimento (Figura 4), sin embargo, éstas fueron las que presentaron las mayores tasas de inhibición en comparación con las muestras para otros períodos (Figura 6), siendo asimismo las de mayores tasas de recuperación durante la tarde (Figura 6). Estos resultados sugieren que las muestras del bloom son menos inhibidas ya que la cantidad de energía por unidad de área que recibieron fue mucho menor en comparación con las células pequeñas (i.e., mayor porcentaje de células nanoplanctónicas). Asimismo, estas células presentaron una velocidad de respuesta lineal entre el NPQ y la inhibición del RF (Figura 8), mientras que las relaciones en las muestras del pre y comienzos del post-bloom, no presentaron las mismas tendencias, disminuyendo el NPQ luego del mediodía local, sin observarse recuperación del RF, o si la hubo fue muy lenta y leve. Asimismo, existen otras vías de disipación tales como

variación en la antena captadora de energía o una rápida recuperación del daño causado en la proteína D1 (Bouchard et al., 2005), componente estructural de los fotosistemas. Estas últimas respuestas, no se han medido en este trabajo, pero son vías efectivas ante un posible daño causado por las distintas bandas energéticas sobre el aparato fotosintético. Al observarse que el NPQ disminuye luego del mediodía, en muestras con alto porcentaje de células pequeñas (i.e., pre y post-bloom), y la inhibición sigue siendo importante, esto podría estar indicando un importante daño en la estructura y funcionamiento de los fotosistemas en relación a la cantidad de energía recibida. La recuperación de los fotosistemas se encuentra relacionada directamente con la síntesis de la proteína D1, siendo esta recuperación en un período de tiempo que puede ir de minutos a horas. Al no observarse una recuperación total del rendimiento fotosintético, se podría estimar que hubo algún tipo de daño en la síntesis de esta proteína (i.e., daño al ADN), con lo cual la recuperación no se realizó completamente, siendo necesario tal vez un período de tiempo más prolongado para reparar el daño y volver a sintetizar nuevamente las proteínas estructurales de los fotosistemas. Otros estudios realizados en la zona de Bahía Engaño (Villafañe et al., 2004a, b y c; Helbling et al., 2005; Capítulo 2), han demostrado asimismo que las poblaciones fitoplanctónicas presentan una significativa variabilidad a los efectos de la radiación ultravioleta entre estaciones, evidenciándose también pequeñas variaciones dentro de la misma estación, cuando es tomado como variable la fijación de carbono.

Como se mencionó anteriormente, el régimen de irradiancias es importante a tener en cuenta cuando se analiza la respuesta del fitoplancton a la radiación solar (Capítulo 2; Helbling et al., 2003; Helbling & Zagarese, 2003). En nuestros resultados, ante un cambio rápido en el régimen de irradiancias (Denman & Gargett, 1983), se observó que no existen diferencias entre muestras de superficie y fondo para una misma condición de mezcla (i.e., CSMs o CSMp); sin embargo, cuando se comparó la respuesta en el ETR integrado entre distintas profundidades de mezcla (i.e., CSMs y CSMp), se observó que los valores de ETR integrados fueron mayores dentro de CSMs. Es importante destacar, que si bien no se pudo determinar la absorción de cada muestra, este valor no influyó en la comparación de los ETR para las muestras del mismo día, ya que al utilizar el valor 1 para la absorción de éstas, el mismo valor relativo se mantuvo en todas las muestras, y por ende en su comparación. En general los resultados demuestran que la profundidad de mezcla es un factor importante en el rendimiento fotosintético (Figura 10), al igual que las condiciones de radiación recibidas (i.e., sistemas fijos o fluctuantes, Figura 11). Estos resultados concuerdan con trabajos que se han realizado anteriormente, los cuales han evaluado la importancia de la porción de la zona eufótica y la profundidad de mezcla en la fotosíntesis (Köhler et al., 2001; Sverdrup, 1953). Por otro lado, uno de los puntos interesantes a comparar en este trabajo es la diferencia observada entre un sistema de irradiancias fijo y otro fluctuante, donde se destaca una clara variación en la respuesta del fitoplancton a las condiciones de radiación establecidas. Los ETR integrados para los sistemas fluctuantes fueron mucho mayores que para los sistemas fijos (Figura 11). Estos resultados estarían indicando que el cambio de irradiancia favorece la recuperación del rendimiento fotosintético a bajas intensidades, reflejándose en una mayor tasa de fotosíntesis. Asimismo, las tasas entre los sistemas fijos y fluctuantes varían, como así también entre condiciones de mezcla –i.e., CSMs y CSMp (Figura 12), por lo cual indicaría que los sistemas de disipación de energía (i.e., NPQ) son más efectivos bajo condiciones fluctuantes que de máximo estrés, donde el daño en los fotosistemas no se puede prevenir totalmente a través de esta vía de disipación bajo un alto estrés lumínico.

Los resultados obtenidos en este trabajo demuestran, una vez más, la importancia del régimen variable de irradiancia en la fotosíntesis del fitoplancton. Asimismo, la profundidad de mezcla (i.e., CSMp y CSMs), condiciona el rendimiento fotosintético de los organismos y su respuesta al cambio de radiación. Por otro lado, se destaca la importancia del tamaño celular en la respuesta del fitoplancton a la radiación solar, estando ésta relacionada con los mecanismos de disipación de energía y con el grado de daño / reparación en los fotosistemas.

## Conclusiones generales

Como se mencionó en el Capítulo 1 (i.e., introducción general), luego del descubrimiento del agujero de ozono, los trabajos en fotobiología, con especial énfasis en el efecto de la RUV en el fitoplancton, aumentaron considerablemente. Sin embargo, hoy son relativamente pocos los estudios que evalúan el efecto conjunto de la RUV y la CSM en la fotobiología de estos organismos fotosintéticos marinos. En estos trabajos se ha observado que la respuesta de los organismos depende de varios factores, tales como la composición específica, el tamaño celular, la historia lumínica y especialmente, la velocidad de inhibición / aclimatación de la fotosíntesis. A lo largo de la experimentación realizada en este trabajo doctoral se han ampliado los conocimientos sobre los efectos de la interacción entre la RUV y la CSM en la fotosíntesis de éstos organismos. En la experimentación se ha trabajado tanto con poblaciones fitoplanctónicas de la zona de estudio (Bahía Engaño, 43° A – 65 ° W; Capítulos 2 y 5) como con cultivos de especies de distintos tamaños celulares (Capítulos 3 y 4).

En general, durante la experimentación realizada, se han observado respuestas variables en la fotosíntesis del fitoplancton de poblaciones naturales, así como en los experimentos realizados con cultivos. De los resultados obtenidos en cada Capítulo se citan las siguientes conclusiones generales:

### Capítulo 2:

- Las especies de invierno (i.e., microplancton), presentaron una mayor inhibición de la fotosíntesis bajo condiciones de irradiancias fluctuantes (i.e., mezcla simulada), en comparación con las especies de primavera-verano, así como con las de otoño (i.e., muestras dominadas en su mayoría por organismos nanoplantónicos).
- Los valores integrados de carbono fijado registrados en el sistema rotativo fueron mayores que los registrados en el sistema fijo durante el pre y post-bloom, (i.e., mayor porcentaje de nanoplankton en la población), en comparación a los registrados en períodos de bloom (i.e., invierno).
- Para bajos niveles de PAR, los organismos fitoplanctónicos poseen la capacidad de utilizar la RUV como fuente de energía para la fotosíntesis.
- La respuesta del fitoplancton depende en general, tanto de la porción de la  $Z_{eu}$  mezclada, como de la historia lumínica, el tamaño celular y la capacidad de reparar el daño causado por la RUV bajo condiciones de mezcla.

