



Universidad Nacional del Comahue
Centro Regional Universitario Bariloche

*Efectos combinados de la radiación
ultravioleta y la temperatura en
cianobacterias*

Trabajo de tesis para optar al grado de Doctor en Biología

Lic. María Valeria Fiorda Giordanino

Director: E. Walter Helbling

Co-directora: Virginia E. Villafañe

2014

Resumen

Las cianobacterias son un grupo de organismos fototróficos de gran importancia, tanto ecológica como económica. Desde un punto de vista de cambio climático, se considera que estos organismos son los mejores adaptados al aumento de la temperatura y de los niveles de RUV, principales efectos de este fenómeno de origen antrópico.

Esta Tesis tiene como objetivo de determinar los efectos combinados de la RUV (280-400 nm) y la temperatura en la morfología, fotosíntesis, crecimiento y diversos procesos metabólicos de cianobacterias, tales como la actividad de ciertas enzimas o la síntesis de pigmentos fotosintéticos (clorofila-a y carotenoides), y potencialmente fotoprotectores (compuestos que absorben RUV - CARUV).

Como resultado de la experimentación realizada se concluye que las cianobacterias tienen una gran adaptabilidad tanto a las condiciones normales como aumentadas en los niveles de RUV y al aumento de temperatura. Esta adaptabilidad se comprobó en muestras naturales en las que las cianobacterias fueron parte dominante del fitoplancton tanto a lo largo del año como de manera circunstancial; en el primer caso se observó que las respuestas eran uniformes a lo largo del ciclo estudiado y solo se alteraban frente a fenómenos extraordinarios mientras que en el segundo caso, las respuestas variaron dependiendo de la composición taxonómica de la muestras: la fotoinhibición era mayor cuando la comunidad estaba dominada por otros grupos (i. e., clorofitas) pero también se observó que cuando la comunidad estaba dominada por cianobacterias, la respuestas variaban de acuerdo a la especie predominante (especie-especificidad).

Así como los efectos de la radiación y la temperatura variaron de acuerdo a la composición taxonómica de las comunidades, los mecanismos que permitieron la adaptación a las condiciones experimentales variaron entre las diferentes especies. De esta forma, las respuestas especie-específicas observadas incluyeron cambios morfológicos en el caso de *Arthrospira platensis*, la síntesis de CARUV en el caso de *Anabaena* sp. o, de carotenoides en el caso de *Planktothrix agardhii*.

Summary

Cyanobacteria are a group of phototrophic organisms that have great ecological and economical importance. From the point of view of climate change, it is considered that these organisms are the best adapted to increases in temperature and UVR levels, which are the main outcomes of this anthropogenic phenomenon.

This thesis has the objective to determine the combined effects of UVR (280-400 nm) and temperature on the morphology, photosynthesis, growth and diverse metabolic processes in cyanobacteria, such as the activity of some enzymes or the synthesis of photosynthetic pigments (chlorophyll a and carotenoids), and potentially photoprotective (UV-absorbing compounds, UVAC).

As a result of the experimentation conducted it is concluded that cyanobacteria are well adapted both to normal and to enhanced UVR levels and increased temperatures. This adaptability was proved in natural samples where cyanobacteria dominated either throughout the year or circumstantially, in the first case it was observed that responses were uniform throughout the study period and that they were only altered under extraordinary conditions, while in the second case, the responses varied with the taxonomic composition of samples: photoinhibition was higher when the community was dominated by other groups (i.e., chlorophytes), but it was also observed that when the community was dominated by cyanobacteria, responses differed according to the predominant species (species-specificity).

As the effects of radiation and temperature varied according to the taxonomic composition of the communities, the underlying mechanisms of this adaptation varied among the different species as well. Thus, the species-specific responses observed included morphological changes in the case of *Arthrospira platensis*, UVAC synthesis in the case of *Anabaena* sp. or carotenoids in the case of *Planktothrix agardhii*.

Contenidos

Agradecimientos	9
Listado de tablas y figuras	10
Listado de abreviaturas	13
Capítulo 1: Introducción general	15
1.1 Cambio climático.....	16
1.1.1 Impacto del cambio climático sobre los ecosistemas.....	19
1.2 Radiación ultravioleta.....	20
1.2.1 Penetración de la RUV en la columna de agua.....	20
1.2.2 Efectos de la RUV sobre los ecosistemas acuáticos.....	22
1.3 Temperatura.....	22
1.4 Cianobacterias.....	23
1.4.1 Conceptos generales.....	23
1.4.2 Importancia de las cianobacterias.....	25
1.4.2.1 Estudios sobre cianobacterias en Argentina.....	28
1.4.3 Fotobiología de cianobacterias.....	29
1.4.4 Las cianobacterias en el contexto del cambio climático.....	31
1.5 Fundamentación general de la Tesis.....	33
1.6 Hipótesis de trabajo.....	35
Capítulo 2: Efecto de la radiación ultravioleta y de la temperatura en un sistema eutrófico con sucesión estacional: Laguna Cacique Chiquichano (Trelew, Chubut)	38
2.1 Introducción.....	39
2.1.1 Efecto de la radiación ultravioleta sobre las comunidades.....	39
2.1.2 Efecto de la temperatura sobre las comunidades.....	40
2.1.3 Interacción entre radiación y temperatura.....	40

2.1.4	Rol del nitrógeno en el metabolismo del fitoplancton.....	41
2.1.5	Objetivo.....	42
2.2	Materiales y Métodos.....	43
2.2.1	Sitio de muestreo.....	43
2.2.2	Protocolo de muestreo.....	44
2.2.3	Condiciones experimentales.....	44
2.2.3.1	Experimentos a mediano plazo.....	44
2.2.3.2	Ciclos diarios.....	45
2.2.4	Mediciones.....	46
2.2.4.1	Parámetros de fluorescencia de la Clor-a.....	46
2.2.4.2	Concentración de pigmentos y compuestos que absorben RUV (CARUV).....	46
2.2.4.3	Recuento de células.....	47
2.2.4.4	Mediciones de temperatura y radiación.....	47
2.2.4.5	Concentración de proteínas y actividad Glutamina Sintetasa (GS).....	47
2.2.4.6	Cálculos y estadística.....	48
2.3	Resultados.....	50
2.3.1	Características del sitio de estudio.....	50
2.3.2	Experimentación a corto plazo.....	52
2.3.3	Experimentación a mediano plazo.....	56
2.3.3.1	Condiciones de radiación.....	56
2.3.3.2	Análisis de pigmentos.....	57
2.3.3.3	Análisis taxonómicos.....	58
2.3.3.4	Análisis de fluorescencia de la Clor-a.....	60
2.3.3.5	Actividad enzimática de la glutamina sintetasa (GS).....	62
2.4	Discusión.....	65

Capítulo 3: Efecto de la radiación ultravioleta y de la temperatura en un sistema eutrófico dominado por una cianobacteria filamentosa: Laguna Don Tomás (Santa Rosa, La Pampa).....69

3.1	Introducción.....	70
3.1.1	Eutrofización.....	70
3.1.2	Eutrofización y floraciones de cianobacterias.....	71

3.1.3	Consecuencias ecológicas.....	72
3.1.4	Objetivo.....	72
3.2	Materiales y métodos.....	74
3.2.1	Sitio de muestreo.....	74
3.2.2	Protocolo de muestreo.....	75
3.2.3	Condiciones experimentales.....	75
3.2.3.1	Ciclos diarios.....	75
3.2.3.2	Experimentos a mediano plazo.....	76
3.2.4	Mediciones.....	77
3.2.4.1	Concentración de pigmentos y CARUV.....	77
3.2.4.2	Mediciones de temperatura y radiación.....	77
3.2.4.3	Cálculos y estadística.....	78
3.3	Resultados.....	79
3.3.1	Experimentos de corto plazo.....	79
3.3.2	Experimentos de mediano plazo.....	82
3.3.2.1	Condiciones de radiación.....	82
3.3.2.2	Evolución de la concentración de pigmentos fotosintéticos y compuestos fotoprotectores.....	82
3.3.2.3	Análisis taxonómicos.....	86
3.3.2.4	Análisis de fluorescencia de la Clor-a.....	88
3.3.2.5	Actividad enzimática de la glutamina sintetasa (GS).....	90
3.4	Discusión.....	92
Capítulo 4: Influencia de la radiación ultravioleta y la temperatura sobre la fotosíntesis y la morfología de cianobacterias.....		95
4.1	Introducción.....	96
PARTE A.....		98
4.2	Materiales y métodos.....	98
4.2.1	Condiciones de cultivo y sitio de estudio.....	98
4.2.2	Condiciones experimentales y protocolo de muestreo.....	98
4.2.3	Análisis y mediciones.....	99

4.2.3.1	Parámetros de fluorescencia.....	99
4.2.3.2	Recuentos de células y morfología.....	99
4.2.3.3	Peso seco.....	100
4.2.3.4	Mediciones de radiación y temperatura.....	100
4.2.3.5	Estadística y cálculos.....	100
4.3	Resultados.....	102
4.4	Discusión.....	110
PARTE B	114
4.5	Materiales y métodos.....	114
4.5.1	Condiciones de cultivo.....	114
4.5.2	Condiciones experimentales y protocolo de muestreo.....	114
4.5.3	Mediciones y análisis.....	115
4.5.3.1	Concentración de pigmentos y CARUV.....	115
4.5.3.2	Cálculos y estadística.....	115
4.6	Resultados.....	116
4.7	Discusión.....	122
Capítulo 5: Conclusiones generales	125
5.1	Nuevos interrogantes y perspectivas futuras de investigación.....	126
Bibliografía	130
Anexo 1: Trabajo de respaldo	144

Listado de tablas y figuras

Fig. 1.1 Concentración atmosférica de CO ₂ en Mauna Loa a lo largo del tiempo.....	16
Fig. 1.2 Cambios observados en el período 1961-1990.....	18
Fig. 1.3 Concentración troposférica de CFC-11 (en ppt) en el período 1950-2000.....	19
Fig. 1.4 Espectro electromagnético solar.....	21
Tabla 1.1 Características de los cinco órdenes de las cianobacterias.....	26
Fig. 1.5 Registro de sitios en los que se observaron floraciones de cianobacterias nocivas.....	29
Fig. 1.6 Dependencia de la temperatura de las velocidades de crecimiento específicas.....	32
Fig. 2.1 Mapa de ubicación de la laguna Cacique Chiquichano.....	43
Fig. 2.2 Imágenes de la laguna Cacique Chiquichano.....	44
Fig. 2.3 Condiciones de radiación sobre la EFPU durante el período de estudio.....	50
Fig. 2.4 Condiciones físicas y concentración de Clor-a en la laguna Chiquichano.....	51
Fig. 2.5 Porcentaje de abundancia de los principales grupos algales a lo largo del año.....	52
Fig. 2.6 Ciclo diario típico observado durante la exposición de una muestra.....	53
Fig. 2.7 Valores de k y % Y y RLM para los ciclos diarios.....	54
Fig. 2.8 Condiciones de radiación durante los experimentos de mediano plazo.....	56
Fig. 2.9 Concentraciones de Clor-a a lo largo de los experimentos de mediano plazo.....	57
Tabla 2.1 Evolución de la concentración de Clor-a.....	58
Tabla 2.2 Abundancia celular inicial y final de los experimentos de mediano plazo.....	58
Fig. 2.10 Porcentaje de abundancia inicial y final de los diferentes grupos algales.....	59
Fig. 2.11 Rendimiento fotoquímico a lo largo de los experimentos de mediano plazo.....	61
Fig. 2.12 Valor de b_{exp} y b_{rec} obtenidos del ajuste exponencial del Y.....	62
Fig. 2.13 Actividad de la GS a lo largo de las diferentes etapas experimentales.....	64

Fig. 3.1 Imágenes obtenidas en la laguna Don Tomás durante la experimentación.....	72
Fig. 3.2 Mapa de ubicación de la laguna Don Tomás.....	74
Fig. 3.3 Diagrama del diseño experimental.....	76
Fig. 3.4 Condiciones físicas y concentración de Clor-a en la laguna Don Tomás.....	79
Fig. 3.5 Porcentaje de abundancia de los principales grupos algales a lo largo del año.....	80
Fig. 3.6 Valores de k y % Y y RLM para los ciclos diarios.....	81
Fig. 3.7 Condiciones de radiación sobre la laguna Don Tomás.....	82
Figura 3.8 Concentraciones de Clor-a a lo largo de los experimentos de mediano plazo.....	83
Tabla 3.1 Evolución de la Clor-a en las instancias experimentales.....	83
Figura 3.9 Concentraciones de carotenoides estandarizada por la concentración de Clor-a.....	84
Figura 3.10 Espectros de absorción inicial y final de las muestras.....	85
Tabla 3.2 Tasa de evolución de la relación Carotenoides/Clor-a.....	85
Tabla 3.3 Abundancia celular inicial y final en los experimentos de mediano plazo.....	87
Fig. 3.11 Porcentaje de abundancia inicial y final de los diferentes grupos algales.....	87
Fig. 3.12 Rendimiento fotoquímico a lo largo de los experimentos de mediano plazo.....	89
Fig. 3.13 Valor de b_{exp} y b_{rec} obtenidos del ajuste exponencial del Y.....	90
Fig. 3.14 Actividad de la GS a lo largo de las diferentes etapas experimentales.....	91
Fig. 4.1 Irradiancia durante el período de estudio.....	102
Fig. 4.2 Variaciones del rendimiento fotoquímico durante los experimentos.....	104
Fig. 4.3 Porcentaje de disminución del Y.....	105
Fig. 4.4 Porcentaje de recuperación del Y.....	106
Fig. 4.5 Cambios en el área de las cianobacterias estudiadas.....	108
Fig. 4.6 Fotografías mostrando los cambios morfológicos de las cianobacterias estudiadas.....	109
Fig. 4.7 Evolución de la concentración de Clor-a a lo largo de los experimentos.....	117

Tabla 4.1 Tasa de cambio de la Clor-a durante los experimentos.....	118
Fig. 4.8 Espectro de absorción de las muestras.....	119
Fig. 4.9 Evolución de la altura del pico correspondiente a los CARUV.....	120
Tabla 4.2 Tasa de síntesis de la CARUV durante los experimentos.....	121

Listado de abreviaturas

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ADP: Adenosin-difosfato

ATP: Adenosin-trifosfato

CARUV: Compuestos que absorben RUV

CDOM: Materia orgánica cromofórica disuelta

CFC: Compuestos cloro-fluorocarbonados

Clor-a: Clorofila-a

DOC: Carbono orgánico disuelto

DOM: Materia orgánica disuelta

DTT: Ditiotreititol

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

EFPU: Estación de Fotobiología Playa Unión

ELDONET: European Light Dosimeter Network

F'_m : Máxima fluorescencia inducida por un pulso de luz saturante

F_t : Fluorescencia del estado basal inducida por la influencia de la luz actínica en células adaptadas a la luz.

GOGAT: Glutamato sintetasa

GS: Glutamina sintetasa

IPCC: Grupo Intergubernamental de Expertos sobre el Cambio Climático

I_0 : Irradiancia en la superficie

I_z : Irradiancia a la profundidad z

k : Tasa de inhibición del Y

k_d : Coeficiente de atenuación

k_{PAR} : Coeficiente de atenuación de PAR

k_{Clor-a} : Coeficiente de atenuación calculado a partir de la concentración de Clor-a

Ma: Millones de años

MAAs: Aminoácidos tipo micosporinas

NR: Nitrato reductasa

PAR: Radiación fotosintéticamente activa

P_i : Fósforo inorgánico

PSII: Fotosistema II

RLM: Regresión lineal múltiple.

ROS: especies de oxígeno reactivas

RUBISCO: Ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa oxigenasa

RUV: Radiación ultravioleta

RUV-A: Radiación ultravioleta A

RUV-B: Radiación ultravioleta B

RUV-C: Radiación ultravioleta C

UR: Unidades relativas

Y: Rendimiento fotoquímico

%Y: Porcentaje de recuperación del Y

Capítulo 1

Introducción General

1.1 CAMBIO CLIMÁTICO

Según el Grupo Intergubernamental de Expertos sobre el Cambio Climático (IPCC), el término cambio climático se refiere a cualquier cambio estadístico en el estado medio del clima a lo largo del tiempo, ya sea debido a procesos naturales internos como así también a cambios persistentes de origen antrópico en la composición de la atmósfera o en el uso de la tierra (IPCC 2007a). Sin embargo, el fenómeno de cambio climático moderno se entiende principalmente como aquellos en la composición atmosférica generados por el hombre (Karl & Trenberth 2003). Según los informes del IPCC (Houghton *et al.* 2001, IPCC 2007b) la concentración atmosférica de CO₂ (Fig. 1.1) se ha incrementado de 280 ppm en 1750 a 379 ppm en 2005 (35%); en el mismo período la concentración de metano en la atmósfera tuvo un aumento del 60%, mientras que el óxido nitroso aumentó un 18%. Estos gases, junto con otros, reciben colectivamente el nombre de “gases invernadero” y son responsables de retener parte de la radiación que se refleja desde la Tierra de regreso al espacio. Frente a un cambio en las concentraciones normales de estos gases, se altera el balance de energía del sistema climático; de hecho, el aumento de las concentraciones atmosféricas de gases invernadero en los últimos años ha generado un aumento del efecto invernadero dando lugar al calentamiento global.

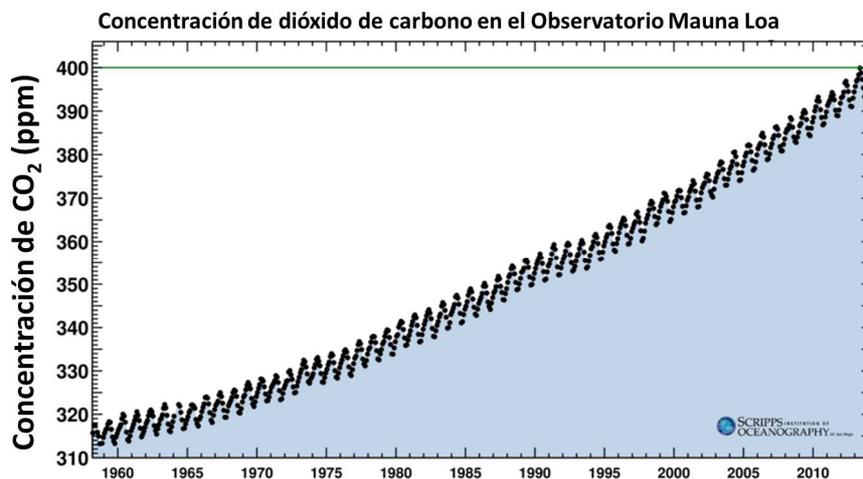


Fig. 1.1 Evolución de la concentración atmosférica de CO₂ registrada en Mauna Loa, Hawaii (línea negra) a lo largo del tiempo (1955-actual). Fuente: <http://keelingcurve.ucsd.edu>

La presencia en la atmósfera de los gases invernadero y su contribución en el fenómeno de calentamiento global ha tenido diferentes consecuencias a nivel mundial: entre otras, por ejemplo, la temperatura superficial promedio global ha aumentado en $0.6 \pm 0.2^\circ \text{C}$ (Fig. 1.2A) desde fines del siglo XIX (IPCC 2007a). Aún más, el mismo reporte indica que hacia 2100 la temperatura media habrá aumentado entre $1.4\text{-}5.8^\circ \text{C}$. El aumento de temperatura se ha visto acompañado por varias observaciones experimentales: el contenido de calor promedio global del océano ha aumentado significativamente desde 1950 junto con el nivel promedio global del mar (Meehl *et al.* 2005) (Fig. 1.2B), las precipitaciones anuales continúan aumentando en las latitudes medias y altas del Hemisferio Norte, excepto para el este de Asia. Por su parte, existe una correlación directa entre el aumento de temperatura y la disminución de la cobertura de nieve y la superficie de tierra cubierta por hielo (Fig. 1.2C). Asimismo, el aumento de la temperatura ha provocado cambios en las concentraciones atmosféricas de vapor de agua; esto ha causado un aumento en la cantidad total de nubes en las regiones continentales de las latitudes medias y altas del Hemisferio Norte, lo que está correlacionado positivamente con la disminución de la amplitud térmica a lo largo del día. A su vez, algunos estudios recientes muestran que en aquellas regiones en las que las precipitaciones han aumentado, ha sido no solo en su frecuencia, sino también en su abundancia. Dado que las precipitaciones estacionales determinan los patrones de descarga y por ende, la concentración de nutrientes en un cuerpo de agua (Zhu *et al.* 2005), un aumento de éstas provoca fenómenos de escorrentía (*runoff*) y de transporte de nutrientes alóctonos hacia los mismos (Delpla *et al.* 2009, Carpenter *et al.* 1992).

Por su parte, otro tipo de gases de origen antrópico alteran la variabilidad climática natural: los halocarbonos. Los halocarbonos son compuestos carbonados que contienen halógenos: cloruro, yoduro, bromuro y fluoruro; estos dos últimos ocasionan una disminución en la concentración de ozono estratosférico y un consecuente aumento de los niveles de radiación ultravioleta (RUV, 280-400 nm) que llegan a la superficie terrestre. Por tal motivo, se decidió consensuar un control de su emisión en 1987 mediante el protocolo de Montreal. Desde entonces, la concentración de muchos de estos gases en distintas partes de la atmósfera se encuentra disminuyendo o aumentando muy lentamente (Montzka *et al.* 1999, Houghton *et al.* 2001, IPCC 2007a). La Fig. 1.3 muestra la evolución de la concentración de uno de estos compuestos a nivel de la tropósfera,

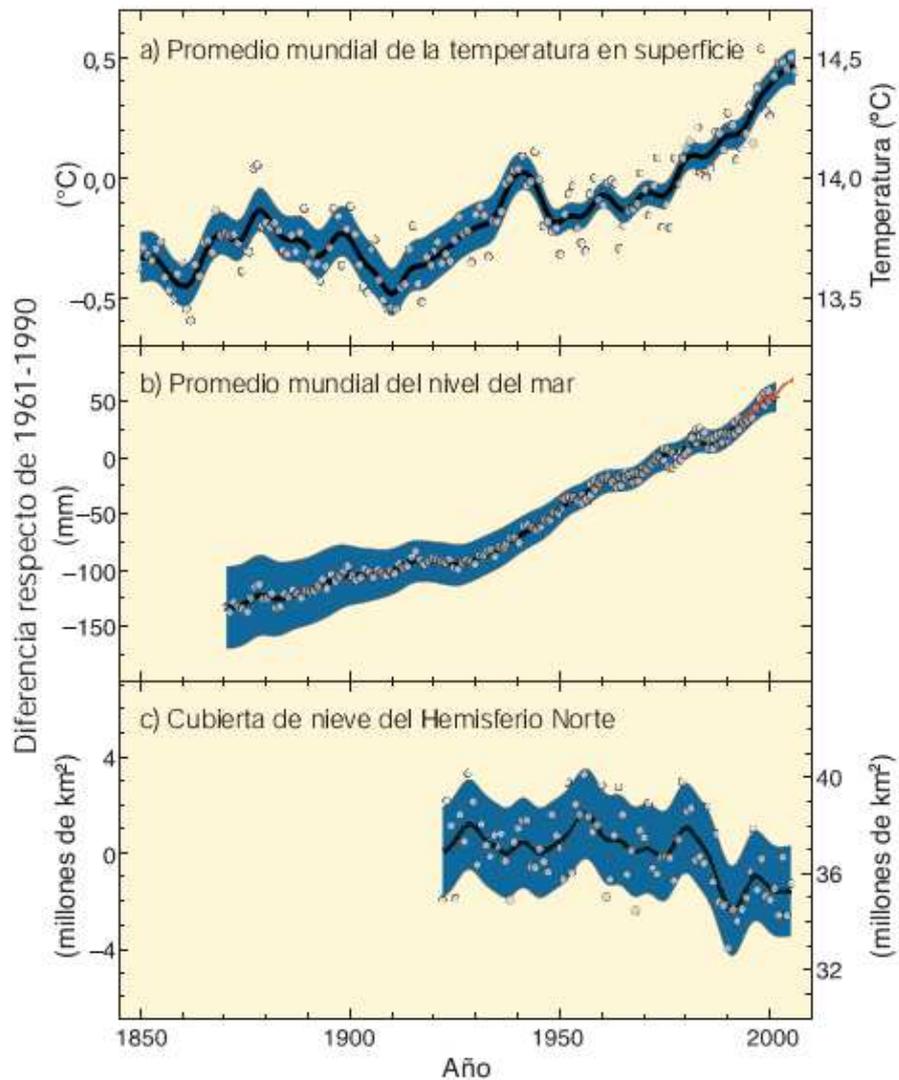


Fig. 1.2 Cambios observados (a) la temperatura superficial promedio global, (b) el nivel del mar promedio global y (c) la cobertura de nieve en el Hemisferio Norte entre Marzo y Abril. Todos los cambios son relativos a los valores promedio en el período 1961-1990. Figura extraída de IPCC 2007a.

el CFC-11 (CFCl_3 , utilizado generalmente en espumas aislantes) a lo largo del tiempo. Como se puede observar, entre 1965 y 1990 se produjo un crecimiento exponencial de la concentración troposférica de este compuesto pero luego de la firma del Protocolo de Montreal, su concentración comenzó a disminuir.

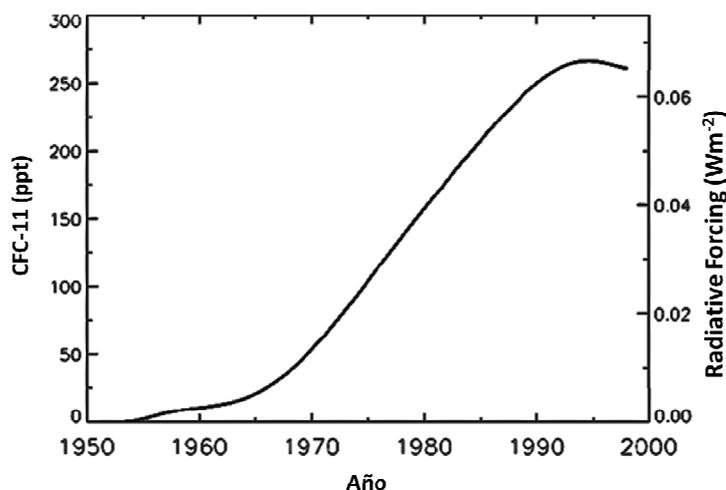


Fig.1.3 Evolución de la concentración troposférica de CFC-11 (en ppt) en el período 1950-2000.

Figura extraída de Houghton *et al.* 2001.

1.1.1 Impacto del cambio climático sobre los ecosistemas

Como es de esperar, todos estos cambios causan un impacto en su entorno y se ha comprobado que tanto los ecosistemas terrestres como los acuáticos se ven influenciados por las variables asociadas al cambio climático (O'Reilly *et al.* 2003, Callaghan *et al.* 2004, Richardson & Schoeman 2004, Ballaré *et al.* 2011, Häder *et al.* 2011). Entre los efectos observados como consecuencia del cambio climático se han propuesto: la extinción de especies (Thomas *et al.* 2004), cambios en la fenología de plantas y animales (Walther *et al.* 2002, Adrian *et al.* 2006, Anneville *et al.* 2007) – tales como llegadas de aves migrantes, aparición de mariposas, florecimiento de plantas, entre otros, más temprano de lo previsto- y cambios en la estructura de la comunidad (Walther *et al.* 2002, Anneville *et al.* 2007).

En el caso particular de los ecosistemas acuáticos, existen varios factores asociados al cambio climático que pueden afectar los organismos y el funcionamiento general de los ecosistemas. Entre las respuestas que se han observado en cuerpos de agua dulce tales como lagos y represas se encuentran los cambios en los factores físicos -nivel, transparencia y temperatura del agua, estratificación térmica, entre otros- químicos –materia orgánica disuelta (DOM), oxígeno y ciclos de nutrientes- y de naturaleza biológica –fenología, etapas de fase clara- (Williamson *et al.* 2009). En esta Tesis, en particular, se enfocará en los efectos de la RUV y del aumento de la temperatura en las cianobacterias, organismos de gran importancia debido a su rol fundamental

como productores primarios en los ecosistemas acuáticos, pero también debido a su implicancia en la potencial producción de metabolitos secundarios que conciernen al ser humano (por su importancia económica por ejemplo) tal como se describe más adelante (ver sección 1.4).

1.2 RADIACIÓN ULTRAVIOLETA

La RUV es una porción del espectro electromagnético solar, que corresponde a las longitudes de onda entre 280-400 nm (Fig. 1.4). Arbitrariamente, se la puede subdividir en RUV-A -315-400 nm-, RUV-B -280-315 nm- y RUV-C -100-280 nm, aunque esta última usualmente no se considera en los estudios fotobiológicos dado que no alcanza la superficie terrestre al ser completamente filtrada por la atmósfera.

Debido al aumento de las concentraciones atmosféricas de los gases halocarbonados de origen antrópico, la capa de ozono se ha visto reducida (Atkinson *et al.* 1989, Solomon 1999), con lo cual se incrementaron los niveles de RUV-B que llegan a la superficie terrestre (Madronich & de Gruijl 1994, McKenzie *et al.* 2007). Sin embargo, existe una diferencia entre el cambio en los niveles de RUV observado (real) y el valor teórico que se esperaría como consecuencia de la variación de los niveles de ozono, dado que existen otros factores que también influyen en su intensidad al alcanzar la superficie terrestre, tales como las variaciones a largo plazo en la concentración de aerosoles, la cobertura de nieve o la presencia de nubes (McKenzie *et al.* 2003). La reflexión de las nubes determinada por satélites ha mostrado un incremento a largo plazo en algunos lugares, especialmente en la región Antártica, pero también en Europa central, que tenderían a reducir los niveles de RUV (McKenzie *et al.* 2003).

1.2.1 Penetración de la RUV en la columna de agua

En los ambientes acuáticos, la radiación solar debe atravesar la columna de agua, cuya transparencia depende de la presencia de sustancias que absorben o dispersan la radiación (Morris *et al.* 1995, Laurion *et al.* 1997, Branco & Kremer 2005): carbono orgánico disuelto (DOC), materia orgánica cromofórica disuelta (CDOM), material particulado y clorofila-a (Clor-a). La presencia de estas sustancias tiene un rol central en la penetración de la radiación en la columna de agua y por lo tanto, en la exposición a ella por parte de los organismos (Williamson *et al.* 1996).

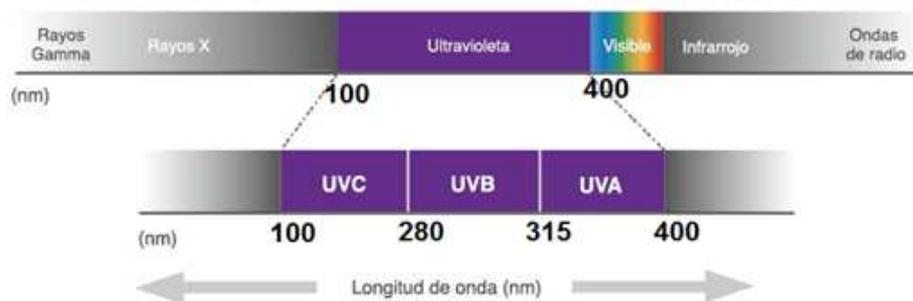


Fig. 1.4 Espectro electromagnético solar. En color violeta se muestra la porción del ultravioleta, el cual se divide, arbitrariamente en RUV-A (315-400 nm), RUV-B (280-315 nm) y RUV-C (100-280 nm). Imagen extraída de la web: <http://sunwork.pe/284/>.

En los estudios limnológicos y oceanográficos se calcula el valor de $k_{(\lambda)}$ para caracterizar la atenuación de la radiación en el agua, siendo k el coeficiente de atenuación y “ λ ” una longitud de onda particular o porción del espectro electromagnético (i.e., PAR, 400-700 nm). Para calcular k se mide la irradiancia (i.e., la magnitud de radiación instantánea incidente) en la superficie (I_0) y a una determinada profundidad z (I_z), y se calcula por la siguiente fórmula (Kirk 1976):

$$I_z = I_0 e^{-k(\lambda)z} \quad (\text{Ec. 1})$$

De esta manera, se puede calcular la profundidad a la que llega el 1% de la radiación incidente (en la superficie), la cual define la zona eufótica, como:

$$Z_{1\%} = \ln 0.01 / -k_{(\lambda)} = 4.6 / k_{(\lambda)} \quad (\text{Ec. 2})$$

Los ambientes acuáticos difieren significativamente en su transparencia y por tanto, en sus coeficientes de atenuación: por ejemplo, Helbling *et al.* (2001), al estudiar un grupo de lagos de la Patagonia Andina, encontraron valores de $K_{\text{RUV-B}}$ que variaban entre 0.36 y 2.80 m^{-1} , mientras que los coeficientes de atenuación de PAR variaron entre 0.12 y 0.46 m^{-1} ; Rose *et al.* (2009), por su parte, trabajando en lagos alpinos y subalpinos encontraron que la penetración de la RUV era significativamente menor en los primeros debido probablemente a una menor concentración de DOC y una mayor incidencia de RUV. Finalmente, Pérez *et al.* (2009) determinaron el coeficiente de atenuación en 16 lagos pampeanos y patagónicos y encontraron que los coeficientes más bajos correspondían a los patagónicos ($k_{\text{PAR}} < 2.5 \text{ m}^{-1}$), mientras que entre los

primeros, aquellos turbios ($k_{PAR} > 13 \text{ m}^{-1}$) presentaron coeficientes de atenuación significativamente superiores a los de los lagos claros-vegetados ($k_{PAR} < 10 \text{ m}^{-1}$). A su vez, puede observarse gran variabilidad en un mismo ambiente debido a cambios estacionales: Torremorell *et al.* (2007), trabajando en la laguna Chascomús (Provincia de Buenos Aires) encontraron variaciones de valores de transparencia (normalizada por profundidad) entre aprox. 2-10 (calculados como la relación entre la profundidad del disco de Secchi y la profundidad máxima de la laguna en el momento de muestreo).

1.2.2 Efectos de la RUV sobre los ecosistemas acuáticos

Las consecuencias de las variaciones en los niveles de RUV en los ambientes acuáticos han sido ampliamente estudiadas y los resultados obtenidos muestran que estas longitudes de onda causan distintos efectos sobre los organismos presentes, afectando de forma generalmente negativa tanto a los mayores productores de biomasa (fitoplancton) como a los consumidores (Häder *et al.* 2007b). Para evitar o minimizar los daños inducidos por la RUV, los organismos han desarrollado una serie de mecanismos (Hansson & Hylander 2009) que incluyen: síntesis de compuestos fotoprotectores (Banaszak 2003, Sommaruga *et al.* 2009), sistemas de reparación (Buma *et al.* 2003, Wulff *et al.* 2008) y cambios de comportamiento – evasión de la RUV (Roy 2000, Alonso *et al.* 2004). Sin embargo, se observa que la respuesta a la RUV es especie-específica (Halac *et al.* 2010), por lo cual es difícil extrapolar al ecosistema a partir de los resultados obtenidos de cultivos o de muestras mono-específicas. Todos los mecanismos previamente mencionados tienen sus costos para los organismos y por lo tanto repercuten a nivel ecosistémico, generalmente manifestándose como una disminución de la productividad general del sistema (Harrison & Smith 2009) o un cambio en la estructura de la comunidad (Wängberg *et al.* 2008, Halac *et al.* 2013).

1.3 TEMPERATURA

Dado que el aumento de la temperatura debido al cambio climático produce un incremento de las temperaturas superficiales de los cuerpos de agua, esto puede ocasionar una mayor estabilidad de la columna de agua, favoreciendo una mayor estratificación vertical, tanto en su intensidad como en la duración de la misma (Hondzo & Stefan 1991). Bajo estas condiciones, el aporte de nutrientes a las aguas superficiales por recambio con las aguas profundas se encuentra reducido (Richardson 2008) lo que condiciona la estructura de la comunidad presente en esta capa. Esto

último es particularmente cierto para ecosistemas marinos, en cambio en los sistemas de agua dulce las lluvias aportan grandes cantidades de nutrientes (Richardson 2008).

El aumento de temperatura ha sido asociado con desarrollos más tempranos de floraciones algales (Lassen *et al.* 2009, Winder & Sommer 2012) aunque asociados a menores biomásas, frecuentemente relacionadas a un aumento en el crecimiento de especies más pequeñas en relación con las más grandes (Winder *et al.* 2009). Esto conllevaría a una menor eficiencia en la transferencia de energía desde los productores primarios a los niveles tróficos superiores (Richardson 2008, Sommer & Lengfellner 2008). Por otra parte, algunos autores han propuesto que un aumento en la temperatura ayudaría a los organismos a mitigar la fotoinhibición de la fotosíntesis generada por la RUV (Halac *et al.* 2010), mientras que otros (Roos & Vincent 1998) encontraron que en el caso particular de la cianobacteria *Phormidium murrayi*, esto no se cumplía; aunque el aumento de temperatura sí disminuía la inhibición del crecimiento generado por la RUV. Sin embargo, también se han asociado efectos negativos al aumento de la temperatura: desde el impacto en aquellas especies que se encuentran en condiciones ambientales cercanas a su límite de tolerancia (Halac *et al.* 2013) a las pérdidas de biomasa en especies que ven aumentada su demanda respiratoria (Germ *et al.* 2004). Como consecuencia de estas diferentes respuestas, Williamson *et al.* (2010) propusieron que frente a un aumento de temperatura y de los niveles de radiación, se favorecería el desarrollo de algunas especies por sobre otras.

1.4 CIANOBACTERIAS

1.4.1 Conceptos generales

Las cianobacterias son organismos procariotas que tienen la capacidad de realizar fotosíntesis, siendo uno de los grupos más diversos, no solo desde el punto de vista morfológico sino también por su fisiología y metabolismo (Stal 2007). Las cianobacterias se distinguen por sintetizar pigmentos accesorios característicos, las ficobiliproteínas, dentro de las cuales se encuentra la ficobilina, responsable de la coloración azulada particular de muchos de estos organismos (Bryant 1982, Whitton & Potts 2002b). Estos pigmentos además les aportan una mayor eficiencia de absorción de la luz en condiciones de baja intensidad lumínica (Bryant 1982) o una adaptación cromática a las condiciones medioambientales (Tandeau de Marsac 1977). Otro rasgo característico de algunas cianobacterias filamentosas es la diferenciación celular (Stal 2007) para

formar estructuras especializadas tales como el heterocisto, que posee paredes celulares gruesas y provee un ambiente propicio para la fijación de nitrógeno, y el acineto, que es una estructura similar a una espora que puede resistir condiciones desfavorables y germinar cuando se restablecen las condiciones propicias (Stal 1995, Adams & Duggan 1999). Existen además estructuras dentro de las células que les permiten regular su posición en la columna de agua tales como los aerótopos que consisten en formaciones microscópicas de proteínas tubulares rígidas que se ubican dentro de las células y contienen gas (Walsby, 1994). Por último, una característica adicional en algunas cianobacterias es la presencia de vainas, cuya síntesis se ve inducida por la exposición a la RUV (Ehling-Schulz *et al.* 1997) asociada a un pigmento fotoprotector, denominado scytonemina (ver sección 1.4.3).

Tanto los geólogos como los geoquímicos concuerdan en que las cianobacterias han tenido una larga historia evolutiva y muchos, aunque no todos, sostienen que su existencia en nuestro planeta dataría de 3500 millones de años (Ma) (Whitton & Potts 2002a). Garcia-Pichel (1998), propone tres etapas en su desarrollo: una primera en la que los altos niveles de RUV-C y RUV-B pueden haber reprimido la habilidad de las protocianobacterias de alcanzar grandes densidades, restringiendo el desarrollo de las poblaciones a refugios contra la RUV; una segunda etapa, entre los 500 y 1500 Ma en los que se produjo la aparición de cianobacterias oxigénicas y la consecuente formación de micro-ambientes oxigenados bajo una atmósfera libre de oxígeno y finalmente, una tercera etapa que comenzó con la oxigenación gradual de la atmósfera y la formación de la capa de ozono estratosférica.

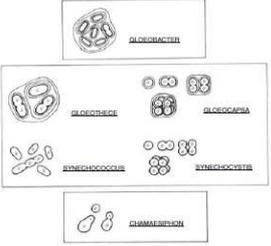
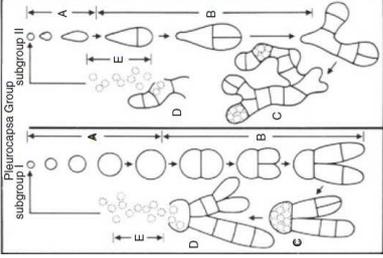
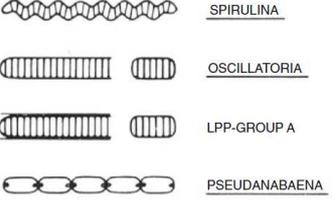
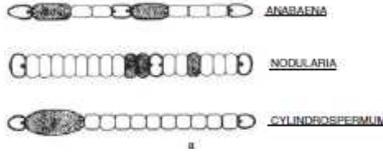
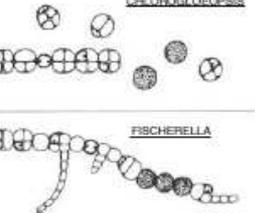
Durante mucho tiempo, existió una fuerte polémica sobre si las cianobacterias debían ser clasificadas dentro de las algas (según los botánicos) o las bacterias (según los microbiólogos) (Stanier *et al.* 1971, Stanier *et al.* 1978, Whitton & Potts 2002b). Los defensores de esta última postura partían para sus estudios taxonómicos de cultivos axénicos (Stanier *et al.* 1971) y monoclonales y consideraban no solo la morfología, sino que tomaban información de un rango de disciplinas (Whitton & Potts 2002b). Sin embargo, la obtención de cultivos consumía tiempo y muchas especies no eran cultivables, sumado a que varias características distintivas (por ej., formación de heterocistos) no se observaban en las condiciones normales de cultivo. Sin embargo, la aparición de métodos modernos, como la introducción del microscopio electrónico y especialmente los métodos moleculares, hacia fines del siglo XX resolvió la controversia (Komárek, 2006). Numerosos caracteres enigmáticos, tales como la ultraestructura de las

vesículas de gas y la estructura de la pared celular, pudieron ser explicadas y esta nueva información proveyó de una nueva visión en las relaciones taxonómicas entre diferentes cianobacterias (Komárek, 2006). Como consecuencia, se re-evaluó la clasificación existente y se propuso una nueva que integra esta información junto con la diversidad y variabilidad morfológica y los caracteres ecológicos y ecofisiológicos, que resulta tan detallada que es ampliamente aceptada por los ecólogos y se propone que permanecerá como la clasificación definitiva durante mucho tiempo (Whitton & Potts 2002a). Esta clasificación es la propuesta en diversas instancias por Anagnostidis y Komárek (Anagnostidis & Komárek, 1985, 1988, Komárek & Anagnostidis, 1986, 1989, 1998, 1999, 2005). En la Tabla 1.1 se muestra la clasificación más aceptada en la actualidad donde se enuncian las características principales de cada orden (Whitton & Potts 2002b, Waterbury 2006).

1.4.2 Importancia de las cianobacterias

Las cianobacterias son organismos de gran importancia, tanto ecológica como económica. Dentro de la primera, se ha comprobado que tienen una amplia distribución global, dominando desde ambientes oligotróficos (Zubkov *et al.* 2003) a eutróficos (Steinberg & Hartmann 1988, Paerl & Huisman 2009) y desde regiones polares (Tang *et al.* 1997, Vincent 2002) a tropicales (Bouvy *et al.* 2000). Entre las razones que permiten esta amplia distribución de las cianobacterias se encuentra su larga historia evolutiva, descrita anteriormente, como también otras características fisiológicas, entre las que se incluyen la síntesis de pigmentos accesorios, como ficocianinas y ficoeritrinas (descritas anteriormente, ver sección 1.4.1) y la fijación del nitrógeno atmosférico (Berman-Frank *et al.* 2003) que les permite competir y dominar en ambientes deficientes en este nutriente (Paerl & Huisman 2009). Además de su amplia distribución geográfica, las cianobacterias se encuentran frecuentemente estableciendo interacciones simbióticas con un amplio rango de organismos eucarióticos, entre los que se encuentran animales y plantas (Hawksworth 1988, Adams 2002, Lesser *et al.* 2004). Siendo autótrofas, y en muchos casos fijadoras de nitrógeno, el beneficio que las cianobacterias proveen a sus huéspedes es claro: la provisión metabólica de formas combinadas de elementos fundamentales para el crecimiento, como son el nitrógeno o el carbono (Adams 2002). Tal es el caso de *Anabaena azollae* con el helecho *Azolla*, utilizada como medio de fertilización natural y de bajo costo en la agricultura,

Tabla 1.1 Características de los cinco órdenes actualmente aceptados dentro de las cianobacterias.

Morfología	Orden y Características
<p>No filamentosos</p> 	<p>Chroococcales: unicelulares o formando agregados de células unidos por una pared externa o matriz gelatinosa. Reproducción por fisión binaria en 1, 2 o 3 planos, simétrica o asimétricamente, o por gemación. Tamaño entre 0.5-30 μm. Ej.: <i>Synechococcus</i>, <i>Aphanothece</i>.</p>
<p>No filamentosos</p> 	<p>Pleurocapsales: unicelulares o formando agregados de células unidos por una pared externa o matriz gelatinosa. Reproducción por fisión interna múltiple con producción de células hijas más pequeñas que las madres o por una mezcla de fisión múltiple y binaria. Ej: <i>Pleurocapsa</i>, <i>Dermocarpa</i>.</p>
<p>Filamentosos</p> 	<p>Oscillatoriales: filamentos uniseriados sin ramificaciones. Reproducción por fragmentación de tricoma o por producción de hormogonios. División celular por fisión binaria en un plano, siempre en ángulo perpendicular al eje del tricoma. Diámetros celulares entre 0.5-100 μm. Sin heterocistos ni acinetos. Ej: <i>Oscillatoria</i>, <i>Planktothrix</i>.</p>
<p>Filamentosos</p> 	<p>Nostocales: filamentos uniseriados o multiseriados. División celular por fisión binaria en un plano, siempre en ángulo perpendicular al eje del tricoma y diferenciación celular en heterocistos, acinetos u hormogonios. Tricomas iso o heteropolares. Ej: <i>Nostoc</i>, <i>Anabaena</i>.</p>
<p>Filamentosos</p> 	<p>Stigonematales: división celular por fisión binaria en más de un plano dando origen a tricomas multiseriados o con ramificaciones o ambos. Diferenciación celular en heterocistos o acinetos. Ej: <i>Stigonema</i>, <i>Fischerella</i>.</p>

particularmente en el cultivo de arroz (Wagner, 1997, Vaishampayan *et al.* 2001). Por otra parte, las cianobacterias juegan un papel importante también en ecosistemas terrestres debido a su tolerancia a la desecación y al estrés hídrico (Potts 1999); de esta manera, desempeñan un rol central en el mantenimiento de la estabilidad de las cortezas superficiales de zonas semi-desérticas y la fertilidad de los suelos usados para cultivo en las regiones áridas (Belnap & Gardner 1993, Whitton 2002).

Desde el punto de vista ecológico, es también importante mencionar que las cianobacterias tienen la capacidad de crecer de forma masiva, dando origen a floraciones algales o blooms, lo que genera problemas en el tratamiento del agua y su abastecimiento debido al aumento de la turbidez y la materia orgánica particulada causando el bloqueo de los filtros (Codd, 2000), además de generar malos olores y sabores (Paerl *et al.* 2001). Cuando estas floraciones son generadas por cianobacterias potencialmente tóxicas, capaces de producir cianotoxinas (por ej. *Microcystis*, *Nodularia*, *Planktothrix*), se generan riesgos en la salud de las poblaciones (humanas o animales) que se abastecen o hacen uso (recreacional, por ejemplo) de estos cuerpos de agua (Codd *et al.* 2005). Las cianobacterias tóxicas producen una gran cantidad de cianotoxinas de estructuras químicas y toxicidad variada (Hitzfeld *et al.* 2000, Dow & Swoboda 2002) de las cuales, la más estudiada es la microcistina cuya toxicidad se manifiesta principalmente a nivel hepático (de Figueiredo *et al.* 2004). La forma más efectiva de disminuir la concentración de toxinas en el agua es evitando el desarrollo de floraciones, por lo que los factores que promueven estas floraciones están siendo ampliamente estudiados (O'Neil *et al.* 2012, Merel *et al.* 2013). Aún más, se sabe que la toxicidad varía entre especies e incluso entre clones (Carmichael 1992, Kardinaal *et al.* 2007, Briand *et al.* 2008, Davis *et al.* 2009), pero se desconoce qué factores influyen en la expresión de esta toxicidad (Dow & Swoboda 2002). Finalmente, es importante mencionar que las floraciones de cianobacterias se han visto intensificadas en los últimos años en relación al cambio climático (ver sección 1.4.4).

En cuanto a su importancia económica, y a nivel industrial, se destaca la producción a gran escala de cultivos de cianobacterias con la posibilidad de obtener distintos productos finales, siendo las más cultivadas *Arthrospira (Spirulina) platensis*, *Nostoc commune* y *Aphanizomenon flos-aquae* (Pulz & Gross 2004, Spolaore *et al.* 2006). De estas, *Spirulina* es la más abundante en el mercado, alcanzando en China (el principal productor a nivel mundial) un total de 3500 toneladas de peso seco de producción en 2009 (Lu *et al.* 2011). Su principal destino es la alimentación,

tanto humana como animal, pero también se utiliza en las industrias farmacéuticas y cosmetológicas para la obtención de diversos compuestos de interés: pigmentos, antioxidantes y antibióticos (Pulz & Gross 2004, Spolaore *et al.* 2006, Mary Leema *et al.* 2010).

1.4.2.1 Estudios sobre cianobacterias en Argentina

Entre los trabajos pioneros en Argentina referentes a cianobacterias se encuentran los de la Dra. Halperín, quien realizó una descripción de las cianobacterias marinas de la costa patagónica (Halperín, 1970, Halperín *et al.*, 1973, Halperín 1974), así como de las cianobacterias de biodermas algales (Halperín, 1968, Halperín *et al.*, 1976). Actualmente varios grupos se encuentran trabajando sobre diversas líneas de investigación relacionadas a las cianobacterias: desde estudios de diversidad (Wenzel & Díaz 2008, Otaño 2009), biotecnológicos (Zulpa de Caire *et al.* 1997, Zulpa de Caire *et al.* 2000, Zaccaro *et al.* 2006), a estudios de floraciones y su toxicidad (Scarafia *et al.* 1995, Amé *et al.* 2003, Ruibal Conti *et al.* 2005, Giannuzzi *et al.* 2011, Ruiz *et al.* 2013).

Respecto a esta última línea de trabajo mencionada, los primeros registros de floraciones de cianobacterias tóxicas en Argentina datan del año 1944 en Santo Tomé, Santa Fe (Echenique & Aguilera 2009) y desde entonces se han producido muchas más, algunas de las cuales fueron recopiladas en Pizzolón (1999). Desde 2004, en el marco del Programa de Hidrología Internacional (UNESCO), se organizó la red global CYANONET, con el objetivo de reunir los antecedentes relacionados a floraciones nocivas de cianobacterias a nivel mundial y poder desarrollar planes de manejo de situaciones de riesgo. De la recopilación de información para el territorio argentino, Echenique y Aguilera (2009) encontraron que los desarrollos masivos de cianobacterias toxígenas son frecuentes en diferentes cuerpos de agua continentales de casi todo nuestro país (Fig. 1.5). Entre las especies identificadas con más frecuencia en las floraciones se encuentran *Microcystis*, *Dolichospermum* (*Anabaena*), *Cylindrospermopsis* y *Raphidiopsis* (Otaño *et al.* 2012), y la toxina más comúnmente identificada es la microcistina (Otaño *et al.* 2012). En los años 2005, 2007, 2008 y 2010 se organizaron en Argentina los Workshops sobre cianobacterias toxígenas del CONOSUR con el objetivo de encontrar estrategias multidisciplinarias para determinar el alcance e impacto de las floraciones, y desarrollar estrategias de prevención y manejo de riesgos (Otaño *et al.* 2012). Como resultado de estos encuentros se publicó en 2009 el libro “*Cianobacterias y Cianotoxinas: Identificación, Toxicología, Monitoreo y Evaluación de Riesgo*” (Gianuzzi 2009) constituyendo un importante

aporte para la región. Sin embargo, mucho queda por realizar, dado que no existen regulaciones a nivel nacional que establezcan valores límites de concentraciones algales o de toxinas, tanto para el agua de uso recreacional como para el agua de consumo, y muchas plantas de tratamiento aún no realizan este tipo de análisis de manera rutinaria.

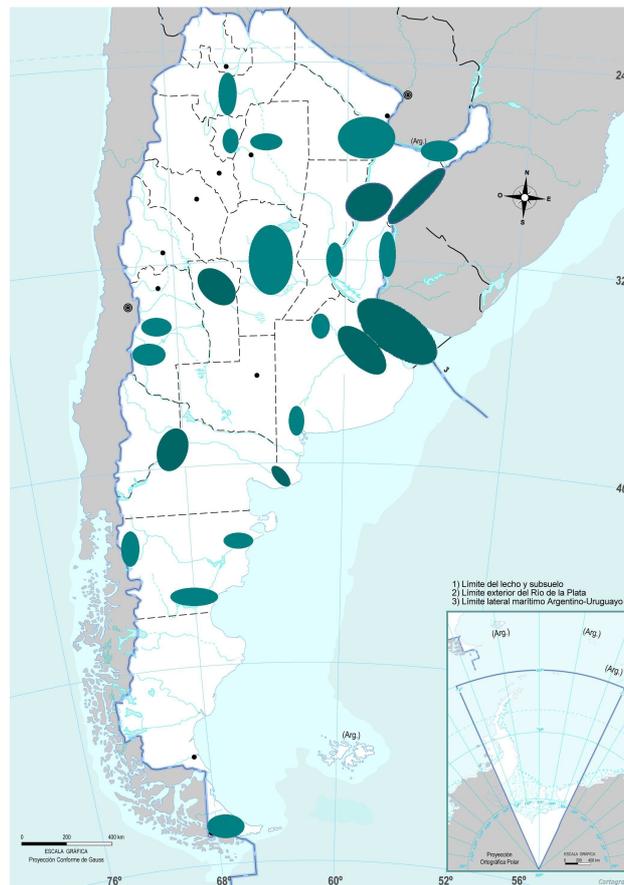


Fig 1.5 Registro de sitios en los que se observaron floraciones de cianobacterias nocivas (extraído de Echenique y Aguilera, 2009).

1.4.3 Fotobiología de cianobacterias

Pese al creciente interés en realizar estudios sobre cianobacterias, desde distintos enfoques, debe reconocerse que, desde el punto de vista fotobiológico, estos organismos han sido relativamente poco estudiados. Los efectos negativos producidos por la RUV sobre las cianobacterias son variables de acuerdo a la longitud de onda incidente: mientras que las mayores a 315 nm (RUV-A) actúan a través de radicales libres formados en presencia de oxígeno, las más cortas (RUV-B)

actúan directamente sobre macromoléculas, principalmente ADN y proteínas (García-Pichel 1998). El ejemplo más claro de absorción de longitudes de onda cortas por macromoléculas lo constituye el ADN, cuyas alteraciones más frecuentes incluyen la formación de fotoproductos diméricos entre pirimidinas adyacentes, 6-4 fotoproductos e incluso la ruptura de las cadenas de ADN (Vincent & Roy 1993, Rastogi & Sinha 2011). La RUV-B también afecta tanto a las reacciones claras como oscuras de la fotosíntesis, causando inactivación de los centros de reacción del PSII (Pérez *et al.* 2012), afectando a las enzimas involucradas como por ejemplo RUBISCO (Sinha *et al.* 1997), e inhibiendo la síntesis de pigmentos fotosintéticos (Sinha *et al.* 2002). En respuesta a las longitudes de onda más largas de la RUV se generan especies de oxígeno reactivas (ROS) que son subproductos del metabolismo aeróbico y potentes agentes causantes de daño oxidativo (Lafiti *et al.*, 2009). Dentro de este daño, los ROS pueden generar reacciones en cadena que evolucionan en una peroxidación lipídica que a su vez afecta a la estructura y función de las membranas (Pérez *et al.* 2012). Algunas de las estrategias defensivas frente a estos daños son enzimáticas (SOD, catalasas y peroxidasas) y otras no enzimáticas: vitaminas A, C y E, carotenoides, etc. (Lafiti *et al.*, 2009).

En concordancia con lo expuesto anteriormente, los trabajos de Donkor *et al.* (1991, 1996) mostraron que la RUV afecta el porcentaje de filamentos móviles en cianobacterias filamentosas que se mueven por deslizamiento e inhibe el intercambio de oxígeno proveniente de la fotosíntesis y, en ambos casos, ante exposiciones prolongadas a la RUV, produce blanqueo de pigmentos fotosintéticos, especialmente de los pigmentos accesorios de la antena. Gao *et al.* (2007), trabajando con *Anabaena* sp. PCC7120 encontraron que la RUV solar inhibía el crecimiento en un 40%, reducía el largo del tricoma en un 49% e inhibía la diferenciación celular en heterocistos, mientras que estudiando las colonias de la cianobacteria filamentosas terrestre *Nostoc flagelliforme* bajo radiación solar (Gao & Ye 2007) encontraron que la actividad fotoquímica durante los procesos de hidratación-deseccación que sufren las colonias no se veía afectada por la RUV-A y RUV-B. Por su parte, Lesser (2008) encontró que la exposición a la RUV causaba una reducción significativa del rendimiento cuántico del fotosistema II (PSII) y de la productividad máxima y una disminución de la actividad nitrogenasa en *Anabaena* sp. Sin embargo, resulta difícil generalizar los efectos de la RUV, dado que existen grandes diferencias de sensibilidad entre las distintas especies e incluso diferentes cepas de cianobacterias (Ehling-Schulz & Scherer 1999).

Pese a los efectos negativos que producen estas longitudes de onda, existen mecanismos que permiten mitigar o minimizar estos efectos (Roy 2000, Banaszak 2003). Entre los mecanismos principales para mitigar los efectos de la RUV sobre las cianobacterias se encuentran la síntesis de compuestos que absorben RUV: los aminoácidos tipo micosporinas –MAAs- (Lesser 2008, Singh *et al.* 2008, Sommaruga *et al.* 2009) y un pigmento característico de las cianobacterias, la scytonemina (Fleming & Castenholz 2007, Garcia-Pichel & Castenholz 1993). Otros pigmentos involucrados en la protección de las cianobacterias frente a la RUV, aunque también frente a los altos niveles de radiación en general, son los carotenoides (Ehling-Schulz *et al.* 1997). Su mecanismo de acción, sin embargo, es fuente de controversia: mientras algunos autores sostienen que los carotenoides constituyen una respuesta rápida de SOS para contrarrestar el daño celular agudo debido a la RUV (Ehling-Schulz *et al.* 1997), otros proponen que su acción es indirecta, funcionando como antioxidantes, extintores de especies como oxígeno singlete y radicales peróxido, e incluso inhibidores de reacciones de formación de radicales libres (Castenholz & Garcia-Pichel 2002). Por otra parte, se ha encontrado que las cianobacterias formadoras de matas (*mats*) pueden migrar verticalmente dentro de ellos para evadir la RUV (Bebout & Garcia-Pichel 1995, Castenholz & Garcia-Pichel 2002). Finalmente, entre los mecanismos de aclimatación de las células a la RUV pueden incluirse la activación de mecanismos de reparación (como la reparación del ADN; Castenholz & Garcia-Pichel 2002) y la síntesis *de novo* de diversos componentes (Campbell *et al.* 1998).

1.4.4 Las cianobacterias en el contexto de cambio climático

Los cambios asociados a las actividades de origen antrópico, tales como el desarrollo urbano, agrícola e industrial aportan nutrientes a los sistemas acuáticos generando aumentos en la productividad primaria de los mismos y por lo tanto, su eutrofización. Esto favorece la proliferación de cianobacterias en muchos ambientes eutróficos de agua dulce (Paerl & Fulton 2006). Además, y dada su capacidad de fijar nitrógeno les permite competir y prevalecer aún en ambientes con escasez de este nutriente (Karl *et al.* 2002, Lesser 2008).

A su vez, un aumento de temperatura favorece el desarrollo de floraciones de cianobacterias (Jöhnk *et al.* 2008, Paerl & Huisman 2008, Paerl & Scott 2010). Esto se debe a varias causas: por un lado, las cianobacterias crecen mejor a temperaturas mayores que el resto de las algas (ver Fig.1.6, Jöhnk *et al.* 2008, Paerl & Huisman 2009). Además, como se describió anteriormente, un

aumento de temperatura aumenta la estabilidad de la columna de agua reduciendo la mezcla, lo cual favorece a las cianobacterias con aerótopos (Jöhnk *et al.* 2008). La formación de aerótopos les permite a las cianobacterias flotar hacia la superficie, formando floraciones densas que impiden el pasaje de la radiación solar a las capas inferiores (Paerl & Huisman 2008). De esta forma, eliminan a sus competidores potenciales a través de la competencia por la luz (Jöhnk *et al.* 2008). A su vez, y dado lo expuesto en la sección anterior, las cianobacterias tienen una alta resistencia a los niveles aumentados de RUV incidente como los que se pueden experimentar en las capas superficiales.

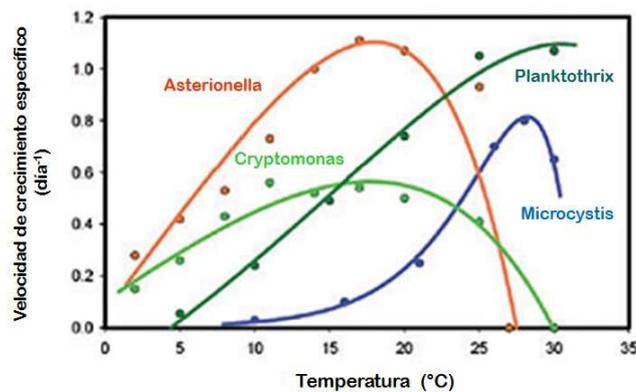


Fig. 1.6 Dependencia de la temperatura de las velocidades de crecimiento específicas de las cianobacterias *Microcystis aeruginosa* y *Planktothrix agardhii*, la diatomea *Asterionella formosa* y la cryptofita *Cryptomonas marssonii*. Figura extraída de Paerl & Huisman 2009.

Sin embargo, y a pesar de que todos estos resultados indicarían un fuerte ventaja adaptativa por parte de las cianobacterias frente al cambio climático y las influencias antrópicas (eutrofización), algunos autores proponen que no todas las especies responderían de la misma forma a las variaciones en las condiciones ambientales producidas por el cambio climático en los cuerpos de agua, que a su vez son diferentes entre sí (Wagner & Adrian 2009). Por ejemplo, Menhert *et al.* (2010) proponen que un futuro aumento de la temperatura promoverá un crecimiento de las especies Nostocales, y de aquellas invasoras en general, mientras que Kosten *et al.* (2012) afirman que en los veranos más cálidos, las cianobacterias que pueden flotar (con aerótopos) se ven favorecidas debido a la mayor estabilidad de la columna de agua. Todo lo expuesto anteriormente sustenta el uso de las cianobacterias como organismos modelos de estudio

particularmente interesantes para evaluar los efectos del cambio global, para luego poder predecir sus consecuencias en los ecosistemas acuáticos. Con esta idea es que se planteó esta Tesis, cuyos fundamentos, objetivos e hipótesis de trabajo se describen a continuación:

1.5 FUNDAMENTACIÓN GENERAL DE LA TESIS

Las cianobacterias se encuentran entre los primeros organismos que colonizaron la superficie terrestre, para lo cual tuvieron que soportar las condiciones más inhóspitas (altas temperaturas y niveles elevados de radiación solar); precisamente, y gracias a su resistencia a estas condiciones adversas fueron quienes colonizaron los ecosistemas primitivos y así fueron responsables de la oxigenación la atmósfera. Actualmente, cuando los datos recolectados por diferentes investigadores alrededor del mundo evidencian la presencia de un fenómeno de cambio climático, las cianobacterias vuelven a ocupar un rol central expandiendo su dominancia en ambientes generalmente afectados por un alto grado de impacto antrópico. Frente a estos antecedentes se generan los interrogantes: ¿qué les aporta esta adaptabilidad? ¿son todas las especies igualmente competitivas frente al cambio climático? ¿qué permite su colonización y permanencia en determinados ambientes acuáticos?

Es por eso que se planteó esta Tesis con el siguiente objetivo general: *determinar los efectos combinados de la radiación ultravioleta (RUV, 280-400 nm) y la temperatura en la morfología, fotosíntesis, crecimiento y diversos procesos metabólicos de cianobacterias, tales como la actividad de enzimas relacionadas al metabolismo del nitrógeno o la síntesis de diversos compuestos, tales como los pigmentos fotosintéticos, potencialmente fotoprotectores y los carotenoides.*

Para alcanzar este objetivo se plantearon experimentos tanto con muestras naturales como con cultivos, para evaluar, en el primer caso, la respuesta de las cianobacterias frente a otros grupos algales y en el segundo, la variabilidad entre especies. Se destaca el hecho de que si bien existían algunos trabajos previos en los que se evaluaba la respuesta de las cianobacterias en comunidades naturales, estos consistían mayormente en la medición de parámetros ambientales y su relación con el desarrollo masivo de cianobacterias (Havens *et al.* 2003, Davis *et al.* 2009). Uno de los aportes de esta Tesis consiste en la evaluación de los efectos combinados de dos de los factores asociados al cambio climático más influyentes en los ambientes acuáticos (RUV y temperatura), en las comunidades de dos lagunas caracterizadas por la presencia de cianobacterias (estacional o

permanentemente) (Capítulos 2 y 3). Para tal fin se seleccionaron dos lagunas urbanas como sitios de estudio: la Laguna Cacique Chiquichano (Trelew, Provincia del Chubut) ha sido estudiada previamente desde el punto de vista fotobiológico (Gonçalves *et al.* 2011) y su comunidad fitoplanctónica se ve caracterizada por cambios estacionales, con dominancias alternados entre cianobacterias y diatomeas y variaciones marcadas en las concentraciones de Clor-a. En cuanto a la Laguna Don Tomás (Santa Rosa, Provincia de La Pampa) ha sido caracterizada previamente (Echaniz & Vignatti 2001, Echániz *et al.* 2008, Alvarez *et al.* 2009) observándose un avance progresivo en el estado trófico de la misma hacia la hiper-eutrofia y un cambio en la composición de la comunidad hacia una dominancia marcada de cianobacterias filamentosas a lo largo de todo el año, con altas concentraciones estables de Clor-a. De esta forma, el estudio de la Laguna Cacique Chiquichano aporta información sobre el posible efecto del cambio climático en el metabolismo y la composición de la comunidad a lo largo de la sucesión anual (Capítulo 2). El estudio de la Laguna Don Tomás, por su parte, permite evaluar el efecto de variables asociadas al cambio climático en un sistema dominado por cianobacterias de manera estable (Capítulo 3), el cual representa un típico caso de laguna con alto impacto antrópico y de difícil restauración (Scheffer *et al.* 1997). Es por esto que el objetivo del Capítulo 2 consiste en evaluar los efectos combinados de la RUV y la temperatura a lo largo del año en la estructura de la comunidad, crecimiento y actividad metabólica de una laguna caracterizada por una sucesión anual mientras que el objetivo del Capítulo 3 consiste en evaluar las mismas variables en una laguna con dominancia de una cianobacteria filamentosa durante el mismo período de tiempo, y de esta forma poder comparar los comportamientos de los dos sistemas, en las mismas condiciones, pero difiriendo en la composición taxonómica.

Con respecto al estado del conocimiento del efecto de la RUV y la temperatura en especies de cianobacterias, debe destacarse que los estudios realizados hasta el momento (por ej., Roos & Vincent 1998, Wu *et al.* 2005, Gao *et al.* 2007b, Gao *et al.* 2008) han aportado información importante pero difícil de contrastar: los estudios diferían en la duración (desde minutos a días), en la calidad y cantidad de radiación aplicada, en la fuente de radiación. Además, la mayoría estudiaba los efectos de a un factor a la vez. Por esto, otro de los aportes de esta Tesis consiste en la evaluación del efecto conjunto de la RUV y la temperatura en cuatro especies de cianobacterias bajo las mismas condiciones de exposición, lo que permite comparar las respuestas obtenidas y evaluar su diferente sensibilidad (Capítulo 4). El objetivo del Capítulo 4 es, por tanto, evaluar la

respuesta a nivel de especie de cuatro cianobacterias con diferente morfología y pertenecientes a diferentes órdenes, a los efectos combinados de la RUV y la temperatura con particular interés en procesos metabólicos, de crecimiento y morfológicos. Finalmente, se discute y se resalta la relevancia de los datos obtenidos, haciendo énfasis en los efectos de variables asociadas al cambio climático a nivel especie-específico, pero también a nivel de dos comunidades fitoplanctónicas con características muy disimiles (Capítulo 5).

1.6 HIPÓTESIS DE TRABAJO

El impacto de la RUV en las enzimas intervinientes en el metabolismo del nitrógeno en las cianobacterias ha sido descrita en trabajos realizados mayormente con *Nostoc* y *Anabaena* (Kumar *et al.* 1996, Sinha & Häder 1996, Kumar *et al.* 2003). Los resultados sugieren que la sensibilidad de las enzimas así como la de las diferentes especies es variable (Kumar *et al.* 1996, Kumar *et al.* 2003) debido probablemente a los diversos mecanismos de protección de cada especie. De esta forma, la exposición de los cultivos de *Nostoc calciola* a irradiancias de RUV-B de 5 W/m² causaron la inactivación total de la nitrogenasa y una inhibición parcial de la GS (Kumar *et al.* 1996). La actividad nitrogenasa también se vio inhibida cuando se expuso a la RUV un cultivo de *Anabaena* sp. (Sinha *et al.* 1996, Lesser 2008) y uno de *Anabaena* BT2 (Kumar *et al.* 2003). Sin embargo, se ha propuesto que un aumento de temperatura incrementaría las velocidades metabólicas (Baulch *et al.* 2005) lo que ayudaría a contrarrestar los efectos negativos de la RUV a través de una mayor actividad de las enzimas de reparación. En función de lo expuesto anteriormente, se postula la primera hipótesis:

- *H₁₁: la actividad de la enzima interviniente en el metabolismo del nitrógeno, glutamina sintetasa, disminuye al ser expuestas las cianobacterias a la RUV.*

H₁₂: Sin embargo, un aumento de temperatura actúa en forma antagónica con la RUV ya que aumenta la actividad enzimática.

Aunque existe alguna controversia al respecto (Laurion & Vincent 1998), se postula que la RUV regula la composición de las comunidades acuáticas al afectar de diferente manera a las distintas especies que la componen según su forma y tamaño celular (Harrison & Smith 2009, Helbling *et al.* 2005, Garcia-Pichel 1994). Estas diferencias pueden deberse a la imposibilidad de sintetizar compuestos fotoprotectores cuando las células son muy pequeñas (Garcia-Pichel 1994) o a una

diferente sensibilidad de los targets moleculares asociadas al tamaño celular: en general, hay una mayor inhibición de la fotosíntesis cuando las células son grandes y mayor daño en el ADN cuando son pequeñas (Helbling *et al.* 2005). Al no existir datos sobre el diferente impacto que la RUV puede tener sobre las distintas cianobacterias en función de su tamaño y morfología, se postula la segunda hipótesis:

- *H2: la forma y tamaño celular condicionan la respuesta de las células a la RUV, por esto la RUV afecta en corto tiempo más el fotosistema de cianobacterias filamentosas que a las que forman agregados celulares globosos.*

Por su parte, diferentes estudios realizados con cultivos monoespecíficos de cianobacterias han mostrado que pueden sufrir cambios morfológicos como consecuencia de su exposición a la RUV. El ejemplo más evidente lo constituye *A. platensis*, cuyos tricomas helicoidales fueron dañados por la RUV en experimentos de corta duración con cultivos con baja densidad celular (Wu *et al.* 2005). Aún más, cuando los cultivos expuestos tuvieron mayores densidades celulares, se observó que los tricomas se quebraban pero también se comprimían, lo que llevó a los autores a proponer que los mecanismos de sombreado o “self-shading” jugaban un rol importante en la protección contra la RUV (Wu *et al.* 2005, Gao *et al.* 2008). Por su parte, Gao *et al.* (2007) trabajando con *Anabaena* sp. PCC7120 observaron que cuando se la exponía a la RUV solar, se observaban reducciones en la longitud del tricoma de 49% y se reprimía la diferenciación celular de heterocistos. Esto último también se encuentra descrito para *Anabaena* sp., *Nostoc* sp., *Nostoc carmium* y *Scytonema* sp (Sinha *et al.* 1996). Dados estos antecedentes, se postula la tercera hipótesis:

- *H3: La exposición a la RUV modifica la morfología de las cianobacterias.*

Las cianobacterias tienen diferentes mecanismos de protección frente a la RUV, entre los que se encuentran la síntesis de compuestos fotoprotectores. Un estudio de cuatro cianobacterias presentes en aguas termales (*Cyanothece*, *Nostoc*, *Scytonema*, y *Rivularia*) identificó la presencia de MAAs caracterizados como shinorine, porphyra-334, y mycosporine-glycine, junto con varios MAAs aún desconocidos (Rastogi *et al.* 2012). Por su parte, al estudiar una floración de *Microcystis* en un lago muy eutrófico Sommaruga *et al.* (2009) encontraron que esta cianobacteria utilizaba una combinación de estrategias fotoprotectoras, que incluía la síntesis de

MAAs, para contrarrestar las altas irradiancias de RUV que recibe durante la formación de la floración junto con la síntesis de otros compuestos como carotenoides y ácido D-galacturónico. Por su parte, Sinha *et al.* 2003) exponiendo cultivos de *Nodularia baltica*, *N. harveyana* y *N. spumigena*, encontraron que el contenido específico de shinorine y porphyra-334 se incrementaba significativamente cuando las muestras se cubrían con filtros de corte a 295 nm, indicando que en comparación con la RUV-A y PAR, la RUV-B es más efectiva en la inducción de MAAs en cianobacterias. Esto llevó a postular la cuarta hipótesis:

- *H4: los compuestos que absorben RUV actúan como protección inicial ante la RUV, e incrementan su concentración al ser expuestas las cianobacterias a la RUV.*

Todos los cambios descritos anteriormente (cambios morfológicos, disminución de actividad enzimática, síntesis de compuestos fotoprotectores) demandan una inversión metabólica y por tanto, retrasan el crecimiento de las cianobacterias (Gao *et al.* 2007b, Xue *et al.* 2007). En el estudio mencionado anteriormente con la cianobacteria *Anabaena* sp. PCC7120, la inhibición de la formación de heterocistos, junto con los cambios morfológicos derivaron en una disminución del 40% en el crecimiento (Gao *et al.* 2007b). Por su parte, en un estudio con nitroprusiato de sodio, se comprobó que la RUV inhibía el crecimiento de *S. platensis*-794 en un 40% en su ausencia aunque solo el 10% cuando este compuesto se hallaba presente en concentraciones de 0.5 mM, probando su rol en la prevención del estrés oxidativo generado por la exposición a la RUV-B (Xue *et al.* 2007). Estos antecedentes llevan a postular la hipótesis:

- *H5: los cambios generados por la exposición a la RUV y la aclimatación de las cianobacterias a los mismos, afectan al crecimiento observándose una disminución del mismo.*

Capítulo 2

Efecto de la radiación ultravioleta
y de la temperatura en un sistema
eutrófico con sucesión estacional:
Laguna Cacique Chiquichano
(Trelew, Chubut)

2.1.- INTRODUCCIÓN

El cambio climático surge como resultado tanto de la variabilidad interna en el clima como también de factores externos (tanto naturales como de origen antrópico) (Houghton *et al.* 2001). Como resultado del cambio climático, se espera la aparición de diferentes fenómenos: temperaturas máximas y mínimas más altas, así como un aumento de la cantidad de días de calor y una disminución de días fríos, menores rangos de temperaturas diurnas, aumento de los eventos de precipitación intensa, entre otros. Además, los incrementos tanto en los niveles de la RUV como en la temperatura han sido descriptos como dos de los factores más importantes resultantes del proceso de cambio climático debido a su potencial impacto a nivel ecosistémico (Houghton *et al.* 2001, UNEP 2005, Hansen *et al.* 2006), los cuales se enumeran a continuación.

2.1.1- Efecto de la radiación ultravioleta sobre las comunidades

La RUV ha sido ampliamente estudiada por su rol como factor de estrés, capaz de modular las comunidades fitoplanctónicas (ver reviews de Harrison & Smith 2009, Häder *et al.* 2011). Entre dichos efectos se encuentran: los cambios en la composición taxonómica de las comunidades hacia especies más resistentes (Villafañe *et al.* 1995, Wängberg *et al.* 2008, Halac *et al.* 2013,) y la inhibición de la fotosíntesis (Zhou *et al.* 2009, Li *et al.* 2011), particularmente ante la falta de nutrientes (Litchman *et al.* 2002) o cuando la síntesis de proteínas se encuentra inhibida (Lesser *et al.* 1994). Otros efectos generados por la RUV reportados recientemente incluyen la disminución de la relación C:P celular debido a una fuerte reducción de la fijación de carbono, pero también al aumento de la incorporación de P, causando un impacto importante en la eficiencia de las transferencias tróficas en las redes alimentarias acuáticas (Hessen *et al.* 2008). Además, se ha encontrado que la RUV altera tanto la fagotrofia, como la fotosíntesis en comunidades dominadas por nanoflagelados, afectando de esta forma los patrones y velocidades de transferencia del carbono (Bastidas Navarro *et al.* 2011). Aún más, los niveles ambientales de RUV son capaces de inducir altas mortalidades en el pico-fitoplancton (aunque estas son de tipo especie-específicas), lo que a su vez afecta el funcionamiento de las redes alimentarias microbianas (Llabrés & Agustí 2006). Por otra parte, se ha propuesto que la presencia de niveles inhibitorios de RUV en lagos de montaña oligotróficos promueve la mixotrofia, constituyendo las bacterias la principal fuente de carbono en condiciones en que la fotosíntesis se ve inhibida (Medina-Sánchez *et al.* 2004, Carrillo *et al.* 2006). Sin embargo, existen algunas especies

tolerantes que se ven beneficiadas en presencia de altos niveles de RUV y frente a pulsos de P (Delgado-Molina *et al.* 2009). Más aún, Gao *et al.* (2007) encontraron que en los ambientes marinos tropicales, el fitoplancton puede utilizar la RUV como fuente de energía adicional en la fijación del carbono. Finalmente, es actualmente ampliamente aceptado el rol de la RUV-A en los mecanismos de fotorreparación (Karentz 1994, Dong *et al.* 2007).

2.1.2- Efecto de la temperatura sobre las comunidades

Por su parte, los efectos del aumento de la temperatura se han estudiado extensamente desde la descripción de la existencia de un proceso de cambio climático (Wiltshire & Manly 2004, Winder & Schindler 2004, Elliott *et al.* 2006). El aumento de temperatura ha sido asociado a fenómenos tales como el cambio en las dinámicas del fitoplancton y zooplancton en primavera (Winder & Schindler 2004), cambios en las sucesiones del fitoplancton y en la aparición de floraciones algales (Wiltshire & Manly 2004, Elliott *et al.* 2006, Jöhnk *et al.* 2008), y aumentos en la biomasa media anual de fitoplancton junto con pérdida de la biodiversidad de especies, especialmente cuando el aumento de temperatura es acompañado por un enriquecimiento de nutrientes en los cuerpos de agua (Elliott *et al.* 2006).

2.1.3- Interacción entre radiación y temperatura

No obstante lo expuesto anteriormente, estos factores no actúan de manera aislada sino en una compleja interacción, por lo que resulta de gran importancia entender sus efectos interactivos sobre el fitoplancton. Algunos estudios han señalado que estos efectos son variables: por ejemplo, un aumento de temperatura redujo la fotoinhibición inducida por la RUV en la diatomea *Thalassiosira pseudonana* (Sobrino & Neale 2007) mientras que Roos y Vincent (1998), trabajando con la cianobacteria *Phormidium murrayi* encontraron que el aumento de temperatura ayudaba a contrarrestar la inhibición del crecimiento inducida por a RUV, pero no la de la fotosíntesis. Se ha propuesto que un aumento de temperatura incrementaría las velocidades metabólicas (Baulch *et al.* 2005) lo que ayudaría a contrarrestar los efectos negativos de la RUV. En concordancia con esto y trabajando con *Thalassiosira weissflogii*, Helbling *et al.* (2011) encontraron que un aumento de temperatura disminuía la inhibición de la fijación de carbono inducida por la RUV y aumentaba tanto la expresión de genes como la actividad de la enzima RUBISCO. Sin embargo, otros estudios contradicen esta hipótesis: Villafañe *et al.* (2013), estudiando las respuestas fotosintéticas de las comunidades fitoplanctónicas en la Patagonia a

través de ciclos diarios, encontraron que la temperatura tenía diferentes efectos a lo largo de la sucesión estacional: mientras en las comunidades pre-floración se observó un efecto pequeño, durante la floración ayudó a contrarrestar la magnitud de la reducción del rendimiento fotoquímico y más aún, actuó sinérgicamente con la RUV durante el inicio de la floración y en primavera aumentando la inhibición fotoquímica total. Además, Lesser (1996) encontró que la exposición a temperaturas elevadas y RUV solar aumenta el estrés oxidativo, disminuyendo el rendimiento fotoquímico del PSII y la actividad de la enzima RUBISCO en el dinoflagelado simbiótico *Symbiodinium bermudense*. En cuanto a los efectos combinados de la radiación y la temperatura a nivel comunitario, Thyssen *et al.* (2011) encontraron que estos factores afectaban de diferente manera a los distintos grupos que la componían. En concordancia con lo anterior, Lionard *et al.* (2012) exponiendo fitoplancton marino a niveles aumentados de radiación y temperatura, encontraron que esta última tenía más peso al momento de afectar la estructura de las comunidades fitoplanctónicas, favoreciendo en mayor medida a las diatomeas en detrimento de las células más pequeñas.

2.1.4- Rol del nitrógeno en el metabolismo del fitoplancton

La productividad biológica en la mayor parte de los océanos del mundo es controlada por el aporte de nutrientes a las aguas superficiales, siendo el balance entre el aporte y la remoción de nutrientes (especialmente nitrógeno, hierro y fósforo) el que determina qué nutriente limita el crecimiento del fitoplancton (Beman *et al.* 2005). En los océanos el crecimiento del fitoplancton está limitado principalmente por el nitrógeno (Falkowski 1997, Chen *et al.* 2004); sin embargo, en los cuerpos de agua dulce de climas templados fríos, particularmente en los lagos, la falta de nitrógeno puede ser compensada por la fijación planctónica de este nutriente por parte de las cianobacterias (Howarth & Marino 2006).

En particular, el nitrógeno es un elemento esencial para la vida: está distribuido en los tejidos orgánicos, principalmente en las proteínas y ácidos nucleicos, pero es también un constituyente importante de las paredes celulares bacterianas (como ácido murámico), compuestos de transferencia de energía como nucleótidos, pigmentos fotosintéticos incluyendo la clorofila y las ficobilinas, vitaminas y productos de reserva como los gránulos de cianoficina (Karl *et al.* 2002). El nitrato y el amonio son las dos especies inorgánicas más importantes que sustentan la producción nueva (basada en nitrato) y la producción regenerada / reciclada (basada en amonio) en los ecosistemas marinos (Dugdale & Goering 1967). Aunque los limnólogos muchas veces

subestiman los conceptos de producción nueva vs. regenerada (Caraco *et al.* 1992), estos también son válidos en ambientes dulceacuícolas (Urabe *et al.* 1995, Caraco *et al.* 1992, Hama *et al.* 1990). Entre los procesos en los cuales es fundamental la utilización del nitrógeno por parte del fitoplancton se incluyen el transporte de membrana, la asimilación e incorporación de nitrógeno disuelto externo en compuestos bioquímicos dentro de la célula a través de varios sistemas enzimáticos (Hong *et al.* 2011). Entre estas enzimas, la nitrato reductasa (NR) y la glutamina sintetasa (GS) son las enzimas más importantes involucradas en la asimilación del nitrógeno. En particular, la GS cataliza la formación de glutamina a partir de amonio (tanto el proveniente de la fijación biológica como el captado del ambiente) y glutamato en presencia de ATP, y juega un rol importante en la asimilación de nitrógeno, pero también actúa como enzima clave uniendo carbono al metabolismo del nitrógeno incorporando nitrógeno inorgánico en nitrógeno orgánico vía GS / glutamato sintetasa (GOGAT) (Hong *et al.* 2011).



2.1.5- Objetivo

El objetivo de este capítulo fue el de determinar el efecto combinado de la RUV y el aumento de temperatura en diferentes comunidades presentes en una laguna eutrófica de Patagonia a lo largo del año, en dos escalas temporales: corto (experimentos a lo largo de ciclos diarios) y mediano plazo (experimentos de 5 días de duración) para evaluar el impacto de estas variables en la composición taxonómica de las muestras, su crecimiento y sus procesos metabólicos: fotosíntesis y actividad enzimática de la GS. Esta laguna, que ha sido objeto de otros estudios, ha sido caracterizada por una sucesión estacional de fitoplancton, con dominancia circunstancial de cianobacterias (ver más adelante).

2.2.- MATERIALES Y MÉTODOS

2.2.1- Sitio de muestreo

La laguna Cacique Chiquichano (Figs. 2.1 y 2.2) es una laguna urbana situada en la ciudad de Trelew, Provincia del Chubut (43° S, 65° W) que cuenta con una superficie de aproximadamente 10 ha, con una profundidad media cercana a 2 m (Rivera 1993). Es una laguna eutrófica que ha sido objeto de varios estudios fotobiológicos, centrados mayormente en el estudio del zooplancton (Gonçalves *et al.* 2007, Gonçalves *et al.* 2011) en los que se encontraron valores elevados de nutrientes a lo largo del año: concentraciones en el rango de 30.9-192 μM de nitrógeno (bajo las formas de $\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$) y 8.8-58.8 μM de fósforo, acompañados por valores variables de atenuación de la radiación solar (2-13 m^{-1}) debidas mayormente a la presencia de fitoplancton, con concentraciones de Clor-a en el rango de 4-700 $\mu\text{g l}^{-1}$ (Gonçalves *et al.* 2011). Sus aguas se encuentran sujetas a una fuerte mezcla vertical en los días de viento (Gonzalez & Tappari 1995) y en un estudio previo (Gonçalves *et al.* 2011), se determinó una comunidad fitoplanctónica con sucesión anual, en la cual el año podía dividirse en 4 períodos: dos dominados por cianobacterias y dos por diatomeas.



Fig. 2.1 Mapa de ubicación de la laguna Cacique Chiquichano (Trelew, Provincia del Chubut).