### Capítulo 3:

- No se encontraron diferencias significativas entre tratamientos de radiación solar (i.e., PAB, PA y P); sin embargo, las tasas de producción / consumo de oxígeno fluctuaron dependiendo del camino recorrido y de la especie.
- Altas y bajas irradiancias afectaron la producción de oxígeno en la especie *D. salina* (Chlorophyta), mientras que la producción de oxígeno para *T. weissflogii* (Diatomea) solo fue inhibida por altas irradiancias. *H. triquetra* (Dinophyceae) presentó la menor variabilidad en la producción de oxígeno, observándose que podría ser la especie más beneficiada fisiológicamente por las fluctuaciones en el régimen de irradiancias.
- *H. triquetra* fue la especie que presentó mayores valores en la producción integrada de  $O_2$ , siendo los menores registrados para la especie *D. salina*.

- En ambientes con gran variabilidad en los procesos de mezcla vertical (i.e., similar a las condiciones de la zona patagónica estudiada) los dinoflagelados serían el grupo taxonómico más beneficiado entre los grupos presentes en la comunidad fitoplanctónica.
- No solo los cambios en irradiancias son importantes en la fotobiología del fitoplancton, sino también la dirección en la cual ocurren esos cambios (i.e., pasando de oscuridad en el fondo, a irradiancias máximas en superficie, o viceversa).

#### Capítulo 4:

- La especie más pequeña (*G. chlorophorum*) presentó la mayor inhibición por RUV en su rendimiento fotoquímico (RF), en comparación con las otras dos especies (i.e., *H. triquetra* y *P. micans*); sin embargo, esta inhibición disminuyó cuando la mezcla se profundizó, presentando una efectiva y rápida recuperación.
- La especie más pequeña presentó valores intermedios en el ETR integrado, presentando las mayores relaciones entre la inhibición y el NPQ.
- La utilización de estos mecanismos de disipación de energía podrían estar otorgando a *G. chlorophorum* una capacidad de respuesta más favorable frente a los cambios de radiación solar en la columna de agua.
- *P. micans* presentó una inhibición por RUV casi constante a lo largo de la experimentación, a pesar que las condiciones de irradiancia fueron variando.
- *H. triquetra* presentó una altísima inhibición por efecto de PAR, sin encontrarse diferencias significativas entre tratamientos de RUV.
- En general, las diferencias encontradas entre estos tres dinoflagelados podrían sugerir que las especies más pequeñas, si bien fueron las más inhibidas durante esta experimentación, poseen una rápida capacidad de respuesta bajo un régimen fluctuante de irradiancias, lo que podría estar relacionado con activos mecanismos de foto-protección y recuperación ante un posible daño.

#### Capítulo 5:

- La fase fotoquímica de la fotosíntesis depende directamente de las condiciones de irradiancia a la cuales se encuentra expuesto el fitoplancton (i.e., distinta velocidad de respuesta al cambio de irradiancia).
- Las muestras con mayores porcentajes de células microplanctónicas (i.e., posibles períodos de bloom) presentaron los menores porcentajes de inhibición durante los ciclos diarios (i.e., irradiancias fijas, simulando condiciones de superficie en la columna de agua), en comparación con las muestras con mayores porcentajes de nanoplancton (i.e., posibles períodos de pre y post-bloom) presentando asimismo las mayores tasas de inhibición y recuperación del RF.
- Bajo condiciones de irradiancias fijas, el mayor efecto registrado sobre el RF fue producido por PAR, y solo en días nublados se encontraron diferencias significativas por RUV.
- Bajo un régimen fluctuante de irradiancias no se encontraron claras diferencias en el RF entre muestras (i.e., posibles períodos de pre-bloom, bloom y post-bloom); sin embargo, las muestras con mayores porcentajes de microplancton presentaron las relaciones máximas entre la inhibición del RF y el NPQ, siendo similares las tendencias bajo los tratamientos P y PAB.
- Bajo un régimen fluctuante de irradiancia, el fitoplancton presentó diferencias en el ETR integrado, siendo mayor dentro de CSMs, independientemente de la dirección del camino recorrido.
- Al comparar condiciones de irradiancia fijas y fluctuantes se observó que para todos los tratamientos de radiación (i.e., PAB, PA y P) el ETR integrado siempre fue mayor en condiciones de irradiancias fluctuantes.
- Estos resultados indicarían que el fitoplancton es más efectivo bajo un régimen fluctuante de irradiancias, ya sea en la recuperación del aparato fotosintético a bajas irradiancias, o debido a que los mecanismos de recuperación y foto-protección son más efectivos bajo estas condiciones lumínicas.

- En CSMp el fitoplancton podría estar limitado en relación a los bajos niveles de irradiancias (i.e., mínima energía 1,5 %) en comparación con CSMs, evidenciando en esta última un mejor rendimiento integrado.

Las conclusiones generales de este trabajo de tesis doctoral sugieren que el efecto de la radiación solar en la fotosíntesis de organismos fitoplanctónicos marinos en latitudes medias depende directamente de la historia lumínica y de las especies estudiadas. En general, se ha encontrado que la mezcla vertical favorece el rendimiento fotosintético del fitoplancton, ya sea porque permite la recuperación del daño generado por un alto estrés lumínico (i.e., condiciones de superficie), o porque bajo condiciones fluctuantes de irradiancias los mecanismos de foto-protección y foto-recuperación son más efectivos que bajo irradiancias fijas. Asimismo, es importante destacar que las respuestas obtenidas en cada uno de los pasos del proceso fotosintético (Esquema 5, capítulo 1) a lo largo de toda la experimentación realizada fue similar y los resultados obtenidos demuestran en todos los casos que la mezcla vertical favorece el rendimiento fisiológico de los organismos fitoplanctónicos marinos en latitudes medias.



**Abreviaturas**

$\mu\text{Ci}$ : micro Curie.  
ADN: Ácido desoxirribonucleico.  
Clor-a: Clorofila a.  
CPDs: Cyclobutane pyrimidine dimers, dímeros de timina.  
CSM: Capa superficial de mezcla.  
CSMp: Capa superficial de mezcla profunda.  
CSMs: Capa superficial de mezcla somera.  
DC: Daño crónico.  
EFPU: Estación de Fotobiología Playa Unión.  
ELDONET: European Light Dosimeter Network.  
ETR: Electron transport rate: Tasa de transporte electrónico.  
 $F^v/F^m$ : rendimiento efectivo.  
 $F_{\text{fix}}$ : Fotosíntesis en el sistema fijo.  
 $F_m$ : Fluorescencia máxima.  
 $F_o$ : Fluorescencia inicial.  
 $F_{\text{rot}}$ : Fotosíntesis en el sistema rotativo.  
FSI: Fotosistema I.  
FSII: Fotosistema II.  
 $F_v$ : Fluorescencia variable.  
 $K_d$ : Coeficiente de atenuación de la radiación en la columna de agua.  
kJ: kilo Joules.  
 $K_{\text{PAR}}$ : Coeficiente de atenuación de la radiación visible (i.e., Photosynthetic available radiation).  
MAAs: Mycosporine like amino-acids, en español hace referencia a las micosporinas que actúan como aminoácidos.  
NPQ: Non-Photochemical quenching, disipación no fotoquímica de energía.  
P: Tratamiento de radiación PAR.  
PA: Tratamiento de radiación PAR + RUV-A.  
PAB: Tratamiento de radiación PAR + RUV.  
PAR: Photosynthetic available radiation, radiación visible (i.e., 400-700 nm).  
Qa: Plastoquinona a.  
Qb: Plastoquinona b.  
qP: Photochemical quenching, disipación fotoquímica de energía.  
RF: Rendimiento fotoquímico.  
RUV: Radiación ultravioleta.  
RUV-A: Radiación ultravioleta A (i.e., 315-400 nm).  
RUV-B: Radiación ultravioleta B (i.e., 280-315 nm).  
RUV-C: Radiación ultravioleta C (i.e., 100-280 nm).  
U.D: Unidades Dobson.  
Z: profundidad.  
 $Z_{\text{CSM}}$ : Profundidad de la capa superficial de mezcla.  
 $Z_{\text{eu}}$ : Profundidad de la zona eufótica (definida como el 1% de la irradiancia en superficie).