Fig. 2.2 (A) Imagen satelital de la ubicación de la laguna Cacique Chiquichano en Trelew, Chubut, (B) Imagen de la laguna y sus alrededores.

2.2.2.- Protocolo de muestreo

Los experimentos se realizaron en el período Julio 2011- Marzo 2012. Las muestras fueron recolectadas el día de la experimentación (en los casos de los experimentos a mediano plazo) y la noche anterior (en el caso de los experimentos a lo largo de ciclos diarios). En todos los casos se registró la temperatura a través de un termómetro digital y luego del traslado de las muestras al laboratorio de la Estación de Fotobiología Playa Unión (EFPU, a 20 min. del sitio de muestreo) se las mantuvo a la temperatura *in situ* hasta el momento de la experimentación.

Las muestras fueron recolectadas con un muestreador previamente enjuagado con HCl (1N) desde la costa de la laguna, tomándolas de la capa superficial. El material obtenido fue filtrado por una malla de 90 μm para excluir al zooplancton y al detritus grande y colocado en los recipientes de experimentación (ver más adelante).

2.2.3.- Condiciones experimentales

2.2.3.1.- Experimentos a mediano plazo

Se realizaron cuatro experimentos, uno por cada estación del año, de cinco días de duración a los que se denominó a los fines prácticos: invierno, primavera, verano y otoño. Las muestras fueron colocadas en botellas de plexiglas de 3.5 l, transparentes a la RUV. Se establecieron dos tratamientos de temperatura (*in situ* y aumentada en 5° C) y dos tratamientos de radiación: muestras recibiendo solo radiación fotosintéticamente activa (PAR: 400-700 nm, tubos cubiertos con filtros Ultraphan UV Opak 395) y muestras recibiendo RUV+PAR (280-700 nm, botellas descubiertas). En todos los casos, y por limitaciones de espacio efectivo, se trabajó con

duplicados. Para proveer las dos temperaturas diferentes se utilizaron dos baños de agua independientes, uno con circulación de agua corriente y otro con un dispositivo que constaba de una resistencia y un termostato al cual se le podía fijar la temperatura de trabajo.

Las botellas se expusieron a la radiación natural (exposición variable a lo largo del año, desde las 9.30 a las 17 hs en verano y otoño, y desde las 10.30 a las 16 hs en invierno y primavera) luego de lo cual se mantuvieron en oscuridad a la temperatura correspondiente de incubación (i.e., *in situ* o aumentada). El protocolo de muestreo fue el siguiente: las muestras para los análisis de pigmentos se tomaron al inicio del experimento (T0) y durante la experimentación en dos momentos: inmediatamente después de terminada la exposición diaria a la radiación natural (fase de exposición) de cada uno de los 5 días y antes del comienzo de la misma (fase oscura). Las muestras para análisis de la fluorescencia de la Clor-a se recolectaron en T0, al mediodía, a la noche y a la mañana, antes de la fase de exposición. Finalmente, a la mañana y a la noche se recolectaron muestras para cuantificación de células y análisis taxonómico.

2.2.3.2.- Ciclos diarios

Se realizaron muestreos cada 2-3 semanas y durante los mismos días en que se realizaron las experiencias a mediano plazo. Estos experimentos se llevaron a cabo para monitorear la respuesta a corto plazo de las distintas comunidades a lo largo del año. Las muestras obtenidas de la laguna fueron colocadas en botellas de plexiglas de 0.75 l, transparentes a la RUV, y se establecieron dos tratamientos de temperatura (*in situ* y aumentada en 5° C) y tres tratamientos de radiación: muestras recibiendo solo radiación fotosintéticamente activa (PAR: 400-700 nm, botellas cubiertas con filtros Ultraphan UV Opak 395), tratamiento P; muestras recibiendo RUV-A + PAR (320-700 nm, botellas cubiertas con filtros Montagefolie 320), tratamiento PA, y muestras recibiendo RUV+PAR (280-700 nm, botellas descubiertas), tratamiento PAB. Las características de transmisión de los filtros se presentan en (Villafañe *et al.* 2003). En todos los casos, y por limitaciones de espacio dentro de los baños termostáticos, se trabajó con duplicados. Para proveer las dos temperaturas diferentes se utilizaron dos baños de agua independientes (ver descripción más adelante). Las botellas se expusieron a la radiación natural (exposición variable a lo largo del año, desde las 9.30 a las 16.30 hs en verano y otoño, y desde las 10.30 a las 15.30 hs en primavera e invierno) luego de lo cual se mantuvieron en oscuridad a la temperatura correspondiente (i.e., *in situ* o aumentada). El protocolo de muestreo fue el siguiente: las muestras para los análisis de pigmentos se recolectaron en T0 y al final la exposición, las

muestras para los análisis de la fluorescencia de la Clor-a se tomaron en T0, luego cada una hora a partir del inicio de la exposición y hasta dos horas después de terminada la misma, y se hicieron dos mediciones más, una a la noche y otra a la mañana siguiente para estimar la recuperación de las muestras luego de haberse eliminado el estrés lumínico. Asimismo, se recolectaron muestras de la laguna en cada experiencia para realizar análisis taxonómicos y cuantificación de células.

2.2.4.- Mediciones

Durante los experimentos se realizaron las siguientes mediciones y análisis:

2.2.4.1.- Parámetros de fluorescencia de la Clor-a

La fluorescencia *in vivo* del fotosistema II de la Clor-a se midió con un fluorómetro de pulso de amplitud modulada (Walz, Water PAM, Effeltrich, Alemania). Se tomaron alícuotas de 3 ml de muestra, que se colocaron en una cubeta y se midieron 6 veces inmediatamente después del muestreo, sin adaptación a la oscuridad. El rendimiento fotoquímico (Y) se calculó usando las ecuaciones de Genty *et al.* (1989) y Weis & Berry (1987) según:

$$Y = \Delta F / F'_m = (F'_m - F_t) / F'_m \quad \text{Ec. 2}$$

donde F'_m es la máxima fluorescencia inducida por un pulso de luz saturante (ca. 5300 μmol fotones $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ en 0.8 s) y F_t es la fluorescencia del estado basal inducida por la influencia de la luz actínica en células adaptadas a la luz.

2.2.4.2.- Concentración de pigmentos y compuestos que absorben RUV (CARUV)

Un volumen variable de muestra (de acuerdo al crecimiento de la población, 25-150 ml) se filtró a través de filtros GF/F, 50 mm (Munktell, Suecia) y se congeló inmediatamente después hasta el momento de realizar el análisis. Los pigmentos fotosintéticos y los CARUV se extrajeron en 5 ml de metanol. Los tubos conteniendo los extractos metanólicos fueron luego sonicados a 20° C durante 20 min. Luego de otros 40 min de extracción, las muestras fueron centrifugadas y se obtuvo un espectro de absorción del sobrenadante entre 250 y 750 nm con un espectrofotómetro (Hewlett Packard, modelo HP 8453E). El mismo extracto metanólico se utilizó para calcular la concentración de Clor-a a través de la fluorescencia del extracto (Holm-Hansen & Riemann 1978) antes y después de la acidificación (HCl 1N) usando un fluorómetro (Turner Designs, modelo TD 700). La estimación de CARUV se realizó a través de la determinación de la altura de

los picos a 337 nm según lo descrito por Dunlap *et al.* (1995), utilizando el software Origin (OriginLab Corporation).

2.2.4.3.- Recuento de células

Las muestras (5 ml, tanto de campo como las provenientes de los distintos tratamientos) se fijaron con formalina neutralizada (concentración final de formaldehído en la muestra de 0.4%) y fueron contadas con una cámara Sedgewick-Rafter usando un microscopio invertido (Leica, modelo DM IL).

2.2.4.4.- Mediciones de temperatura y radiación

La radiación solar incidente en el área fue monitoreada constantemente con un radiómetro de banda ancha (ELDONET, Real Time Computer, Möhrendorf, Alemania) que mide RUV-B (280–315 nm), RUV-A (315–400 nm) y PAR (400–700 nm) cada segundo, promediando los datos de un intervalo de un minuto y guardando los datos en una computadora (los valores de RUV se obtuvieron de la suma de la banda de RUV-A y RUV-B). Este instrumento está instalado permanentemente en el techo de la EFPU y es calibrado anualmente utilizando un procedimiento de calibración solar. Para las mediciones del coeficiente de atenuación en la laguna, y dado que la laguna es poco profunda y que no se pudieron realizar perfiles debido a la ausencia de muelles o plataformas, se tuvieron en cuenta estudios anteriores que indican que en la laguna Cacique Chiquichano el k_{PAR} se encuentra mayormente influenciado por la Clor-a (Gonçalves *et al.* 2011), teniendo el CDOM una influencia muy pequeña y prácticamente sin material particulado; por lo tanto se realizó el cálculo del mismo en base a los modelos de Morris (1995) y Branco (2005) , con las modificaciones propuestas por Gonçalves (2011) para este caso particular:

$$k_{Clor-a} = 0.22 + 0.008 * Clor-a + 0.054 * Clor-a^{0.66} \quad \text{Ec. 3}$$

2.2.4.5- Concentración de proteínas y actividad de la enzima Glutamina Sintetasa (GS)

Un volumen variable de muestra de los contenedores expuestos en la experiencia de mediano plazo (y de acuerdo al crecimiento de la población, 25-150 ml estimado por el desarrollo de color en la muestra) se filtró a través de filtros GF/F de 50 mm (Munktell, Suecia) y se congeló inmediatamente después hasta el momento de realizar el análisis. Para extraer las proteínas totales se siguió el protocolo de Ivleva (2007) con algunas adaptaciones: la muestra se colocó en un tubo congelado y se le agregaron 1.5 ml de buffer de extracción (Buffer HEPES 50 mM, pH

7.5, MgCl₂ 20 mM, EDTA 0.2 mM, DDT 5 mM, NaHCO₃ 25 mM, TritonX100 0.1%) y microesferas de vidrio. Se trató la mezcla con ciclos de 30 seg de agitación y 30 seg de reposo en hielo durante 10 min. Luego se centrifugó la mezcla durante 15 min a 1000 g y se determinó la actividad de la GS en el sobrenadante. La concentración de proteínas se determinó por el método de Bradford (1976) mientras que la actividad de la GS se determinó por el método descrito en Rees *et al.* (1995), modificado levemente para trabajar con muestras congeladas. La actividad GS se expresó en unidades relativas (UR), donde 1 UR representa 1 μmol de fósforo inorgánico (P_i) producido por mg de proteína por hora.

2.2.4.6.- Cálculos y estadística

Para los experimentos de mediano plazo, cada tratamiento se realizó en duplicado; por lo tanto, todos los datos se presentan como su media y la mitad del rango entre réplicas, mientras que en los ciclos diarios, cada tratamiento se realizó por triplicado, por lo que los datos se presentan como su media y desvío estándar. Para determinar interacciones entre temperatura y radiación se utilizó un ANOVA de dos vías con un límite de confianza del 95% (Zar 1999) y como test post-hoc se utilizó un Fisher-LSD, mientras que para analizar la evolución del Y en las distintas estaciones se utilizó un ANOVA de medidas repetidas. Para describir la evolución de la Clor-a se calculó la máxima pendiente a la curva de concentración de la Clor-a a lo largo de cada experimento. En aquellos casos en los que no se observó la típica fase de crecimiento exponencial (por ej. cuando no se observó aumento en las concentraciones o incluso se vio una disminución) el ajuste lineal se realizó con todos los puntos.

Se realizó un ajuste exponencial ($y = a * e^{bx}$) con los valores del rendimiento fotoquímico efectivo al mediodía (exposición) y en la mañana temprano (oscuridad) a lo largo de cada experimento de mediano plazo usando un límite de confianza de 95%. En cada caso se obtuvo un valor de b, denominado b_{exp} y b_{rec} respectivamente.

Para los valores de Y de los ciclos diarios, se realizó un ajuste exponencial ($y = a * e^{kx}$) con los valores de disminución de Y (ver Fig. 2.5), obteniéndose el valor del exponente k (de ahora en más, Tasa de inhibición de Y). También se calculó el porcentaje de recuperación de Y (%Y), utilizando la siguiente fórmula:

$$\% Y = (Y_{fin} / Y_{T0}) * 100 \quad \text{Ec.4}$$

siendo Y_{fin} y Y_{T0} el rendimiento final e inicial respectivamente, mostrándose en la gráfica correspondiente (Fig. 2.6) la relación entre Y_{final}/Y_{T0} para permitir una mejor visualización. Para evaluar las variables que predecían de mejor forma el valor de k y %Y a lo largo del año, se realizó una regresión lineal múltiple (RLM) con los ciclos diarios, considerando como variables independientes la irradiancia media durante la exposición, el porcentaje de cianobacteria, la temperatura de exposición y la concentración de Clor-a. Previo a esto, se realizó un ANOVA de medidas repetidas con cada ciclo diario para detectar interacciones de temperatura y radiación en los mismos y excluirlos de la RLM. Del total de 25 ciclos, se excluyeron ocho ciclos como se indica a continuación: en la experimentación de invierno, se registraron efectos de la temperatura sobre el rendimiento el 5/7 y de la temperatura y la radiación únicamente en la experimentación del 28/8, mientras que en primavera se registraron efectos de la radiación en un ciclo (25/10) y de la temperatura en otro (12/12). En verano se registró una interacción de la temperatura y la radiación en dos ocasiones (3/1 y 1/3) y de la radiación en una ocasión (5/1). Finalmente, en otoño se registró un efecto de temperatura y radiación en una sola ocasión (26/3).

2.3. RESULTADOS

2.3.1. Características del sitio de estudio

Las condiciones de radiación durante la etapa experimental se muestran en la Fig. 2.3. Las dosis diarias a lo largo del año fueron variables (Fig. 2.3 A) con valores máximos en verano de $13.9 \text{ MJ}\cdot\text{m}^{-2}$, $2.17 \text{ MJ}\cdot\text{m}^{-2}$ y $51.7 \text{ kJ}\cdot\text{m}^{-2}$ y mínimos en invierno de $0.27 \text{ MJ}\cdot\text{m}^{-2}$, $0.07 \text{ MJ}\cdot\text{m}^{-2}$ y $0.29 \text{ kJ}\cdot\text{m}^{-2}$ para PAR, RUV-A y RUV-B respectivamente. Las diferencias observadas entre días cercanos se debieron a la presencia de nubes.

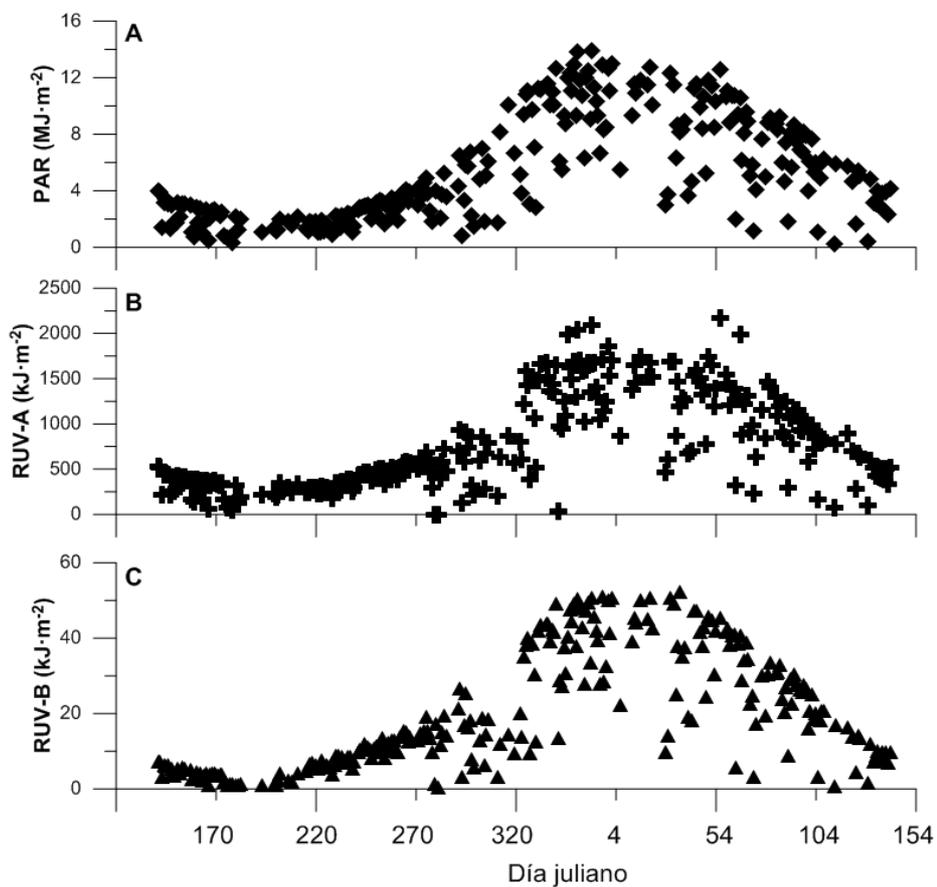


Fig. 2.3 Condiciones de radiación sobre la EFPU durante el período de estudio: dosis diarias de PAR, en MJ m^{-2} (A), RUV-A, en kJ m^{-2} y, (B) y RUV-B, en kJ m^{-2} (C).

Las condiciones físicas y la concentración de Clor-a a lo largo del año se muestran en la Fig. 2.4. La temperatura del agua (Fig. 2.4. A) varió a lo largo del período experimental desde los 8°C en

invierno hasta los 25° C en verano. Por su parte, los coeficientes de atenuación se mantuvieron bajos ($\sim 0.5 \text{ m}^{-1}$) en el período en el que la concentración de Clor-a se mantuvo baja (fase clara, con altas abundancias de *Daphnia*), esto es mayo-octubre 2011, y aumentaron durante la primavera-verano, alcanzando valores de $\sim 6 \text{ m}^{-1}$. Mientras tanto, la concentración de Clor-a se mantuvo baja durante el período mencionado, luego aumentó y mostró dos picos, el primero de $\sim 430 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ en noviembre y otro de $\sim 330 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ en enero. Como muestra la figura, los primeros dos experimentos se realizaron en la etapa de fase clara, mientras que los últimos se llevaron a cabo en el inicio y final del desarrollo del segundo pico de Clor-a.

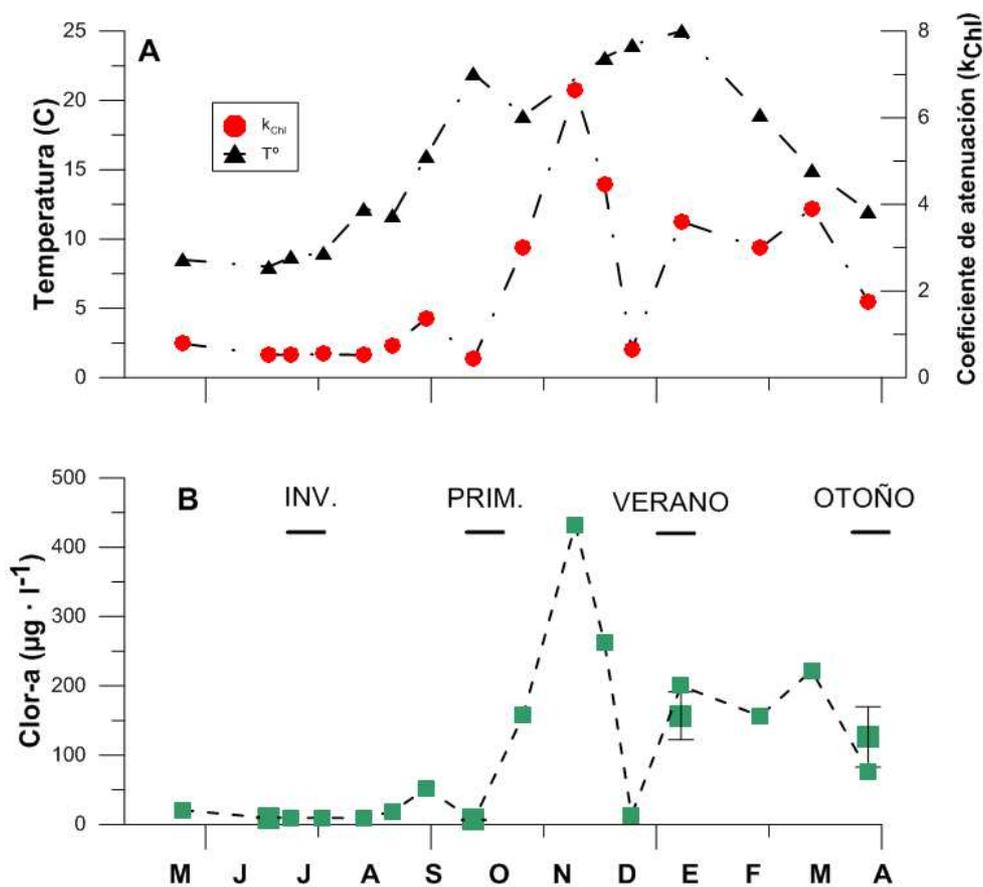


Fig. 2.4 Condiciones físicas (temperatura del agua y coeficiente de atenuación) (A) y concentración de Clor-a (B) en la laguna Chiquichano a lo largo del período experimental. Las líneas rectas en el panel B indican los períodos de experimentación de mediano plazo.

La composición de las muestras extraídas de la laguna a lo largo del año se muestra en la Fig. 2.5. Las muestras estuvieron dominadas por cianobacteria de tamaño muy pequeño en la mayor parte del año, siendo los géneros más representativos *Synechocystis* y *Aphanothece*, a excepción de la etapa estival en la que se observó la aparición de colonias de *Microcystis* y filamentos de *Anabaenopsis*. El segundo grupo en abundancia fue el de las clorofitas, representado principalmente por *Chlamydomonas*. En primavera, se observó un aumento marcado de la abundancia de este grupo, causado por una floración del género *Tetraspora*. Dicho aumento fue acompañado por una fuerte disminución en la abundancia de las cianobacterias. De la misma forma, la disminución en las abundancias de las clorofíceas fue acompañada por aumentos de las cianobacterias. Las diatomeas, en cambio, fueron escasas durante todo el año siendo los géneros más representativos *Navicula*, *Gomphonema* y *Cyclotella*.

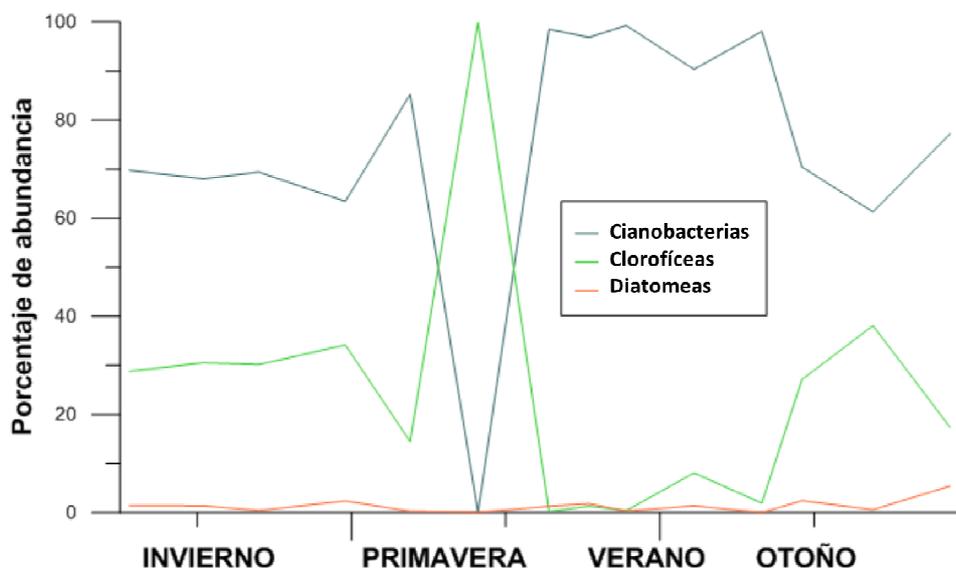


Fig. 2.5 Porcentaje de abundancia de Cianobacterias, Clorofíceas y Diatomeas a lo largo del año en la laguna Cacique Chiquichano.

2.3.2. Experimentación a corto plazo

A modo de ejemplo, la Fig. 2.6 muestra un ciclo diario típico de eficiencia fotosintética de una muestra de la laguna Cacique Chiquichano expuesta a las condiciones experimentales previamente descritas (ver sección de Materiales y Métodos). En todos los ciclos se observó una disminución en los valores de Y durante el inicio de la exposición, siendo esta disminución

máxima generalmente alrededor del mediodía. Pasado este momento, se observó un aumento en los valores de Y , indicando su recuperación; en algunos casos esta recuperación se observó mientras las muestras se encontraban expuestas, denominándose recuperación dinámica. Sin embargo, en muchos casos, la mayor parte de esta recuperación se observó durante la etapa oscura, luego de finalizada la exposición, alcanzándose en muchos casos porcentajes de recuperación mayores a 100% (indicativo de que los valores finales alcanzados eran mayores que los iniciales, ver Fig. 2.7).

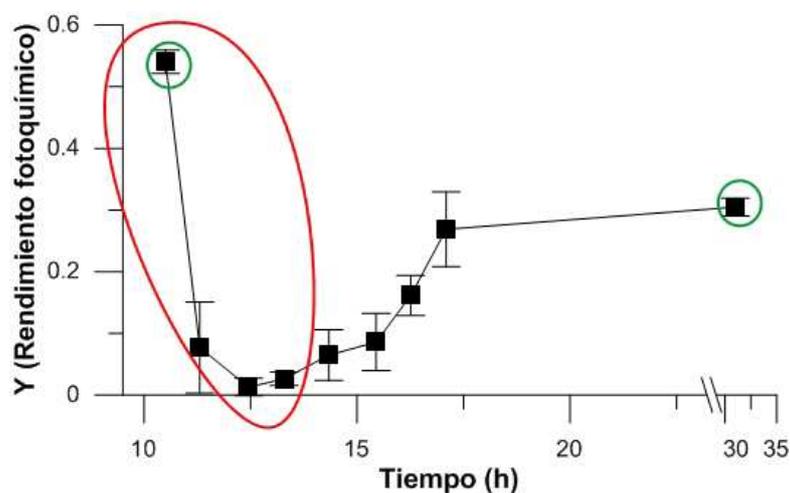


Fig. 2.6 Ciclo diario de Y típico observado durante la exposición de una muestra extraída de la laguna Cacique Chiquichano. Nótese el corte de eje cercano a las 23 hs. En color rojo se muestran los puntos utilizados para calcular el valor de la tasa de inhibición del Y (k) mientras que en color verde se muestran los puntos que se utilizaron en el cálculo del porcentaje de recuperación de Y (% Y).

Los valores de la tasa de inhibición de Y y del porcentaje de recuperación % Y se presentan en la Fig. 2.7. En general, se observó que los valores absolutos de k (Fig. 2.7 A) eran menores en verano y primavera y mayores en otoño e invierno. Además, no se observaron diferencias significativas entre tratamientos de radiación y temperatura a lo largo del año. Por su parte, los valores del porcentaje de recuperación % Y (Fig. 2.7 B) mostraron una mejor recuperación en las muestras expuestas durante otoño e invierno, con valores cercanos o mayores a 1 mientras que en primavera y verano se registraron valores más bajos, menores a 1, lo que implica que las muestras sufrieron una inhibición crónica.

A fin de explicar los valores de k y % Y a lo largo del año, se realizaron RLM con las variables medidas, obteniéndose en cada caso un modelo que se muestra en la Fig. 2.7. El ajuste realizado con los ciclos diarios mostró que el valor del exponente de inhibición k estaba relacionado con la irradiancia recibida y con la concentración de Clor-a ($r^2 = 0.84$) pudiendo expresarse esta relación mediante la ecuación:

$$k = -2.60 * 10^{-5} \text{ Irradiancia} - 1.51 * 10^{-5} \text{ Clor-a}$$

Ec. 5

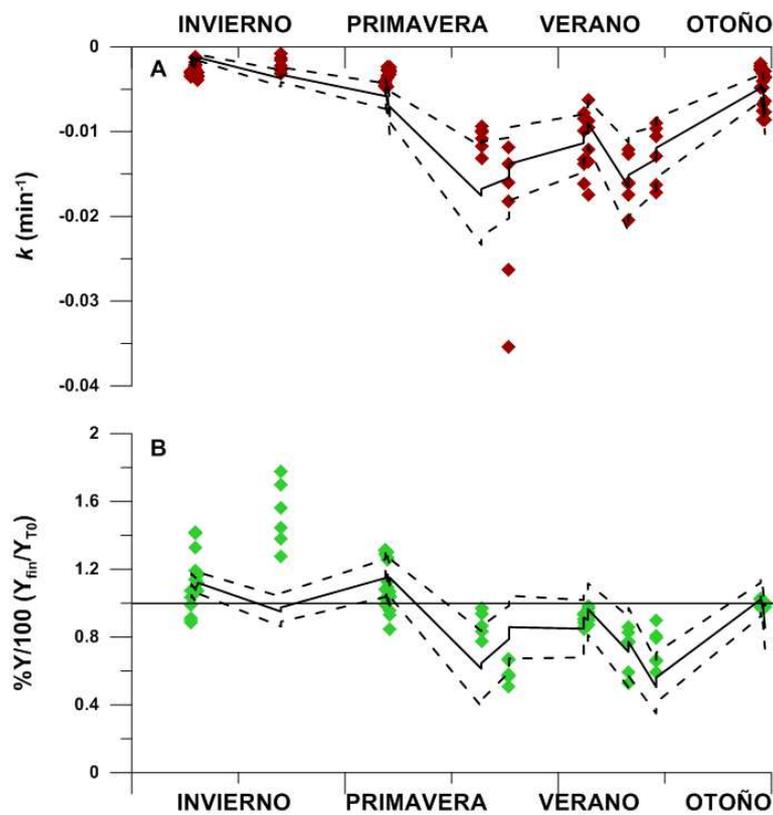


Fig. 2.7 Valores k (A) y % Y (B) para los ciclos diarios realizados bajo los distintos tratamientos de radiación y de temperatura durante las distintas estaciones del año en la laguna CaciQue Chiquichano. La línea continua representa el modelo de regresión múltiple (RLM) obtenido con las variables irradiancia, temperatura experimental, porcentaje de cianobacterias y concentración de Clor-a. Las líneas discontinuas representan el intervalo de confianza del RLM.

Por su parte, el valor de % Y se relacionó con las mismas variables independientes (Irradiancia y concentración de Clor-a) pero además con el porcentaje de cianobacterias presente en la muestra, obteniéndose un buen ajuste de los datos ($r^2 = 0.95$). La ecuación de ajuste en este caso fue:

$$\%Y = 129.38 \% \text{ cianobacterias} - 0.113 \text{ Irradiancia} - 0.138 \text{ Clor-a} \quad \text{Ec. 6}$$

2.3.3 Experimentación a mediano plazo

2.3.3.1 Condiciones de radiación

Las condiciones de radiación sobre la laguna Cacique Chiquichano durante las experiencias de mediano plazo se muestran en la Fig. 2.8. Las condiciones durante los experimentos fueron mayormente nubladas, con valores máximos de PAR de ~ 123 , 383, 477 y 275 W m^{-2} en invierno, primavera, verano y otoño respectivamente (Fig. 2.8 B) y de RUV de ~ 17 , 57, 76 y 43 (Fig. 2.8 C) en invierno, primavera, verano y otoño respectivamente.

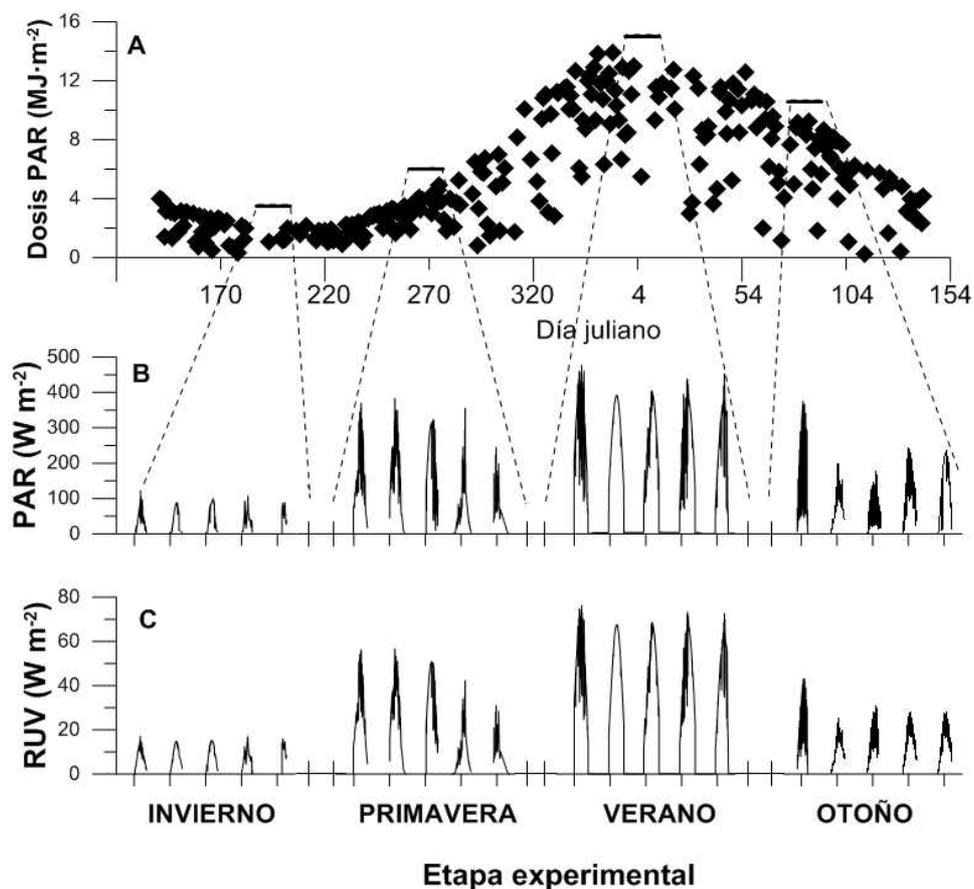


Fig. 2.8 Condiciones de radiación durante los experimentos de mediano plazo: dosis de PAR (en MJ m^{-2}) (A) a lo largo del año indicando con segmentos el momento de las diferentes experiencias: invierno, primavera, verano y otoño, e irradiancias (en W m^{-2}) de PAR, 400-700 nm (B) y RUV, 280-400 nm (C) durante estas experiencias.

2.3.3.2 Análisis de pigmentos

La evolución de la Clor-a a lo largo de los experimentos a mediano plazo se muestra en la Fig. 2.9. Tanto en invierno (Fig. 2.9 A) como en primavera (Fig. 2.9 B) se observa un aumento de la Clor-a hacia el final del experimento, siendo mayor para las muestras expuestas a temperaturas más elevadas. En verano, sin embargo, hay una disminución de las concentraciones de Clor-a, siendo esta disminución mayor para las muestras bajo el tratamiento P. En otoño en cambio, se observa un aumento de las concentraciones de Clor-a, alcanzando las muestras expuestas a temperaturas más elevadas de manera más rápida la fase de estacionaria. Para comparar estadísticamente la evolución de la Clor-a se calcularon las velocidades de cambio de la misma (Tabla 2.1). En ninguna de las estaciones se detectaron interacciones; sin embargo sí hubo efectos combinados de la radiación y de la temperatura en invierno, mientras que se confirmó el efecto de la temperatura sobre la comunidad de primavera y de la radiación sobre la de verano. En ninguna de las etapas experimentales se detectó la presencia de concentraciones significativas de pigmentos fotoprotectores (CARUV o carotenoides) bajo ninguno de los tratamientos de radiación o temperatura.

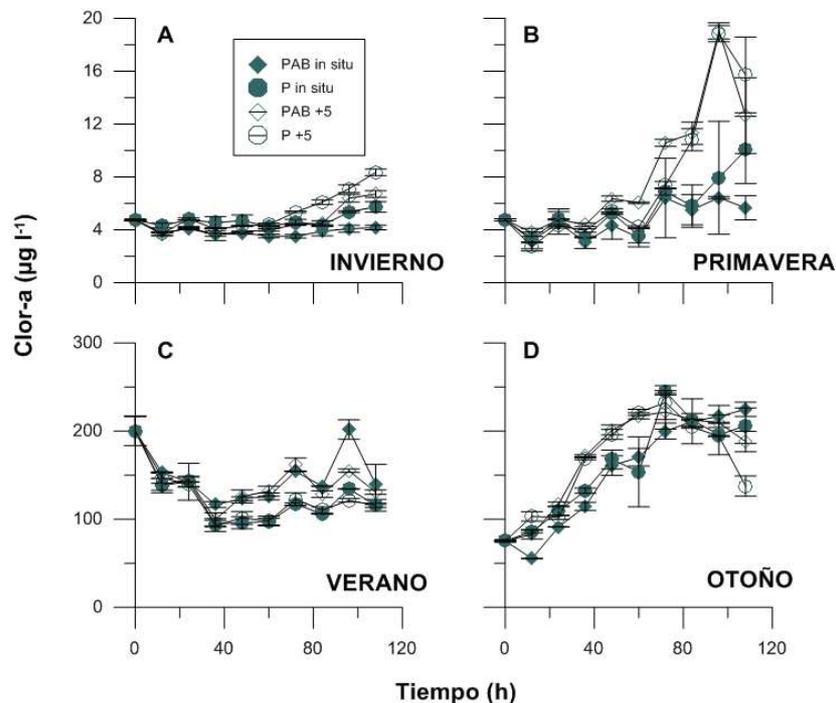


Fig. 2.9 Concentraciones de Clor-a ($\mu\text{g l}^{-1}$) a lo largo de los experimentos de mediano plazo para los diferentes tratamientos de radiación: PAB y P (PAR+UV y PAR solo, respectivamente) y de temperatura is (*in situ*) y +5 (*in situ* y temperatura aumentada, respectivamente).

Tabla 2.1 Evolución de la Clor-a ($\mu\text{g Clor-a l}^{-1}$) en cada uno de los períodos experimentales para los diferentes tratamientos de radiación: PAB, PA y P y de temperatura is (*in situ*) y +5 (temperatura aumentada). Las últimas tres filas detallan los resultados del ANOVA de dos vías realizado con estos valores (se muestran los valores de p) para determinar los efectos de la radiación, de la temperatura o de su combinación.

Tratamiento	Invierno	Primavera	Verano	Otoño
PABis	0.02 \pm 0.01	0.07 \pm 0.02	0.97 \pm 0.42	1.93 \pm 1.03
Pis	0.04 \pm 0.02	0.10 \pm 0.10	0.57 \pm 0.21	2.09 \pm 0.92
PAB+5	0.06 \pm 0.03	0.33 \pm 0.16	1.61 \pm 0.80	2.36 \pm 1.30
P+5	0.08 \pm 0.04	0.39 \pm 0.17	0.71 \pm 0.53	2.39 \pm 1.07
Radiación	0.001	ns	0.031	ns
Temperatura	0.025	0.01	ns	ns
RxT	ns	ns	ns	ns

Tabla 2.2 Abundancia de organismos al inicio y al final de los experimentos de mediano plazo, expresadas como número de células $\times 10^3 \text{ ml}^{-1}$ para los diferentes tratamientos de radiación: PAB, PA y P y de temperatura is (*in situ*) y +5 (temperatura aumentada). Los datos se muestran como la media \pm la mitad del rango entre réplicas. Las últimas tres filas detallan los resultados del ANOVA de dos vías realizado con estos valores (se muestran los valores de p) para determinar los efectos de la radiación, de la temperatura o de su combinación. Grados de libertad: 1.

Tratamiento	Invierno	Primavera	Verano	Otoño
T0	73.13 \pm 6.88	300.17 \pm 34.18	686.00 \pm 31.11	100.33 \pm 0.94
PABis	100.53 \pm 33.75	204.50 \pm 2.12	427.58 \pm 106.19	127.00 \pm 26.40
Pis	196.97 \pm 0.05	158.67 \pm 70.24	499.33 \pm 10.37	143.83 \pm 31.35
PAB+5	169.77 \pm 1.93	187.98 \pm 69.74	473.33 \pm 1.89	158.00 \pm 19.80
P+5	183.43 \pm 0.05	181.33 \pm 53.27	432.00 \pm 20.74	143.00 \pm 1.41
Radiación	ns	ns	ns	ns
Temperatura	ns	ns	ns	ns
RxT	0.025	ns	ns	ns

2.3.3.3 Análisis taxonómicos

Los resultados de los análisis de abundancia celular (en células $\times 10^3 \text{ ml}^{-1}$) en cada una de las estaciones se muestran en la Tabla 2.2. Mientras que en primavera y verano se observó una

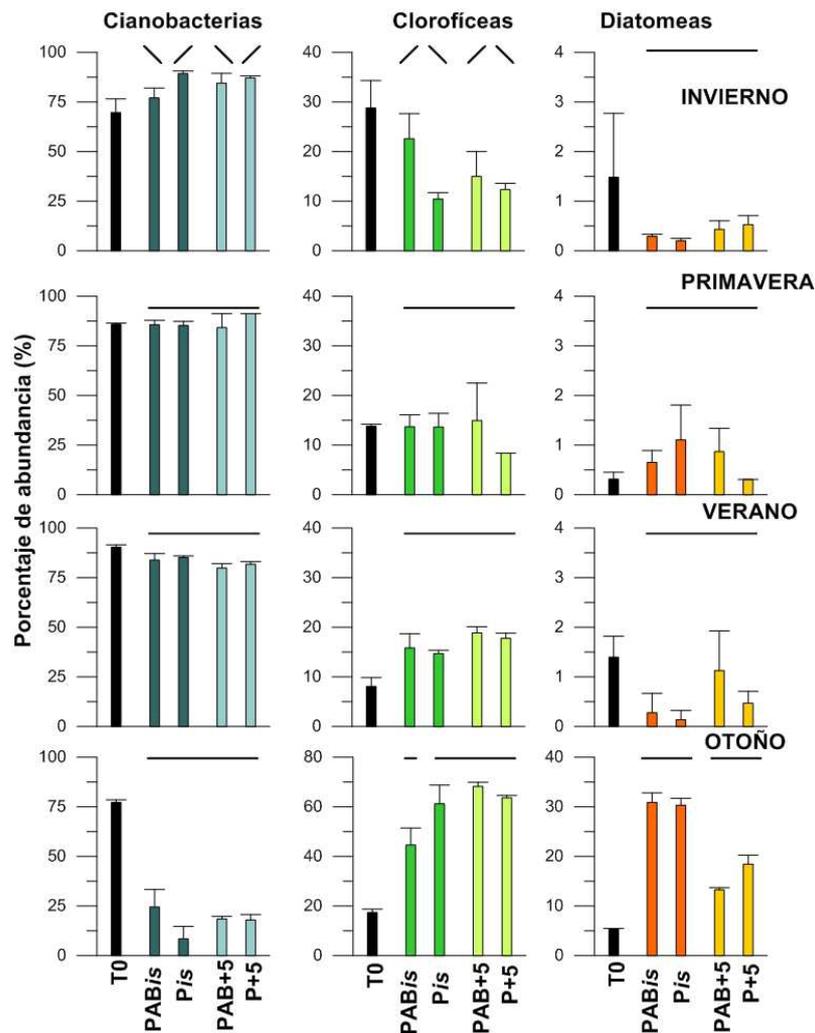


Fig. 2.10 Porcentaje de abundancia de los diferentes grupos algales al inicio y al final del experimento para cada uno de los tratamientos. Las diferentes líneas evidencian diferencias estadísticas entre los mismos.

disminución en la concentración de fitoplancton, en otoño e invierno se observó lo contrario, habiéndose detectado en este último una interacción antagónica de radiación y temperatura, siendo la concentración de algas en el tratamiento PAB de la temperatura *in situ* menor que los demás tratamientos hacia el final del experimento. El porcentaje de abundancia de los principales grupos algales al inicio y al final del experimento se muestra en la Fig. 2.10. En todas las estaciones se puede observar un fuerte predominio de cianobacterias (principalmente *Synechococcus* sp. y *Aphanothece* sp.) al inicio de las incubaciones. Mientras esta dominancia de cianobacterias se mantuvo en invierno, las muestras que recibieron RUV tuvieron menores

abundancias ($p=0.043$) que las del tratamiento P, observándose lo contrario para clorofitas ($p=0.046$), cuya abundancia final (en todos los tratamientos) fue menor a la inicial. La dominancia de cianobacterias se mantuvo alto durante primavera y verano, aunque durante esta última etapa experimental también se observó un aumento en la abundancia de las clorofitas. Durante el otoño, sin embargo, se observó una disminución de la abundancia de cianobacterias acompañado por un aumento de la presencia de especies de clorofitas (i.e. *Oocystis* sp.) y diatomeas (i.e., diatomeas pennadas tales como *Navicula* sp.). Este último grupo se vio afectado por la temperatura (*in situ* $<+5^{\circ}\text{C}$, $p=0.0002$) mientras que para clorofíceas se observó una interacción sinérgica entre la RUV y la temperatura ($p=0.045$, las muestras expuestas a PAB y temperatura *in situ* fueron menos abundantes que las otras). Cuando el test estadístico se repitió con los valores absolutos de abundancia, se obtuvieron algunas diferencias: se encontraron efectos de la temperatura para las diatomeas en invierno ($p=0.039$) y primavera ($p=0.039$) y las clorofíceas en otoño ($p=0.036$), así como interacciones para las clorofíceas en verano ($p=0.02$) y para las cianobacterias en invierno ($p=0.023$). Por último, no se observaron efectos para las clorofíceas en invierno (que habían sido afectadas por la radiación y la temperatura cuando se consideraron las abundancias porcentuales).

2.3.3.4 Análisis de fluorescencia de la Clor-a

El rendimiento fotoquímico en los diferentes tratamientos a lo largo de los experimentos se muestra en la Fig. 2.11. Tanto en invierno como primavera (Fig. 2.11 A y B, respectivamente) se pudo observar una aclimatación de las muestras a las condiciones ambientales (evidenciada por un aumento del rendimiento fotoquímico), siendo ésta mayor para las muestras expuestas a temperaturas aumentadas. En verano (Fig. 2.11 C) la aclimatación fue mucho menor, mientras que en otoño (Fig. 2.11 D) se observó un deterioro en las condiciones fisiológicas de las algas (evidenciada por una disminución del rendimiento fotoquímico). No se encontraron diferencias significativas a lo largo de cada experimento luego de realizar el ANOVA de medidas repetidas; sin embargo se observó un patrón hacia el final del experimento tanto en las comunidades de invierno como de primavera: las muestras expuestas a mayor temperatura tuvieron valores de Y más altos que aquellas incubadas *in situ*.

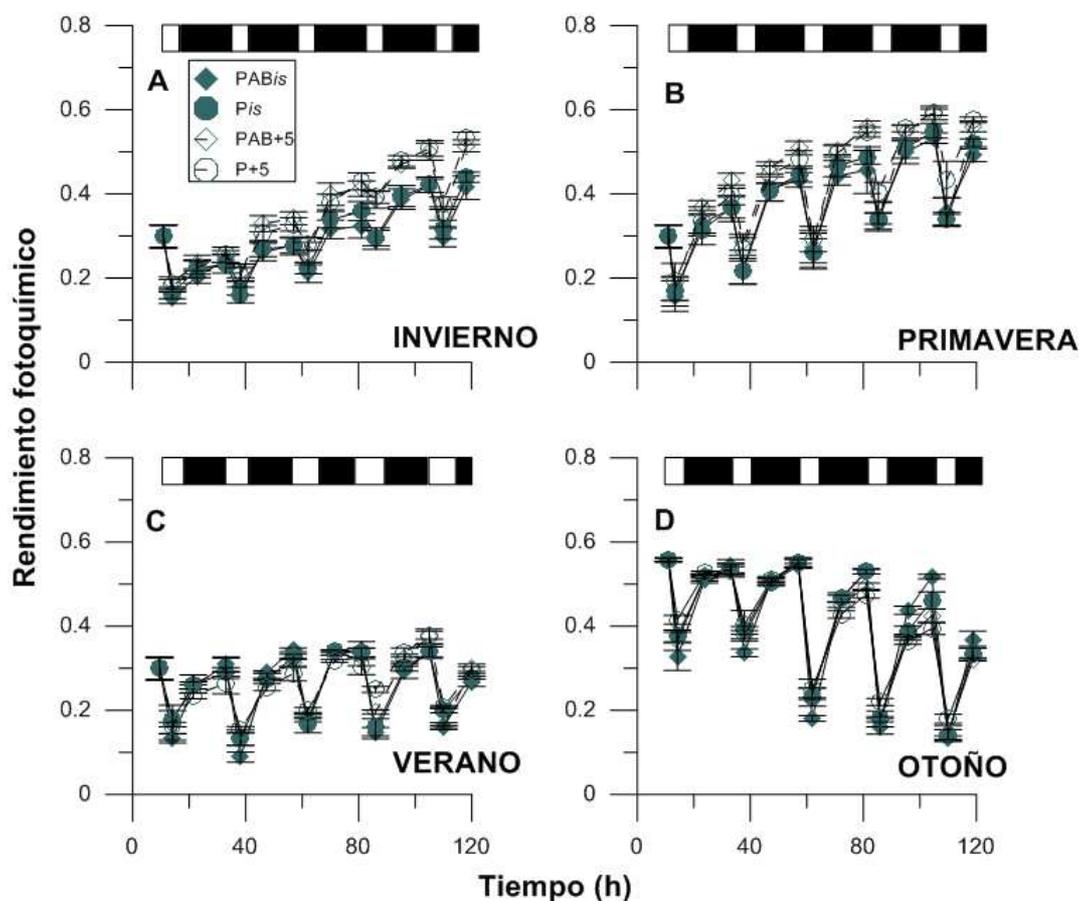


Fig. 2.11 Rendimiento fotoquímico a lo largo de los experimentos en las distintas instancias experimentales. Las barras superiores indican las fases del experimento: exposición (claras) y recuperación (oscuras).

Con la finalidad de entender la dinámica fotoquímica y la posible adaptación de las comunidades en cada etapa experimental, se realizó un ajuste exponencial con las mediciones de Y al mediodía (que corresponden a la exposición durante las condiciones de máxima irradiancia) y otro con los de la mañana temprano (luego de toda una noche de recuperación en la oscuridad). La Fig. 2.12 muestra el valor de b obtenido en los ajustes (ver sección 2.2.4.6) para cada estación. Los valores de b para la exposición (Fig. 2.12 A) evidencian lo mencionado anteriormente: durante invierno, primavera y verano se observó una aclimatación, que fue menor para este último, mientras que en otoño, el deterioro de las condiciones fisiológicas se evidenció en los valores negativos que se obtuvieron para b_{exp} . En ninguna de las estaciones se detectaron diferencias significativas. De manera similar, los valores de b obtenidos con los valores de Y medido a la mañana (fase oscura,

Fig. 2.12 B) fueron positivos en invierno, primavera y verano (siendo menores en este último) y negativos en otoño. Para los valores de b durante la fase oscura, se encontraron diferencias entre los tratamientos de temperatura en invierno, siendo mayores los valores de b de las muestras expuestas a una temperatura aumentada que para las expuestas a temperaturas *in situ* ($p = 0.011$) y en otoño se encontraron efectos de la temperatura y la radiación ($p = 0.001$ y $p = 0.018$ respectivamente) siendo $P_{+5^{\circ}\text{C}} < PAB_{+5^{\circ}\text{C}} < P_{in\ situ} < PAB_{in\ situ}$.

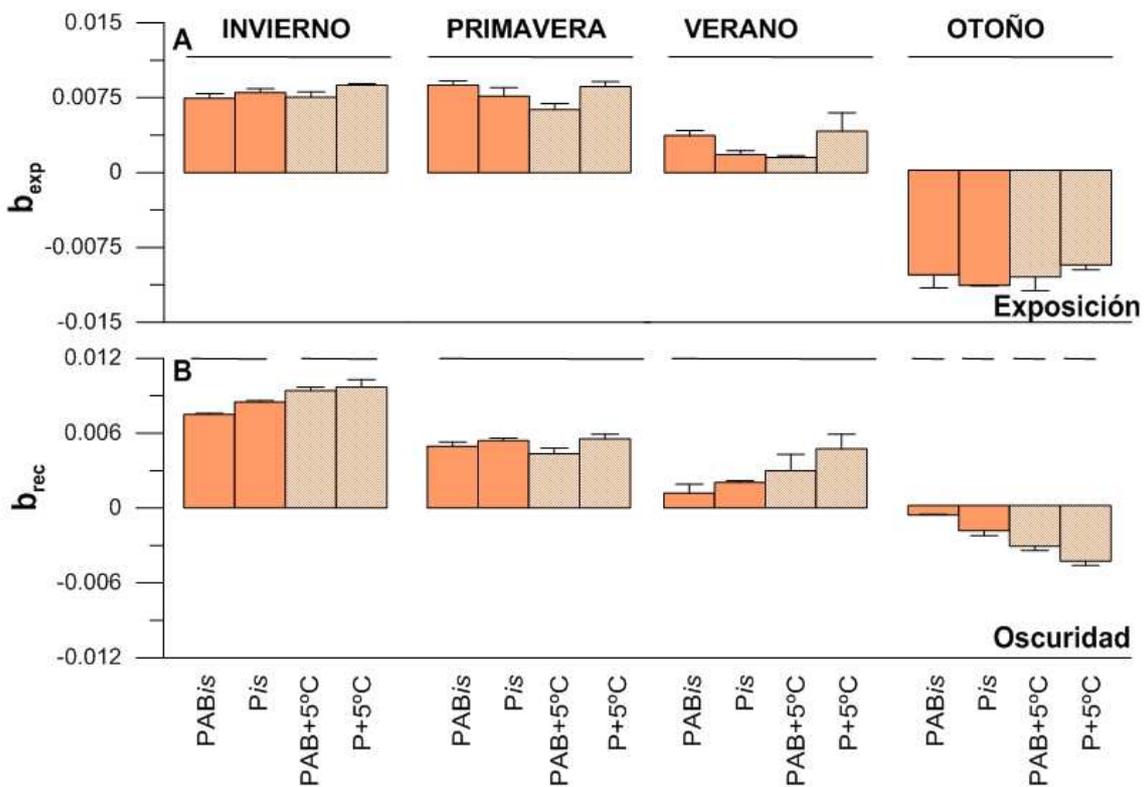


Fig. 2.12 Valor de b obtenido del ajuste exponencial del rendimiento fotoquímico al mediodía (b_{exp}) y a la mañana (b_{rec}). Las diferentes líneas evidencian diferencias estadísticas entre los tratamientos.

2.3.3.5 Actividad enzimática de la glutamina sintetasa GS

La actividad de la enzima GS a lo largo de los experimentos de mediano plazo se muestra en la Fig. 2.13. En todos los casos se observó una gran variabilidad en su actividad a lo largo del experimento, siendo esta variabilidad más pronunciada en invierno. Sin embargo, con excepción de la primavera, cuando los valores oscilaron entre 0-1 UR mostrando una estabilidad relativa a lo largo del experimento, en las demás instancias experimentales se observó que los valores de la

actividad GS oscilaron alrededor de un valor central o disminuyeron al inicio del experimento - aunque siempre con la variabilidad mencionada- para recuperarse hacia el final del mismo, alcanzando valores iguales o menores al inicial. En primavera, además, se observó un pico en la actividad GS para el tratamiento PAB a temperatura *in situ* al inicio del experimento, para luego disminuir a valores similares a los observados para los otros tratamientos. Si bien en algunos momentos se registraron diferencias entre los tratamientos, éstas no fueron significativas a lo largo del experimento según el análisis de medidas repetidas.

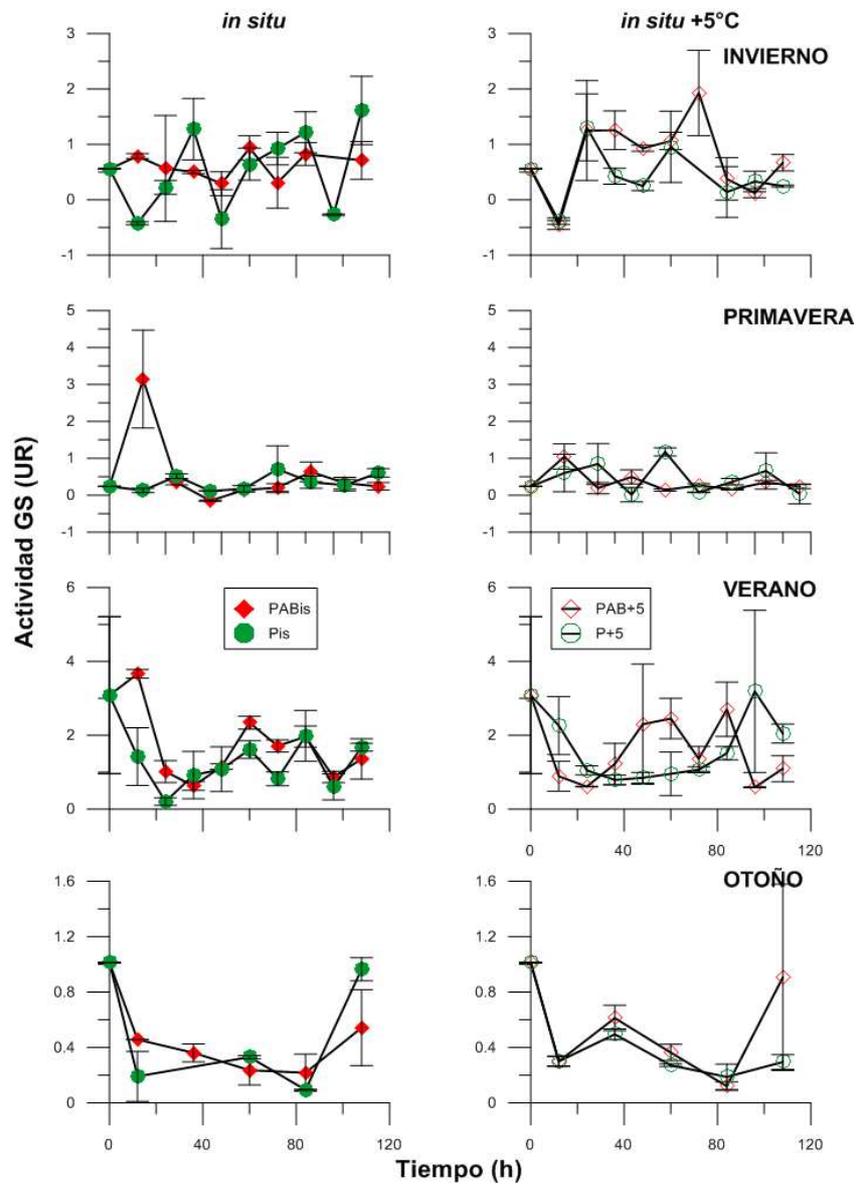


Fig. 2.13 Actividad glutamina sintetasa - GR (en unidades relativas - UR) a lo largo de las diferentes etapas experimentales.

2.4. DISCUSIÓN

En los últimos años, se han realizado muchos estudios tendientes a cuantificar y/o predecir el impacto del cambio climático en las comunidades acuáticas (Wiltshire & Manly 2004, Lassen *et al.* 2009, Harrison & Smith 2009, Daufresne *et al.* 2009). Los resultados obtenidos en este capítulo muestran que la respuesta de las comunidades a dos factores de estrés asociados con el cambio climático, tales como la temperatura y la RUV a lo largo del año, es variable.

Al evaluar los resultados obtenidos para la laguna Cacique Chiquichano, se observó que si bien se encuentra caracterizada lo largo de todo el año por fitoplancton muy pequeño, sufre variaciones estacionales en la composición de las especies. Previamente, Gonçalves *et al.* (2011) encontraron que la dinámica del fitoplancton en esta laguna se encuentra mayormente influenciada por la radiación solar y la abundancia de predadores, y que los mayores valores de inhibición fotosintética fueron hallados cuando el grupo dominante en el fitoplancton era el de las cianobacterias. En concordancia con esto último, los resultados presentados en este capítulo muestran que la disminución en los valores del rendimiento fotoquímico (esto es mayor inhibición fotoquímica, expresada por el parámetro k) se relaciona fuertemente y de forma negativa con la irradiancia recibida (Ec. 5), pero también, nuevamente de manera negativa, con la concentración de Clor-*a* al momento del muestreo, aunque no se observa una relación significativa (tanto positiva como negativa) con el porcentaje de cianobacterias presente en la muestra. Estos resultados indicarían que la disminución del rendimiento fotoquímico es mayor cuando mayor irradiancia reciben las células, y cuanto más sombreadas (i.e., historia lumínica) se encuentran las muestras, ya que en esta laguna la concentración de Clor-*a* se encuentra relacionada directamente con el coeficiente de extinción k_d (Gonçalves *et al.* 2011). Esto último se debe a que en condiciones de alta concentración de Clor-*a*, las células se encuentran aclimatadas a situaciones de “oscuridad”, por lo que cuando son transferidas a condiciones de irradiancias más altas, se inhiben fácilmente. En contraposición, cuando las concentraciones de Clor-*a* son bajas, las células se encuentran aclimatadas a condiciones “claras” (k_d más bajos, cuerpos de agua más transparentes, con niveles de irradiancia mayores) por lo que cuando son expuestas a situaciones de irradiancias altas se inhiben menos. Estudios previos han demostrado que las altas irradiancias están asociadas a la fotoinhibición de la eficiencia cuántica de la fotosíntesis, siendo esta fotoinhibición una función tanto de la irradiancia como del tiempo (Kok 1956, Long *et al.* 1994). A su vez, otros estudios han demostrado la relación entre la

transparencia del agua y la fotoinhibición: Lehmann *et al.* (2004) presentaron un modelo para estimar la fotoinhibición de la fotosíntesis en la columna de agua a través del valor de k_d mientras que Kromkamp *et al.* (2008), realizando mediciones de fluorescencia con equipamiento similar al utilizado en estas experiencias en un lago holandés encontraron que la turbidez (variable asociada a la transparencia del agua) era el factor que explicaba de mejor forma los parámetros fotosintéticos obtenidos. Por otra parte, el porcentaje de recuperación del rendimiento fotoquímico % Y también estuvo relacionado con la irradiancia recibida durante la exposición así como con la concentración de Clor-a presente en las muestras, pero también con el porcentaje de cianobacterias presente en las muestras. Si bien existen muchos mecanismos que utilizan las cianobacterias para evadir / protegerse de porciones particulares del espectro electromagnético (por ej. de la RUV) o irradiancias muy altas (para una revisión ver Castenholz & Garcia-Pichel 2002) y se han descrito algunos mecanismos que propician su recuperación cuando se ven expuestas a estas situaciones (como por ej., la síntesis *de novo* de la proteína D1 descrita por Campbell *et al.* 1998), no existen hasta la fecha mecanismos diferenciales con respecto a los otros grupos algales que expliquen su predominio en ambientes y condiciones extremas.

Por su parte, los experimentos de mediano plazo muestran que cuando las cianobacterias dominaron a lo largo de todo el experimento, existe una aclimatación a las condiciones experimentales, evidenciada en un aumento progresivo de los valores de Y, confirmado por los valores de b (tanto de exposición como de oscuridad) en los ajustes exponenciales (Fig. 2.12). Sin embargo, cuando las cianobacterias fueron reemplazadas en dominancia por las clorofíceas (i.e., otoño), se observó una disminución progresiva de los valores de Y a lo largo de los experimentos, evidenciada también en los valores negativos de b en los ajustes. Esto puede deberse al cambio en la distribución de tamaños de las especies presentes en la muestra, que pasó de especies pequeñas como *Synechococcus* sp. y *Aphanothece* sp. al inicio del experimento a especies más grandes, como *Oocystis* sp. Con respecto a esto último, se ha sugerido que las especies más pequeñas son más resistentes a la RUV cuando se determinan sus efectos sobre la fotosíntesis (Helbling *et al.* 2001, Helbling *et al.* 2005) aunque también son más propensas a sufrir daños en la estructura del ADN (Boelen *et al.* 2000, Helbling *et al.* 2005). Además, y si bien no se determinó en esta tesis la presencia de pigmentos fotoprotectores específicamente en vainas, tanto *Synechococcus* sp. como *Aphanothece* sp. se encuentran rodeadas de una vaina mucilaginosa y se ha propuesto que RUV promueve no solo el desarrollo de estas estructuras, sino también la síntesis en las mismas

de compuestos fotoprotectores como la scytonemina en otras especies (Ehling-Schulz *et al.* 1997). Más aún, varios trabajos describen la síntesis de estos compuestos fotoprotectores en la vaina tanto para *Aphanothece* (Pócs, 2009) como en *Synechococcus* (García-Pichel & Castenholz 1993), por lo que las respuestas observadas pueden haberse debido también a la capacidad de estas cianobacterias de sintetizar compuestos fotoprotectores aunque su presencia no se haya detectado (probablemente enmascarada por la presencia de otros grupos algales como se da en una comunidad). En cuanto a la sensibilidad de las clorofíceas frente a la RUV, los estudios resultan contradictorios: mientras algunos autores encontraron que su crecimiento se veía inhibido en presencia de la RUV (van Donk *et al.* 2001), otros encontraron lo contrario (Roy *et al.* 2006) a la vez que Villafañe *et al.* (2008) describieron que la fotoinhibición inducida por RUV era menor cuando las clorofíceas dominaban las comunidades fitoplanctónicas marinas de la Patagonia. En este estudio, la disminución de los valores de Y observada hacia el final del experimento fue acompañada por un estancamiento y posterior disminución de la síntesis de Clor-a (Fig. 2.9), aunque no llegó a reflejarse en el número de células.

Si bien las comunidades de primavera y verano fueron las que tuvieron los valores más altos de k (asociados a la disminución del Y) y más bajos del % Y (asociados a la recuperación del Y en oscuridad) en los ciclos diarios, las experimentaciones a mediano plazo durante estos períodos del año mostraron que estas comunidades se aclimataron a lo largo del experimento, disminuyendo de esta forma el impacto de las condiciones experimentales sobre la comunidad fitoplanctónica. Los resultados presentados en este capítulo concuerdan con estudios anteriores: por ejemplo Díaz *et al.* (1997), trabajando con especies fitoplanctónicas antárticas en dos escalas temporales (corto y largo plazo) y exponiéndolas a la RUV solar, encontraron que si bien durante las experiencias de corto plazo las especies estudiadas exhibieron una inhibición de la fotosíntesis alta, esta inhibición disminuyó a medida que progresó el estudio en las experiencias a largo plazo, debido a procesos de aclimatación. De la misma forma, Helbling *et al.* (1996) encontraron que al inicio del experimento las tasas fotosintéticas de cuatro especies de diatomeas estaban significativamente inhibidas por la RUV mientras que al final del mismo, no se encontraron diferencias significativas entre las muestras expuestas únicamente a PAR y las expuestas a PAR+RUV. Estos resultados resaltan la importancia de realizar este tipo de estudios en escalas de tiempo acordes para poder evaluar los diferentes procesos (fotoinhibición, crecimiento, aclimatación).

Finalmente, y en cuanto a los resultados de la actividad GS, se encontró que independientemente del tratamiento aplicado, los valores obtenidos mostraban una tendencia similar de disminución al inicio del experimento y aumento progresivo hacia el final del mismo (Fig. 2.13, aunque marcado por una fuerte variabilidad. Estudios previos mostraron que la exposición a la RUV inhibía la actividad GS en escalas cortas de tiempo (Kumar *et al.* 2003, Kumar *et al.* 1996). Sin embargo, los niveles de RUV y las escalas de tiempo utilizadas en estos trabajos difieren notablemente de las utilizadas en este capítulo: mientras en este trabajo las exposiciones duraron 4 días y los niveles de RUV nunca excedieron el máximo de 2.3 W m^{-2} durante el día, los experimentos citados expusieron cultivos a irradiancias de $2.5 - 5 \text{ W m}^{-2}$ por espacio de $1.5 - 5$ hs. Podría pensarse que las condiciones experimentales utilizadas en este capítulo permitieron una doble aclimatación: por exponerse las muestras a radiación natural, los niveles de radiación fueron aumentando progresivamente hacia el mediodía hasta alcanzar los niveles máximos para disminuir posteriormente, a la vez que al utilizar escalas de tiempo más prolongadas, se permitió la suficiente adaptación a las condiciones de exposición.

Los resultados presentados en este capítulo muestran que el sistema eutrófico estudiado, caracterizado por una sucesión estacional, se encuentra fuertemente influenciado por la irradiancia recibida y la concentración de Clor-a, siendo estas determinantes de la disminución del rendimiento fotoquímico y de su recuperación en una escala temporal corta. Sin embargo, y dependiendo de la composición de la comunidad, esta puede recuperarse cuando la escala temporal es mayor: de esta forma, si la comunidad se encuentra dominada por cianobacterias, se observa una progresiva aclimatación a las condiciones experimentales, no siendo así cuando el grupo dominante son las clorofíceas.

Capítulo 3

Efecto de la radiación ultravioleta y de la temperatura en un sistema eutrófico dominado por una cianobacteria filamentosa: Laguna Don Tomás (Santa Rosa, La Pampa)

3.1.- INTRODUCCIÓN

El uso por parte del ser humano de los recursos naturales altera la estructura y el funcionamiento de los ecosistemas (Vitousek *et al.* 1997) por lo que, sumado al fenómeno de cambio climático, se debe considerar otra problemática actual asociada particularmente a la urbanización y a las actividades de origen antrópico: la eutrofización (Paerl & Huisman 2008). Con respecto al uso de las tierras, se estima que una gran porcentaje de las tierras se encuentra transformada o degradada por el ser humano; de este porcentaje la mayor parte la comprenden las actividades agrícolas o áreas urbanas-industriales seguido por la utilización en forma de pasturas (Vitousek *et al.* 1997). Como resultado de estas actividades (agrícolas, ganaderas y combustión de combustibles fósiles) se generan fuentes no puntuales de nutrientes, que son frecuentemente muy difíciles de controlar (Anderson, 2002). Por su parte, existe una relación directa entre el crecimiento demográfico y las aplicaciones de fertilizantes y el aumento de flujos de N y P a los ríos (Anderson, 2002). Cuando estos aportes alcanzan los cuerpos de agua (ríos, estuarios, aguas costeras), se encuentran disponibles para ser captados por el fitoplancton y utilizados para su crecimiento, lo que puede generar otros problemas entre los que se encuentran: aumento de biomasa y cambio en la composición de especies de fitoplancton y perifiton, disminución de la transparencia, problemas de sabor y olor, variaciones nocivas en el pH y concentraciones de oxígeno disuelto, etc. (Smith *et al.* 1999). Todos estos cambios conducen a un deterioro general del cuerpo de agua (Paerl *et al.* 2001, Paerl & Fulton 2006).

3.1.1 Eutrofización

Originalmente, se definía la eutrofización como el proceso de envejecimiento natural de los ecosistemas acuáticos (Anderson 2002) mientras que actualmente el término se asocia con el mismo proceso pero acelerado debido al aporte de nutrientes proveniente de las actividades humanas. Nixon (1995) definió la eutrofización como “*un aumento en la velocidad de aporte de materia orgánica a un ecosistema*”. Si bien este término es comúnmente aplicado para lagos y embalses, su uso también se aplica a ríos, estuarios y aguas costeras (Smith *et al.* 1999) y aunque esta definición abarca a los nutrientes en general, los que se consideran mayoritariamente son el fósforo y el nitrógeno (Anderson, 2002).

La dinámica de descarga / aporte de nutrientes ha cambiado sustancialmente en las últimas épocas: mientras se han promovido activamente las reducciones en los aportes de P, la instalación

de poblaciones humanas cercanas a los cuerpos de agua ha crecido en paralelo con el aporte de N a los mismos, frecuentemente a velocidades más altas que el de P (Vitousek *et al.* 1997, Paerl & Paul 2012). El aporte excesivo de N es hoy una preocupación tan importante como la del aporte de P, ya que se ha determinado que ambos estimulan la eutrofización de ambientes marinos, estuarios y cuerpos de agua dulce así como la proliferación de floraciones de algas nocivas, entre las que se incluyen las cianobacterias (Paerl & Huisman 2009, Paerl & Paul 2012).

3.1.2 Eutrofización y floraciones de cianobacterias

En particular, el desarrollo de floraciones de cianobacterias se ha visto promovida por la eutrofización en conjunto con el aumento de temperatura (Elliott *et al.* 2006, Paerl & Huisman 2008, Paerl & Huisman 2009), en algunos casos favoreciendo la proliferación de especies tóxicas en detrimento de las no tóxicas (Davis *et al.* 2009). Los cuerpos de agua ricos en nutrientes son especialmente proclives a desarrollar floraciones de cianobacterias tóxicas, especialmente si tienen tiempos de residencia largos, temperaturas del agua periódicamente > 20 °C, aguas superficiales calmas y estratificación vertical persistente (Paerl & Otten 2013). A su vez, el intercambio entre los sedimentos y la columna de agua de nutrientes previamente recibidos, almacenados y reciclados, junto con la regeneración celular y el reciclaje de nutrientes por bacterias heterotróficas y microzooplancton pueden ayudar a sostener la biomasa de la floración (Paerl & Otten 2013).

Las floraciones de cianobacterias pueden tener diferentes dinámicas temporales: estacionales, que empiezan en verano y duran hasta otoño, picos, que duran solo días o semanas, y persistentes, que abarcan todas las estaciones (Havens 2008). La duración de la floración depende del grado en que los factores ambientales influyen en su dinámica: en lagos extremadamente someros (profundidad media < 2 m), la dominancia de las cianobacterias puede persistir por años si la relación entre la profundidad de la zona eufótica y la profundidad de la capa de mezcla alcanza niveles que permitan el crecimiento de especies adaptadas a bajas irradiancias como *Planktothrix agardhii*, pero es lo suficientemente bajo como para excluir a otros organismos planctónicos, esto es a valores de Z_{eu}/Z_{UML} muy pequeños (Havens *et al.* 2003, Havens 2008).

3.1.3 Consecuencias ecológicas

El desarrollo masivo de floraciones de cianobacterias aumenta la turbidez y por lo tanto restringe la penetración de la luz en los ecosistemas afectados (Fig. 3.1 A). Esto, a su vez compromete el establecimiento y crecimiento de macrófitas acuáticas y microalgas bénticas afectando de esta forma el hábitat para los demás niveles tróficos (Jeppesen *et al.* 2007, Paerl & Paul 2012,). Las floraciones masivas también consumen grandes cantidades de oxígeno durante la noche a través de la respiración y de la descomposición bacteriana, que pueden resultar en mortandades masivas de peces (Fig. 3.1 B) y pérdida de la flora y fauna béntica (Paerl & Fulton 2006, Paerl & Paul 2012,).

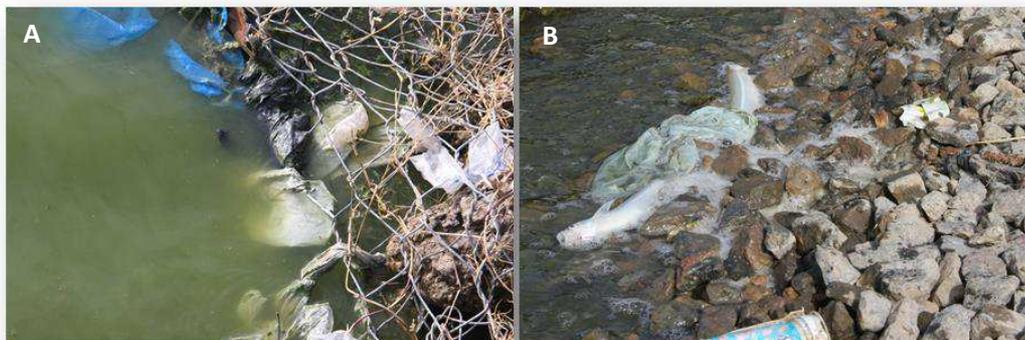


Fig. 3.1 Imágenes obtenidas en la laguna Don Tomás durante la experimentación: A) alta turbidez en la laguna, nótese la pérdida de visibilidad de las bolsas a los pocos centímetros de profundidad. B) mortandad de peces registrada el 17/12/2012.

3.1.4 Objetivo

De forma similar al Capítulo 2, el objetivo de éste fue el de determinar el efecto combinado de la RUV y el aumento de temperatura en la comunidad presente en una laguna eutrófica de la provincia de La Pampa a lo largo del año, en dos escalas temporales: corto (ciclos diarios) y mediano plazo (experimentos de 5 días de duración) para evaluar el impacto de estas variables en su composición taxonómica, crecimiento y procesos metabólicos: actividad fotosintética del fotosistema II y actividad enzimática de la GS. La elección de esta laguna radica en el hecho de que a raíz de un desmejoramiento en la calidad del cuerpo de agua (aumento de nutrientes, pérdida de transparencia, ver más adelante), la comunidad de esta laguna ha pasado de sostener una sucesión anual (Alvarez *et al.* 2009) a una dominada a lo largo del año por una cianobacteria

filamentosa, *Planktothrix agardhii*, constituyendo un típico caso de laguna impactada por la eutrofización. De esta forma, se buscó dar respuesta al interrogante de qué mecanismos permiten a estas cianobacterias dominar a lo largo del año frente a condiciones altamente variables (radiación, temperatura, regímenes hídricos) a diferencia de otras lagunas, que frente a estas condiciones muestran variaciones también en la composición de su comunidad fitoplanctónica.

3.2.- MATERIALES Y MÉTODOS

3.2.1- Sitio de muestreo

La laguna Don Tomás es una laguna urbana situada en el extremo oeste de la ciudad de Santa Rosa, Provincia de La Pampa (36° S, 64° W, Fig. 3.2) que cuenta con una superficie de aproximadamente 200 ha, con una profundidad media de 2.5-3 m (Alvarez *et al.* 2009). Es una laguna considerada como hipereutrófica, en la que se han realizado estudios previos que compararon su estado a lo largo de los años (Echaniz & Vignatti 2001, Echániz *et al.* 2008), comprobando un deterioro general (en cuanto a la disminución de la transparencia y un aumento de las concentraciones de fósforo y de Clor-a). Las concentraciones de nutrientes descriptas para la laguna fueron de 3.75-16.9 y 7.5-16.88 mg·l⁻¹ para fósforo y nitrógeno, respectivamente en el período febrero-diciembre de 2006, mientras que las de Clor-a fueron de 89-211 µg l⁻¹ (Echániz *et al.* 2008).



Fig. 3.2 Mapa de ubicación de la laguna Don Tomás (Santa Rosa, Provincia de La Pampa).

3.2.2.- Protocolo de muestreo

Los experimentos se realizaron en el período Junio 2011- Marzo 2012. Las muestras fueron recolectadas el día de la experimentación, tanto para aquellas de mediano plazo como para los ciclos diarios. En todos los casos, se registró la temperatura usando un termómetro digital; las temperaturas *in situ* registradas en la laguna fueron de 9, 14, 23 y 22° C en invierno, primavera, verano y otoño, respectivamente.

Las muestras fueron recolectadas desde un muelle con un muestreador previamente enjuagado con HCl 1N, tomándolas de la capa superficial. Inmediatamente después de recolectadas, fueron trasladadas a un laboratorio de campo montado a menos de 1 km de la laguna.

3.2.3.- Condiciones experimentales

3.2.3.1.- Ciclos diarios

Estas experiencias se realizaron con el fin de evaluar la respuesta a “corto plazo” de la comunidad de la laguna. Las muestras fueron colocadas en botellas de plexiglas de 0.75 l, transparentes a la RUV y se establecieron dos tratamientos de temperatura (*in situ* y aumentada en 5° C) y tres tratamientos de radiación: muestras recibiendo solo radiación fotosintéticamente activa (PAR: 400-700 nm, botellas cubiertas con filtros Ultraphan UV Opak 395), muestras recibiendo RUV-A + PAR (320-700 nm, botellas cubiertas con filtros Montagefolie 320) y muestras recibiendo RUV+PAR (280-700 nm, botellas descubiertas); los espectros de transmisión de los filtros y materiales se encuentran publicados en Villafañe, (2003). Como en el caso de las experiencias realizadas en la laguna Cacique Chiquichano, en todos los casos se trabajó con duplicados. Para proveer las dos temperaturas diferentes se utilizaron dos baños de agua independientes (tal como se describió en el capítulo anterior, Fig. 3.3). Las botellas se expusieron a la radiación natural (exposición variable a lo largo del año, desde las 9.30 a las 16.30 hs en verano y otoño, y desde las 10.30 a las 15.30 hs en primavera e invierno) luego de lo cual se mantuvieron en oscuridad hasta la mañana siguiente. El protocolo de muestreo fue el siguiente: las muestras para análisis de pigmentos se recolectaron en T0 y al final del mismo, las muestras para análisis de la fluorescencia de la Clor-a en T0, cada dos horas luego de iniciada la exposición y hasta dos horas después de terminada la misma y se realizaron dos mediciones más a la noche y a la mañana siguiente para monitorear la recuperación de las muestras. Finalmente, se recolectaron muestras de la laguna y se fijaron con formalina neutralizada (concentración final

de formaldehído en la muestra de 0.4%) en cada experiencia para recuento de células y realizar análisis taxonómicos de la misma forma que la descrita en el capítulo 2: las muestras (5 ml, tanto de campo como provenientes de los distintos tratamientos) fueron contadas con una cámara Sedgewick-Rafter usando un microscopio invertido (Leica, modelo DM IL).

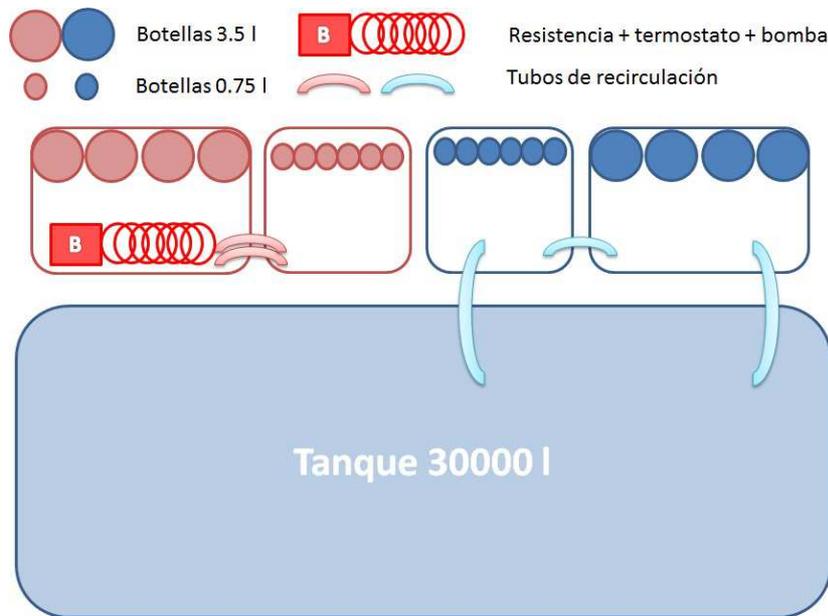


Fig. 3.3 Diagrama que esquematiza el diseño experimental: botellas de 3.5 y 0.75 l expuestas a dos temperaturas (*in situ* y aumentada, azules y rojas respectivamente). Se muestra la posición del dispositivo provisto de una resistencia, termostato y bomba para mantener la temperatura aumentada y el sistema de recirculación de agua proveniente del tanque para mantener la temperatura *in situ*.

3.2.3.2.- Experimentos a mediano plazo

Se realizaron cuatro experimentos, uno por cada estación del año, de cuatro días de duración, a los que se denominó a los fines prácticos: invierno, primavera, verano y otoño, aún cuando las fechas de inicio de los mismos fueron unos días antes del cambio de estación. Las muestras fueron colocadas en botellas de plexiglas de 3.5 l, transparentes a la RUV y se establecieron dos tratamientos de temperatura (*in situ* y aumentada en 5° C) y dos tratamientos de radiación: muestras recibiendo solo radiación fotosintéticamente activa (PAR: 400-700 nm, tubos cubiertos con filtros Ultraphan UV Opak 395) y muestras recibiendo RUV+PAR (280-700 nm, botellas descubiertas). Como en el caso de los experimentos realizados en la laguna Cacique Chiquichano, en todos los casos se trabajó con duplicados. Para proveer las dos temperaturas diferentes se

utilizaron dos baños de agua independientes, uno con circulación de agua proveniente de una pileta de 30000 l y otro con un dispositivo que consta de una resistencia y un termostato al cual se le puede fijar la temperatura de trabajo. Las botellas se expusieron a la radiación natural (exposición variable a lo largo del año, desde las 9.30 a las 17 hs en verano y otoño, y desde las 10.30 a las 16 hs en primavera e invierno) luego de lo cual se mantuvieron en oscuridad. El protocolo de muestreo fue el siguiente: las muestras para análisis de pigmentos se tomaron al inicio del experimento (T0) y durante la experimentación en dos momentos: inmediatamente después de terminada la exposición diaria a la radiación natural (fase de exposición) y antes del comienzo de la misma (fase oscura). Las muestras para análisis de la fluorescencia de la Clor-a se recolectaron en T0, al mediodía, a la noche y a la mañana antes de la fase de exposición. Finalmente, a la mañana y a la noche se recolectaron muestras que fueron fijadas en formalina neutralizada para realizar la cuantificación de células y análisis taxonómico.

3.2.4.- Mediciones

Durante los experimentos se realizaron las mismas mediciones y análisis que las correspondientes al capítulo 2 (i.e., parámetros de fluorescencia, cuantificación de células y análisis taxonómico, concentración de proteínas), con las siguientes salvedades:

3.2.4.1.- Concentración de pigmentos y CARUV

La concentración de pigmentos fotosintéticos se determinó por la metodología descrita en el capítulo 2, pero al corroborar en los espectros de absorción el aumento del área del pico correspondiente a los carotenoides, se calculó su concentración de acuerdo a la fórmula descrita en Wellburn (1994).

3.2.4.2.- Mediciones de temperatura y radiación

La radiación incidente sobre la ciudad de Santa Rosa se midió con dos instrumentos; durante los experimentos de invierno y primavera con un radiómetro ELDONET portátil cuyo funcionamiento es igual al ELDONET de la EFPU descrito anteriormente, y durante los experimentos de verano y otoño con un radiómetro diseñado por personal de la EFPU del mismo funcionamiento. Ambos instrumentos fueron calibrados con el radiómetro ELDONET instalado en el techo de la EFPU. El perfil de temperaturas de la laguna Don Tomás se midió con una sonda multiparámetros Yellow Spring Instrument (YSI 600 XML) mientras que para calcular el

coeficiente de atenuación (k_{PAR}) se realizaron espectros desde 200 a 1100 nm a diferentes profundidades con un espectroradiómetro (Ocean Optics HR 2000 CG).