**Capítulo 1**

	Pág.
<b>Esquema 1:</b> Espectro electromagnético donde se observan las distintas bandas energéticas en función de la longitud de onda (nm). Dentro del rango de la radiación visible (PAR) se observa el color correspondiente a cada longitud de onda. (extraído del libro Naturaleza y efectos de la radiación ultravioleta y la capa de ozono, Capítulo I Zaratti , 1997)	3
<b>Figura 1:</b> Variación latitudinal de la radiación solar ( $W m^{-2}$ ) que llega a la superficie de la Tierra.	4
<b>Figura 2:</b> Dosis diarias y concentración de ozono (UD) para la zona de Bahía Engaño ( $43^{\circ} S - 65^{\circ} O$ ) durante los años 1999-2001. A) Dosis diarias para PAR (400-700 nm) y RUV-A (315-400 nm), B) Dosis diarias para RUV-B (280-315 nm), y concentración de ozono (UD), en función de los días Julianos.	5
<b>Tabla 1:</b> Porcentaje de dosis media para las estaciones de verano e invierno entre los años 1999-2001, para tres bandas energéticas: PAR, 400-700 nm, RUV-A, 320-400 nm; y RUV-B, 280-320 nm. Datos registrados por un radiómetro ELDONET (European Light Dosimeter Network) instalado en la Estación de Fotobiología Playa Unión.	6
<b>Figura 3:</b> Ejemplo de la atenuación de la radiación en función de la profundidad para una estación de la zona de Bahía Engaño ( $43^{\circ} S - 65^{\circ} W$ ) para el mes de Agosto de 2000.	6
<b>Figura 4:</b> Perfil de Sigma-t en función de la profundidad (m) para una zona tropical y una zona polar	7
<b>Figura 5:</b> Distribución global de la profundidad de la capa superficial de mezcla (CSM) para los meses de Enero (A) y Julio (B). Figura extraída de <a href="http://www7320.nrlssc.navy.mil">http://www7320.nrlssc.navy.mil</a> (U.S National Oceanic Atmospheric Administration)	8
<b>Esquema 2:</b> Cloroplasto típico de organismos fotosintéticos. Se diferencian las dos fases del proceso de fotosíntesis: a) la fase fotoquímica en la membrana tilacoidal y b) la fase enzimática en el estroma. Se detallan los productos finales de ambas fases. Fuente: <a href="http://www.virtual.unal.edu.co">http://www.virtual.unal.edu.co</a>	9
<b>Esquema 3:</b> Esquema representativo del fotosistema II (FSII). La zona coloreada en verde es la zona donde se encuentran la mayor cantidad de antenas captadoras de fotones. Fuente: <a href="http://www.virtual.unal.edu.co">http://www.virtual.unal.edu.co</a>	10
<b>Esquema 4:</b> Esquema resumen del proceso fotosintético en organismos autótrofos. Fuente: <a href="http://www.virtual.unal.edu.co">http://www.virtual.unal.edu.co</a>	11
<b>Esquema 5:</b> Cloroplasto típico de organismos fotosintéticos. Se destacaron los 3 puntos a estudiar en el marco de esta tesis doctoral: 1) Fase enzimática: a) incorporación de Carbono marcado en la síntesis de hidratos de carbono (Capítulo 2); 2) Fase fotoquímica: a) producción de oxígeno (Capítulo 3) y b) transporte electrónico (Capítulos 4 y 5).	15

**Capítulo 2**

	Pág.
<b>Figura 1:</b> Características generales de la zona de estudio durante el año 2000 en función de la época del año (días del año). A) Dosis diarias de PAR (400-700 nm); B) Dosis diarias de RUV-A (315-400 nm) y RUV-B (280-315 nm); C) Concentración de fitoplancton estimado por Clor-a ( $\mu g L^{-1}$ ) y porcentaje de células nanoplanctónicas. Las 3 líneas horizontales indican los períodos de muestreo de pre-bloom, bloom y post-bloom	21

- Figura 2:** Valores de inhibición por RUV en función de la radiación (calculado como  $[(F_{PAR} - F_{RUV}) / F_{PAR} * 100]$  para diferentes muestras fitoplanctónicas. A) Muestras del pre-bloom colectadas durante Marzo de 2000; B) Muestras del bloom colectadas durante Junio de 2000; C) Muestras del post-bloom colectadas durante Diciembre de 2000. Las barras grises representan muestras incubadas en sistemas fijos a distintas irradiancias, y las barras negras representan muestras en sistemas rotativos. Kruskal-Wallis \* $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ . 23
- Figura 3:** Comparación de la fotosíntesis integrada entre sistema fijo y rotativo (calculado como  $[(F_R - F_F) / F_F * 100]$ , para los tratamientos de radiación de PAR + RUV y solo PAR. Kruskal-Wallis: \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ . 24
- Figura 4:** Valores de inhibición de la tasa de fotosíntesis por RUV en función de la irradiancia recibida (calculada como  $[(F_{PAR} - F_{RUV}) / F_{PAR} * 100]$ , para muestras fitoplanctónicas del post-bloom, expuestas a distintas condiciones de mezcla. A)  $Z_{CSM} / Z_{Eu} = 0,6$ , B)  $Z_{CSM} / Z_{Eu} = 0,76$ , y C)  $Z_{CSM} / Z_{Eu} = 0,91$ . Las barras grises representan las muestras incubadas en sistemas fijos, mientras que las barras negras representan las muestras incubadas en el sistema rotativo. Kruskal-Wallis: \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ . 25
- Figura 5:** Comparación entre la inhibición integrada de la fotosíntesis (calculada como  $[(F_{PAR} - F_{RUV}) / F_{PAR} * 100]$ , cuando las muestras fueron expuestas a distintas condiciones de mezcla. Las barras grises representan muestras incubadas en sistemas fijos, mientras que las barras negras representan muestras en sistema rotativos. Kruskal-Wallis: \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ . 26

### Capítulo 3

- |  | Pág. |
|--|------|
| <b>Figura 1:</b> Esquema general de la organización de los experimentos, detallando la simulación de los dos caminos recorridos por los organismos fitoplanctónicos. Ver detalles en el texto..  | 32   |
| <b>Figura 2:</b> Espectro de absorción normalizado por la concentración de clorofila (D.O. [ $\mu\text{g Clor-a}^{-1}$ ] a tiempo inicial en función de la longitud de onda (nm) para <i>D. salina</i> , <i>T. weissflogii</i> y <i>H. triquetra</i>   | 34   |
| <b>Figura 3:</b> Tasa de producción media de $\text{O}_2$ ( $\mu\text{g O}_2 \text{ l}^{-1} \text{ min}^{-1}$ ) para <i>D. salina</i> en función de la irradiancia PAR ( $\text{W m}^{-2}$ ) durante el movimiento “Hacia arriba” (cuadrados blancos) y el movimiento “Hacia abajo” (círculos negros). Las líneas horizontales indican la desviación estándar y las flechas representan los puntos de comienzo de los movimientos.       | 35   |
| <b>Figura 4:</b> Tasa de producción media de $\text{O}_2$ ( $\mu\text{g O}_2 \text{ l}^{-1} \text{ min}^{-1}$ ) para <i>T. weissflogii</i> en función de la irradiancia PAR ( $\text{W m}^{-2}$ ) durante el movimiento “Hacia arriba” (cuadrados blancos) y el movimiento “Hacia abajo” (círculos negros). Las líneas horizontales indican la desviación estándar y las flechas representan los puntos de comienzo de los movimientos.. | 36   |
| <b>Figura 5:</b> Tasa de producción media de $\text{O}_2$ ( $\mu\text{g O}_2 \text{ l}^{-1} \text{ min}^{-1}$ ) para <i>H. triquetra</i> en función de la irradiancia PAR ( $\text{W m}^{-2}$ ) durante el movimiento “Hacia arriba” (cuadrados blancos) y el movimiento “Hacia abajo” (círculos negros). Las líneas horizontales indican la desviación estándar y las flechas representan los puntos de comienzo de los movimientos.    | 37   |
| <b>Figura 6:</b> Producción integrada de $\text{O}_2$ para <i>D. salina</i> , <i>T. weissflogii</i> y <i>H. triquetra</i> durante el movimiento “Hacia arriba” (barras claras) y el movimiento “Hacia abajo” (barras oscuras) circulando dentro de una CSM simulada ( $Z_{CSM} = 10 \text{ m}$ ). Las líneas sobre las barras representan las desviaciones estándar. La explicación completa se encuentra en el texto.                   | 38   |