3.2.4.3.- Cálculos y estadística

De forma similar al Capítulo 2, para evaluar las variables que predecían de mejor forma el valor de la reducción en el rendimiento fotoquímico, k y el porcentaje de recuperación del mismo, %Y a lo largo del año, se realizó una RLM con los ciclos diarios, considerando como variables independientes la irradiancia media durante la exposición, el porcentaje de cianobacterias, la temperatura de exposición y la concentración de Clor-a. Previo a esto, se realizó un ANOVA de medidas repetidas con cada ciclo diario para detectar interacciones de temperatura y radiación en los mismos y excluirlos de la RLM. Por esta razón, no se consideraron los siguientes ciclos: 19/06/11 por encontrarse una interacción entre temperatura y radiación, y 18/09/11 por detectarse un efecto de la temperatura.

3.3.- RESULTADOS

3.3.1.- Experimentos de corto plazo

Las condiciones físicas y la concentración de Clor-a en la laguna se muestran en la Fig. 3.4. El coeficiente de atenuación fue siempre alto ($>40 \text{ m}^{-1}$, Fig. 3.3 A) aunque tuvo una fuerte disminución en verano, que fue acompañada por una reducción en la concentración de Clor-a (Fig. 3.4 B). Las temperaturas del agua variaron a lo largo del año siendo mínimas en invierno ($9 \text{ }^\circ\text{C}$) y máximas en verano ($23 \text{ }^\circ\text{C}$). Las concentraciones de Clor-a fueron también muy altas a lo largo del año, siempre $> 100 \text{ } \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$, y $> 350 \text{ } \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ en invierno y primavera, luego disminuyeron en verano para recuperarse parcialmente en otoño.

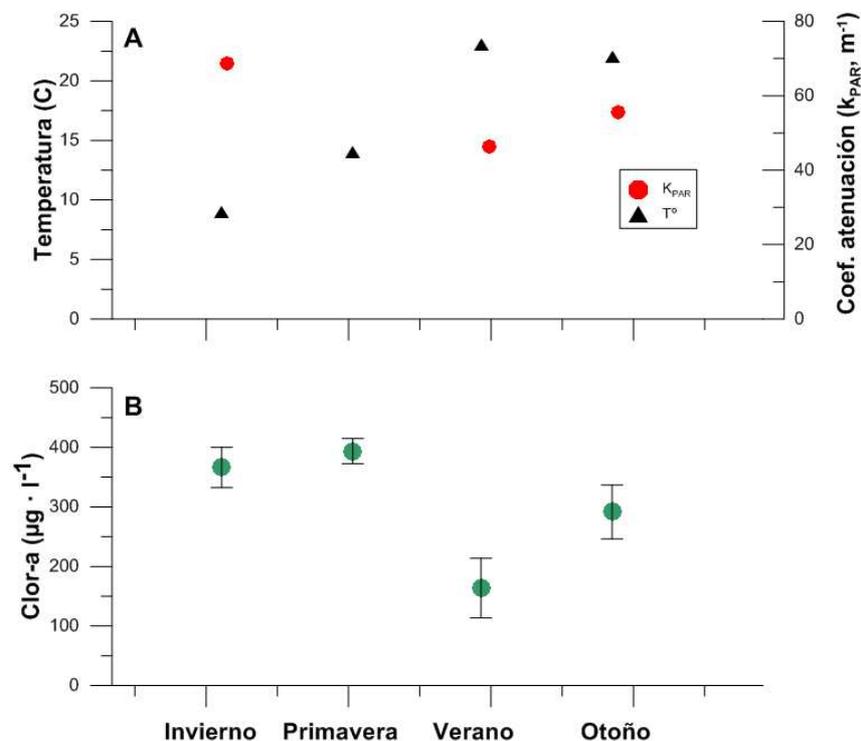


Fig. 3.4 Condiciones físicas (temperatura del agua (C) y coeficiente de atenuación (m^{-1}) (A) y concentración de Clor-a ($\mu\text{g l}^{-1}$) (B) en la laguna Don Tomás en las diferentes etapas experimentales. No hay datos disponibles de k_{PAR} en los experimentos de primavera.

La composición de las muestras extraídas de la laguna a lo largo del año se muestra en la Fig. 3.5. Las muestras estuvieron siempre dominadas por cianobacterias (porcentajes de abundancia $\geq 75\%$), particularmente por la especie filamentosa *Planktothrix agardhii*, cuyo porcentaje de

abundancia en el grupo fue $> 90\%$ durante todo el año, excepto en otoño, donde la abundancia disminuyó al 81%. Dentro de las clorofíceas, cuyo porcentaje de abundancia varió entre 4 y 13% a lo largo del año, los géneros más representativos fueron *Chlamydomonas*, *Monoraphidium*, *Chlorella* y *Scenedesmus*. Las diatomeas, por su parte, fueron escasas a lo largo del año, siendo su abundancia menor que la de los otros grupos. Entre los géneros más representativos se encontraron *Aulacoseira* y *Navicula*.

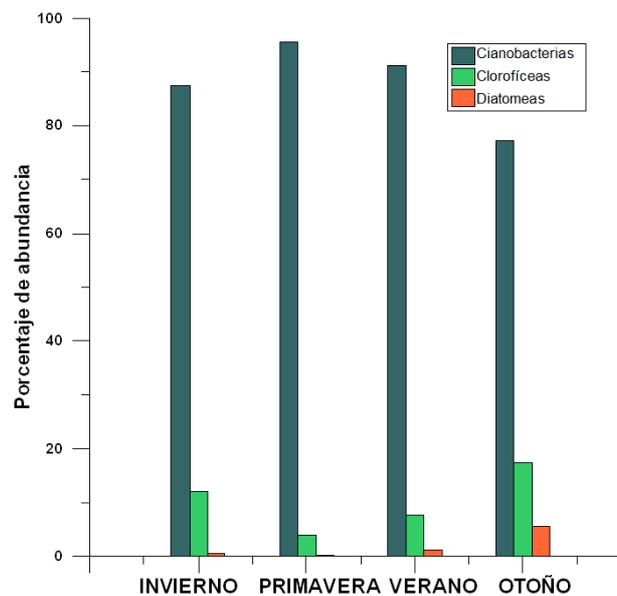


Fig. 3.5 Porcentaje de abundancia de Cianobacterias, Clorofíceas y diatomeas a lo largo del año en la laguna Don Tomás.

Los valores de k y % Y (su cálculo se explica en el capítulo 2) obtenidos a partir de los ciclos diarios realizados durante las etapas experimentales se muestran en la Fig. 3.6. Si bien no se registraron diferencias entre tratamientos de radiación y temperatura a lo largo del año, los valores absolutos de k fueron levemente mayores en verano y otoño que en invierno y primavera (Fig. 3.6 A). Los valores de % Y (Fig. 3.6 B) fueron similares a lo largo del año, alcanzando valores de recuperación mayores al 100% únicamente para las muestras expuestas a temperatura *in situ* en verano, cuando se registró una mortandad de peces junto con un empobrecimiento en las condiciones fisiológicas de las algas (registrado como una disminución de los valores iniciales de Y a lo largo de la etapa estival).

A fin de explicar los valores de k y %Y a lo largo del año, se realizaron RLM con las variables medidas, obteniéndose en cada caso un modelo que se muestra en la ec. 1 (ver también Fig. 3.6). Para esto, se utilizaron como variables independientes el porcentaje de cianobacterias en las muestras, la irradiancia recibida, la temperatura experimental y la concentración de Clor-a. El ajuste realizado con los ciclos diarios mostró que el valor del exponente de inhibición k estaba relacionado con todas las variables seleccionadas ($r^2 = 0.77$) pudiendo expresarse esta relación mediante la ecuación:

$$k = 2.38 * 10^{-5} \text{ Irradiancia} - 7.07 * 10^{-4} \text{ Temperatura}$$

$$+ 2.09 * 10^{-4} \% \text{ cianobacterias} + 3.63 * 10^{-5} \text{ Clor-a}$$

Ec. 1

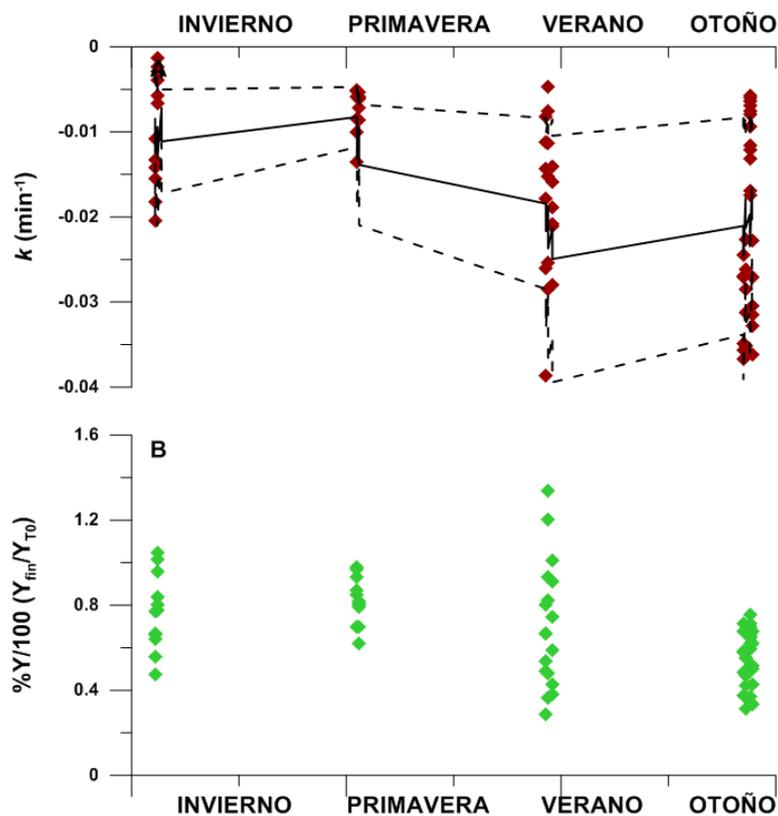


Fig. 3.6 Valores k (A, en min^{-1}) y %Y (B) para los ciclos diarios realizados bajo los distintos tratamientos de radiación y de temperatura durante las distintas estaciones del año en la laguna Don Tomás. La línea continua representa el modelo de RLM obtenido para k con las variables irradiancia, temperatura experimental, porcentaje de cianobacterias y la concentración de Clor-a. Las líneas discontinuas representan el intervalo de confianza del RLM.

Por su parte, para el valor de % Y no se pudo obtener un buen ajuste.

3.3.2.- Experimentos de mediano plazo

3.3.2.1 Condiciones de radiación

Las condiciones de radiación durante los períodos de experimentación a lo largo del año sobre la laguna Don Tomás se muestran en la Fig. 3.7. En primavera y verano las condiciones de radiación a lo largo de los días de experimentación fueron similares, mientras que en invierno y en otoño, variaron notablemente, debido a una fuerte cobertura de nubes acompañada por lluvia que redujo notablemente la irradiancia. Los valores máximos de irradiancia de PAR (Fig.3.7 A) fueron de 232, 344, 470, 404 $W \cdot m^{-2}$ en invierno, primavera, verano y otoño, respectivamente, mientras que las de RUV (Fig.3.7 B) fueron 25, 47, 75, 50 $W \cdot m^{-2}$ en invierno, primavera, verano y otoño, respectivamente.

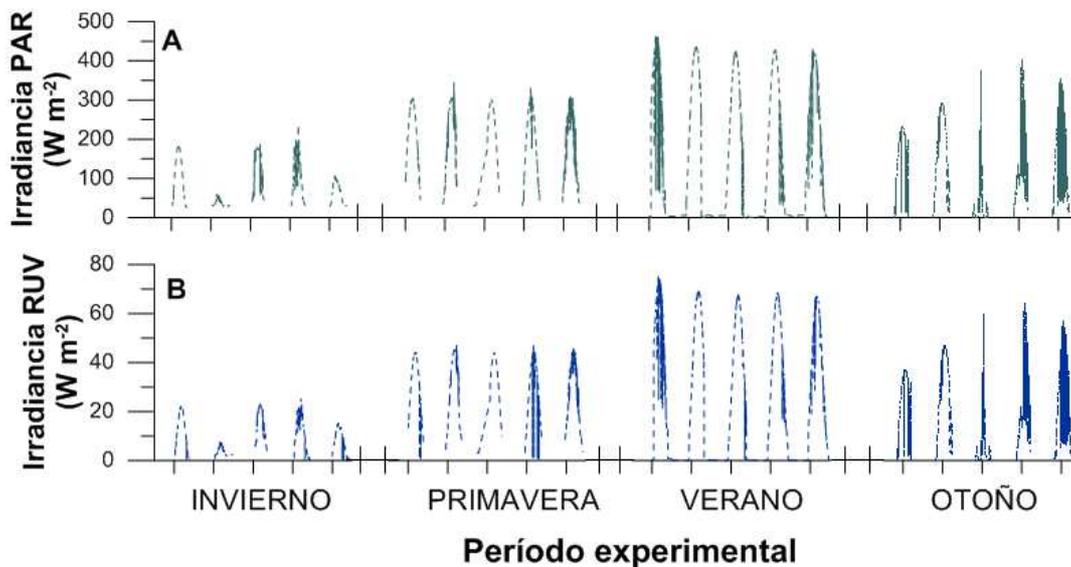


Fig. 3.7 Condiciones de radiación (irradiancia, en $W m^{-2}$) sobre la laguna Don Tomás durante los períodos de experimentación en las distintas estaciones del año: irradiancias de PAR (A) y RUV (B).

3.3.2.2 Evolución de la concentración de pigmentos fotosintéticos y compuestos fotoprotectores

La evolución de la concentración de Clor-a en las distintas instancias experimentales se muestra en la Fig. 3.8. Con la excepción de la experimentación de otoño (Fig. 3.8 D) donde se observó un aumento de las concentraciones de Clor-a, en invierno, primavera y verano se mantuvieron estables (Fig. 3.8 A y C) o incluso disminuyeron (Fig. 3.8 D). Cuando se calcularon las

velocidades de cambio de las concentraciones de Clor-a, se encontró que estas no eran afectadas por ninguno de los tratamientos (Tabla 3.1), ni se encontraron interacciones entre la radiación y la temperatura.

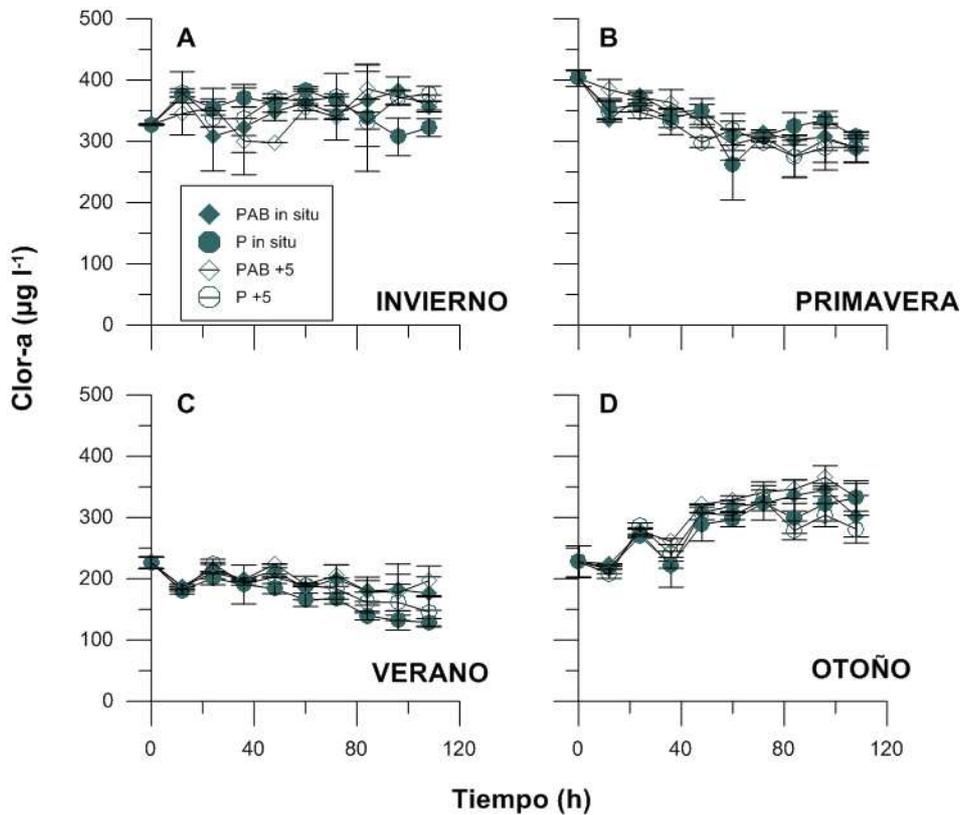


Figura 3.8 Concentraciones de Clor-a (en $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$) a lo largo de los experimentos de mediano plazo.

Tabla 3.1 Evolución de la concentración de Clor-a ($\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{l}^{-1}$) en cada una de las instancias experimentales.

Tratamiento	Invierno	Primavera	Verano	Otoño
PABis	0.47 ± 0.08	-0.93 ± 0.42	-0.29 ± 0.01	0.99 ± 0.45
Pis	-0.30 ± 0.23	-0.68 ± 0.32	-0.91 ± 0.45	1.18 ± 0.72
PAB+5	0.42 ± 0.22	-1.14 ± 0.45	-0.13 ± 0.21	1.46 ± 0.88
P+5	0.24 ± 0.06	-0.94 ± 0.49	-0.91 ± 0.39	0.61 ± 0.39

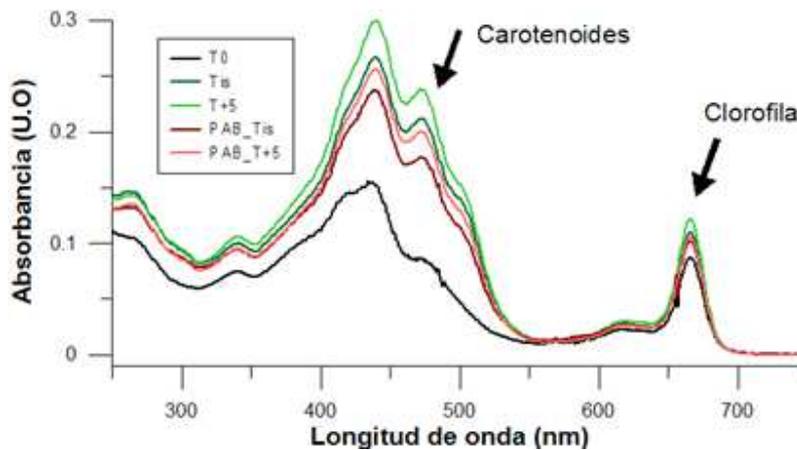


Figura 3.9 Espectros de absorción de las muestras a tiempo cero (T0) y tiempo final de los experimentos realizados con muestras obtenidas durante el otoño sometidas a diferentes tratamientos de radiación y temperatura.

Los espectros obtenidos para los diferentes tratamientos en otoño se muestra en la Fig. 3.9. En la figura se pueden observar los datos a partir de los cuales se calcula la concentración de carotenoides y Clor-a. Además se observa que si bien el pico utilizado para el cálculo de la concentración de Clor-a (652 y 665 nm) es similar en todos los espectros, el de carotenoides (470 nm) es mucho mayor y más marcado en las muestras a tiempo final.

La concentración de carotenoides (estandarizada por la concentración de Clor-a) a lo largo de los experimentos se muestra en la Fig. 3.10. En invierno se observó un aumento de la relación Carotenoides / Clor-a, que fue mayor para los tratamientos P que para los tratamientos PAB (Fig. 3.10 A). En primavera, la relación se mantuvo estable a lo largo del experimento (Fig. 3.10 B) mientras que en verano, se observó un incremento particularmente acentuado en el caso del tratamiento P expuesto a temperaturas aumentadas (Fig. 3.10 C). Por su parte, en otoño la relación Carotenoides / Clor-a aumentó notablemente, siendo los valores finales significativamente mayores para los tratamientos P que para los PAB (Fig. 3.10 D). A fin de comparar estadísticamente la evolución de la relación Carotenoides / Clor-a se calcularon las velocidades de cambio de la misma (Tabla 3.2). En ninguna de las estaciones se detectaron interacciones salvo en Verano, donde la relación para el tratamiento P de la temperatura aumentada fue significativamente más alto que los demás.

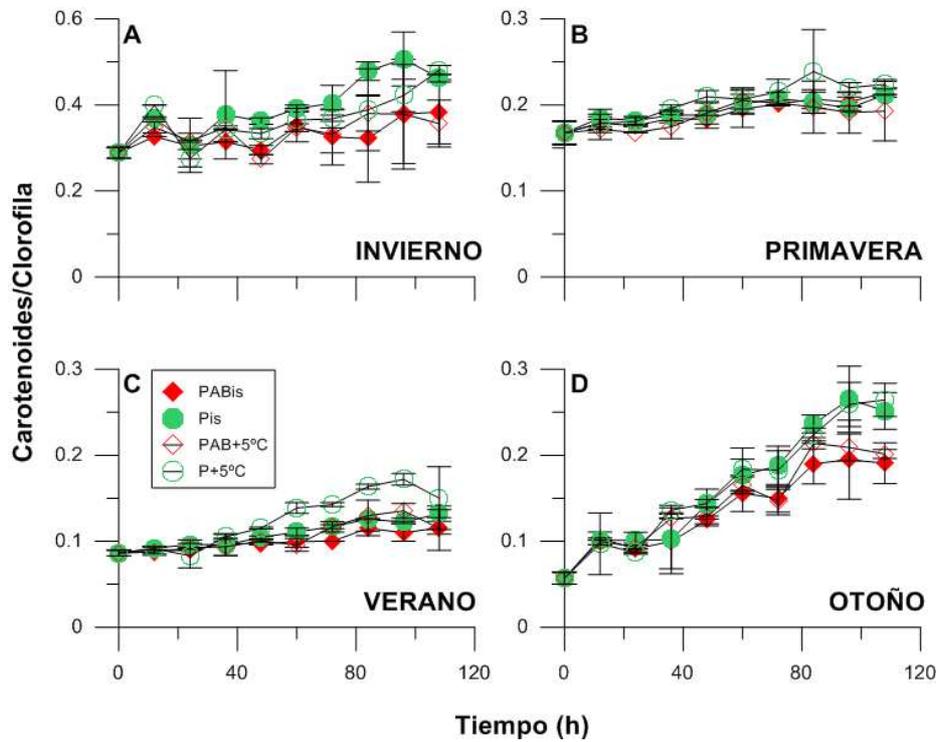


Figura 3.10 Concentraciones de carotenoides estandarizada por la concentración de Clor-a a lo largo de los experimentos de mediano plazo.

Tabla 3.2 Tasa de evolución de la relación Carotenoides/Clor-a en cada uno de los períodos experimentales. Las últimas tres filas detallan los resultados del ANOVA de dos vías realizado con estos valores para determinar los efectos de la radiación, de la temperatura o de su combinación.

Tratamiento	Invierno	Primavera	Verano	Otoño
PABis	$(1.15 \pm 1.46) \times 10^{-3}$	$(4.05 \pm 1.77) \times 10^{-4}$	$(2.72 \pm 1.15) \times 10^{-4}$	$(14.2 \pm 9.00) \times 10^{-4}$
Pis	$(3.14 \pm 1.21) \times 10^{-3}$	$(3.32 \pm 1.68) \times 10^{-4}$	$(4.19 \pm 2.22) \times 10^{-4}$	$(20.6 \pm 9.50) \times 10^{-4}$
PAB+5	$(4.26 \pm 1.78) \times 10^{-3}$	$(3.08 \pm 0.17) \times 10^{-4}$	$(5.20 \pm 2.63) \times 10^{-4}$	$(15.2 \pm 8.15) \times 10^{-4}$
P+5	$(1.67 \pm 1.49) \times 10^{-3}$	$(5.51 \pm 2.18) \times 10^{-4}$	$(10.1 \pm 5.15) \times 10^{-4}$	$(1.99 \pm 1.11) \times 10^{-3}$
Radiación	ns	ns	9.20×10^{-5}	ns
Temperatura	ns	ns	2.72×10^{-4}	ns
RxT	ns	ns	2.83×10^{-3}	ns

3.3.2.3 Análisis taxonómicos

Las concentraciones de células al inicio y al final de las experiencias se muestran en la Tabla 3.3. Tanto en invierno como en primavera no se observaron grandes variaciones en la concentración de células a lo largo del experimento; sin embargo en verano, y más claramente evidente en otoño, se observó un aumento de la misma. Cuando se analizaron las densidades celulares al final del experimento, no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos. No se observaron efectos significativos de la radiación ni de la temperatura, ni de la interacción entre estas variables.

Cuando se estudió la composición taxonómica de las muestras al inicio y al final de los experimentos, se observó que en todas las instancias las muestras estuvieron dominadas por cianobacterias (Fig. 3.11) a lo largo de todo el experimento, particularmente por *Planktothrix agardhii* cuyo porcentaje de abundancia dentro de su grupo fue siempre $\geq 77\%$. En menor porcentaje se hallaron encontraron clorofíceas (*Scendesmus*, *Monoraphidium*, *Pediastrum* y *Chlorella*) y diatomeas (diatomeas pennadas mayormente). Tanto en invierno como en primavera, la abundancia de cianobacterias se mantuvo estable a lo largo del experimento; sin embargo en invierno la temperatura afectó a la abundancia de diatomeas, teniendo mayor abundancia las muestras incubadas a la temperatura aumentada que aquellas a la temperatura *in situ* ($p = 0.02$). Mientras tanto, si bien no se detectaron diferencias significativas en primavera, se observó un aumento en la abundancia de diatomeas. En verano, la abundancia de cianobacterias disminuyó hacia el final del experimento y se vio afectada por la temperatura y la radiación: la abundancia de las muestras incubadas a la temperatura aumentada fue menor que la de las muestra incubadas a temperatura *in situ* ($p = 0.002$), al igual que las de los tratamientos PAB fueron menores que las de los tratamientos P ($p = 0.002$). Mientras tanto, se detectó una interacción sinérgica para las clorofíceas, donde la abundancia del tratamiento PAB de la temperatura aumentada fue mayor que el de la temperatura *in situ* ($p = 0.009$). Finalmente, mientras que no se observaron diferencias entre los tratamientos para las diatomeas, sí se observó un aumento de las abundancias hacia el final del experimento. En otoño, se observaron efectos de la radiación sobre todos los grupos algales: mientras los tratamientos P fueron más abundantes que los tratamientos PAB para cianobacterias ($p = 0.02$), lo opuesto se observó para clorofíceas y diatomeas ($p = 0.045$ y 0.015 , respectivamente). Cuando se repitió el test estadístico con las

Tabla 3.3 Abundancia de organismos al inicio y al final de los experimentos de mediano plazo, expresadas como número de células x 10³ ml⁻¹. Los datos se muestran como la media ± la mitad del rango entre réplicas.

Tratamiento	Invierno	Primavera	Verano	Otoño
T0	157 ± 15	183 ± 0	37 ± 4	44 ± 5
PABis	167 ± 23	186 ± 9	61 ± 13	187 ± 88
Pis	160 ± 8	209 ± 8	46 ± 5	171 ± 108
PAB+5	172 ± 18	188 ± 7	60 ± 0	253 ± 18
P+5	185 ± 2	178 ± 40	56 ± 2	253 ± 25

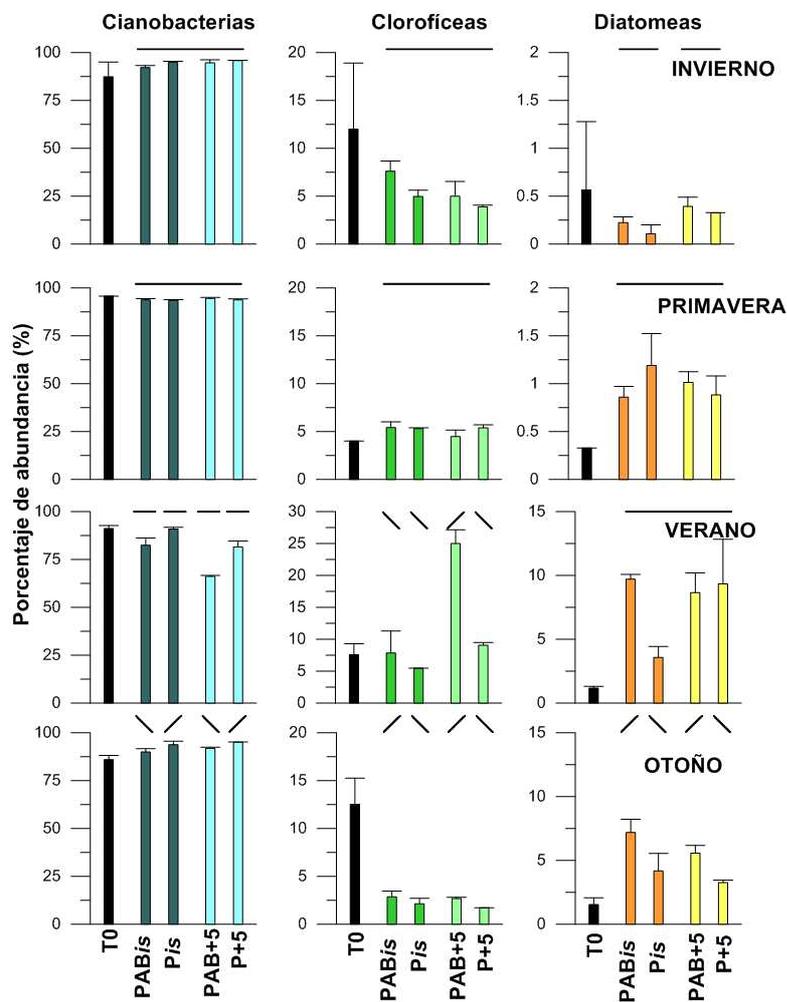


Fig. 3.11 Porcentaje de abundancia de los diferentes grupos algales al inicio y al final del experimento para cada uno de los tratamientos; los datos se presentan como la media ± la mitad del rango entre réplicas. Las líneas evidencian diferencias estadísticas entre los mismos.

abundancias absolutas, se obtuvieron los mismos resultados con excepción de cianobacterias en verano y otoño (no se observaron diferencias significativas) y clorofíceas en invierno, donde se observó un efecto de la radiación y la temperatura ($p = 0,022$ y $p = 0,037$, respectivamente).

3.3.2.4 Análisis de fluorescencia de la Clor-a

La evolución del rendimiento fotoquímico (Y) a lo largo de los experimentos se muestra en la Fig. 3.12. En general, se observa el típico comportamiento de disminución al mediodía y recuperación hacia el final de la fase oscura (temprano en la mañana), excepto para algunos días en particular, donde debido a la fuerte cobertura de nubes no se observó una disminución del rendimiento durante la exposición. Tanto en invierno (Fig. 3.12 A) como en primavera (Fig. 3.12 B), el rendimiento fotoquímico disminuyó fuertemente al mediodía para recuperarse casi totalmente en la mañana; en verano (Fig. 3.12 C), en cambio, la recuperación no fue total, particularmente en los primeros días, mientras que en otoño (Fig. 3.12 D), la respuesta fue variable debido a la presencia de nubes; sin embargo, el rendimiento fotoquímico disminuyó hacia el final del experimento. No se encontraron diferencias significativas a lo largo de cada experimento luego de realizar el ANOVA de medidas repetidas; sin embargo se observó un patrón hacia el final del experimento en las comunidades de verano: las muestras expuestas a mayor temperatura tuvieron valores de Y más bajos que aquellas incubadas *in situ*.

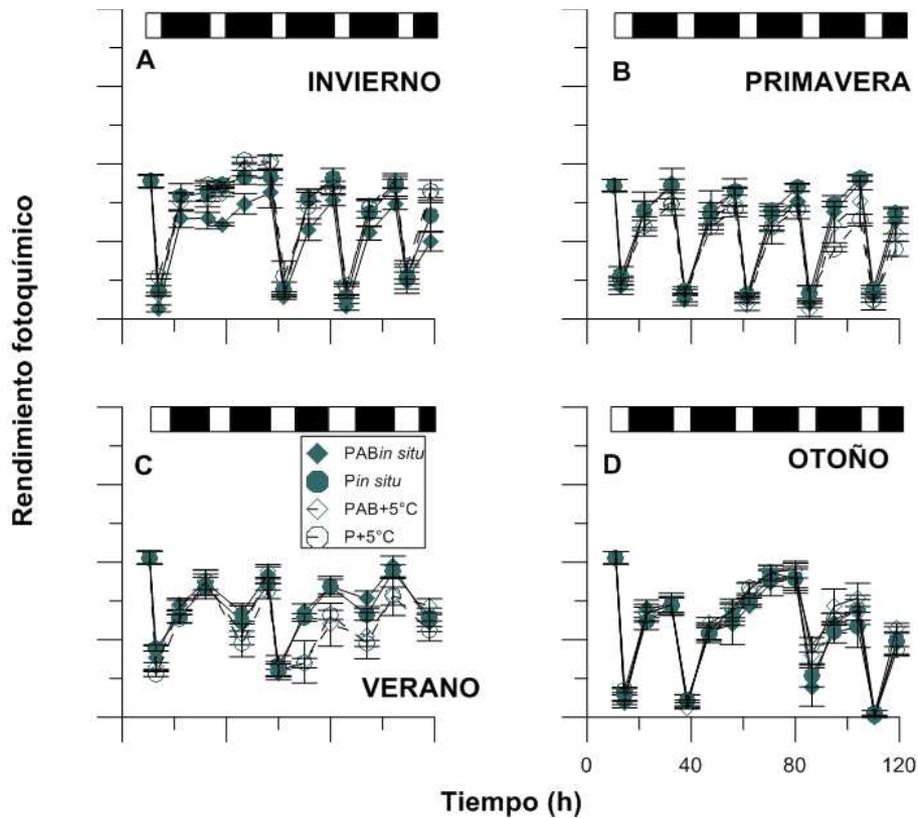


Fig. 3.12 Rendimiento fotoquímico a lo largo de los experimentos en las distintas estaciones del año. Las barras superiores indican las fases del experimento: exposición (claras) y recuperación (oscuras). Las líneas sobre los símbolos indican la desviación estándar.

Para evaluar la dinámica de disminución / recuperación del rendimiento fotoquímico, se muestra el valor de b (Fig. 3.13) obtenido del ajuste exponencial de los valores de rendimiento al mediodía (durante la exposición) y la mañana temprano (final de la fase oscura). Los valores de b_{exp} obtenidos fueron generalmente negativos (Fig. 3.13 A), teniendo valores absolutos mayores en otoño; solamente se determinaron valores positivos en el tratamiento PAB*in situ* en invierno. No se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos para la fase de exposición en ninguna de las épocas del año. Por su parte, durante la fase oscura (Fig. 3.13 B), se observó que mientras los demás tratamientos se vieron caracterizados por valores positivos de b_{rec} (aunque en algunos casos con altos valores de varianza), el tratamiento P expuesto a temperatura aumentada estuvo caracterizado por valores negativos durante invierno y primavera, al igual que ambos tratamientos de radiación de la temperatura aumentada en verano. Solo en este último caso, se

detectaron diferencias estadísticas ($p = 0.046$). En otoño, sin embargo, mientras los demás tratamientos se vieron caracterizados por valores altos de b_{rec} , para el tratamiento *Pis* se obtuvieron valores negativos de b_{rec} .

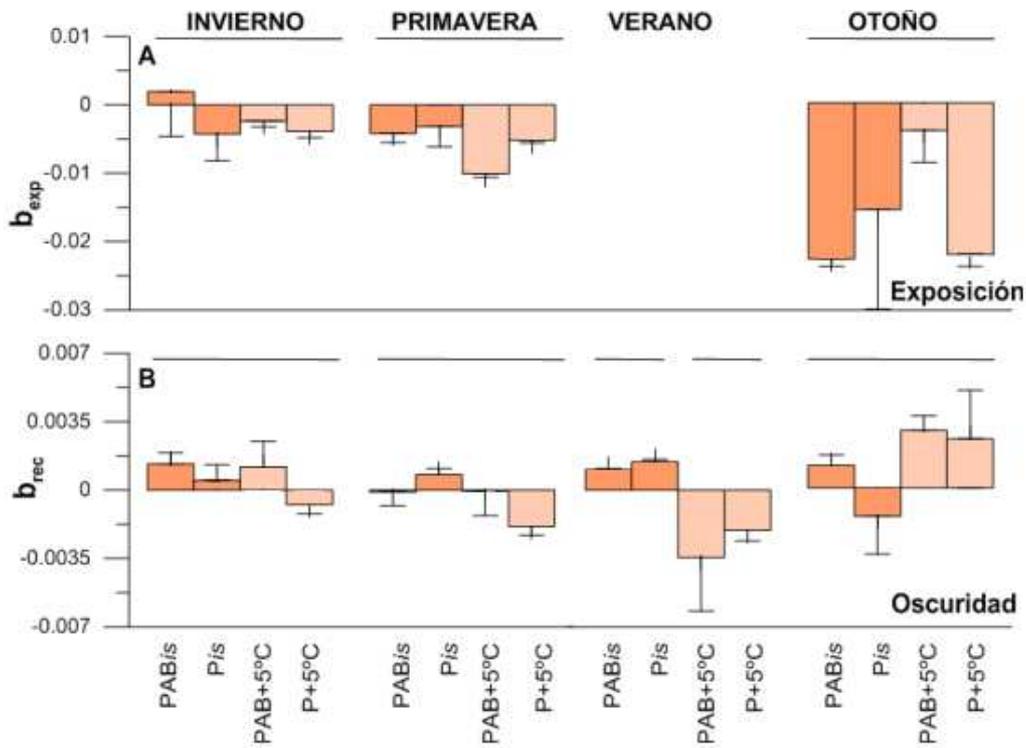


Fig. 3.13 Valor de b obtenido del ajuste exponencial del rendimiento fotoquímico al mediodía (exposición) y a la mañana (fase oscura). Las diferentes líneas evidencian diferencias estadísticas entre los tratamientos. No se realizó un ajuste de los valores del mediodía en verano debido a la pérdida de datos correspondientes al mediodía en esta instancia experimental.

3.3.2.5 Actividad enzimática de la glutamina sintetasa (GS)

La actividad de la enzima GS a lo largo de los experimentos de mediano plazo se muestra en la Fig. 3.14. Si bien en algunos momentos se registraron diferencias entre los tratamientos, éstas no fueron significativas a lo largo del experimento según el análisis de medidas repetidas. En invierno (Fig. 3.14 A y B), y a diferencia de las otras estaciones, los valores de actividad GS aumentaron para todos los tratamientos y se estabilizaron hacia la mitad del experimento en valores cercanos a 0.4. En primavera (Fig. 3.14 C y D) y verano (Fig. 3.14 E y F) los valores se

mantuvieron estables aunque en este último se registró una gran variabilidad en algunas mediciones. Finalmente, en otoño, los valores de actividad GS disminuyeron progresivamente hacia el final del experimento (Figs. 3.14 G y H).

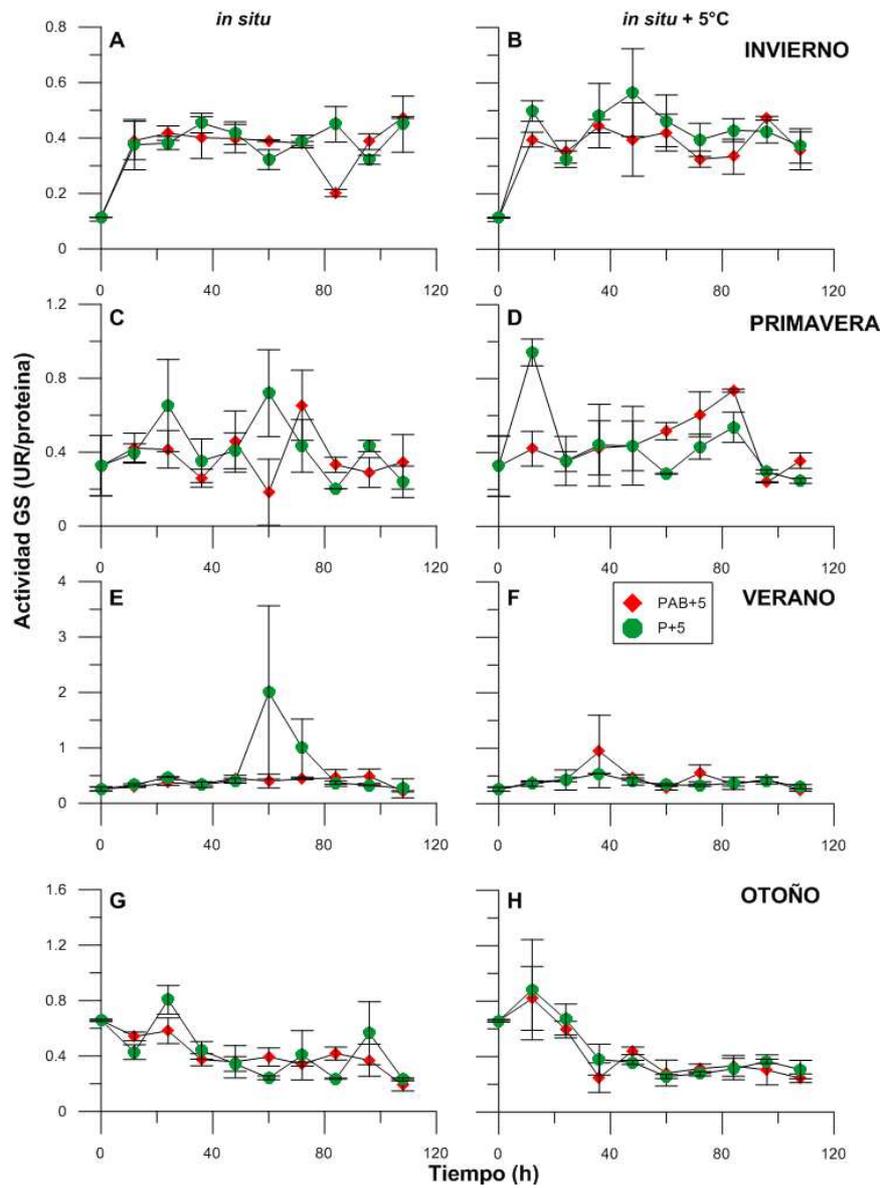


Fig. 3.14 Actividad glutamina sintetasa (en unidades relativas) a lo largo de las diferentes etapas experimentales.

3.4 DISCUSIÓN

La laguna Don Tomás estuvo dominada todo el año por las cianobacterias, y dentro de este grupo particularmente por *P. agardhii*, con una dominancia mayor a 75%, no observándose sucesión fitoplanctónica. Esta situación, en la cual un grupo predomina sobre otros a lo largo del año ya ha sido descrita anteriormente para otros lagos del hemisferio norte (Berger 1975, Scheffer *et al.* 1997) y se ha propuesto que ocurre porque las cianobacterias no solo son buenas competidoras en condiciones de baja penetración de la radiación en la columna de agua, sino que también promueven estas condiciones para asegurar su dominancia (Scheffer *et al.* 1997). Particularmente, se ha mencionado a *P. agardhii* como probablemente la más importante causante de floraciones en lagos someros en zonas templadas (Scheffer *et al.* 1997). Otros trabajos la han descrito como una de las especies que se desarrollan de forma más regular y a lo largo del año en comparación con otras especies dominantes (Salmaso 2002). Como se mencionó anteriormente, estudios previos han alertado sobre el desmejoramiento en las condiciones en la laguna Don Tomás (diversidad, transparencia) a lo largo de los últimos años (Alvarez *et al.* 2009, Echániz *et al.* 2008, Echaniz & Vignatti 2001). Echániz *et al.* (2008) habían propuesto anteriormente que la laguna se encontraba evolucionando de un estado eutrófico a un estado hipereutrófico, afirmación con la que coinciden nuestras observaciones.

En las experiencias a mediano plazo se observó una respuesta similar al analizar el rendimiento fotoquímico: importantes disminuciones durante la exposición y recuperaciones cercanas al total luego de la fase oscura. Si bien en general para las variables estudiadas no se observaron diferencias entre los tratamientos a lo largo del año, esto no fue así en verano, donde una mortandad de peces fue observada en la laguna cuando se realizaban los muestreos (Fig. 3.1 B). Al mismo tiempo se observó un desmejoramiento en el rendimiento de las muestras expuestas a temperaturas aumentadas en comparación con las temperaturas *in situ*, lo indica que en estas circunstancias la temperatura puede haber actuado como un factor de estrés más. En la misma etapa experimental, y para todos los tratamientos, se observó un cambio en la composición de las muestras: disminuyó el porcentaje de abundancia de cianobacterias y aumentó el de diatomeas.

Por su parte, las experiencias realizadas con ciclos diarios de exposición a lo largo del año mostraron que el coeficiente de disminución del rendimiento fotoquímico, k , se encontraba afectado por la irradiancia recibida, la temperatura de exposición, la concentración de Clor-a y el porcentaje de cianobacterias presente en las muestras. Estas diferencias en las experiencias a

corto plazo (que sí se ven afectadas por las variables estudiadas) y mediano plazo (que parecen ser afectadas únicamente en condiciones extraordinarias) pueden deberse a los mecanismos de adaptación de estas cianobacterias a las condiciones experimentales: si bien no se detectó la síntesis de CARUV, lo que se encuentra en contraposición a resultados previos de otros autores en sistemas con floraciones de cianobacterias (Sommaruga *et al.* 2009, Liu *et al.* 2004), sí se registró un aumento de la relación carotenoides / Clor-a, que probablemente mitigó el exceso de radiación incidente en las experiencias de mediano plazo, pero no pudo hacerlo en las de corto plazo. Estudios anteriores apoyan el rol de los carotenoides como fotoprotectores: Lakatos *et al.* (2001) exponiendo una población natural de cianobacterias terrestres a radiación solar directa encontraron un aumento en las concentraciones de derivados del β -caroteno, en particular de cantaxantina. Por su parte, Gao *et al.* (2007) trabajando con *Anabaena* sp. PCC 7120 observó que un aumento de la concentración de carotenoides, así como también de la relación carotenoides / Clor-a protegió a las células de los altos niveles experimentales de PAR.

Por su parte, la actividad GS mostró un comportamiento similar al expuesto en el capítulo anterior en cuanto a que no se registraron diferencias entre tratamientos de radiación y temperatura. Sin embargo, mostró una disminución hacia el final del experimento que puede haberse debido al consumo de los nutrientes y en consecuencia, a la falta de sustrato. Además, considerando los estudios previos realizados con cianobacterias (Kumar *et al.* 1996, Kumar *et al.* 2003), se refuerza la observación de que ante exposiciones prolongadas y bajo condiciones naturales de radiación, se produce una aclimatación que permite disminuir la inhibición de la actividad enzimática.

Los resultados presentados en este capítulo muestran que las cianobacterias tienen una alta capacidad de adaptación a las variables asociadas con el cambio climático estudiadas, en concordancia con lo expuesto anteriormente por diferentes autores (Paerl & Huisman 2008, 2009, Paerl & Paul 2012). Sumado a todo lo expuesto anteriormente, se deben considerar las condiciones ambientales en las que se encuentra la comunidad: si bien en las experiencias realizadas las comunidades fueron expuestas en recipientes de aproximadamente 1 y 3.5 l permitiendo exposiciones a irradiancias mayores a las reales, se debe tener en cuenta que en la laguna la mayor parte de la radiación es filtrada por los primeros centímetros de la columna de agua, como se pudo ver en los altos valores de coeficiente de atenuación k_{PAR} y en la Fig. 3.1 A. Según trabajos anteriores, esto no solo favorecería el desarrollo de *P. agardhii*, cuyo crecimiento

se produce a bajas irradiancias (Havens *et al.* 2003) sino que también impediría el desarrollo de otras especies con mayores requerimientos lumínicos (Havens *et al.* 2003, Havens 2008). A esto se debe agregar las altas concentraciones de nutrientes en la laguna (Echániz *et al.* 2008) que sostiene la alta biomasa a lo largo del tiempo (Paerl & Otten 2013) evitando su colapso.

Capítulo 4

Influencia de la radiación ultravioleta y la temperatura sobre la fotosíntesis y la morfología de cianobacterias

Parte de este capítulo es una traducción del trabajo de respaldo de esta Tesis que se encuentra publicado como: Fiorda Giordanino MV, Strauch SM, Villafañe VE & Helbling EW (2011) *Influence of temperature and UVR on photosynthesis and morphology of four species of cyanobacteria*, *Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology* 103 (1): 68-77. Anexo 1

4.1 INTRODUCCIÓN

Se sabe que el cambio climático afecta directa e indirectamente tanto la estructura como el funcionamiento de los ecosistemas acuáticos (Wrona *et al.* 2006, Häder *et al.* 2007b). Aunque el cambio climático es un proceso muy complejo, sus mecanismos forzantes incluyen principalmente variaciones en los niveles de radiación solar y temperatura (Williamson *et al.* 2009). Por lo tanto, se han invertido grandes esfuerzos en evaluar el impacto sobre diversos organismos tanto de la radiación ultravioleta (RUV, 280-400 nm) solar –especialmente de la RUV-B (280-315 nm) aumentada debido a la disminución de la capa de ozono- como del calentamiento global debido al input de gases invernadero (Sobrino & Neale 2007, Halac *et al.* 2010, Hernández Moresino & Helbling 2010).

Las cianobacterias son el grupo más grande y más ampliamente distribuido de organismos procariotas, que han colonizado una variedad de ecosistemas acuáticos y terrestres (Paerl & Huisman 2009). Algunas especies de cianobacterias forman asociaciones simbióticas con numerosos organismos (Adams 2002), otras forman floraciones y algunas otras producen toxinas (Paerl & Huisman 2009). Aún más, las cianobacterias son los únicos fotótrofos oxigénicos capaces de fijar el nitrógeno atmosférico (Karl *et al.* 2002). Por lo tanto, ha habido un interés obvio en evaluar el impacto de las variables asociadas al cambio climático en estos organismos relevantes desde el punto de vista ecológico. La RUV es considerada actualmente como un factor de estrés para los organismos acuáticos, aún en sus niveles normales (ver la revisión de Helbling & Zagarese Helbling & Zagarese 2003) y para el caso particular de las cianobacterias, se ha comprobado que produce, entre otros efectos, inhibición de la fotosíntesis (Miller *et al.* 1998, Wu *et al.* 2005), daño en el ADN (Sinha *et al.* 2001), blanqueo de pigmentos (Donkor & Häder 1996) y cambios morfológicos (Wu *et al.* 2005). Sin embargo, las cianobacterias han desarrollado un conjunto de mecanismos para evitar o minimizar el estrés generado por la RUV que incluye la migración vertical (Bebout & Garcia-Pichel 1995) o la síntesis de compuestos protectores como los aminoácidos tipo micosporinas (MAAs) o scytoneminas (Sinha *et al.* 2001, Ferroni *et al.* 2010, Dillon & Castenholz 1999) o proteínas (Campbell *et al.* 1998) y algunas enzimas reparadoras (Sinha & Häder 2002). En relación al aumento de la temperatura, se ha encontrado que favorece la dominancia de las cianobacterias (Paerl & Huisman 2009) como se observó en algunos lagos del hemisferio norte (Shatwell *et al.* 2008, Elliott 2010).

En general, la mayoría de los estudios que tratan sobre los efectos de estas variables asociadas al cambio climático sobre las cianobacterias han considerado de a una por vez. Por lo tanto, y para estos organismos, se conoce muy poco sobre los efectos interactivos de la RUV y el aumento de temperatura, que pueden actuar de forma sinérgica o antagónica (Dunne 2010). En este sentido, Roos y Vincent (1998), trabajando con cianobacterias antárticas, encontraron que la inhibición del crecimiento inducida por la RUV aumentaba linealmente con la disminución de la temperatura, mientras que no encontraron ningún efecto aparente de la temperatura sobre la magnitud de la fotoinhibición inducida por la RUV. Gao *et al.* (2008) encontraron que un aumento de la temperatura beneficiaba a las células de *Arthrospira platensis* dañadas por la RUV. Por lo tanto, y con el objetivo de conocer más sobre los efectos combinados de la temperatura y la RUV sobre la fotosíntesis, la síntesis de compuestos fotoprotectores y la morfología, se realizaron experimentos con cuatro especies de cianobacterias. El diseño experimental constó de dos partes. Por un lado, se incubaron cultivos monoespecíficos bajo la radiación solar en un sitio patagónico (43,3° S; 65° W) a fines de la primavera austral usando dos tratamientos de temperatura: 18° C (control) y 23° C; de esta manera se simuló el incremento de 5° C previsto para el año 2100 (Houghton *et al.* 2001) y tres calidades de radiación. En estas condiciones se evaluó el efecto de la RUV y la temperatura sobre parámetros fotosintéticos y el área de cianobacterias de diferente morfología (Parte A). Por otra parte, se seleccionaron dos de las cianobacterias que habían sido utilizadas en la parte anterior (*Anabaena* sp. y *Nostoc* sp), y se expusieron en condiciones controladas a dos temperaturas y tres calidades de radiación para evaluar la eficiencia de otro mecanismo de defensa contra los efectos negativos de la RUV, tales como la síntesis de compuestos fotoprotectores: los compuestos que absorben radiación ultravioleta - CARUV (Parte B).

PARTE A

4.2 MATERIALES Y MÉTODOS

4.2.1 Condiciones de cultivo y sitio de estudio

Las especies de cianobacterias usadas en este estudio fueron obtenidas de la Colección de Cultivos de Algas de la Estación de Fotobiología Playa Unión (EFPU). *Microcystis* sp. Kützing ex Lemmermann, *Anabaena* sp. (Bory de Saint-Vincent ex Bornet & Flahault) y *Nostoc* sp. (Vaucher ex Bornet et Flahault) crecieron en medio BG-11 (Rippka 1988) mientras que *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis* (Nordstet) Gomont creció en medio Zarrouk (Zarrouk 1966). Los cultivos fueron diluidos, colocados en botellas de 6 l hasta completar el 40% de su volumen y pre-aclimatados por al menos 3 días previos a la experimentación a 18° C en una cámara Minicella, o a 23° C en una cámara Sanyo MLR, según correspondiese. Ambas cámaras se encontraban provistas de tubos fluorescentes luz-día ($300 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de PAR - 400–700 nm) con un fotoperíodo 12L:12O. Luego del período de pre-aclimatación, los cultivos se utilizaron para los experimentos de la manera que se describe más adelante. Los experimentos se realizaron a fines de la primavera austral (desde el 30 de Noviembre hasta el 3 de Diciembre y desde el 14 al 17 de Diciembre de 2009) en la EFPU, ubicada en la costa patagónica de Argentina (43,3° S; 65° W).

4.2.2 Condiciones experimentales y protocolo de muestreo

Las muestras de los cultivos pre-aclimatados se colocaron en recipientes transparentes a la RUV (500-1000 ml) y se expusieron, por duplicado, a tres tratamientos de radiación: (i) P [PAR (400–700 nm), tubos cubiertos con filtros Ultraphan UV Opak 395], (ii) PA [PAR + RUV-A (320–700 nm), tubos cubiertos con filtros Montagefolie 320 y (iii) PAB [PAR + RUV-A + RUV-B (280–700 nm), tubos sin filtros]. Se implementaron también dos tratamientos de temperaturas para cada tratamiento de radiación: 18 y 23° C, las cuales fueron mantenidas con un baño termostático (Frío 21, Argentina) provisto de dos circuitos independientes para controlar la temperatura. Las muestras fueron incubadas bajo la radiación solar durante cuatro días y se realizaron las siguientes mediciones: cada una hora se midió la fluorescencia de la clorofila-a (Clor-a) y antes del atardecer se tomaron muestras para realizar determinaciones de concentración de Clor-a y

pigmentos accesorios, concentración de células, peso seco y morfometría. Estas últimas fueron realizadas al inicio y al final de las experiencias en el caso de *Anabaena* sp., *Nostoc* sp. y *Microcystis* sp., y diariamente en el caso de *A. platensis* (ver más adelante).

4.2.3 Análisis y mediciones

Las siguientes mediciones y análisis fueron realizados durante los experimentos:

4.2.3.1 Parámetros de fluorescencia

Los parámetros fotosintéticos *in vivo* fueron medidos cada hora con un fluorómetro de pulso de amplitud modulada (PAM) (Walz, Water PAM, Effeltrich, Alemania). Para esto se tomaron alícuotas de 3 ml de muestra, se las colocaron en una cubeta y se midieron 6 veces inmediatamente después del muestreo, sin adaptar a la oscuridad. El rendimiento fotoquímico efectivo se calculó usando las ecuaciones de Genty *et al.* (1989) y Weis & Berry (1987) según:

$$Y = \Delta F / F'_m = (F'_m - F_t) / F'_m \quad (\text{Ec. 1})$$

donde F'_m es la fluorescencia máxima inducida por un pulso de luz saturante (ca. 5300 μmol fotones $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ en 0.8 s) y F_t es el estado basal de la fluorescencia inducido por una luz actínica en células adaptadas a la luz.

4.2.3.2 Recuentos de células y morfología

Se tomaron muestras de 5 ml diariamente y se fijaron con formalina neutralizada (concentración final de 0.4% de formaldehído). Las células se contaron con un microscopio invertido (Leica DM IL) usando una cámara Sedgewick-Rafter. Los cambios en la morfología se analizaron a través de fotografías tomadas con una video cámara (Watec, Alta Resolución) añadida al microscopio invertido y usando un software específico para análisis y procesamiento de imágenes (Image J – 1.43 r15, <http://www.softpedia.com/get/Multimedia/Graphic/Graphic-Editors/ImageJ.shtml>). Se determinaron diferentes parámetros para cada especie: el área del filamento para *Anabaena* sp. y *Nostoc* sp., el área de la colonia para *Microcystis* sp. y el área del tricoma para *A. platensis*. Para cada réplica se analizaron 30 fotografías.

4.2.3.3 Peso seco

Se tomaron muestras de 20 ml de cada réplica al inicio y al final del experimento para realizar el análisis de peso seco, se filtraron en filtros de fibra de vidrio GF-C (Munktell, Suecia) previamente pesados y se secaron en una estufa (65° C) durante la noche. Los filtros se mantuvieron en un desecador durante 3-4 h hasta peso constante. El peso seco se calculó como la diferencia entre el peso final e inicial de cada filtro.

4.2.3.4 Mediciones de radiación y temperatura

La radiación solar se monitoreó continuamente utilizando un radiómetro de banda ancha (ELDONET, Real Time Computer, Möhrendorf, Alemania) instalado permanentemente en el techo de la EFPU; este instrumento mide RUV-B (280–315 nm), RUV-A (315–400 nm) y PAR (400–700 nm) cada segundo, promedia los datos obtenidos en un minuto y los guarda en una computadora (Häder *et al.* 2007a). Este radiómetro es calibrado anualmente usando un procedimiento de calibración solar. La temperatura del agua en los baños termostáticos se controló con sensores unidos a un canal de temperatura y se ajustaron automáticamente a lo largo del experimento.

4.2.3.5 Estadística y cálculos

Debido a las diferencias en las condiciones de radiación incidente y la consiguiente imposibilidad de comparar estudios realizados en diferentes fechas, solo se realizó un experimento con cada especie. Para cada experimento, los tratamientos se realizaron por duplicado, por lo tanto los datos se expresan como la media y la mitad del rango entre réplicas. Las diferencias entre irradiancias, temperaturas y especies se determinaron con un análisis de la varianza (ANOVA) de una vía de mediciones repetidas mientras que las interacciones entre temperatura y radiación se determinaron con un ANOVA de dos vías, usando un límite de confianza del 95% (Zar 1999).

Los siguientes cálculos se realizaron con los datos obtenidos:

(i) La disminución del Y al mediodía debida a PAR, RUV-A y RUV-B se calculó comparando el rendimiento fotoquímico efectivo de cada mañana (antes del amanecer) y aquel valor al mediodía y expresándolo como porcentaje de inhibición:

$$\% \text{ disminución del Y debido a PAR (Inh}_{\text{PAR}}) =$$

$$100 * (Y_{PAR(t_0)} - Y_{PAR(t_{mediodía})}) / Y_{PAR(t_0)} \quad (\text{Ec. 2})$$

% disminución del Y debido a RUV-A (Inh_{RUV-A})

$$= [100 * (Y_{RUV-A(t_0)} - Y_{RUV-A(t_{mediodía})}) / Y_{RUV-A(t_0)}] - Inh_{PAR} \quad (\text{Ec. 3})$$

% disminución del Y debido a RUV-B (Inh_{RUV-B})

$$= [100 * (Y_{RUV-B(t_0)} - Y_{RUV-B(t_{mediodía})}) / Y_{RUV-B(t_0)}] - Inh_{RUV-A} \quad (\text{Ec. 4})$$

donde Y representa el rendimiento fotoquímico efectivo al inicio del experimento (t_0) y al mediodía ($t_{mediodía}$) bajo cada tratamiento de radiación para cada día.

(ii) La recuperación del rendimiento durante la tarde se calculó como:

$$\text{Recuperación a la luz} = (\% Y_{tluz} - \% Y_{t_0}) \quad (\text{Ec. 5})$$

donde Y representa el rendimiento fotoquímico efectivo bajo un tratamiento de radiación particular (P, PA o PAB) al final del período de exposición (t_{luz}) y en el tiempo cero (t_0).

(iii) La recuperación del rendimiento durante la noche se calculó como:

$$\text{Recuperación en oscuridad} = (\% Y_{tnoche} - \% Y_{t_0}) \quad (\text{Ec. 6})$$

donde Y representa el rendimiento fotoquímico efectivo bajo un tratamiento de radiación particular (P, PA o PAB) al inicio del próximo día de exposición (t_{noche}) i.e., después de recuperarse durante toda la noche, y en el tiempo cero (t_0).

4.3 RESULTADOS

Las condiciones de radiación durante la etapa experimental se caracterizaron por la presencia de una importante cobertura de nubes como se muestra en la Fig. 4.1. Las irradiancias máximas fueron de ~ 550 , 68 y $1.6 \text{ W}\cdot\text{m}^{-2}$ para PAR, RUV-A y RUV-B, respectivamente. Las irradiancias medias durante los experimentos llevados a cabo con *Anabaena* sp. y *Nostoc* sp. (30 Noviembre-3 Diciembre) fueron de 247, 33.7 y $0.77 \text{ W}\cdot\text{m}^{-2}$ para PAR, RUV-A y RUV-B, respectivamente. Durante los experimentos llevados a cabo con *A. platensis* y *Microcystis* sp. (14-17 de Diciembre) las irradiancias medias fueron levemente superiores: 274.4 , 37.4 y $0.84 \text{ W}\cdot\text{m}^{-2}$ para PAR, RUV-A y RUV-B, respectivamente.

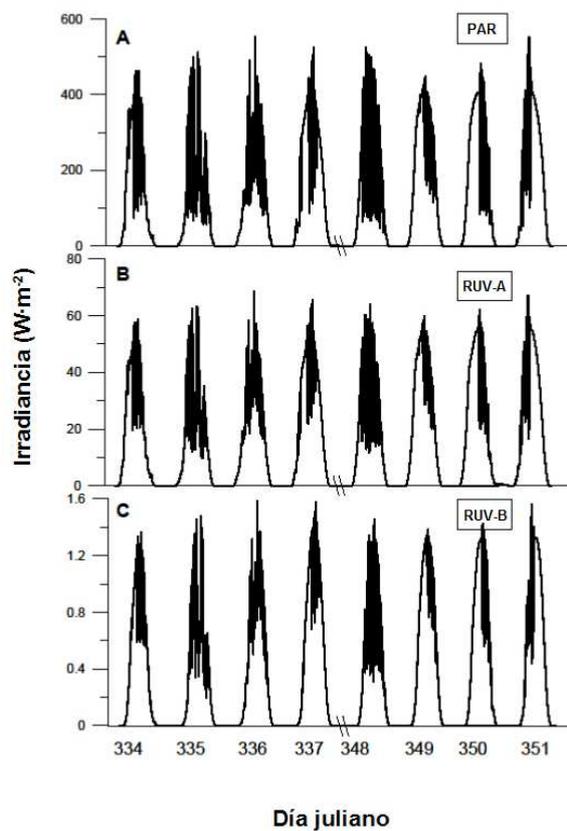


Fig. 4.1 Irradiancia (en $\text{W}\cdot\text{m}^{-2}$) durante el período de estudio: (A) PAR (400–700 nm), (B) RUV-A (315–400 nm) and, (C) RUV-B (280–315 nm). Los experimentos realizados con *Anabaena* sp. y *Nostoc* sp. se realizaron durante el período 30 Noviembre - 3 Diciembre (días julianos 334–337) mientras que aquellos con *Arthrospira platensis* y *Microcystis* sp. se realizaron durante el período 14-17 Diciembre (días julianos 348–351). Nótese el corte del eje entre los días julianos 337-348.

Las variaciones del rendimiento fotoquímico efectivo (Y) a lo largo de los experimentos se muestran en la Fig. 4.2. Para todas las especies y tratamientos se observó el mismo patrón general de disminución de los valores de Y desde la mañana temprano hasta el mediodía y de recuperación durante la tarde. Con la excepción de *Microcystis* sp., se obtuvieron valores más altos para las temperaturas más altas; los valores de Y fueron incluso más altos hacia el final que al comienzo del experimento, como se observa claramente con *Nostoc* sp. (Fig. 4.2 D). En general, se observaron efectos de los diferentes tratamientos de radiación, siendo los valores de Y más altos para los tratamientos P que para los PA y PAB, con la excepción de *A. platensis* hacia el final del experimento a 18 °C (Fig. 4.2 E) donde los valores de Y más altos correspondieron al tratamiento PAB. Hubo también comportamientos específicos cuando se comparan las respuestas a la radiación solar y la temperatura de las cuatro especies testeadas: *Anabaena* sp. exhibió una fuerte disminución del Y a lo largo del experimento llevado a cabo a 18° C (Fig. 4.2 A) pero con una recuperación casi completa todas las noches bajo el tratamiento P, y si bien esto mismo se observó en el experimento a 23° C (Fig. 4.2 B), los valores de Y fueron más altos hacia el final del experimento. *Nostoc* sp. tuvo valores bajos de Y durante los dos primeros días de experimentación a 18° C y luego su recuperación fue más alta (Fig. 4.2C); en las muestras expuestas a 23° C se alcanzó una mayor recuperación desde el primer día (Fig. 4.2D) especialmente en el tratamiento P. De manera similar *A. platensis* (Fig. 4.2E y 4.2F) tuvo una fuerte disminución del Y y una posterior recuperación parcial al inicio del experimento a 18° C, pero una recuperación completa a 23° C para el mismo momento. Finalmente, *Microcystis* sp. mostró la menor variación en ambos tratamientos de temperatura y radiación, teniendo una fuerte disminución del Y durante los primeros tres días a 18° C (Fig. 4.2G) pero menos a 23° C (Fig. 4.2H); una leve recuperación se observó durante la tarde y la noche.

En las Figs. 4.3 y 4.4. se presenta una información más detallada sobre la dinámica de disminución y recuperación del Y. En relación a la disminución del Y causada por las diferentes porciones del espectro (Fig.4.3), se vio que la mayor parte era debida a PAR, con RUV-A y RUV-B contribuyendo de manera similar (y muy baja). En los experimentos en los que las muestras se incubaron a 23° C se observó una disminución del Y inducida por PAR, especialmente para *Anabaena* sp. y *Nostoc* sp. (Fig. 4.3B y D). Esta disminución fue seguida por un aumento de la contribución de la RUV-A en todas las especies incubadas a 23° C (Fig. 4.3B,

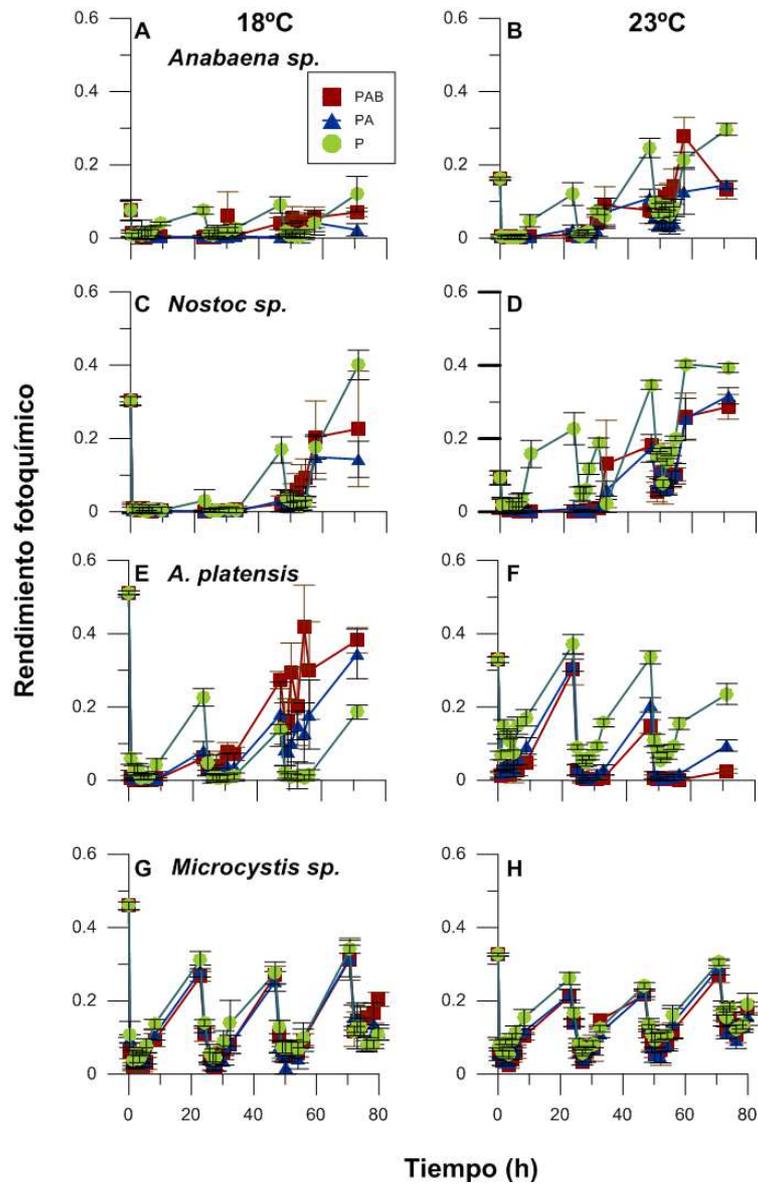


Fig. 4.2 Variaciones del rendimiento fotoquímico (Y) durante los experimentos con *Anabaena sp.* (A y B), *Nostoc sp.* (C y D), *Arthrospira platensis* (E y F) y *Microcystis sp.* (G y H). Los paneles de la izquierda y de la derecha corresponden a experimentos realizados a 18 y 23° C, respectivamente. Los símbolos indican las medias de los diferentes tratamientos de radiación mientras que las líneas verticales indican la mitad del rango entre medias.

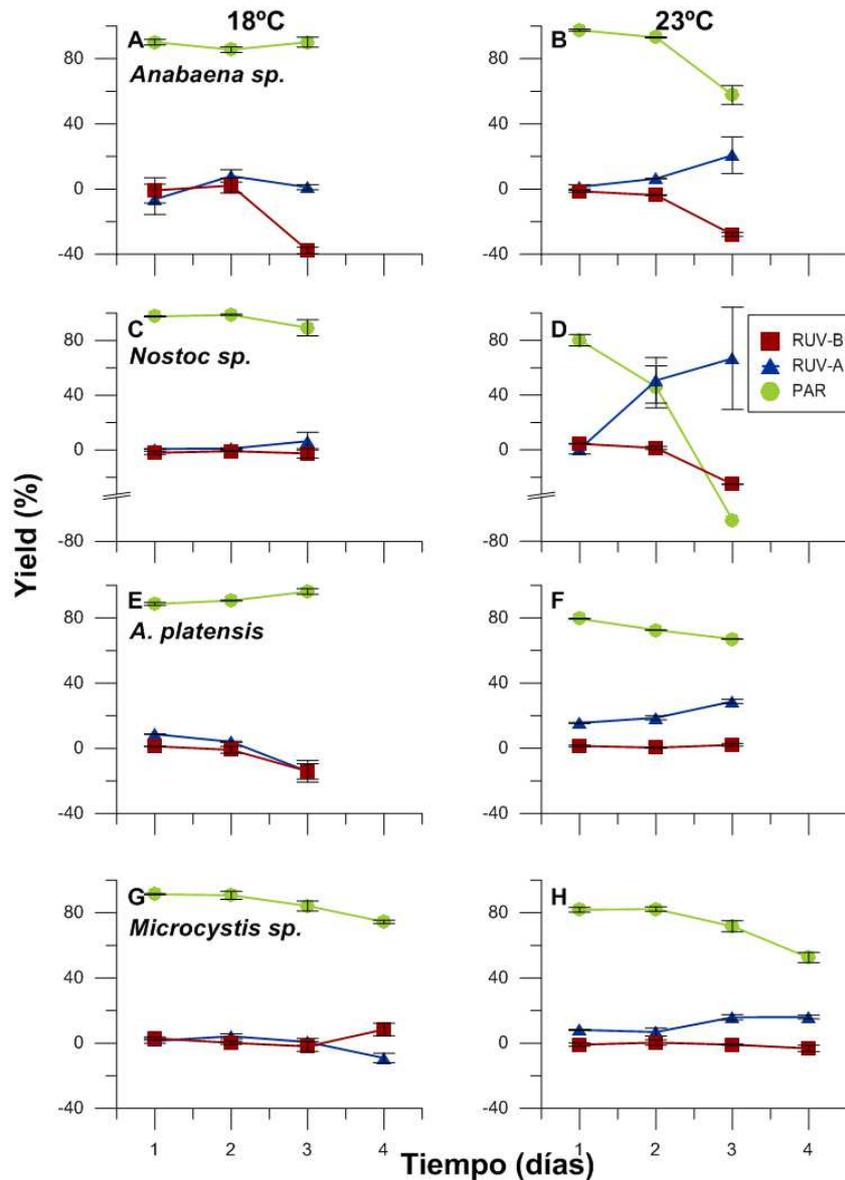


Fig. 4.3 Porcentaje de disminución del Y (%) debido a PAR, RUV-A y RUV-B durante los experimentos realizados con *Anabaena* sp. (A y B), *Nostoc* sp. (C and D), *Arthrospira platensis* (E y F) y *Microcystis* sp. (G and H). Los paneles de la izquierda y de la derecha corresponden a experimentos realizados a 18 y 23° C, respectivamente. Los símbolos indican las medias de los diferentes tratamientos de radiación mientras que las líneas verticales indican la mitad del rango entre réplicas, los símbolos abiertos corresponden a los valores de la tarde mientras que los llenos representan los valores de la mañana.

D, F y H). Es importante observar que en *Nostoc* sp. incubado a 23° C (Fig. 4.3D) se observaron valores negativos en el tratamiento P (i.e., promoviendo la fotosíntesis).

En relación a la recuperación (Fig. 4.4), en general se observaron valores más altos hacia el final del experimento que al inicio, como se ve claramente para *Anabaena* sp. (Fig. 4.4A y B) y *Nostoc*

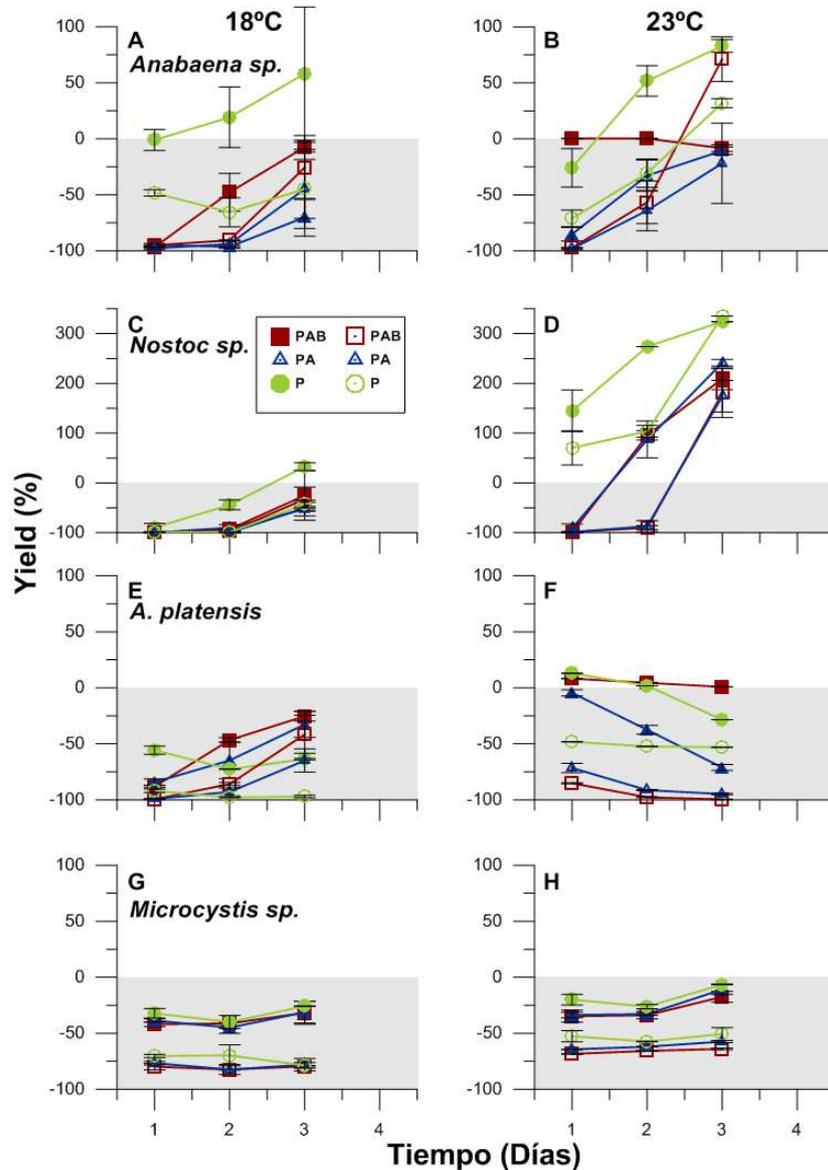


Fig. 4.4 Porcentaje del Y (%) de los tratamientos PAB, PA y P durante los experimentos realizados con *Anabaena* sp. (A y B), *Nostoc* sp. (C y D), *Arthrospira platensis* (E y F) y *Microcystis* sp. (G y H). Los paneles de la izquierda y de la derecha corresponden a experimentos realizados a 18 y 23° C, respectivamente. Los símbolos indican las medias de los diferentes tratamientos de radiación y las líneas verticales indican la mitad del rango entre réplicas, los símbolos abiertos corresponden a los valores de la tarde y los llenos representan los valores de la mañana. El área gris indica que los valores de Y fueron menores a los del tiempo cero.

sp. (Figs. 4.4C y D), aunque lo contrario ocurrió con *A. platensis* incubada a 23° C (Fig. 4.4F); sin embargo, esta tendencia fue menos evidente durante la tarde. No todas las especies alcanzaron una recuperación total a lo largo del experimento (i.e., valores < 0) y esto fue especialmente evidente en los experimentos realizados con *Microcystis* sp. (Figs. 4.4G y H). Es importante notar el claro efecto de la temperatura en la recuperación durante la noche de *Nostoc* sp., donde las muestras expuestas a 23° C alcanzaron valores significativamente más altos que los de las muestras expuestas a 18° C (Figs. 4.4C y D); al contrario, *Microcystis* sp. tuvo un comportamiento similar en ambas temperaturas de incubación. Finalmente, y en relación a los tratamientos de radiación, se observó un efecto claro en la recuperación de la noche de *Anabaena* sp. (Figs. 4.4 A y B) mientras que no se determinaron efectos en *Nostoc* sp. (Figs. 4.4 C y D) y en *Microcystis* sp. (Figs. 4.4 G y H).

Los cambios morfológicos observados durante los experimentos se presentan en las Figs. 4.5 y 4.6. Hubo tanto diferencias inter-específicas significativas, como respuestas relacionadas a la temperatura y/o a la radiación solar: a 18° C, el área inicial del filamento de *Anabaena* sp. (Figs. 4.5 A y 4.6) fue significativamente mayor que al final, que mostró valores similares para los tres tratamientos de radiación. Sin embargo, a 23° C, el área de los filamentos al final del experimento fue significativamente menor en las muestras del tratamiento PAB que en los otros tratamientos de radiación (Figs. 4.5 B y 4.6). En *Nostoc* sp., se encontraron diferencias significativas en el área del filamento entre el inicio y el fin del experimento realizado a 18° C, teniendo las muestras del tratamiento P áreas mayores que las de los tratamientos PA o PAB (Figs. 4.5 C y 4.6) mientras que no se determinaron diferencias a 23° C tanto en el tiempo como entre los tratamientos de radiación (Figs. 4.5 D y 4.6). Para *A. platensis* se observó una marcada reducción en el área del tricoma a lo largo del experimento (Figs. 4.5 E y 4.6), siendo más acentuada a 18 que a 23° C. En general, para esta especie, las muestras bajo el tratamiento P tuvieron mayores áreas que aquellas bajo el tratamiento PA y PAB. Finalmente, no se observaron diferencias significativas para *Microcystis* sp. en el tamaño de sus colonias (Figs. 4.5 G y H, Fig. 4.6) a las dos temperaturas experimentales y tratamientos de radiación.

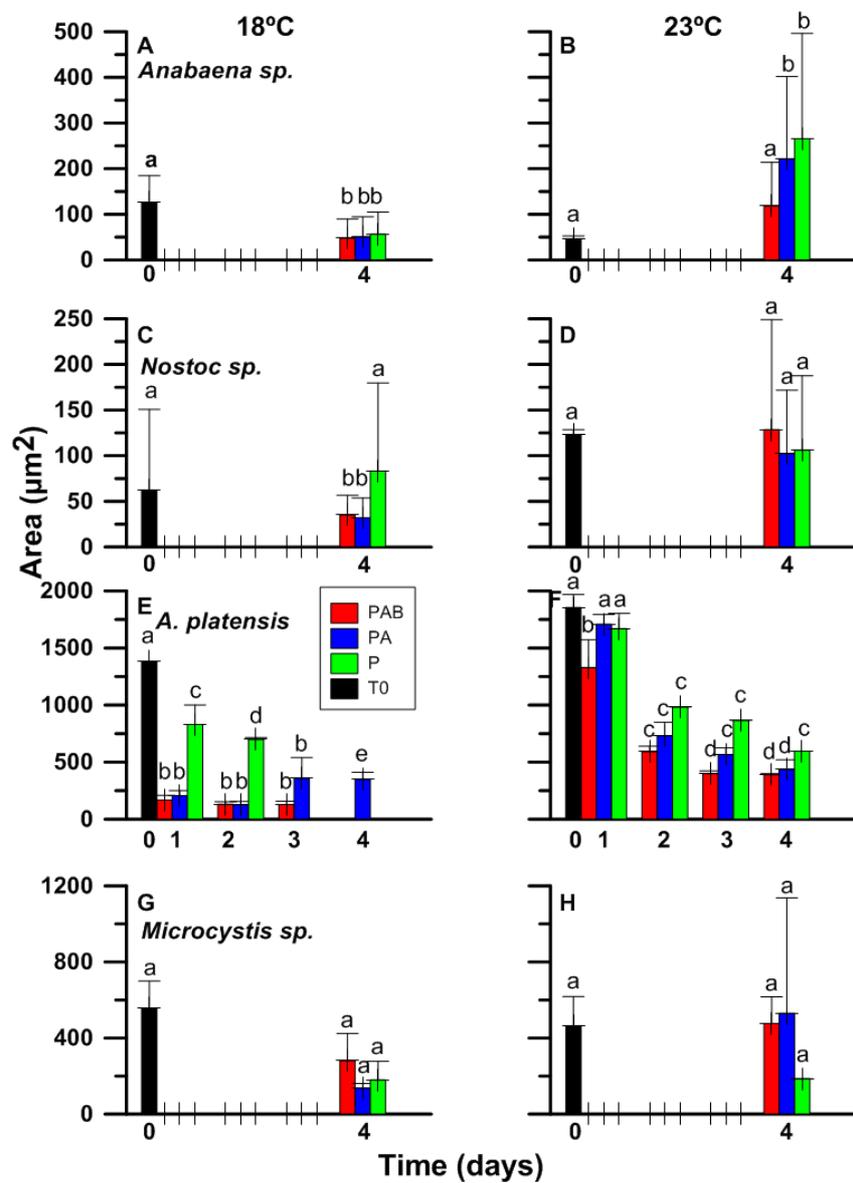


Fig. 4.5 Cambios en el área (en μm^2) de: (A y B) filamentos de *Anabaena sp.* (C y D) filamentos de *Nostoc sp.* (E y F), tricomas de *A. platensis* y (G y H) y colonias de *Microcystis sp.* Los paneles de la izquierda y de la derecha corresponden a experimentos realizados a 18 y 23° C, respectivamente. Las columnas negras representan el área al inicio del experimento mientras que las rojas, azules y verdes representan el área final de los tratamientos: PAB, PA y P, respectivamente. Las líneas sobre las barras indican el desvío estándar.

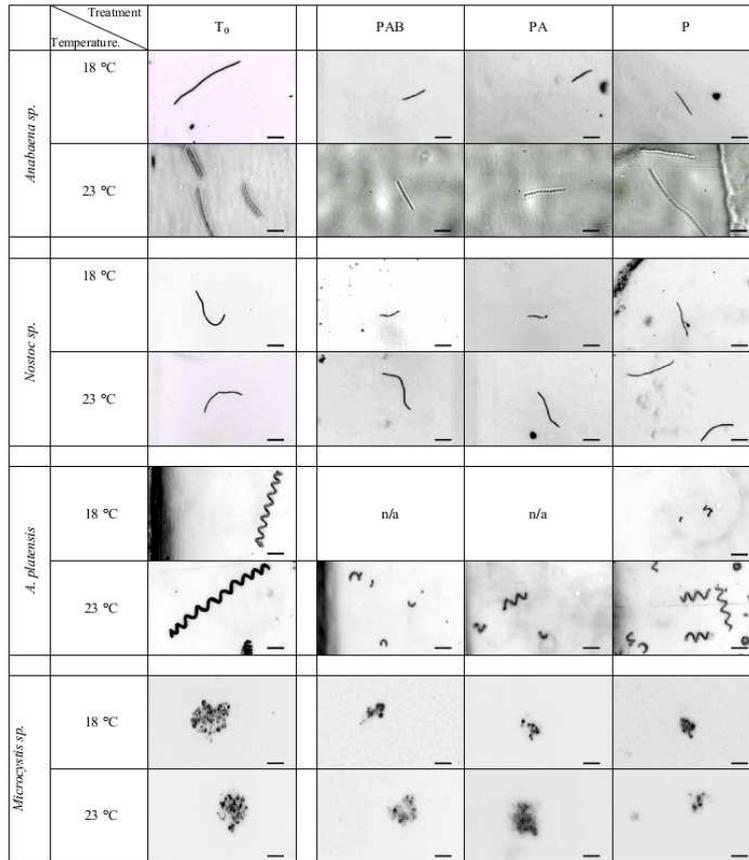


Fig. 4.6 Fotografías mostrando los cambios morfológicos de *Anabaena* sp., *Nostoc* sp. *A. platensis* y *Microcystis* sp. expuestas a diferentes tratamientos de radiación y temperatura. El largo de la barra de medición es de 20 μ m.