**Capítulo 4**

	<b>Pág.</b>
<b>Esquema 1:</b> Esquema del aparato fotosintético indicando captación de energía y flujo de electrones entre fotosistemas. PS: fotosistema II (FS II), PS I: fotosistema I (FSI).	45
<b>Figura 1:</b> Espectro de absorción (DO [ $\mu\text{g clor-a}$ ] $^{-1}$ ) para las tres especies de dinoflagelados ( <i>G. chlorophorum</i> , <i>H. triquetra</i> y <i>P. micans</i> ) utilizados en la experimentación.	49
<b>Figura 2:</b> Valores medios de rendimiento fotoquímico, RF, (con su desviación estándar) en función del tiempo para <i>G. chlorophorum</i> bajo distintas condiciones de irradiancia: A) CSMs; B) CSMp. Las muestras de superficie están representadas por círculos y las muestras de fondo por cuadrados. Los porcentajes de irradiancias se cambiaron cada 30 minutos. Las líneas verticales representan el error estándar entre duplicados del mismo tratamiento. Los números sobre los símbolos se corresponden con las diferencias significativas encontradas entre tratamientos de radiación ( $p < 0.05$ ): 1) PAB-PA-P, 2) PAB-PA//PAB-P; 3) PAB-PA//PA-P; 4) PAB-P//PA-P; 5) PAB-P y 6) PA-P.	50
<b>Figura 3:</b> Valores medio de rendimiento fotoquímico, RF, (con sus desviaciones estándar) en función del tiempo para <i>H. triquetra</i> bajo distintas condiciones de irradiancia: A) CSMs; B) CSMp. Las muestras de superficie están representadas por círculos y las muestras de fondo están representadas por cuadrados. Los porcentajes de irradiancias se cambiaron cada 30 minutos. Las líneas verticales representan el error estándar entre duplicados del mismo tratamiento. Los números sobre los símbolos se corresponden con las diferencias significativas encontradas entre tratamientos de radiación ( $p < 0.05$ ): 1) PAB-PA-P, 2) PAB-PA//PAB-P; 3) PAB-PA//PA-P; 4) PAB-P//PA-P; 5) PAB-P y 6) PA-P.	52
<b>Figura 4:</b> Valores medio de rendimiento fotoquímico, RF, (con su desviación estándar) en función del tiempo para <i>P. micans</i> bajo distintas condiciones de irradiancia: A) CSMs; B) CSMp. Las muestras de superficie están representadas por círculos y las muestras de fondo por cuadrados. Los porcentajes de irradiancias se cambiaron cada 30 minutos. Las líneas verticales representan el error estándar entre duplicados del mismo tratamiento. Los números sobre los símbolos se corresponden con las diferencias significativas encontradas entre tratamientos de radiación ( $p < 0.05$ ): 1) PAB-PA-P, 2) PAB-PA//PAB-P; 3) PAB-PA//PA-P; 4) PAB-P//PA-P; 5) PAB-P y 6) PA-P.	53
<b>Figura 5:</b> Valores de tasa de transporte electrónico (ETR) integrados normalizados por la concentración inicial de clor-a ( $\mu\text{g clor-a l}^{-1}$ ) para las 3 especies: A) <i>G. chlorophorum</i> , B) <i>H. triquetra</i> y C) <i>P. micans</i> en cada tratamiento de radiación. Las líneas verticales corresponden a la desviación estándar para cada tratamiento. Las líneas y asteriscos sobre las barras representan diferencias significativas entre tratamientos de radiación.	55
<b>Figura 6:</b> Tasas medias de Non-photochemical quenching (NPQ) en relación a la inhibición de cada punto con respecto al tiempo inicial [ $1 - (Y_{\text{tpox}} / Y_{\text{tpo0}})$ ], registrada bajo los tratamientos PAB (Figura A y C) y P (Figura B y D). A) CSMs bajo tratamiento PAB, B) CSMs bajo el tratamiento P, C) CSMp bajo el tratamiento PAB, D) CSMp bajo el tratamiento P. Los símbolos negros representan muestras de superficie, mientras que los colores grises representan muestras de fondo. Los círculos corresponden a <i>G. chlorophorum</i> , los cuadrados a <i>H. triquetra</i> y los triángulos a <i>P. micans</i> .	56
<b>Tabla 1:</b> Tasas entre el NPQ y la inhibición en cada muestreo respecto al tiempo inicial [ $1 - (Y_{\text{tpox}} / Y_{\text{tpo0}})$ ] bajo dos tratamientos de radiación (P y PAB) para las tres especies utilizadas en la experimentación.	57

**Capítulo 5**

- |  | <b>Pág.</b> |
|--|-------------|
| <b>Foto 1:</b> A) Mapa indicando la estación de muestreo “EGI” y la zona de experimentación, donde se llevaron a cabo los trabajos (Bahía Engaño, Rawson – Chubut, 43° S – 65° O). B) Foto en la que se observa la desembocadura del Río Chubut y la escollera norte que canaliza junto a la escollera sur (la cual no se logra observar en la fotografía), la salida del río al mar. Entre ambas escolleras se encuentra la escollera vieja, sobre la cual se halla la estación de muestreo EGI.  | 62          |
| <b>Figura 1:</b> A) Concentración de clorofila-a ( $\mu\text{g Clor-a l}^{-1}$ ) en función de los días Julianos tanto para la fracción total de la muestra (círculos negros), como para la fracción menor a 20 $\mu\text{m}$ (círculos blancos), y porcentaje de nanoplancton (rombos grises). B) Temperatura superficial en función de los días Julianos al momento de cada muestreo.  | 66          |
| <b>Figura 2:</b> Espectros de absorción normalizados por la concentración de clorofila ( $\mu\text{g Clor l}^{-1}$ ) de la fracción total para tres muestras, 28 de Abril, 09 de Junio y 04 de Agosto de 2005. A) Espectros para la porción total de las muestras, y B) Espectros de absorción para la fracción menor a 20 $\mu\text{m}$ .   | 67          |
| <b>Figura 3:</b> Rendimiento fotoquímico durante un ciclo diario para muestras colectadas durante: A) 29 de abril, B) 13 de Mayo, C) 27 de Mayo, D) 09 Junio, E) 23 de Junio, F) 21 de Julio y G) 04 de agosto de 2005. En líneas punteadas se observa la irradiancia (PAR + RUV) para cada día de experimentación. Los símbolos negros representan los tratamientos de radiación PAB, los grises PA y los blancos P. Las líneas verticales representan las desviaciones estándar para cada punto. Los asteriscos representan diferencias significativas entre tratamientos de radiación (* $p < 0.05$ ).  | 68          |
| <b>Figura 4:</b> A) Porcentaje de inhibición del RF al mediodía local con respecto al tiempo inicial ( $[(Y_{13}-Y_0)/Y_0]*100$ ), B) Porcentaje de inhibición del RF a las 17:00 h. con respecto al tiempo inicial ( $[(Y_{17}-Y_0)/Y_0]*100$ ), C) Porcentaje de recuperación del RF durante la tarde ( $[(Y_{17}-Y_{13})/Y_0]*100$ ). Las barras negras corresponden al tratamiento PAB, las barras grises al tratamiento PA y las barras blancas al tratamiento P. Las líneas verticales representan las desviaciones estándar para cada tratamiento. Al pie de los gráficos A y B se observa la inhibición (%) del RF por RUV en las muestras que presentaron diferencias significativas entre tratamientos (i.e., * KW, $p < 0,05$ ). Los asteriscos (*) representan diferencias significativas (* $p < 0.05$ ). | 70          |
| <b>Figura 5:</b> A) Porcentaje de recuperación del RF luego del período de oscuridad para las muestras del mediodía $[(Y_{\text{rec13}}-Y_{13})/Y_0]*100$ , B) Porcentaje de recuperación del RF luego de un período de oscuridad para las muestras de la tarde $[(Y_{\text{rec17}}-Y_{17})/Y_0]*100$ , C) Porcentaje de DC, luego del período de oscuridad para las muestras de las 17 horas en comparación con el tiempo inicial $[(Y_0-Y_{\text{osc17}})/Y_0]*100$ . Las barras negras corresponden al tratamiento PAB, las barras grises al tratamiento PA y las barras blancas al tratamiento P. Los asteriscos representan diferencias significativas entre tratamientos (* $p < 0.05$ ).  | 72          |
| <b>Figura 6:</b> A) Tasa de inhibición ( $\text{RF h}^{-1}$ ), normalizada por la irradiancia recibida para las distintas muestras, B) Tasa de recuperación ( $\text{RF h}^{-1}$ ), normalizada por la irradiancia media recibida para las distintas muestras estudiadas. Las barras negras corresponden al tratamiento PAB, las barras grises al tratamiento PA y las barras blancas al tratamiento P. Las líneas perpendiculares al eje X representan el error estándar. Los asteriscos representan diferencias significativas entre tratamientos (* $p < 0.05$ ).   | 73          |
| <b>Figura 7:</b> A) Tasa de inhibición normalizada por la irradiancia media recibida, en función del porcentaje de nanoplancton, B) Tasa de recuperación normalizada por la irradiancia media recibida, en función del porcentaje de nanoplancton. Los símbolos negros corresponden al tratamiento PAB, los grises al tratamiento PA y los blancos al tratamiento P. En línea negra gruesa se observa en ajuste para el tratamiento PAB, en negra fina el ajuste para el tratamiento PA y en línea punteada el ajuste lineal para el tratamiento P.  | 74          |