4.4 DISCUSIÓN

Los resultados presentados en esta sección del capítulo contribuyen a entender los efectos interactivos de la temperatura y la RUV solar sobre diferentes especies de cianobacterias cuando se exponen a niveles de radiación como los que ocurren naturalmente en la Patagonia, y simulando un aumento de temperatura debido al cambio climático como está predicho para el año 2100 (Houghton *et al.* 2001). El hallazgo más importante de este trabajo consiste en que un aumento de temperatura tiene diferentes resultados: benefició a dos de las cuatro especies estudiadas (*Anabaena* sp. y *Nostoc* sp.) mientras que no generó efectos aparentes en las otras dos especies (*A. platensis* y *Microcystis* sp.). Los efectos benéficos de la temperatura en *Anabaena* sp. y *Nostoc* sp. se tradujeron en una mejora en el rendimiento fotosintético fotoquímico (Fig. 4.2), lograda mayormente por las altas recuperaciones (tanto durante la tarde como durante la noche, Fig. 4.4) hacia el final del experimento. *A. platensis* y *Microcystis* sp., por su parte, mostraron mejor respuesta fotosintética en el día a día (Fig. 4.2) mientras que no se evidenció un efecto de la temperatura en la recuperación de la fotosíntesis. Los resultados de este estudio resaltan la importancia de las respuestas especie-específicas de las cianobacterias cuando son expuestas a la RUV y a un aumento de la temperatura. En los próximos párrafos se discutirán las posibles causas de las diferentes respuestas exhibidas por las distintas especies usadas en este estudio.

En principio, un mejor desempeño fotosintético significaría una mejor utilización de la radiación solar para producir biomasa. Previamente se ha demostrado (Halac *et al.* 2010) que algunas especies de diatomeas se benefician con un aumento de temperatura y que el balance entre inhibición / recuperación del desempeño fotosintético cambió, dado que las células se recuperaron o disiparon más energía. En este trabajo se observó una respuesta similar, i.e. como una mayor recuperación (Fig. 4.2). Dentro de ciertos límites de tolerancia y del rendimiento fotosintético de cada especie, un aumento de temperatura supondría un aumento de las tasas metabólicas lo cual ayudaría a las células a reparar cualquier daño potencial ocasionado por la RUV. Uno de los objetivos (*targets*) de la RUV dentro del fotosistema II es la proteína D1 (Sicora *et al.* 2006) y se ha demostrado que un aumento de temperatura resultaría en una rápida reposición y reparación de ésta, hecho que se traduciría en una mejor respuesta fotosintética (Bouchard *et al.* 2005). En este estudio, sin embargo, no se midieron los niveles de proteínas D1 y no todas las especies mostraron una mejor respuesta fotosintética a mayores temperaturas (Fig.

4.2-4.4). Por lo tanto, este mecanismo (i.e. rápida reposición y reparación de la proteína D1) podría haber influido solo parcialmente en las respuestas fotosintéticas observadas en algunas especies utilizadas en este trabajo. Además, cuando fueron expuestas a temperaturas más altas, en algunas especies podría haberse encontrado una mayor actividad o cantidades más altas de RUBISCO. Sin embargo, debido al volumen limitado de muestra (i.e., volumen de los contenedores / espacio en el incubador), estas mediciones no se llevaron a cabo.

Las diferentes respuestas y sensibilidad a la RUV de las cianobacterias fue previamente abordada en otros estudios (Garcia-Pichel 1998, Ehling-Schulz & Scherer 1999). Se propuso que estas diferencias se deben a sus diferentes historias evolutivas recientes (Garcia-Pichel 1998); sin embargo, otros estudios (Wu *et al.* 2005) encontraron que en cambio, la historia lumínica previa de las células a las cuales fueron aclimatadas tenía una influencia más importante en las respuestas observadas. En nuestro caso, y dado que todos los cultivos fueron pre-aclimatados y expuestos a condiciones de radiación similares, las respuestas observadas parecen estar más relacionadas a otras variables, tales como la temperatura y / o cambios morfológicos ocurridos a lo largo del experimento. Además, las diferencias en las respuestas observadas en las cuatro especies de cianobacterias estudiadas pueden ser parcialmente explicadas por el grado y/o la eficiencia de los diferentes mecanismos de protección utilizados por cada especie. Por ejemplo, la síntesis de CARUV, como los aminoácidos tipo micosporinas, se ha descrito previamente para *Microcystis* sp. (Liu *et al.* 2004) y *Nostoc* sp. (Ehling-Schulz *et al.* 1997, Sinha *et al.* 2001) pero en este estudio, sin embargo, no se encontraron cantidades significativas de estos compuestos en los espectros metanólicos (i.e. medidas espectrofotométricas) de estas especies. Por otra parte, se encontraron cantidades importantes de CARUV sólo en el tratamiento P de *Anabaena* sp. (datos no mostrados); estos compuestos, sin embargo, no fueron inducidos por la RUV como ha sido determinado en estudios previos (Sinha *et al.* 2001). Finalmente, en el caso de *A. platensis* se encontraron cantidades insignificantes de CARUV de acuerdo con estudios previos realizados con esta especie (Wu *et al.* 2005, Gao *et al.* 2008).

En este estudio, los cambios morfológicos observados en cada cianobacteria fueron diversos y en algunos casos no pueden ser asociados a un solo factor (i.e., temperatura o RUV). Sin embargo, algunos estudios previos mostraron la influencia de varios factores (por ej., temperatura, composición del medio de cultivo, salinidad) en la morfología de cepas de *Anabaena* y *Nostoc* (Stulp & Stam 1984, Zapomělová *et al.* 2008). En el caso particular de *Anabaena*, se encontró

que la RUV solar inhibía el desarrollo de heterocistos responsables de la fijación del nitrógeno atmosférico (Gao *et al.* 2007b, Lesser 2008) y cuando se incubaban las muestras a 20° C, se reducía el largo del tricoma hasta un 49% (Gao *et al.* 2007b). En este trabajo, se encontró que cuando se exponían bajo RUV a 18° C, *Nostoc* sp. y *Anabaena* sp. sufrían una reducción significativa en el área del filamento, mientras que a 23° C se observaba un aumento para *Anabaena* sp. pero no para *Nostoc* sp. (Figs. 4.5 y 4.6). Estos resultados muestran que un aumento de la temperatura contrarresta parcialmente los efectos que la RUV tiene en la morfología de estas especies. La disminución en el área de los tricomas de *A. plantensis* a lo largo del experimento, observada para todos los tratamientos de radiación y temperatura, se condice con resultados anteriores (Wu *et al.* 2005, Gao *et al.* 2008). El área del tricoma se redujo significativamente cuando se lo expuso bajo RUV (Fig. 4.5 y 4.6), pero también se observó este comportamiento en muestras expuestas solo a PAR. Los cambios morfológicos observados parecen contrarrestar parcialmente la disminución del Y inducida por la RUV, especialmente a 23° C. Esto puede deberse al mecanismo de “auto-sombreado” propuesto por Gao *et al.* (2008) el cual parece ser altamente efectivo en cultivos densos. Sin embargo, y dado que se trabajó con cultivos diluidos, las células deben haber estado sobre-expuestas a la RUV y los cambios morfológicos pueden no haber sido suficientes para neutralizar completamente los efectos negativos causados por los niveles relativamente altos de radiación solar como los que se reciben en el área de estudio (Fig. 4.1). Finalmente, y según nuestro conocimiento, esta es la primera vez que se reportan los efectos combinados de la RUV y de la temperatura sobre la morfología de *Microcystis* sp. No se observaron cambios en el área de la colonia en todas las condiciones experimentales, de acuerdo con estudios previos (Wu *et al.* 2008) que mostraron que la exposición a bajas temperaturas y oscuridad no producía efectos en la morfología de esta especie. Esto también concuerda con la respuesta fotosintética de *Microcystis* sp. observada en este trabajo, donde casi no se detectan diferencias entre los tratamientos de radiación y temperatura. Sin embargo, otros factores podrían influir en la morfología, tal como se describió para *Microcystis aeruginosa* bajo presión de pastoreo (Yang *et al.* 2008), lo que indujo la formación de colonias y por lo tanto un incremento de su tamaño. Los cambios morfológicos, ya sea reducción o aumento del área de la célula / colonia alteran la relación superficie / volumen y por tanto la radiación recibida por las células / colonias también variaría. Cómo estos cambios afectan el rendimiento fotosintético, depende de muchas variables que incluyen la pre-aclimatación de las

células, la cantidad de radiación incidente y la temperatura, entre otros. En este caso, y como se discutió anteriormente, esta relación entre cambios morfológicos y fotosíntesis fue evidente para *A. platensis*. Sin embargo, deberían realizarse otros estudios para elucidar cómo los cambios en la morfología condicionarían la aclimatación de las células y por ende, su rendimiento fotosintético. El aumento de los gases invernadero (por ej. vapor de agua, dióxido de carbono, óxido nitroso, etc.) y de origen antrópico han causado un proceso de cambio climático que se asocia con el aumento global de la temperatura (Houghton *et al.* 2001, Hansen *et al.* 2006, Paerl & Huisman 2008) y una reducción de la capa de ozono, incrementándose de esta manera los niveles de radiación que llegan a la superficie terrestre (McKenzie *et al.* 2003). Estos factores han condicionado la vida en los ecosistemas acuáticos, afectando a algunos organismos, i.e. ya sea causando la extinción de especies (Thomas *et al.* 2004), cambios en la dinámica de la población (Molinero *et al.* 2008) o favoreciendo a otros, entre los que se encuentran las cianobacterias que parecen verse beneficiadas y proliferar bajo temperaturas aumentadas (Paerl & Huisman 2008). Aquí se muestra que las respuestas a las variables asociadas al cambio climático son especie-específicas: un aumento de temperatura evita una disminución en el área de los filamentos / tricomas de *Anabaena* sp., *Nostoc* sp y *A. platensis* mientras que también beneficia la recuperación fotosintética de *Anabaena* sp. y *Nostoc* sp. luego de la exposición a la RUV. Aún se desconoce cómo estos mecanismos impactarán en las redes tróficas acuáticas y en la producción, pero merece ser investigado.

PARTE B

A raíz de que dos de las especies estudiadas en la Parte A fueron anteriormente descritas como potenciales productoras de compuestos fotoprotectores – CARUV (Sinha *et al.* 2001, Lesser 2008, Singh *et al.* 2010), se realizó un experimento, donde se evaluó su síntesis bajo diferentes tratamientos de radiación y temperatura, utilizando cultivos de *Anabaena* sp. y *Nostoc* sp. Los resultados de este experimento adicional tienen por lo tanto, el objetivo de evaluar la potencial síntesis de compuestos fotoprotectores cuando las cianobacterias son expuestas a diferentes temperaturas y rangos de longitudes de onda particulares como mecanismo para reducir los efectos negativos ocasionados por la exposición a la RUV.

4.5 MATERIALES Y MÉTODOS

4.5.1 Condiciones de cultivo

Las condiciones de cultivo han sido las mismas que las presentadas en la Parte A de este capítulo, pero esencialmente consistieron en cultivar *Anabaena* y *Nostoc* sp. en medio BG-11 (Rippka 1988) a dos temperaturas experimentales: 18° C y 23° C, bajo iluminación PAR (300 $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) con un fotoperíodo 12L:12O, para luego ser utilizadas en los experimentos tal como se describe a continuación:

4.5.2 Condiciones experimentales y protocolo de muestreo

Los cultivos pre-aclimatados a las dos temperaturas se colocaron en recipientes transparentes a la RUV (1000 ml) y se expusieron por triplicado a 18 y 23° C, bajo tres tratamientos de radiación: (i) P [PAR (400–700 nm), tubos cubiertos con filtros Ultraphan UV Opak 395], (ii) PA [PAR + RUV-A (320–700 nm), tubos cubiertos con filtros Montagefolie 320 y (iii) PAB [PAR + RUV-A + RUV-B (280–700 nm), tubos descubiertos] durante 3-5 días. Las muestras se expusieron en una cámara (Sanyo modelo MLR) provista de tubos fluorescentes luz día (300 $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ de PAR) y cinco lámparas Q-Pannel (modelo UVA-340) que en conjunto aportaron irradiancias medias de 66, 15.3 y 0.7 $\text{W}\cdot\text{m}^{-2}$ de PAR, RUV-A y RUV-B, respectivamente, con un fotoperíodo 12L:12O. Hacia el final de cada ciclo de exposición / oscuridad y al inicio del experimento se recolectaron muestras para la determinación de la concentración de Clor-a y de CARUV.

4.5.3 Mediciones y análisis

4.5.3.1 Concentración de pigmentos y CARUV

Se filtró una alícuota de 20 ml de muestra en filtros GF-C (Munktell, Suecia) y se extrajeron los pigmentos fotosintéticos y los CARUV en 5 ml de metanol. Los tubos con el extracto metanólico fueron sonicados durante 20 min a 20° C, luego de los cuales se dejó extraer por otros 40 min. Después de centrifugar los tubos por 20 min, se obtuvo el espectro de absorción de las muestras mediante un barrido entre 250 y 750 nm con un espectrofotómetro (Hewlett Packard, modelo HP 8453E). La concentración de Clor-a se calculó con las ecuaciones de Porra (2002), el mismo extracto se utilizó para calcular la concentración de Clor-a mediante a partir de la fluorescencia del extracto (Holm-Hansen & Riemann 1978) antes y después de acidificar con HCl 1 N usando un fluorómetro (Turner Designs, modelo TD 700). Los CARUV fueron estimados por la altura del pico a 330-337 nm como describieron previamente Dunlap *et al.* (1995).

4.5.3.2 Cálculos y estadística

Estos experimentos se realizaron por triplicado para cada tratamiento de radiación (a cada temperatura experimental), por lo que los datos se expresan como la media y su desvío estándar. Para calcular las tasas de evolución de la Clor-a se realizó un ajuste lineal con los datos y se obtuvo la pendiente de la recta. Para calcular las tasas de síntesis de CARUV, se realizó un ajuste lineal con los puntos correspondientes a la recta de máxima pendiente y se obtuvo el valor de la misma. De esta forma, la tasa obtenida representa la máxima tasa de síntesis de CARUV. Para determinar las diferencias entre los tratamientos de radiación a lo largo del experimento se utilizó un ANOVA de medidas repetidas, para determinar interacciones entre los tratamientos de radiación y temperatura se utilizó un ANOVA de dos vías, y para determinar interacciones entre los tres factores: especies, temperatura y radiación en las tasas calculadas se utilizó un ANOVA de tres vías. En todos los casos se eligió como test post-hoc el Fisher-LSD (*Least Significant Difference*).

4.6 RESULTADOS

La evolución de la Clor-a de las dos especies bajo los diferentes tratamientos de radiación y temperatura se muestra en la Fig. 4.7. Se observaron diferencias en la evolución de la Clor-a en *Anabaena* sp. (Fig. 4.7 A) para las diferentes temperaturas experimentales: las muestras que se expusieron a 18° C mostraron una disminución inicial en los valores de Clor-a para luego mantenerse estables mientras que las muestras expuestas a 23° C, si bien mostraron una leve disminución al inicio, alcanzaron valores mayores a los iniciales hacia el final del experimento; por otra parte, no se detectaron diferencias entre los tratamientos de radiación a lo largo del experimento para ninguna de las temperaturas experimentales. Por su parte *Nostoc* sp. (Fig. 4.7 B), mostró diferentes respuestas tanto para sus tratamientos de radiación como de temperatura. Si bien las muestras bajo el tratamiento PAB a 18° C mostraron una marcada disminución en sus valores de Clor-a, no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos de radiación a 18° C. Por su parte, los tratamientos PA y P de esta temperatura se mantuvieron valores estables a lo largo del experimento sin observarse un aumento de la concentración de Clor-a. Por su parte, las muestras expuestas a 23° C mostraron valores similares de Clor-a a lo largo del experimento y no se detectaron diferencias significativas entre los tratamientos de radiación a lo largo del experimento. Dado que los cultivos fueron previamente aclimatados a diferentes temperaturas, sus concentraciones iniciales de Clor-a difieren; por esta razón se calcularon las tasas de cambio de la Clor-a para cada tratamiento y se compararon mediante un ANOVA de tres vías para detectar diferencias entre las cianobacterias y los tratamientos de radiación y temperatura (Tabla 4.1). Los resultados obtenidos mostraron una interacción entre radiación, temperatura y especie, siendo la tasa de cambio para el tratamiento PAB de *Nostoc* sp. a 18°C menor que el resto de los tratamientos. Por su parte, al considerar solo las tasas de *Anabaena* sp., se observó un efecto de la temperatura, siendo las tasas a 23°C mayor que las de 18°C ($p < 0.05$), mientras que para *Nostoc* sp., se observó una interacción entre radiación y temperatura siendo la tasa del tratamiento PAB a 18°C menor que las demás.

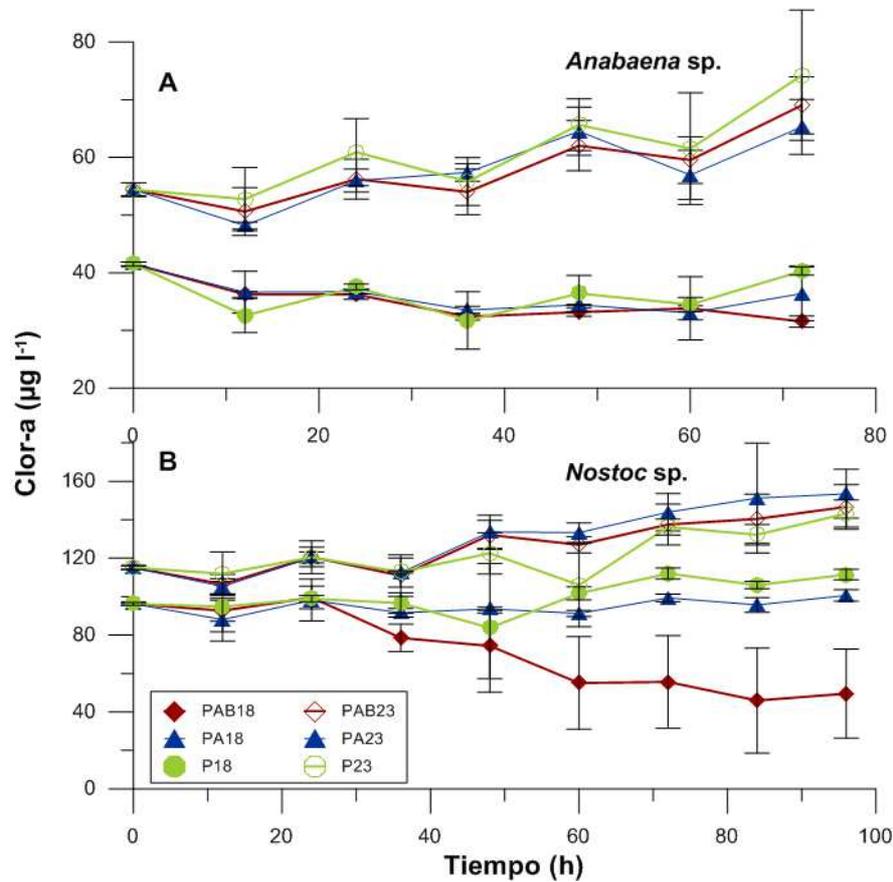


Fig. 4.7 Evolución de la concentración de Clor-a a lo largo de los experimentos realizados con muestras de *Anabaena sp.* y *Nostoc sp.* expuestas a diferentes tratamientos de radiación (PAB: rombos rojos, PA: triángulos azules y P: círculos verdes) y temperatura (símbolos llenos: muestras a 18°C y símbolos vacíos: muestras a 23°C).

Los espectros de absorción de las muestras expuestas a los diferentes tratamientos se muestran en la Fig. 4.8. Se puede observar el aumento de la altura del pico correspondiente a los CARUV en *Anabaena sp.* (Figs. 4.8 A y B), mientras que por su parte, las muestras de *Nostoc sp.* no mostraron un crecimiento en la altura de sus picos de CARUV, tanto cuando fueron expuestos a 18 como a 23°C.

Tabla 4.1 Tasa de cambio de la Clor-a para los diferentes tratamientos de radiación y temperatura durante el experimento. Las últimas siete filas detallan los resultados del ANOVA de tres vías realizado con estos valores para determinar los efectos de la radiación, temperatura y especie o de su combinación (se muestra el valor de p).

	<i>Anabaena sp.</i>		<i>Nostoc sp.</i>	
	18°C	23°C	18°C	23°C
PAB	-0.11±0.03	0.20±0.05	-0.56±0.31	0.00±0.10
PA	-0.07±0.05	0.20±0.06	0.06±0.07	0.18±0.18
P	-0.00±0.02	0.24±0.13	0.15±0.07	0.12±0.07
Especie			5.80x10 ⁻²	
Temperatura			3.00x10 ⁻⁵	
Radiación			1.14x10 ⁻⁶	
Especie x Temperatura			5.00x10 ⁻¹	
Especie x Radiación			1.67x10 ⁻³	
Temperatura x Radiación			9.73x10 ⁻³	
Especie x Temperatura x Radiación			4.16x10 ⁻²	

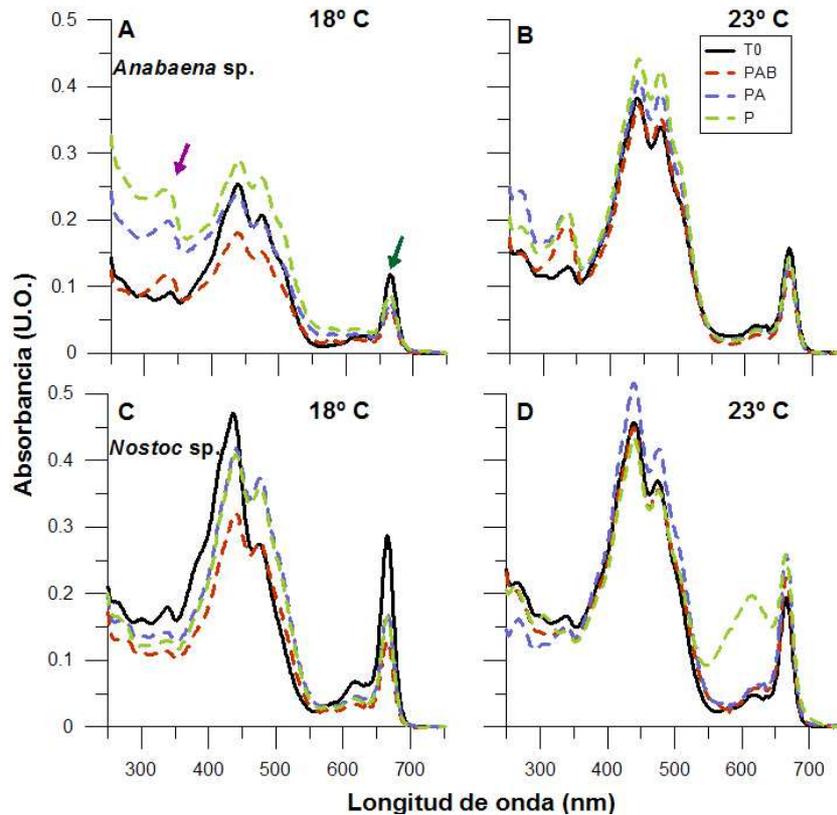


Fig. 4.8 Espectro de absorción de las muestras de *Anabaena* sp. (A y B) y *Nostoc* sp. (C y D) al inicio (línea llena negra) y al final del experimento: tratamientos PAB, PA y P (líneas cortadas de color rojo, azul y verde, respectivamente). Los paneles de la izquierda y de la derecha corresponden a las muestras expuestas a 18° C y 23° C, respectivamente. Las flechas violeta y verde indican los picos de absorción utilizados para el cálculo de la altura del pico de CARUV y la concentración de Clor-a, respectivamente.

La evolución de los CARUV a lo largo del experimento se muestra en la Fig. 4.9. Para *Anabaena* sp. (Fig. 4.9 A) se observaron diferencias entre los tratamientos de radiación, que fueron comprobadas estadísticamente: para las muestras expuestas a 23 °C, si bien las diferencias fueron significativas ($p= 0.010$), el test *a posteriori* no pudo identificar los tratamientos diferentes mientras que a 18 °C, las muestras bajo el tratamiento PAB sintetizaron cantidades significativamente menores de CARUV ($p= 0.032$) que las del tratamiento PA y P. Es de destacar que este comportamiento fue completamente opuesto al observado para las muestras expuestas a mayor temperatura. Para *Nostoc* sp. (Fig. 4.9 B), se observó que la síntesis de estos compuestos era menor que la observada para *Anabaena* sp., con valores de altura de pico más bajos y valores

finales de altura de pico iguales o menores a los iniciales. No se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos de radiación a lo largo del experimento.

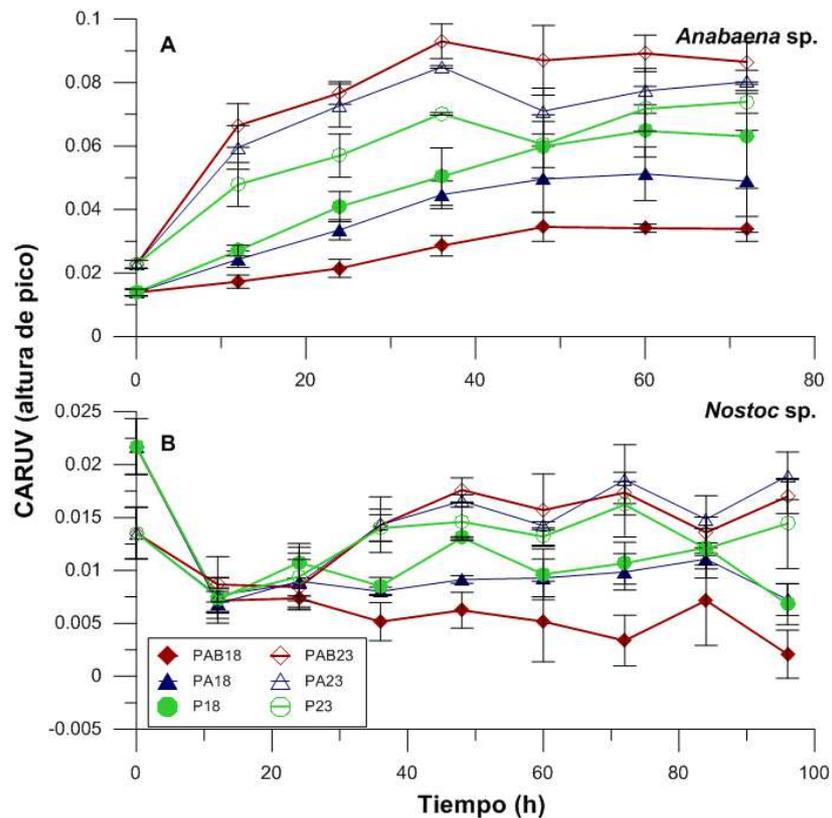


Fig. 4.9 Evolución de la altura del pico correspondiente a los CARUV a lo largo de los experimentos realizados con muestras de *Anabaena sp.* y *Nostoc sp.* expuestas a diferentes tratamientos de radiación (PAB: rombos rojos, PA: triángulos azules y P: círculos verdes) y temperatura (símbolos llenos: muestras a 18°C y símbolos vacíos: muestras a 23°C).

A fin de comparar la síntesis de CARUV entre las especies se calcularon sus tasas de crecimiento para cada tratamiento de radiación y temperatura y para las dos cianobacterias estudiadas, luego de lo cual se compararon mediante un ANOVA de tres vías. Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 4.2. Se detectó una interacción entre la especie, la temperatura y la radiación siendo las tasas de síntesis de *Anabaena sp.* mayores que las de *Nostoc sp.* A su vez, la tasa del tratamiento PAB a 18°C para *Anabaena sp.* fue menor que las tasas para PA y P de la misma temperatura y que la del tratamiento P a 23°C. Finalmente, las tasas más altas fueron para los tratamientos PAB y PA a 23° de la misma especie.

Tabla 4.2 Tasa de síntesis de la CARUV para los diferentes tratamientos de radiación y temperatura durante el experimento. Las últimas siete filas detallan los resultados del ANOVA de tres vías realizado con estos valores para determinar los efectos de la radiación, temperatura y especie o de su combinación.

	<i>Anabaena sp.</i>		<i>Nostoc sp.</i>	
	18°C	23°C	18°C	23°C
PAB	4.16±1.11	18.1±1.25	-0.41±0.87	-1.10±1.03
PA	8.90±1.26	16.6±0.11	0.49±0.54	-1.08±1.33
P	11.0±2.33	12.8±2.22	1.28±0.40	-1.83±0.82
Especie	0.00x10 ¹			
Temperatura	0.00x10 ¹			
Radiación	1.65x10 ⁻¹			
Especie x Temperatura	0.00x10 ¹			
Especie x Radiación	5.29x10 ⁻¹			
Temperatura x Radiación	2.00x10 ⁻⁶			
Especie x Temperatura x Radiación	4.09x10 ⁻⁴			

4.7 DISCUSIÓN

Los organismos acuáticos utilizan diferentes mecanismos para evadir / contrarrestar los efectos negativos de la RUV: evasión (Rocco *et al.* 2002, Leech *et al.* 2005,), reparación enzimática del daño (Sanders *et al.* 2005) y síntesis de compuestos fotoprotectores (Rocco *et al.* 2002, Sommaruga *et al.* 2009). Entre los compuestos fotoprotectores se incluyen los aminoácidos tipo micosporinas (MAAs). Los MAAs son compuestos ampliamente distribuidos en organismos acuáticos, habiendo sido identificados en organismos muy diversos taxonómicamente (Dunlap & Shick 1998, Sinha *et al.* 2007). Se han propuesto diversas funciones para estos compuestos (Oren & Gunde-Cimerman 2007), entre los que figuran la ormorregulación, su función antioxidante y su función fotoprotectora (Korbee *et al.* 2006). Esta última es la función más ampliamente aceptada, existiendo una extensa literatura que describe la inducción de MAAs por la RUV (Rocco *et al.* 2002, Tartarotti & Sommaruga 2006, Sommaruga *et al.* 2009). Sin embargo, en este estudio se demostró que para *Anabaena* sp., la síntesis de CARUV no se veía inducida mayoritaria o exclusivamente por la porción del ultravioleta, como había sido descrito en trabajos anteriores (Shick *et al.* 1999, Ben-Yosef *et al.* 2006,) sino también por la porción del PAR. Karsten *et al.* (1998) encontraron que si bien la síntesis de algunos MAAs, como shinorine, eran más estimulada por la RUV, la de otros MAAs lo era por PAR, lo que indicaría una inducción específica de diferentes MAAs por las distintas porciones del espectro electromagnético.

En los experimentos, por otra parte, se pudo comprobar que a temperaturas más bajas, la síntesis de CARUV en *Anabaena* sp. era menor en las muestras que recibieron RUV-B (tratamiento PAB) que en aquellas que no lo hicieron (tratamientos PA y P), observándose lo contrario en la exposición a temperaturas más altas, lo que evidencia un efecto interactivo de la radiación y la temperatura. Esto puede deberse a una mayor actividad enzimática a temperaturas altas, que permitió aumentar tanto la síntesis de MAAs como la reparación de los daños generados por la RUV-B (MacFadyen *et al.* 2004, Bouchard *et al.* 2005), mientras que a temperaturas bajas, la actividad de las enzimas de reparación no fue suficiente para contrarrestar los efectos negativos producidos por la RUV. Varios estudios destacan el rol de la temperatura como inductor de la síntesis de compuestos fotoprotectores: Tartarotti *et al.* (2006), estudiando los cambios de MAAs en organismos planctónicos de un lago alpino, encontraron que el contenido de estos en el

fitoplancton, relativo al de la Clor-a, estaba relacionado con la transparencia a la RUV del agua y la radiación solar incidente, pero de manera más importante con la temperatura del agua. En concordancia con esto, varios estudios realizados en organismos marinos y de agua dulce que bioacumulan MAAs encontraron que las mayores concentraciones estaban relacionados entre otras variables, con la temperatura del agua (Shick *et al.* 1996, García *et al.* 2010,).

En la Parte A de este capítulo se pudo observar que la exposición de las muestras a 18°C provocaba la reducción del área del filamento para *Anabaena* sp, observándose lo contrario a 23°C, siendo esto acompañado por una recuperación del Y (relativo al valor inicial) que, aunque con diferencias para los distintos tratamientos de radiación, fue mayor a 23°C. Estos resultados concuerdan con un estudio previo en el que la exposición de *Anabaena* sp. PCC7120 a la RUV provocó una disminución del 90% en la eficiencia fotoquímica y una disminución del 49% en la longitud del tricoma (Gao *et al.* 2007b). En la Parte B, se comprobó que esta especie además sintetizaba CARUV, lo que fue acompañado por el aumento o estabilidad a lo largo del experimento de las concentraciones de Clor-a, sin observarse diferencias entre tratamientos de radiación. Estos resultados muestran que la cianobacteria estudiada puede valerse de ambos mecanismos (cambios morfológicos y síntesis de compuestos fotoprotectores) para contrarrestar el impacto inicial de la RUV en su fotosistema. Mientras tanto, y aún cuando estudios previos indicaban que *Nostoc* sp. producía cantidades significativas de CARUV (Sinha *et al.* 2001), la cepa utilizada en el presente estudio produjo concentraciones insignificantes, lo que se vio acompañado por una estabilidad o disminución en las concentraciones de Clor-a a lo largo del experimento, siendo esto último particularmente para el tratamiento que recibió RUV-B a bajas temperaturas de exposición. En concordancia con estos resultados, en la Parte A se pudo observar que las muestras expuestas a la RUV sufrían disminuciones en el área de sus filamentos a bajas temperaturas y se recuperaban en menor grado que las expuestas a mayor temperatura; éstas últimas a su vez no sufrían cambios morfológicos. En el caso de esta cianobacteria, puede que los mecanismos de defensa utilizados sean otros y que estos se vean beneficiados por el aumento de la temperatura como pueden ser: síntesis *de novo* de proteínas afectadas (por ej. D1) o reparación del ADN y síntesis de pigmentos extracelulares (Ehling-Schulz & Scherer 1999, Castenholz & Garcia-Pichel 2002).

Como conclusión se puede afirmar al estudiar dos mecanismos de protección frente a la RUV utilizados por las cianobacterias (los cambios morfológicos y la síntesis de compuestos

fotoprotectores) que son de tipo especie-específico. Por lo tanto, no todas las especies exhibieron los mismos y a su vez, el grado de efectividad de los mecanismos desplegados también varió de acuerdo a la especie estudiada.

Capítulo 5

Conclusiones Generales

Los resultados obtenidos en esta Tesis muestran que las cianobacterias tienen una gran adaptabilidad tanto a las condiciones normales como aumentadas en los niveles de RUV y aquellas de temperaturas previstas como consecuencia de los cambios climáticos. Tanto si se encuentran como parte dominante del fitoplancton a lo largo del año (Capítulo 3) como si su dominancia es circunstancial (Capítulo 2), sus respuestas demuestran que poseen una gran versatilidad para aclimatarse a las condiciones de estrés. Esta versatilidad en las respuestas varían dependiendo de la composición de las muestras: en la laguna Cacique Chiquichano se observó una fuerte aclimatación en invierno y primavera cuando la comunidad estuvo dominada por cianobacterias pequeñas (*Aphanothece*, *Synechocystis*), y una menor aclimatación cuando aparecieron cianobacterias más grandes (*Microcystis*, *Anabenopsis*), lo que evidenció un fuerte componente especie-específico en las respuestas mostradas por las diferentes comunidades (Capítulo 2). Sin embargo, en todos los casos, la fotoinhibición fue alta cuando se evaluaron escalas temporales cortas (ciclos diarios) pero disminuyó cuando se evaluaron escalas temporales más largas (experimentos de mediano plazo). Además, los mayores valores de fotoinhibición se observaron cuando el porcentaje de abundancia de las cianobacterias era muy bajo y la comunidad se encontraba dominada por clorofíceas. Por su parte, la laguna Don Tomás, dominada a lo largo de todo el año por *Planktothrix agardhii* mostró respuestas generalmente uniformes, cuya estabilidad se perdió cuando se observó un marcado desmejoramiento en las condiciones fisiológicas de las algas, que pudo haberse debido al consumo del oxígeno durante la noche por la abundante biomasa que debe sostener el sistema (Capítulo 3).

Así como las respuestas variaron de acuerdo a la composición de las comunidades, los mecanismos que permitieron la adaptación a las condiciones experimentales variaron entre las diferentes especies. De esta forma, las respuestas especie-específicas observadas incluyeron cambios morfológicos en el caso de *Arthrospira platensis* (Capítulo 4), la síntesis de CARUV en el caso de *Anabaena* sp. (Capítulo 4) o de carotenoides en el caso de *P. agardhii* (Capítulo 3).

Con respecto a las hipótesis planteadas en esta Tesis (ver Capítulo 1) se concluye que:

- 1) *Hipótesis 1₁: la actividad de la enzima interviniente en el metabolismo del nitrógeno, glutamina sintetasa, disminuye al ser expuestas las cianobacterias a la RUV.*

Hipótesis 1₂: Sin embargo, un aumento de temperatura actúa en forma antagónica con la RUV ya que aumenta la actividad enzimática.

Esta hipótesis se trabajó en conjunto (Capítulos 2 y 3) y se pudo observar que en las condiciones experimentales utilizadas la actividad GS de comunidades naturales no cambió por exposición de la comunidad a la RUV ni por el aumento de temperatura. Por lo tanto, esta hipótesis **se rechaza**.

- 2) *Hipótesis 2: la forma y tamaño celular condicionan la respuesta de las células a la RUV, por esto la RUV afecta en corto tiempo más el fotosistema de cianobacterias filamentosas que a las que forman agregados celulares globosos.*

En el Capítulo 4 se trabajó con tres cianobacterias filamentosas (*A. platensis*, *Nostoc* sp. y *Anabaena* sp.) y una formadora de agregados celulares globosos (*Microcystis* sp.). Con respecto a las tres cianobacterias filamentosas, se observó que el fotosistema más afectado fue el de *A. platensis* mientras que los de las cianobacterias *Nostoc* sp. y *Anabaena* sp. fueron muy afectados inicialmente (en corto tiempo) pero pudieron aclimatarse a mediano plazo. Por su parte, la cianobacteria que forma agregados celulares globosos, *Microcystis* no sufrió cambios en su fotosistema. Por este motivo, esta hipótesis **no se rechaza**.

- 3) *Hipótesis 3: La exposición a la RUV modifica la morfología de las cianobacterias*

Esta hipótesis **no se rechaza** para las cianobacterias *Nostoc* sp. y *Anabaena* sp. que tuvieron cambios en su área al ser expuestas a la RUV, lo que le permitió disminuir su impacto a nivel del fotosistema. Sin embargo, **se rechaza** para la cianobacteria *Microcystis* sp. que no sufrió cambios morfológicos cuando se expuso a la RUV y para la cianobacteria *A. platensis*, que si bien sufrió cambios en el área de sus tricomas, estos no pudieron reducir el impacto de la RUV sobre su fotosistema (Capítulo 4).

- 4) *Hipótesis 4: los compuestos que absorben RUV actúan como protección inicial ante la RUV, e incrementan su concentración al ser expuestas las cianobacterias a la RUV.*

Esta hipótesis **no se rechaza** para la cianobacteria *Anabaena* sp., cuya síntesis de CARUV se vio inducida por la RUV, aunque también por la radiación PAR, lo que le confirió protección frente a los efectos deletéreos de la RUV que se vieron evidenciados en una recuperación del rendimiento fotoquímico y aumento de las concentraciones de Clor-a hacia el final del experimento. Sin embargo, cabe destacar que la temperatura actúa

de forma interactiva con la RUV, de manera que si la temperatura es muy baja, la síntesis bajo RUV es menor y las concentraciones de CARUV son menores cuando las muestras se exponen a PAR + RUV que cuando se exponen a PAR + RUV-A o únicamente a PAR. **Se rechaza** esta hipótesis para *Nostoc* sp., *A. plateis* y *Microcystis* sp. dado que las especies utilizadas no sintetizan CARUV (Capítulo 4).

- 5) *Hipótesis 5: los cambios generados por la exposición a la RUV y la aclimatación de las cianobacterias a los mismos, afectan al crecimiento observándose una disminución del mismo*

Esta hipótesis **se rechaza** ya que la exposición a la RUV y la adaptación de las cianobacterias no fue siempre acompañada de una disminución en el crecimiento (Capítulos 2, 3 y 4). En invierno en la laguna Cacique Chiquichano las muestras expuestas a la RUV tuvieron menor abundancia celular que aquellas expuestas únicamente a PAR, siendo esta diferencia mayor cuando las temperaturas eran menores. En las muestras de las otras estaciones de la laguna Cacique Chiquichano y en todas las muestras de la laguna Don Tomás no se detectaron diferencias entre las abundancias celulares. Mientras tanto, como se ha determinado en el Capítulo 4, la evolución de la Clor-a de las muestras de *Nostoc* sp. expuestas a la RUV-B fueron menores que aquellas en las que se excluyó a la RUV-B. Sin embargo, esta disminución no fue detectada cuando la temperatura fue mayor.

5.1 Nuevos interrogantes y perspectivas futuras de investigación

Las conclusiones principales en el marco de esta tesis se refieren principalmente a que las cianobacterias se encuentran muy adaptadas a las condiciones asociadas con el cambio climático y que el efecto de su exposición a la RUV y un aumento de la temperatura varía en función de la composición de las muestras, debido a los diferentes mecanismos de defensa presentes en cada especie de cianobacteria.

Dada la relevancia de estos organismos en la formación de floraciones y el deterioro de la calidad del agua, en muchos casos tratándose de fuentes de consumo humano surge como perspectiva futura de investigación la necesidad de estudiar más detalladamente la ecofisiología de las cianobacterias más comúnmente formadoras de floraciones en nuestro territorio, así como la influencia de diferentes tratamientos externos como pueden ser la mezcla, la cloración o la bio-

manipulación (inserción de macrófitas, eliminación de peces bentívoros) en la estabilidad de la floraciones. Esta información permitirá establecer un manejo local de la aparición y duración de las floraciones, así como un monitoreo de las condiciones para poder predecir la posible aparición floraciones.

Otra posible línea, y relacionada con la anterior, consiste en el estudio de la toxicidad de las cianobacterias presentes comúnmente en los cuerpos de agua en relación con los cambios anuales en los niveles de RUV y temperatura, para poder predecir los niveles de toxicidad de los cuerpos de agua y así poder tomar medidas en consecuencia.