**Figura 8:** Relación entre el mecanismos de disipación no fotoquímico (NPQ) y la inhibición para cada uno de los puntos del experimento a lo largo del día y para los tres tratamientos espectrales (PAB, PA y P). A) 29 de abril, B) 13 de Mayo, C) 27 de Mayo, D) 09 Junio, E) 23 de Junio, F) 21 de Julio y G) 04 de agosto de 2005. **76**

**Figura 9:** RF en función del tiempo para las distintas muestras que se expusieron bajo un regimen de irradiancias fluctuantes: CSMs, círculos y CSMp, cuadrados. Las muestras utilizadas fueron: A y B) 28 de Abril, C y D) 12 de Mayo, E y F) 26 de Mayo, G y H) 8 de Junio; I y J) 22 de Junio, K y L) 20 de Julio y M y N) 4 de Agosto. Las muestras "Superficie" se representan con círculos, mientras que las de fondo en cuadrados. Los tratamientnos de radiación utilizados en la experimentación se encuentran diferenciads por color: Negro=PAB, gris=PA y blanco=P. La línea punteada respresenta la irradiancia PAR+RUV ( $W\ m^{-2}$ ) recibida durante la experimentación. Las lí8neas perpendiculares respresentean las desviaciones estándar, para cada punto deurante la experimentación. **78**

**Figura 10:** ETR diario para las distintas condiciones de mezcla utilizadas en la experimentación. A) ETR diario para CSMs. B) ETR diario para CSMp. C) Comparación de los ETR diario para CSMs y CSMp para muestras de superficie D) Comparación de los ETR diario para CSMs y CSMp para muestras de fondo. Las líneas verticales representan las desviaciones estándar para cada punto. **79**

**Figura 11:** ETR diario integrado en función de la dosis diaria media mensual para los sistemas de irradiancias fijas vs. los sistemas de irradiancias fluctuantes para los distintos tratamientos de radiación: A) PAB, B) PA y C) P. Las líneas verticales indican las desviaciones estándar para cada uno de los puntos. **80**

**Figura 12:** Tasa resultante de la relación entre el NPQ y la inhibición del RF en cada punto a lo largo del experimento, con respecto al tiempo inicial bajo los tratamientos P (A) y PAB (B), para las distintas condiciones experimentales. **81**

## Agradecimientos

El trabajo doctoral demanda un compromiso permanente tanto en el plano científico, humano, como espiritual. Al momento de escribir estos agradecimientos es una larga lista de personas que estuvieron a mi lado, la cual sería imposible de nombrar, asociadas cada una a situaciones de la vida que llegan a mi mente y mi corazón. A todas esas almas que estuvieron a mi lado quiero hoy decirles de corazón... Gracias, por todos y cada uno de los momentos que hemos compartido a lo largo de estos cinco años. Algunas de esas personas están cerca, otras están lejos, pero sin embargo siempre están presentes. A todas quiero hoy regalarles este pequeño poema que encierra muchas de las cosas que he aprendido durante esta etapa de mi vida, y cosas que nunca debemos olvidar...

### Uno no escoge

Uno no escoge el país donde nace;  
pero ama el país donde ha nacido.

Uno no escoge el tiempo para venir al mundo;  
pero debe dejar huella de su tiempo.

Nadie puede evadir su responsabilidad.

Nadie puede taparse los ojos, los oídos,  
enmudecer y cortarse las manos.

Todos tenemos un deber de amor que cumplir,  
una historia que hacer,  
una meta que alcanzar

No escogimos el momento para venir al mundo:  
Ahora podemos hacer el mundo,  
en que nacerá y crecerá  
la semilla que trajimos con nosotros.

En el marco de este trabajo doctoral se agradece a las siguientes instituciones:

- ❖ Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET).
- ❖ Agencia Nacional de Promoción Científicas y Tecnológicas (ANPCyT).
- ❖ Fundación Playa Unión (FPU).
- ❖ Universidad Nacional del Comahue (UNCOMA).

*iii GRACIAS!!!*



**Referencias**

- Andrade Flores, M. (2003) Aspectos físicos de la atmósfera: La atmósfera. En: La radiación ultravioleta en Bolivia, Zaratti Sacchetti y Forno Gisbert editores. p. 3-14.
- Ayestarán, M.G., & Sastre, A.V. (1995) Diatomeas del curso inferior del Río Chubut (Patagonia Argentina). Pennales I: Naviculaceae. Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica 31 (1-2), 57-68.
- Banaszak, A.T. & Neale, P.J. (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. En: UV effects in aquatic organisms and ecosystems. The Royal Society of Chemistry. E. W. Helbling & H. E. Zagarese editores. p. 329-356.
- Bandaranayake, W.M. (1998) Mycosporines: Are they nature's screens? *Natural Products Reports*. 159-172.
- Blankenship, R. (2001) Molecular mechanisms of photosynthesis. Blackwell Science.
- Barbieri, E.S., Villafañe, V.E. & Helbling, E.W. (2000) Inhibición fotosintética producida por la RUV en el fitoplancton de Bahía Engaño (Chubut, Argentina). IV Jornadas Nacionales de Ciencias del Mar, Puerto Madryn, Argentina (poster / abstract).
- Bidigare, R.R. (1989) Potential effects of UV-B radiation on marine organisms of the southern ocean: distributions of phytoplankton and krill during austral spring. *Photochemistry and Photobiology* 50(4), 469-477.
- Bothwell, M.L., Sherbot, D., Roberge, A.C., & Daley, R.J. (1994) Ecosystem response to solar ultraviolet-B radiation: Influence of trophic-level interactions. *Journal of Phycology* 29: 24-35.
- Bouchard, J.N., Roy, S., Ferreyra, G., Campbell, D.A., & Curtosi, A. (2005) Ultraviolet-B effects on photosystem II efficiency of natural phytoplankton communities from Antarctica *Polar Biology* 28:607-618.
- Buma, A.G.J., Van Hannen, E.J., Veldhuis, M.J.W. & Gieskes, W.W.C. (1995) Monitoring ultraviolet-B-induced DNA damage in individual diatom cells by immunofluorescent thymine dimer detection. *Journal of Phycology* 31, 314-321.
- Buma, A.G.J., Engelen, A.H. & Gieskes, W.W.C. (1997) Wavelength-dependent induction of thymine dimers and growth rate reduction in the marine diatom *Cyclotella* sp. exposed to ultraviolet radiation. *Marine Ecology Progress Series* 153, 91-97.
- Buma, A.G.J., Helbling, E.W., de Boer, M.K. & Villafañe, V.E. (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., Boelen, P. & Jeffrey, W.H. (2003) UVR-induced DNA damage in aquatic organisms. En: UV effects in aquatic organisms and ecosystems. The Royal Society of Chemistry. E. W. Helbling & H. E. Zagarese editores. p. 291-327.
- Caldwell, M.M., Teramura, A.H., Tevini, M., Bornman, J.F., Björn, L.O., & Kulandaivelu, G. (1995) Effects of increased solar ultraviolet radiation on terrestrial plants. *Ambio* 24:3-166
- Carreto, M.O., Carignan, G., Daleo, S., & De Marco. (1990) Occurrence of mycosporine-like aminoacids in the red-tide dino.agellate *Alexandrium excavatum*: UV-photoprotective compounds? *Journal of Plankton Reserach* 12, 909-921.
- Charpy, L.J., & Charpy-Roubaud, C.J. (1980) La production primaire des eaux du Golfe San Jose (Peninsule Valdes, Argentine).III. Estimation de la production phytoplantonique annuelle. *Hydrobiologia* 75, 225-229.
- Cullen, J.J., & Lewis, M.R. (1988) The kinetics of algal photoadaptation in the context of vertical mixing. *Journal of Plankton Research* 10 (5), 1039-1063.
- Cullen, J.J., & Neale, P.J. (1994) Ultraviolet radiation, ozone depletion, and marine photosynthesis. *Photosynthesis Research* 39, 303-320.
- Denman, K.L., & Gargett, A.E. (1983) Time and space scales of vertical mixing and advection of phytoplankton in the upper ocean. *Limnology and Oceanography* 28 (5), 801-815.



- Döhler, G. (1987) Effect of irradiation on nitrogen metabolism in marine diatoms and phytoplankton. *Oceanis*, 13, 487-493.
- Döhler, G. (1997) Assimilation of inorganic nitrogen by Antarctic and temperate marine phytoplankton species under UV stress. *Russian Journal of Plant Physiology* 44(4), 518-525.
- Dunlap, W.C., Rae, G.A., Helbling, E.W., Villafañe, V.E., & Holm-Hansen, O. (1995) Ultraviolet-absorbing compounds in natural assemblages of Antarctic phytoplankton. *Antarctic Journal of the United States* 30, 323-326.
- Dunlap W.C. & Yamamoto, Y. (1995) Small molecular antioxidants in marine organisms: Antioxidant activity of mycosporine-glycine. *Comp. Biochem. Physiol.* 112: 105-114.
- Falkowski, P.G., & Wirick, C.D. (1981) A simulation model of the effects of vertical mixing on primary productivity. *Marine Biology* 65, 69-75.
- Falkowski, P.G., & Kolber, Z. (1993) Estimation of phytoplankton photosynthesis by active fluorescence. *Marine Science Symposium*. 197: 92-103
- Falkowski, P.G., & Raven, J.A. (1997) *Aquatic photosynthesis*. Massachusetts, U.S.A.: Blackwell Science.
- Farman, J.C., Gardiner, B.G., & Shanklin, J.D. (1985) Large losses of total ozone in Antarctica reveal seasonal ClOx/NOx interaction. *Nature* 315, 207-210.
- Figueroa, F.L., Salles, S., Aguilera, J., Jiménez, C., Mercado, J., Viñegla, B., Flores-Moya, A., & Altamirano, M. (1997) Effects of solar radiation on photoinhibition and pigmentation in the red alga *Porphyra leucosticta*. *Marine Ecology Progress Series* 151, 81-90.
- Gallegos, C.L., & Platt, T. (1982) Phytoplankton production and water motion in surface mixed layers. *Deep-Sea Research* 29 (1A), 65-76.
- Garcia-Pichel, F. (1994) A model for internal shelf-shading in planktonic organisms and its implications for the usefulness of ultraviolet sunscreens. *Limnology and Oceanography* 39, 1704-1717.
- Gayoso, A.M. (2001) Observations on *Alexandrium tamarense* (Lebour) Balech and other dinoflagellate populations in Golfo Nuevo, Patagonia (Argentina). *Journal of Plankton Research* 23(1).
- Genty, B.E., Briantais, J.M., & Baker, N.R. (1989) Relative quantum efficiencies of the two photosystems of leaves in photorespiratory and non-photorespiratory conditions. *Plant Physiology and Biochemistry* 28, 1-10.
- Gerber, S., & Häder, D.P. (1995) Effects of enhanced solar irradiation on chlorophyll fluorescence and photosynthetic oxygen production of five species of phytoplankton. *FEMS Microbiology Ecology* 16, 33-42.
- Gribbin, J. 1988. *The hole in the sky*. Bantam Books, New York, 192 pp.
- Guillard, R.R.L., & Ryther, J.H. (1962) Studies of marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Husted, and *Detonula confervacea* (Cleve) Gran. *Canadian Journal of Microbiology* 8, 229-239.
- Häder, D. P., & Figueroa, F.L. (1997) Photoecophysiology of marine macroalgae. *Photochemistry and Photobiology* 66(1), 1-14.
- Häder, D.P., & Worrest, R.C. (1997) Consequences of the effects of increased solar ultraviolet radiation on aquatic ecosystems. En: *The effects of ozone depletion on aquatic ecosystems*. Environmental Intelligence Unit. R. G. Landes Company, Academic Press, Texas, USA, D.P. Häder, editor. p. 11-30.
- Hanelt, D. (1996) Photoinhibition of photosynthesis in marine macroalgae *Scientia Marina* 60: 243-248.
- Helbling, E.W., Santamarina, J.M., & Villafañe, V.E. (1992a) Chubut river estuary (Argentina): estuarine variability under different conditions of river discharge. *Revista de Biología Marina* 27(1), 73-90.
- Helbling, E.W., Villafañe, V.E., Ferrario, M.E., & Holm-Hansen, O. (1992b) 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., Villafañe, V.E. & Holm-Hansen, O. (1994) Effects of ultraviolet radiation on Antarctic marine phytoplankton photosynthesis with particular attention to the influence of

- mixing. En: Ultraviolet Radiation in Antarctica: Measurements and Biological Effects. American Geophysical Union. C.S. Weiler & P.A. Penhale, editores. p. 207-227.
- Helbling, E.W., Chalker, B.E., Dunlap, W.C., Holm-Hansen, O. & Villafañe, V.E. (1996a) Photoacclimation of antarctic marine diatoms to solar ultraviolet radiation. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 204, 85-101.
- Helbling, E.W., Eilertsen, H.C., Villafañe, V.E., & Holm-Hansen, O. (1996b) Effects of UV radiation on post-bloom phytoplankton populations in Kvalsund, North Norway. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 33, 255-259.
- Helbling, E.W., Buma, A.G.J., de Boer, M.K., & Villafañe, V.E.. (2001a) *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., Villafañe, V.E., & Barbieri, E.S. (2001b) Sensitivity of winter phytoplankton communities from Andean lakes to ultraviolet-B radiation. *Revista Chilena de Historia Natural* 74, 273-282.
- Helbling, E.W., Villafañe, V.E., Buma, A.G.J., Andrade, M., & Zaratti, F. (2001c) DNA damage and photosynthetic inhibition induced by solar UVR in tropical phytoplankton (Lake Titicaca, Bolivia). *European Journal of Phycology* 36, 157-166.
- Helbling, E.W., Gao, K., Goncalves, R.J., Wu, H., & Villafañe, V.E. (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., & Zagarese, H.E. (2003) UV effects in aquatic organisms and ecosystems. *Comprehensive Series in Photochemical and Photobiological Sciences*, The Royal Society of Chemistry. pp. 575.
- Helbling, E.W., Barbieri, E.S., Marcoval, M.A., Goncalves, R.J., & Villafañe, V.E. (2005) Impact of Solar Ultraviolet Radiation on Marine Phytoplankton of Patagonia, Argentina. *Photochemistry and Photobiology* 81, 807-818.
- Helbling, E.W., Farias, M.E., Fernandez Zenoff, M.V., & Villafañe, V.E. (2006) *In situ* responses of phytoplankton from the subtropical Lake La Angostura (Tucumán, Argentina) in relation to solar ultraviolet radiation exposure and mixing conditions. *Hydrobiologia* 559, 123-134.
- Hernando, M.P. & Ferreyra, G.A. (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.
- Holm-Hansen, O., Lorenzen, C.J., Holmes, R.W., & Strickland, J.D.H. (1965) Fluorometric determination of chlorophyll. *Journal du Conseil permanent International pour l'Exploration de la Mer* 30 (1), 3-15.
- Holm-Hansen, O., & Riemann, B. (1978) Chlorophyll a determination: improvements in methodology. *Oikos* 30, 438-447.
- Holm-Hansen, O., Helbling, E.W., & Lubin, D. (1993) Ultraviolet radiation in Antarctica: inhibition of primary production. *Photochemistry and Photobiology* 58(4), 567-570.
- Holm-Hansen, O., & Helbling, E.W. (1995) Técnicas para la medición de la productividad primaria en el fitoplancton. En: *Manual de Métodos Ficológicos*. Universidad de Concepción. K. Alveal, M.E. Ferrario, E.C. Oliveira, & E. Sar, editores. p. 329-350.
- Huot, Y., Jeffrey, W.H., Davis, R.F., & Cullen, J.J. (2000) Damage to DNA in bacterioplankton: A model of damage by ultraviolet radiation and its repair as influenced by vertical mixing. *Photochemistry and Photobiology* 72, 62-74.
- Ibelings B.W., Kroon, B.M.A., & Mur, L.R. (1994) Acclimation of photosystem II in a cyanobacterium and a eukaryotic green alga to high and fluctuating photosynthetic photon flux densities, simulating light regimes induced by mixing in lakes. *New Phytol.* 128: 407-424.
- Jewson, D.H., & Wood, R.B. (1975) Some effects on integral photosynthesis of artificial circulation of phytoplankton through light gradients. *Internationale Vereinigung fur Theoretische und Angewandte Limnologie* 19, 1037-1044.
- Jokiel, P.L., & York, R.H. (1984) Importance of ultraviolet radiation in photoinhibition of microalgal growth. *Limnology and Oceanography* 29 (1), 192-199.

- Kiefer, D. A. (1973) Chlorophyll a fluorescence in marine centric diatoms: responses of chloroplasts to light and nutrient stress. *Marine Biology* 23, 39-46.
- Kirk, J.T.O. (1994) *Light and photosynthesis in aquatic ecosystems*, 2 ed. Cambridge University Press. pp. 509.
- Köhler, J., Schmitt, M., Krumbeck, H., Kapfer, M., Litchmann, E., & Neale, P.J. (2001) Effects of UV on carbon assimilation of phytoplankton in a mixed water column. *Aquatic Sciences* 63, 294-309.
- 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 (8), 1031-1054.
- Krause, G.H. & Weis, E. (1991) Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: The basis. 42:313-349.
- Kroon, B.M.A., Latasa, M., Ibelings, B.W., & Mur, L.R. (1992) The effect of dynamic light regimes on *Chlorella*. I. Pigments and cross sections. *Hydrobiologia* 238, 71-78.
- Lesser, M.P., Cullen, J.J., & Neale, P.J. (1994) Carbon uptake in a marine diatom during acute exposure to ultraviolet B radiation: relative importance of damage and repair. *Journal of Phycology* 30, 183-192.
- Lesser, M.P. (1996) 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.
- Lewis, M.R., Horne, E.P.W., Cullen, J.J., Oakey, N.S., & Platt, T. (1984) Turbulent motions may control phytoplankton photosynthesis in the upper ocean. *Nature* 311, 49-50.
- Litchman, E. (1998) Population and community responses of phytoplankton to fluctuating light. *Oecologia*. 117: 247-257.
- Litchman, E. (2000) Growth rates of phytoplankton under fluctuating light. *Freshwater Biology* 44, 223-235.
- Litchman, E., Neale, P.J., & Banaszak, A.T. (2002) Increased sensitivity to ultraviolet radiation in nitrogen-limited dinoflagellates: Photoprotection and repair. *Limnology and Oceanography* 47(1), 86-94.
- Litchman, E. (2003) Competition and coexistence of phytoplankton under fluctuating light: Experiments with two cyanobacteria. *Aquatic Microbial Ecology*. 31: 241-248.
- Litchman E., Klausmeier, C.A., & Bossard, P. (2004) Phytoplankton nutrient competition under dynamic light regimes. *Limnology and Oceanography* 49: 1457-1462.
- Lubin, D., & Holm-Hansen, O. (1995) Atmospheric ozone and the biological impact of solar ultraviolet radiation. *Encyclopedia of environmental biology*. Academic Press, Inc. p. 147-168.
- Lubin, D., & Jensen, E.H. (1995) Effects of clouds and stratospheric ozone depletion on ultraviolet radiation trends. *Nature* 377, 710-713.
- Madronich, S. (1993) The atmosphere and UV-B radiation at ground level. En: *Environmental UV photobiology*. Plenum Press. Young, A.R., Björn, L.O., Moan, J. & Nultsch, W. p. 1-39.
- Marra, J. (1978) Phytoplankton photosynthetic response to vertical movement in a mixed layer. *Marine Biology* 46, 203-208.
- Marwood, C.A., Smith, R.E.H., Furgal, J.A., Charlton, M.N., Solomon, K.R., & Greenberg, B.M. (2000) Photoinhibition of natural phytoplankton assemblages in Lake Erie exposed to solar ultraviolet radiation. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 57, 371-379.
- Maske, H., & Latasa, M. (1997) Solar ultraviolet radiation dependent decrease of particle light absorption and pigments in lake phytoplankton. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 54, 697-704.
- Maxwell, K., Johnson, G.N. (2000) Chlorophyll fluorescence - a practical guide. *Journal of Experimental Botany* 51: 659-668.
- Mitchell, B.G., & Holm-Hansen, O. (1991) Observations and modelling of the Antarctic phytoplankton crop in relation to mixing depth. *Deep-Sea Research* 38 (8/9), 981-1007.

- Neale, P.J., Cullen, J.J., & Davis, R.F. (1998a) Inhibition of marine photosynthesis by ultraviolet radiation: Variable sensitivity of phytoplankton in the Weddell-Scotia Confluence during the austral spring. *Limnology and Oceanography* 43, 433-448.
- Neale, P.J., Davis, R.F., & Cullen, J.J. (1998b) Interactive effects of ozone depletion and vertical mixing on photosynthesis of Antarctic phytoplankton. *Nature* 392, 585-589.
- Neale, P.J., Helbling, E.W., & Zagarese, H.E. (2003) Modulation of UVR exposure and effects by vertical mixing and advection. En: *UV effects in aquatic organisms and ecosystems*. Royal Society of Chemistry. E.W. Helbling & H.E. Zagarese editores.
- Oliver, R.L. & Whittington, J. (1998) Using measurements of variable chlorophyll-a fluorescence to investigate the influence of water movement on the photochemistry of phytoplankton. En: *Physical Processes in Lakes and Oceans. Coastal and Estuarine Studies*. American Geophysical Union, Washington DC. Imberger, J. editor. p. 517-534.
- Oliver, R.L., Whittington, J., Lorenz, Z., & Webster, I.T. (2003) The influence of vertical mixing on the photoinhibition of variable chlorophyll a fluorescence and its inclusion in a model of phytoplankton photosynthesis. *Journal of Plankton Research* 25(9), 1107-1129.
- Orce, V.L., & Helbling, E.W. (1997a) Latitudinal UVR-PAR measurements in Argentina: Extent of the "ozone hole". *Global and Planetary Change* 15, 113-121.
- Orce, V.L., Paladini, A., & Helbling, E.W. (1997b) Radiación ultravioleta y ozono atmosférico: Influencia del "agujero" de ozono en Argentina. En: *Naturaleza y efectos de la radiación ultravioleta y la capa de ozono*. Instituto de Investigaciones Físicas. R. Forno & M. Andrade editores. p. 31-41.
- Orfila, J.D., Scapini, M.C., Perillo, G.M.E. & Piccolo, M.C. (1987) Características químicas del estuario del río Chubut. 1-6. La Molina, Perú, 2° Congreso Latinoamericano de Ciencia del Mar.
- Osmond, C.B. (1994). What is photoinhibition? Some insights from comparisons of shade and sun plants. En: *Photoinhibition of photosynthesis, from molecular mechanisms to the field*. Bios Scientific Publ. N.R. Baker & J.R. Bowyer editores. p. 1-24.
- Perillo, G.M.E., Piccolo, M.C., Scapini, M.C., & Orfila, J. (1987) Hidrografía del estuario del río Chubut (Argentina) en condiciones de baja descarga. 1-8. La Molina, Perú, Congreso Latinoamericano de Ciencias del Mar.
- Perillo, G.M.E., Piccolo, M.C., Scapini, M.C., & Orfila, J. (1989) Hydrography and circulation of the Chubut river estuary (Argentina). *Estuaries* 12 (3), 186-194.
- Raven J.A. (1994) The cost of photoinhibition to plant communities. En: *Photoinhibition of photosynthesis: From molecular mechanisms to the field*. Bios Scientific, Oxford. N. Baker & J. Bowyer editores. p. 449-464.
- Richardson K., J. Beardall and J. A. Raven. 1983. Adaptation of unicellular algae to irradiance: An analysis of strategies. *New Phytol.* 93: 157-191.
- Rodríguez-Román, A. & Iglesias-Prieto, R. (2005) Regulation of photochemical activity in cultured symbiotic dinoflagellates under nitrate limitation and deprivation. *Marine Biology*. 146: 1063-1073.
- Roy, S. (2000) Strategies for the minimization of UV-induced damage. En: *The effects of UV radiation in the marine environment*. Cambridge Environ. Chem. Ser., 10. Cambridge University Press, Cambridge. De Mora, S., Demers, S. & Vernet, M. editores. p. 177-205.
- Sancar, A., & Sancar, G.B. (1988) DNA repair enzymes. *Annual Review of Biochemistry* 57, 29-67.
- Santinelli, N., & Esteves, J.L. (1993) Características químicas y fitoplanctónicas del estuario del Río Chubut (Patagonia, Argentina). *Naturalia Patagónica, Ciencias Biológicas* 1, 22-34.
- Sastre, A.V., Santinelli, N.H., Otaño, S.H., & Ivanissevich, M.E. (1998) Water quality in the lower section of the Chubut River, Patagonia, Argentina. *Verhandlungen Internationale Vereinigung für Theoretische und Angewandte Limnologie* 26, 951-955.
- Smith, R.C. (1989) Ozone, middle ultraviolet radiation and the aquatic environment. *Photochemistry and Photobiology* 50 (4), 459-468.
- Steele J.H. (1985) A comparison of terrestrial and marine ecological systems. *Nature*. 313: 355-358.

- Sverdrup, H.U. (1953) On conditions for the vernal blooming of phytoplankton. *Journal du Conseil permanent International pour l' Exploration de la Mer* 18, 287-295.
- Villafañe, V.E., Helbling, E.W. & Santamarina, J. (1991) Phytoplankton blooms in the Chubut river estuary (Argentina): Influence of stratification and salinity. *Revista de Biología Marina* 26 (1), 1-20.
- Villafañe, V.E., Helbling, E.W., & Holm-Hansen, O. (1995) 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., & Reid, F.M.H. (1995) Métodos de microscopía para la cuantificación del fitoplancton. En: *Manual de Métodos Ficológicos*. Universidad de Concepción. K. Alveal, M.E. Ferrario, E.C. Oliveira, & E. Sar editores. p. 169-185.
- Villafañe, V.E., Helbling, E.W., Holm-Hansen, O. & Chalker, B.E. (1995c) Acclimatization of Antarctic natural phytoplankton assemblages when exposed to solar ultraviolet radiation. *Journal of Plankton Research* 17(12), 2295-2306.
- Villafañe, V.E., Helbling, E.W., & Zagarese, H.E. (2001) Solar ultraviolet radiation and its impact on aquatic systems of Patagonia, South America. *Ambio* 30(2), 112-117.
- Villafañe, V.E., Sundbäck, K., Figueroa, F.L., & Helbling, E.W. (2003) Photosynthesis in the aquatic environment as affected by UVR. En: *UV effects in aquatic organisms and ecosystems*. Royal Society of Chemistry. E.W. Helbling & H.E. Zagarese editores. p. 325-365.
- Villafañe, V.E., Barbieri, E.S., & Helbling, E.W. (2004a) Annual patterns of ultraviolet radiation effects on temperate marine phytoplankton off Patagonia, Argentina. *Journal of Plankton Research* 26(2), 167-174.
- Villafañe, V.E., Buma, A.G.J., Boelen, P., & Helbling, E.W. (2004b) Solar UVR-induced DNA damage and inhibition of photosynthesis in phytoplankton from Andean lakes of Argentina. *Archiv für Hydrobiologie* 161 (2), 245-266.
- Villafañe, V.E., Marcoval, M.A., & Helbling, E.W. (2004c) Photosynthesis versus irradiance characteristics in phytoplankton assemblages off Patagonia (Argentina): Temporal variability and solar UVR effects. *Marine Ecology Progress Series* 284, 23-34.
- Wängberg, S.A., Selmer, J.A., & Gustavson, K. (1996) Effects of UV-B radiation on biomass and composition in marine phytoplankton communities. *Scientia Marina* 60(Supl. 1), 81-88.
- Weis, A. & Berry, J. (1987) Quantum efficiency of Photosystem II in relation to energy dependent quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochim Biophys Acta* 894: 198-208
- Xenopoulos, M.A., Prairie, Y.T., & Bird, D.F. (2000) Influence of ultraviolet-B radiation, stratospheric ozone variability, and thermal stratification on the phytoplankton biomass dynamics in a mesohumic lake. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 57, 600-609.
- Yoder, J.A., & Bishop, S.S. (1985) Effects of mixing-induced irradiance fluctuations on photosynthesis of natural assemblages of coastal phytoplankton. *Marine Biology* 90, 87-93.
- Zagarese, H.E., Cravero, W., González, P., & Pedrozo, F. (1998) Copepod mortality induced by fluctuating levels of natural ultraviolet radiation simulating vertical water mixing. *Limnology and Oceanography* 43(1), 169-174.
- Zar, J.H. (1984) *Biostatistical analysis*, 2nd ed. Prentice Hall.
- Zaratti Sacchetti, F. (1997) La radiación solar. En: *Naturaleza y efectos de la radiación ultravioleta y la capa de ozono*. Instituto de Investigaciones Físicas – UMSA, La Paz, Bolivia. R. Forno G., M. Andrade F. editores. P. 1-7.
- Zaratti Sacchetti, F. & Forno Gisbert, R. (2003) La radiación ultravioleta en Bolivia. *Organización Panamericana de la salud y laboratorio de física de la atmósfera*. pp. 164.