Bibliografía

- Adams D (2002) Symbiotic Interactions. En: Whitton B, Potts M (eds) *The Ecology of Cyanobacteria*. Springer Netherlands
- Adams DG, Duggan PS (1999) Heterocyst and akinete differentiation in cyanobacteria. *New Phytologist* 144:3-33
- Adrian R, Wilhelm S, Gerten D (2006) Life-history traits of lake plankton species may govern their phenological response to climate warming. *Global Change Biology* 12:652-661
- Alonso C, Zagarese HE, Rocco V, Barriga JP, Battini MA (2004) Surface avoidance by freshwater zooplankton: Field evidence on the role of ultraviolet radiation. *Limnology and Oceanography* 49:225-232
- Alvarez SB, Bazán GI, Bernardos JN (2009) Diversidad fitoplanctónica en los cuencos principal y norte de la laguna Don Tomás (La Pampa, Argentina). *Limnetica* 28:253-260
- Amé MV, Díaz MdP, Wunderlin DA (2003) Occurrence of toxic cyanobacterial blooms in San Roque Reservoir (Córdoba, Argentina): a field and chemometric study. *Environmental Toxicology* 18:192-201
- Anagnostidis K, Komárek J (1985) Modern approach to the classification systems of Cyanophytes. 1. Introduction. *Archiv fuer Hydrobiologie. Supplementband. Algological Studies* 38 - 39: 291 – 302
- Anagnostidis K, Komárek J (1988) Modern approach to the classification system of Cyanophytes, 3. Oscillatoriales. *Archiv fuer Hydrobiologie. Supplementband. Algological Studies*. 80 1-4: 327-472
- Anderson DM, Glibert PM, Burkholder JM (2002) Harmful algal blooms and eutrophication: nutrient sources, composition and consequences. *Estuaries* 25 (4): 704–726
- Anneville O, Molinero JC, Souissi S, Balvay G, Gerdeaux D (2007) Long-term changes in the copepod community of Lake Geneva. *Journal of Plankton Research* 29:i49-i59
- Atkinson RJ, Matthews WA, Newman PA, Plumb RA (1989) Evidence of the mid-latitude impact of Antarctic ozone depletion. *Nature* 340:290-294
- Ballaré CL, Caldwell MM, Flint SD, Robinson SA, Bornman JF (2011) Effects of solar ultraviolet radiation on terrestrial ecosystems. Patterns, mechanisms, and interactions with climate change. *Photochemical & Photobiological Sciences* 10:226-241
- Banaszak AT (2003) Photoprotective physiological and biochemical responses of aquatic organisms. En: Helbling EW, Zagarese HE (eds) *UV effects in aquatic organisms and ecosystems*. The Royal Society of Chemistry, Cambridge
- Bastidas Navarro M, Balseiro E, Modenutti B (2011) UV radiation simultaneously affects phototrophy and phagotrophy in nanoflagellate-dominated phytoplankton from an Andean shallow lake. *Photochemical & Photobiological Sciences* 10:1318-1325
- Baulch HM, Schindler DW, Turner MA, Findlay DL, Paterson MJ, Vinebrooke RD (2005) Effects of warming on benthic communities in a boreal lake: Implications of climate change. *Limnology and Oceanography* 50:1377-1392
- Bebout BM, Garcia-Pichel F (1995) UV B-induced vertical migrations of cyanobacteria in a microbial mat. *Applied and Environmental Microbiology* 61:4215
- Belnap J, Gardner JS (1993) Soil microstructure in soils of the Colorado Plateau: The role of the cyanobacterium *Microcoleus vaginatus*. *Western North American Naturalist* 53:40-47
- Beman MJ, Arrigo KR, Matson PA (2005) Agricultural runoff fuels large phytoplankton blooms in vulnerable areas of the ocean. *Nature* 434:211-214
- Ben-Yosef DZ, Kashman Y, Benayahu Y (2006) Response of the soft coral *Heteroxenia fuscescens* to ultraviolet radiation regimes as reflected by mycosporine-like amino acid biosynthesis. *Marine Ecology* 27:219-228

- Berger C (1975) Occurrence of *Oscillatoria agardhii* Gom. in some shallow eutrophic lakes. *Verh Int Ver Theor Angew Limnol* 19
- Berman-Frank I, Lundgren P, Falkowski P (2003) Nitrogen fixation and photosynthetic oxygen evolution in Cyanobacteria. *Research in Microbiology* 154:157-164
- Boelen P, de Boer MK, Kraay GW, Veldhuis MJW, Buma AGJ (2000) UVBR-induced DNA damage in natural marine picoplankton assemblages in the tropical Atlantic Ocean. *Marine Ecology Progress Series* 193:1-9
- Bouchard JN, Campbell DA, Roy S (2005) Effects of UV-B radiation on the D1 protein repair cycle of natural phytoplankton communities from three latitudes (Canada, Brazil, and Argentina). *Journal of Phycology* 41:273-286
- Bouvy M, Falcao D, Marinho M, Pagano M, Moura A (2000) Occurrence of *Cylindrospermopsis* (Cyanobacteria) in 39 Brazilian tropical reservoirs during the 1998 drought. *Aquatic Microbial Ecology* 23:13-27
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72:248-254
- Branco AB, Kremer J (2005) The relative importance of chlorophyll and colored dissolved organic matter (CDOM) to the prediction of the diffuse attenuation coefficient in shallow estuaries. *Estuaries* 28:643-652
- Briand E, Gugger M, Francois J, Bernard C, Humbert J, Quiblier C (2008) Temporal variations in the dynamics of potentially microcystin-producing strains in a bloom-forming *Planktothrix agardhii* (cyanobacterium) population. *Applied and Environmental Microbiology* 74:3839-3848
- Bryant DA (1982) Phycoerythrocyanin and phycoerythrin: Properties and occurrence in cyanobacteria. *Journal of General Microbiology* 128:835-844
- Buma AGJ, Boelen P, Jeffrey WH (2003) UVR-induced DNA damage in aquatic organisms. En: Helbling EW, Zagarese HE (eds) *UV effects in aquatic organisms and ecosystems*. The Royal Society of Chemistry, Cambridge
- Callaghan TV, Björn LO, Chernov Y, Chapin T, Christensen TR, Huntley B, Ims RA, Johansson M, Jolly D, Jonasson S, Matveyeva N, Panikov N, Oechel W, Shaver G, Elster J, Jónsdóttir IS, Laine K, Taulavuori K, Taulavuori E, Zöckler C (2004) Responses to projected changes in climate and UV-B at the species level. *Ambio* 33
- Campbell D, Eriksson MJ, Öquist G, Gustafsson P, Clarke AK (1998) The cyanobacterium *Synechococcus* resists UV-B by exchanging photosystem II reaction-center D1 proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 95:364-369
- Caraco NF, Cole JJ, Likens GE (1992) New and recycled primary production in an oligotrophic lake: Insights for summer phosphorus dynamics. *Limnology and Oceanography* 37:590-602
- Carmichael WW (1992) Cyanobacteria secondary metabolites—the cyanotoxins. *Journal of Applied Bacteriology* 72:445-459
- Carpenter SR, Fisher SG, Grimm NB, Kitchell JF (1992) Global change and freshwater ecosystems. *Annual Review of Ecology and Systematics* 23:119-139
- Carrillo P, Medina-Sánchez JM, Villar-Argaiz M, Delgado-Molina JA, Ballejos FJ (2006) Complex interactions in microbial food webs: Stoichiometric and functional approaches. *Limnetica* 25:189-204
- Castenholz R, Garcia-Pichel F (2002) Cyanobacterial Responses to UV-Radiation. En: Whitton B, Potts M (eds) *The Ecology of Cyanobacteria*. Springer Netherlands
- Codd GA (2000) Cyanobacterial toxins, the perception of water quality, and the prioritisation of eutrophication control. *Ecological Engineering* 16: 51–60
- Codd GA, Morrison LF, Metcalf JS (2005) Cyanobacterial toxins: Risk management for health protection. *Toxicology and applied pharmacology* 203:264-272
- Chen YL, Chen HY, Karl DM, Takahashi M (2004) Nitrogen modulates phytoplankton growth in spring in the South China Sea. *Continental Shelf Research* 24:527-541

- Daufresne M, Lengfellner K, Sommer U (2009) Global warming benefits the small in aquatic ecosystems. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 106:12788-12793
- Davis TW, Berry DL, Boyer GL, Gobler CJ (2009) The effects of temperature and nutrients on the growth and dynamics of toxic and non-toxic strains of *Microcystis* during cyanobacteria blooms. *Harmful Algae* 8:715-725
- de Figueiredo DR, Azeiteiro UM, Esteves SM, Gonçalves FJM, Pereira MJ (2004) Microcystin-producing blooms—a serious global public health issue. *Ecotoxicology and environmental safety* 59:151-163
- Delgado-Molina JA, Carrillo P, Medina-Sánchez JM, Villar-Argaiz M, Bullejos FJ (2009) Interactive effects of phosphorus loads and ambient ultraviolet radiation on the algal community in a high-mountain lake. *Journal of Plankton Research* 31:619-634
- Delpla I, Jung AV, Baures E, Clement M, Thomas O (2009) Impacts of climate change on surface water quality in relation to drinking water production. *Environment International* 35:1225-1233
- Díaz HG, Avaria S, Villafañe VE, Helbling EW (1997) Aclimatación y sensibilidad de especies fitoplanctónicas antárticas a la radiación ultravioleta solar. *Revista de Biología Marina y Oceanografía* 32:157-175
- Dillon JG, Castenholz RW (1999) Scytonemin, a cyanobacterial sheath pigment, protects against UVC radiation: Implications for early photosynthetic life. *Journal of Phycology* 35:673-681
- Dong Q, Svoboda K, Tiersch TR, Monroe WT (2007) Photobiological effects of UVA and UVB light in zebrafish embryos: Evidence for a competent photorepair system. *Journal of Photochemistry and Photobiology, B: Biology* 88:137-146
- Donkor VA, Häder DP (1991) Effects of solar and ultraviolet radiation on motility, photomovement and pigmentation in filamentous, gliding cyanobacteria. *FEMS Microbiology Ecology* 86:159-168
- Donkor VA, Häder DP (1996) Effects of ultraviolet irradiation on photosynthetic pigments in some filamentous cyanobacteria. *Aquatic Microbial Ecology* 11:143-149
- Dow CS, Svoboda UK (2002) Cyanotoxins. En: Whitton BA, Potts M (eds) *The ecology of Cyanobacteria*. Springer Netherlands
- Dugdale RC, Goering JJ (1967) Uptake of new and regenerated forms of nitrogen in primary productivity. *Limnology and Oceanography* 12:196-206
- Dunlap WC, Rae GA, Helbling EW, Villafañe VE, Holm-Hansen O (1995) Ultraviolet-absorbing compounds in natural assemblages of Antarctic phytoplankton. *Antarctic Journal of the United States* 30:323-326
- Dunlap WC, Shick JM (1998) Ultraviolet radiation-absorbing mycosporine-like amino acids in coral reef organisms: A biochemical and environmental perspective. *Journal of Phycology* 34:418-430
- Dunne RP (2010) Synergy or antagonism—interactions between stressors on coral reefs. *Coral Reefs* 29:145-152
- Echaniz SA, Vignatti AM (2001) Composición y variación anual de la taxocenosis de cladóceros (Crustacea: Anomopoda y Ctenopoda) planctónicos y química del agua de la laguna Don Tomás (La Pampa, Argentina). *Revista de la Facultad de Agronomía, UNLPam* 12:23-35
- Echániz SA, Vignatti AM, Bunino PC (2008) El zooplancton de un lago somero hipereutrófico de la región central de Argentina: Cambios después de una década. *Biota Neotropica* 8:63-71
- Echenique RO, Aguilera A (2009) Floraciones de Cyanobacteria tóxicas en la República Argentina: antecedentes. En: Gianuzzi L (ed) *Cianobacterias y cianotoxinas- Identificación, toxicología, monitoreo y evaluación de riesgo*
- Ehling-Schulz M, Bilger W, Scherer S (1997) UV-B-induced synthesis of photoprotective pigments and extracellular polysaccharides in the terrestrial cyanobacterium *Nostoc commune*. *Journal of Bacteriology* 179:1940
- Ehling-Schulz M, Scherer S (1999) UV protection in cyanobacteria. *European Journal of Phycology* 34:329-338
- Elliott JA (2010) The seasonal sensitivity of Cyanobacteria and other phytoplankton to changes in flushing rate and water temperature. *Global Change Biology* 2010:864–876

- Elliott JA, Jones ID, Thackeray SJ (2006) Testing the sensitivity of phytoplankton communities to changes in water temperature and nutrient load, in a temperate lake. *Hydrobiologia* 559:401-411
- Falkowski PG (1997) Evolution of the nitrogen cycle and its influence on the biological sequestration of CO₂ in the ocean. *Nature* 387:272-275
- Ferroni L, Klisch M, Pancaldi S, Häder D-P (2010) Complementary UV-absorption of mycosporine-like amino acids and scytonemin is responsible for the UV-insensitivity of photosynthesis in *Nostoc flagelliforme*. *Marine Drugs* 8:106-121
- Fleming ED, Castenholz RW (2007) Effects of periodic desiccation on the synthesis of the UV-screening compound, scytonemin, in cyanobacteria. *Environmental Microbiology* 9:1448-1455
- Gao K, Li P, Watanabe T, Helbling EW (2008) Combined effects of ultraviolet radiation and temperature on morphology, photosynthesis, and DNA of *Arthrospira (Spirulina) platensis* (Cyanophyta). *Journal of Phycology* 44:777-786
- Gao K, Wu Y, Li G, Wu H, Villafañe VE, Helbling EW (2007a) Solar UV radiation drives CO₂ fixation in marine phytoplankton: A double-edged sword. *Plant Physiology* 144:54-59
- Gao K, Ye C (2007) Photosynthetic insensitivity of the terrestrial cyanobacterium *Nostoc flagelliforme* to solar UV radiation while rehydrated or desiccated. *Journal of Phycology* 43:628-635
- Gao K, Yu H, Brown MT (2007b) Solar PAR and UV radiation affects the physiology and morphology of the cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120. *Journal of Photochemistry and Photobiology, B: Biology* 89:117-124
- Garcia-Pichel F (1994) A model for internal self-shading in planktonic organisms and its implications for the usefulness of ultraviolet sunscreens. *Limnology and Oceanography* 39:1704-1717
- Garcia-Pichel F (1998) Solar ultraviolet and the evolutionary history of cyanobacteria. *Origins of life and evolution of the biosphere* 28:321-347
- Garcia-Pichel F, Castenholz RW (1993) Occurrence of UV-absorbing, mycosporine-like compounds among cyanobacterial isolates and an estimate of their screening capacity. *Applied and Environmental Microbiology* 59 (1):163-169
- García PE, Diéguez MC, Ferraro MA, Zagarese HE, Pérez AP (2010) Mycosporine-like amino acids in freshwater copepods: Potential sources and some factors that affect their bioaccumulation. *Photochemistry and Photobiology* 86:353-359
- Genty BE, Briantais JM, Baker NR (1989) Relative quantum efficiencies of the two photosystems of leaves in photorespiratory and non-photorespiratory conditions. *Plant Physiology and Biochemistry* 28:1-10
- Germ M, Simcic T, Gaberscik A, Breznik B, Hrastel M (2004) UV-B treated algae exhibiting different responses as a food source for *Daphnia magna*. *Journal of Plankton Research* 26:1219-1228
- Giannuzzi L, Sedan D, Echenique RO, Andrinolo D (2011) An acute case of intoxication with Cyanobacteria and cyanotoxins in recreational water in Salto Grande Dam, Argentina. *Marine Drugs* 9:2164-2175
- Gianuzzi L (2009) Cianobacterias y Cianotoxinas – Identificación, toxicología, monitoreo y evaluación de riesgo, Vol
- Gonçalves RJ, Barbieri ES, Villafañe VE, Helbling EW (2007) Motility of *Daphnia spinulata* as affected by solar radiation throughout an annual cycle in mid-latitudes of Patagonia. *Photochemistry and Photobiology* 83:824-832
- Gonçalves RJ, Villafañe VE, Medina CD, Barbieri ES, Helbling EW (2011) Plankton dynamics and photosynthesis responses in a eutrophic lake of Patagonia (Argentina): Influence of grazing and UVR. *Latin American Journal of Aquatic Research* 39:117-130
- Gonzalez C, Tappari F (1995) Características geológicas, biológicas y ambientales de la zona de la laguna Cacicque Chiquichano de Trelew. Informe técnico. Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco, Trelew, Chubut, Argentina
- Häder D-P, Helbling EW, Williamson CE, Worrest RC (2011) Effects of UV radiation on aquatic ecosystems and interactions with climate change. *Photochemical and Photobiological Sciences* 10:242-260

- Häder D-P, Lebert M, Schuster M, del Ciampo L, Helbling EW, McKenzie R (2007a) ELDONET - A decade of monitoring solar radiation on five continents. *Photochemistry and Photobiology* 83:1384-1357
- Häder DP, Kumar HD, Smith RC, Worrest RC (2007b) Effects of solar UV radiation on aquatic ecosystems and interactions with climate change. *Photochemical and Photobiological Sciences* 6:267-285
- Halac SR, Guendulain-García SD, Villafañe VE, Helbling EW, Banaszak AT (2013) Responses of tropical plankton communities from the Mexican Caribbean to solar ultraviolet radiation exposure and increased temperature. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 445:99-107
- Halac SR, Villafañe VE, Helbling EW (2010) Temperature benefits the photosynthetic performance of the diatoms *Chaetoceros gracilis* and *Thalassiosira weissflogii* when exposed to UVR. *Journal of Photochemistry and Photobiology, B: Biology* 101:196-205
- Halperín DR (1968) Las algas del suelo y su importancia ecológica. CIBIMA. Contrib. Téc. 3: 19 pp.
- Halperín DR (1970) Cianofíceas marinas Del Chubut (Argentina). I. Golfo San Jose, Golfo Nuevo y alrededores de Rawson. *Physis*. 30:33-96
- Halperín DR (1974) Cianofíceas marinas de Puerto Deseado (Provincia de Santa Cruz, Argentina). III. *Physis Secc A*. 33: 465-482
- Halperín DR, Asensi AO, Boraso AL (1973) Informe preliminar sobre la distribución de algunas algas de interés industrial en la costa patagónica (R. Argentina). Centro de Investigacion de Biología Marina, Estación Puerto Deseado, Estación Austral
- Halperín DR, Mule MCZ, Caire GZ (1976) Biodermas algales como fuente de nitrógeno en suelos subhúmedos y semi-áridos (Provincias de Chaco y Fomosa, Argentina). *Darwiniana* 20: 342-370
- Hama T, Matsunaga K, Handa N, Takahashi M (1990) Nitrogen budget in the euphotic zone of Lake Biwa from spring to summer, 1986. *Journal of Plankton Research* 12:125-131
- Hansen J, Sato M, Ruedy R, Lo K, Lea DW, Medina-Elizade M (2006) Global temperature change. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 103:14288-14293
- Hansson LA, Hylander S (2009) Effects of ultraviolet radiation on pigmentation, photoenzymatic repair, behavior, and community ecology of zooplankton. *Photochemical & Photobiological Sciences* 8:1266-1275
- Harrison JW, Smith REH (2009) Effects of ultraviolet radiation on the productivity and composition of freshwater phytoplankton communities. *Photochemical and Photobiological Sciences* 8:1218-1232
- Havens KE (2008) Cyanobacteria blooms: Effects on aquatic ecosystems. En: Hudnell HK (ed) *Cyanobacterial harmful algal blooms: State of the science and research needs*, Book 619. Springer New York
- Havens KE, James RT, East TL, Smith VH (2003) N: P ratios, light limitation, and cyanobacterial dominance in a subtropical lake impacted by non-point source nutrient pollution. *Environmental Pollution* 122:379-390
- Hawksworth DL (1988) The variety of fungal-algal symbioses, their evolutionary significance, and the nature of lichens. *Botanical Journal of the Linnean Society* 96:3-20
- Helbling EW, Barbieri ES, Marcoval MA, Gonçalves RJ, Villafañe VE (2005) Impact of solar ultraviolet radiation on marine phytoplankton of Patagonia, Argentina. *Photochemistry and Photobiology* 81:807-818
- Helbling EW, Buma AGJ, Boelen P, van der Strate HJ, Fiorda Giordanino MV, Villafañe VE (2011) Increase in Rubisco activity and gene expression due to elevated temperature partially counteracts ultraviolet radiation-induced photoinhibition in the marine diatom *Thalassiosira weissflogii*. *Limnology and Oceanography* 56:1330-1342
- Helbling EW, Buma AGJ, de Boer MK, Villafañe VE (2001) *In situ* impact of solar ultraviolet radiation on photosynthesis and DNA in temperate marine phytoplankton. *Marine Ecology Progress Series* 211:43-49

- Helbling EW, Chalker BE, Dunlap WC, Holm-Hansen O, Villafañe VE (1996) Photoacclimation of antarctic marine diatoms to solar ultraviolet radiation. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 204:85-101
- Helbling EW, Zagarese HE (2003) UV effects in aquatic organisms and ecosystems, Vol. The Royal Society of Chemistry, Cambridge
- Hernández Moresino RD, Helbling EW (2010) Combined effects of UVR and temperature on the survival of crab larvae (Zoea I) from Patagonia: The role of UV-absorbing compounds. *Marine Drugs* 8:1681-1698
- Hessen DO, Leu E, Færøvig PJ, Petersen SF (2008) Light and spectral properties as determinants of C:N:P-ratios in phytoplankton. *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography* 55
- Hitzfeld BC, Höger SJ, Dietrich DR (2000) Cyanobacterial toxins: Removal during drinking water treatment, and human risk assessment. *Environmental health perspectives* 108:113
- Holm-Hansen O, Riemann B (1978) Chlorophyll a determination: Improvements in methodology. *Oikos* 30:438-447
- Hondzo M, Stefan HG (1991) Three case studies of lake temperature and stratification response to warmer climate. *Water Resources Research* 27:1837-1846
- Hong HS, Wang YJ, Wang DZ (2011) Response of phytoplankton to nitrogen addition in the Taiwan strait upwelling region: Nitrate reductase and glutamine synthetase activities. *Continental Shelf Research* 31:S57-S66
- Houghton JT, Ding Y, Griggs DJ, Noguer M, van der Linden PJ, Dai X, Maskell K, Johnson CA (2001) *Climate Change 2001: The scientific basis*, Vol. Cambridge University Press, Cambridge
- Howarth RW, Marino R (2006) Nitrogen as the limiting nutrient for eutrophication in coastal marine ecosystems: Evolving views over three decades. *Limnology and Oceanography* 51:364-376
- IPCC (2007a) *Climate Change 2007: The physical science basis*. Contribution of working group I to the fourth assessment report of the Intergovernmental Panel on Climate Change, Vol. Cambridge University Press, New York (USA)
- IPCC (2007b) Summary for Policymakers. En: *Climate Change 2007: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fourth Assessment report of the Intergovernmental Panel on Climate Change* [Solomon, S., D. Qin, M. Manning, Z. Chen, M. Marquis, K.B Averyt, M. Tignor and H.L. Miller (eds.)]. In. IPCC, Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA
- Ivleva NB, Golden SS (2007) Protein extraction, fractionation, and purification from cyanobacteria. En: Rosato E (ed) *Circadian Rhythms*, Book 362. Humana Press
- Jeppesen E, Søndergaard M, Meerhoff M, Lauridsen T, Jensen JP (2007) Shallow lake restoration by nutrient loading reduction—some recent findings and challenges ahead. *Hydrobiologia* 584:239-252
- Jöhnk KD, Huisman J, Sharples J, Sommeijer B, Visser PM, Stroom JM (2008) Summer heatwaves promote blooms of harmful cyanobacteria. *Global Change Biology* 14:495-512
- Kardinaal WEA, Tonk L, Janse I, Hol S, Slot P, Huisman J, Visser PM (2007) Competition for light between toxic and nontoxic strains of the harmful Cyanobacterium *Microcystis*. *Applied and Environmental Microbiology* 73:2939-2946
- Karentz D (1994) Ultraviolet tolerance mechanisms in Antarctic marine organisms. En: Weiler CS, Penhale PA (eds) *Ultraviolet Radiation and Biological Research in Antarctica* American Geophysical Union, Washington DC
- Karl D, Michaels A, Bergman B, Capone D, Carpenter E, Letelier R, Lipschultz F, Paerl H, Sigman D, Stal L (2002) Dinitrogen fixation in the world's oceans. *Biogeochemistry* 57-58:47-98
- Karl TR, Trenberth KE (2003) Modern global climate change. *Science* 302:1719-1723
- Karsten U, Franklin LA, Lüning K, Wiencke C (1998) Natural ultraviolet radiation and photosynthetically active radiation induce formation of mycosporine-like amino acids in the marine macroalgae *Chondrus crispus* (Rhodophyta). *Planta* 205:257-262

- Kirk JT (1976) A theoretical analysis of the contribution of algal cells to the attenuation of light within natural waters III. cylindrical and spheroidal cells. *New Phytologist* 77:341-358
- Kok B (1956) On the inhibition of photosynthesis by intense light. *Biochimica et biophysica acta* 21:234-244
- Komárek J Anagnostidis K (1986) Modern approach to the classification system of Cyanophytes, 2 – Chroococcales. *Archiv fuer Hydrobiologie. Supplementband. Algological Studies* 73 (2): 157-226
- Komárek J Anagnostidis K (1989). Modern approach to the classification system of Cyanophytes 4 – Nostocales. *Archiv fuer Hydrobiologie. Supplementband. Algological Studies.* 56: 247- 345
- Komárek J Anagnostidis K (1998) Cyanoprokaryota 1. Teil: Chroococcales. En: Süßwasserflora von Mitteleuropa, Ettl H., Gärtner G., Heynig, H. & D. Mollenhauer. Eds.19/1 Gustav Fischer, Jena Stuttgart-Lübeck-Ulm. Pp 1-584
- Komárek J Anagnostidis K (1999) Cyanoprokaryota 1. Teil: Chroococcales. Gustav Fischer. Berlin
- Komárek J Anagnostidis K (2005) Cyanoprokaryota II. Teil. Oscillatoriales. En: Süßwasserflora von Mitteleuropa, Büdel, B., Krienitz, L., Gärtner, G. & M. Schagerl (Eds). pp. 759. Elsevier GmbH. München.
- Komárek J (2006) Cyanobacterial taxonomy: Current problems and prospects for the integration of traditional and molecular approaches. *Algae* 21(4): 349-375
- Korbee N, Figueroa FL, Aguilera J (2006) Acumulación de aminoácidos tipo micospolina (MAAs): Biosíntesis, fotocontrol y funciones ecofisiológicas. *Revista Chilena de Historia Natural* 79:119-132
- Krompkamp JC, Dijkman NA, Peene J, Simis SGH, Gons HJ (2008) Estimating phytoplankton primary production in Lake IJsselmeer (The Netherlands) using variable fluorescence (PAM-FRRF) and C-uptake techniques. *European Journal of Phycology* 43:327-344
- Kumar A, Sinha RP, Häder DP (1996) Effect of UV-B on enzymes of nitrogen metabolism in the cyanobacterium *Nostoc calcicola*. *Journal of Plant Physiology* 148:86-91
- Kumar A, Tyagi MB, Jha PN, Srinivas G, Singh A (2003) Inactivation of cyanobacterial nitrogenase after exposure to ultraviolet-B radiation. *Current Microbiology* 46:380-384
- Latifi A, Ruiz M, Zhang C (2009) Oxidative stress in cyanobacteria. *FEMS Microbiology Reviews* 33: 258–278
- Lassen MK, Dewar Nielsen K, Richardson K, Garde K, Schlüter L (2009) The effects of temperature increases on a temperate phytoplankton community — A mesocosm climate change scenario. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 383:79-88
- Laurion I, Vincent WF (1998) Cell size versus taxonomic composition as determinants of UV-sensitivity in natural phytoplankton communities. *Limnology and Oceanography* 43:1774-1779
- Laurion I, Vincent WF, Lean DRS (1997) Underwater ultraviolet radiation: development of spectral models for northern high latitude lakes. *Photochemistry and Photobiology* 65:107-114
- Leech DM, Padeletti A, Williamson CE (2005) Zooplankton behavioral responses to solar UV radiation vary within and among lakes. *Journal of Plankton Research* 27:461-471
- Lehmann MK, Davis RF, Huot Y, Cullen JJ (2004) Spectrally weighted transparency in models of water-column photosynthesis and photoinhibition by ultraviolet radiation. *Marine Ecology Progress Series* 269:101-110
- Lesser MP (1996) Elevated temperatures and ultraviolet radiation cause oxidative stress and inhibit photosynthesis in symbiotic dinoflagellates. *Limnology and Oceanography* 41:271-283
- Lesser MP (2008) Effects of ultraviolet radiation on productivity and nitrogen fixation in the cyanobacterium, *Anabaena* sp. (Newton's strain). *Hydrobiologia* 598:1-9
- Lesser MP, Cullen JJ, Neale PJ (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 MP, Mazel CH, Gorbunov MY, Falkowski PG (2004) Discovery of symbiotic nitrogen-fixing cyanobacteria in corals. *Science* 305:997-1000

- Li G, Gao K, Yuan D, Zheng Y, Yang G (2011) Relationship of photosynthetic carbon fixation with environmental changes in the Jiulong River estuary of the South China Sea, with special reference to the effects of solar UV radiation. *Marine Pollution Bulletin* 62:1862-1868
- Lionard M, Roy S, Tremblay-Létourneau M, Ferreyra GA (2012) Combined effects of increased UV-B and temperature on the pigment-determined marine phytoplankton community of the St. Lawrence Estuary. *Marine Ecology Progress Series* 445:219-234
- Litchman E, Neale PJ, Banaszak AT (2002) Increased sensitivity to ultraviolet radiation in nitrogen-limited dinoflagellates: Photoprotection and repair. *Limnology and Oceanography* 47:86-94
- Liu Z, Häder DP, Sommaruga R (2004) Occurrence of mycosporine-like amino acids (MAAs) in the bloom-forming cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Journal of Plankton Research* 26:963-966
- Long SP, Humphries S, Falkowski PG (1994) Photoinhibition of photosynthesis in nature. *Annual Review of Plant Biology* 45:633-662
- Lu YM, Xiang WZ, Wen YH (2011) Spirulina (*Arthrospira*) industry in Inner Mongolia of China: Current status and prospects. *Journal of Applied Phycology* 23:265-269
- Llabrés M, Agustí S (2006) Picophytoplankton cell death induced by UV radiation: Evidence for oceanic Atlantic communities. *Limnology and Oceanography* 51:21-29
- MacFadyen EJ, Williamson CE, Grad G, Lowery M, Wade JH, Mitchell DL (2004) Molecular response to climate change: temperature dependence of UV-induced DNA damage and repair in the freshwater crustacean *Daphnia pulex*. *Global Change Biology* 10:408-416
- Madronich S, de Groot FR (1994) Stratospheric ozone depletion between 1979 and 1992: Implications for biologically active ultraviolet-B radiation and non-melanoma skin cancer incidence. *Photochemistry and Photobiology* 59:541-546
- Mary Leema JT, Kirubakaran R, Vinithkumar NV, Dheenan PS, Karthikayulu S (2010) High value pigment production from *Arthrospira (Spirulina) platensis* cultured in seawater. *Bioresource Technology* 101:9221-9227
- McKenzie RL, Aucamp PJ, Bais AF, Björn LO, Ilyas M (2007) Changes in biologically-active ultraviolet radiation reaching the Earth's surface. *Photochemical and Photobiological Sciences* 6:218-231
- McKenzie RL, Björn L-O, Bais A, Ilyas M (2003) Changes in biologically active ultraviolet radiation reaching the Earth's surface. *Photochemical and Photobiological Sciences* 2:5-15
- Medina-Sánchez JM, Villar-Argaiz M, Carrillo P (2004) Neither with nor without you: A complex algal control on bacterioplankton in a high mountain lake. *Limnology and Oceanography* 49:1722-1733
- Meehl GA, Washington WM, Collins WD, Arblaster JM, Hu A, Buja LE, Strand WG, Teng H (2005) How much more global warming and sea level rise? *Science* 307:1769-1772
- Mehnert G, Leunert F, Cirés S, Jöhnk KD, Rucker J, Nixdorf B, Wiedner C (2010) Competitiveness of invasive and native cyanobacteria from temperate freshwaters under various light and temperature conditions. *Journal of Plankton Research* 32:1009-1021
- Merel S, Walker D, Chicana R, Snyder S, Baurès E, Thomas O (2013) State of knowledge and concerns on cyanobacterial blooms and cyanotoxins. *Environment International* 59: 303-327
- Miller SR, Wingard CE, Castenholz RW (1998) Effects of visible light and UV radiation on photosynthesis in a population of a hot spring cyanobacterium, a *Synechococcus sp.*, subjected to high-temperature stress. *Applied and Environmental Microbiology* 64:3893-3899
- Molinero JC, Ibanez F, Souissi S, Buecher E, Dallot S, Nival P (2008) Climate control on the long-term anomalous changes of zooplankton communities in the Northwestern Mediterranean. *Global Change Biology* 14:11-26
- Montzka SA, Butler JH, Elkins JW, Thompson TM, Clarke AD, Lock LT (1999) Present and future trends in the atmospheric burden of ozone-depleting halogens. *Nature* 398:690-693
- Morris DP, Zagarese HE, Williamson CE, Balseiro EG, Hargreaves BR, Modenutti BE, Moeller R, Quemaliños CP (1995) The attenuation of solar UV radiation in lakes and the role of dissolved organic carbon. *Limnology and Oceanography* 40:1381-1391

- Nixon SM (1995) Coastal marine eutrophication: A definition, social causes, and future concerns. *Ophelia* 41: 199-219
- O'Neil JM, Davis TW, Burford MA, Gobler CJ (2012) The rise of harmful cyanobacteria blooms: The potential roles of eutrophication and climate change. *Harmful algae* 14: 313-334
- O'Reilly CM, Alin SR, Plisnier PD, Cohen AS, McKee BA (2003) Climate change decreases aquatic ecosystem productivity of Lake Tanganyika, Africa. *Nature* 424:766-768
- Oren A, Gunde-Cimerman N (2007) Mycosporines and mycosporine-like amino acids: UV protectants or multipurpose secondary metabolites? *FEMS Microbiological Letters* 269:1-10
- Otaño S, Salerno G, Ruiz M, Aguilera A, Echenique RO (2012) Cyanobacteria and cyanotoxins: Identification, toxicology, monitoring and risk assessment. In: Chorus I (ed) *Current approaches to Cyanotoxin risk assessment, risk management and regulations in different countries*. Federal Environment Agency, Germany
- Otaño SH (2009) First report of the cyanobacterium *Aphanizomenon schindleri* (Nostocales, Cyanophyceae) in River Uruguay, Argentina. *Algological Studies* 131:35-42
- Paerl H, Scott J (2010) Throwing fuel on the fire: Synergistic effects of excessive nitrogen inputs and global warming on harmful algal blooms. *Environmental Science & Technology* 44:7756-7758
- Paerl HW, Fulton RS, III (2006) Ecology of harmful cyanobacteria. In: Granéli E, Turner JT (eds) *Ecology of harmful algae*, Book 189. Springer-Verlag, Berlin, Germany
- Paerl HW, Fulton RS, Moisaner PH, Dyble J (2001) Harmful freshwater algal blooms, with an emphasis on cyanobacteria. *The Scientific World Journal* 1:76-113
- Paerl HW, Huisman J (2008) Blooms like it hot. *Science* 320:57-58
- Paerl HW, Huisman J (2009) Climate change: A catalyst for global expansion of harmful cyanobacterial blooms. *Environmental Microbiology Reports* 1:27-37
- Paerl HW, Otten TG (2013) Harmful cyanobacterial blooms: Causes, consequences, and controls. *Microbial Ecology* 65:995-1010
- Paerl HW, Paul VJ (2012) Climate change: Links to global expansion of harmful cyanobacteria. *Water research* 46:1349-1363
- Pérez GL, Torremorell A, Bustingorry J, Escaraya R, Pérez P, Diéguez M, Zagarese H (2010) Optical characteristics of shallow lakes from the Pampa and Patagonia regions of Argentina. *Limnologica - Ecology and Management of Inland Waters*. 40 (1): 30-39
- Pérez G, Doldán S, Borsani O, Irisarri P (2012) Differential response to moderate UV-B irradiation of two heterocystous cyanobacteria isolated from a temperate ricefield. *Advances in Microbiology* 2:37-47
- Pócs T (2009) Cyanobacterial crust types, as strategies for survival in extreme habitats. *Acta botanica hungarica* 51 (1-2): 147-178
- Porra RJ (2002) The chequered history of the development and use of simultaneous equations for the accurate determination of chlorophylls a and b. *Photosynthesis Research* 73:149-156
- Potts M (1999) Mechanisms of desiccation tolerance in cyanobacteria. *European Journal of Phycology* 34:319-328
- Pulz O, Gross W (2004) Valuable products from biotechnology of microalgae. *Applied Microbiology and Biotechnology* 65:635-648
- Rastogi RP, Kumari S, Richa, Han T, Sinha RP (2012) Molecular characterization of hot spring cyanobacteria and evaluation of their photoprotective compounds. *Canadian Journal of Microbiology*:719-727
- Rastogi RP, Sinha RP (2011) Solar ultraviolet radiation-induced DNA damage and protection/repair strategies in cyanobacteria. *International Journal of Pharma and Bio Sciences* 2:271-288
- Rees TAV, Larson TR, Heldens JWG, Huning FGJ (1995) *In situ* glutamine synthetase activity in a marine unicellular alga (development of a sensitive colorimetric assay and the effects of nitrogen status on enzyme activity). *Plant physiology* 109:1405-1410
- Richardson AJ (2008) In hot water: Zooplankton and climate change. *ICES Journal of Marine Science* 65:279-295

- Richardson AJ, Schoeman DS (2004) Climate impact on plankton ecosystems in the Northeast Atlantic. *Science* 305:1609-1612
- Rippka R (1988) Isolation and purification of cyanobacteria. En: Lester Packer ANG (ed) *Methods in Enzymology*, Book Volume 167. Academic Press
- Rivera SG (1993) Variación espacio-temporal en la estructura comunitaria del fitoplancton de la laguna Caciue Chiquichano (Trelew - Chubut - Patagonia Argentina). Licenciatura, Universidad Nacional del la Patagonia San Juan Bosco, Trelew, Chubut, Argentina
- Rocco VE, Oppezzo O, Pizarro R, Sommaruga R, Ferraro M, Zagarese HE (2002) Ultraviolet damage and counteracting mechanisms in the freshwater copepod *Boeckella poppei* from the Antarctic Peninsula. *Limnology and Oceanography* 47:829-836
- Roos JC, Vincent WF (1998) Temperature dependence of UV radiation effects on antarctic cyanobacteria. *Journal of Phycology* 34:118-125
- Roy S (2000) Strategies for the minimization of UV-induced damage. En: De Mora SJ, Demers S, Vernet M (eds) *The effects of UV radiation in the marine environment*. Cambridge University Press, Cambridge
- Roy S, Mohovic B, Ganesella SMF, Schloss IR, Ferrario ME, Demers S (2006) Effects of enhanced UV-B on pigment-based phytoplankton biomass and composition of mesocosm-enclosed natural marine communities from three latitudes. *Photochemistry and Photobiology* 82:909-922
- Ruibal Conti AL, Guerrero JM, Regueira JM (2005) Levels of microcystins in two argentinean reservoirs used for water supply and recreation: Differences in the implementation of safe levels. *Environmental Toxicology* 20:263-269
- Ruiz M, Galanti L, Ruibal AL, Rodriguez MI, Wunderlin DA, Amé MV (2013) First report of microcystins and anatoxin-a co-occurrence in San Roque Reservoir (Córdoba, Argentina). *Water, Air, & Soil Pollution* 224:1-17
- Salmaso N (2002) Ecological patterns of phytoplankton assemblages in Lake Garda: seasonal, spatial and historical features. *Journal of Limnology* 61:95-115
- Sanders RW, Macaluso AL, Sardina TJ, Mitchell DL (2005) Photoreactivation in two freshwater ciliates: Differential responses to variations in UV-B flux and temperature. *Aquatic Microbial Ecology* 40:283-292
- Scarafia ME, Agnese AM, Cabrera JL (1995) *Microcystis aeruginosa*: Behaviour and toxic features in San Roque Dam (Argentina). *Natural Toxins* 3:75-77
- Scheffer M, Rinaldi S, Gragnani A, Mur LR, van Nes EH (1997) On the dominance of filamentous cyanobacteria in shallow, turbid lakes. *Ecology* 78:272-282
- Shatwell T, Köhler J, Nicklisch A (2008) Warming promotes cold-adapted phytoplankton in temperate lakes and opens a loophole for Oscillatoriales in spring. *Global Change Biology* 14:2194-2200
- Shick JM, Lesser MP, Jokiel PL (1996) Effects of ultraviolet radiation on corals and other coral reef organisms. *Global Change Biology* 2:527-545
- Shick JM, Romaine-Lioud S, Ferrier-Pagès C, Gattuso JP (1999) Ultraviolet-B radiation stimulates shikimate pathway-dependent accumulation of mycosporine-like amino acids in the coral *Stylophora pistillata* despite decreases in its population of symbiotic dinoflagellates. *Limnology and Oceanography* 44:1667-1682
- Sicora CI, Appleton SE, Brown CM, Chung J, Chandler J, Cockshutt AM, Vass I, Campbell DA (2006) Cyanobacterial psbA families in *Anabaena* and *Synechocystis* encode trace, constitutive and UVB-induced D1 isoforms. *Biochimica et Biophysica Acta* 1757:47-56
- Singh SP, Klisch M, Sinha RP, Häder DP (2010) Genome mining of mycosporine-like amino acid (MAA) synthesizing and 2 non-synthesizing cyanobacteria: A bioinformatics study. *Genomics* 95:120-128
- Singh SP, Sinha RP, Klisch M, Häder D-P (2008) Mycosporine-like amino acids (MAAs) profile of a rice-field cyanobacterium *Anabaena doliolum* as influenced by PAR and UVR. *Planta* 229:225-233

- Sinha RP, Ambasht NK, Sinha JP, Klisch M, Häder DP (2003) UV-B-induced synthesis of mycosporine-like amino acids in three strains of *Nodularia* (cyanobacteria). *Journal of Photochemistry and Photobiology, B: Biology* 71:51-58
- Sinha RP, Häder D-P (2002) UV-induced DNA damage and repair: a review. *Photochemical and Photobiological Sciences* 1 225 -236
- Sinha RP, Häder DP (1996) Photobiology and ecophysiology of rice field cyanobacteria. *Photochemistry and Photobiology* 64:887-896
- Sinha RP, Klisch M, Helbling EW, Häder D-P (2001) Induction of mycosporine-like amino acids (MAAs) in cyanobacteria by solar ultraviolet-B radiation. *Journal of Photochemistry and Photobiology, B: Biology* 60:129-135
- Sinha RP, Richter P, Faddoul J, Braun M, Häder DP (2002) Effects of UV and visible light on cyanobacteria at the cellular level. *Photochemical and Photobiological Sciences* 1:553-559
- Sinha RP, Singh N, Kumar A, Kumar HD, Häder DP (1997) Impacts of ultraviolet-B irradiation on nitrogen-fixing cyanobacteria of rice paddy fields. *Journal of Plant Physiology* 150:188-193
- Sinha RP, Singh N, Kumar A, Kumar HD, Häder M, Häder DP (1996) Effects of UV irradiation on certain physiological and biochemical processes in cyanobacteria. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 32:107-113
- Sinha RP, Singh SP, Häder DP (2007) Database on mycosporines and mycosporine-like amino acids (MAAs) in fungi, cyanobacteria, macroalgae, phytoplankton and animals. *Journal of Photochemistry and Photobiology, B: Biology* 89:29-35
- Smith WO, Nelson DM, Mathot S (1999) Phytoplankton growth rates in the Ross Sea, Antarctica, determined by independent methods: Temporal variations. *Journal of Plankton Research* 21:1519-1536
- Sobrino C, Neale PJ (2007) Short-term and long-term effects of temperature on photosynthesis in the diatom *Thalassiosira pseudonana* under UVR exposures. *Journal of Phycology* 43:426-436
- Solomon S (1999) Stratospheric ozone depletion: A review of concepts and history. *Reviews of Geophysics* 37:275-316
- Sommaruga R, Chen Y, Liu Z (2009) Multiple strategies of bloom-forming *Microcystis* to minimize damage by solar ultraviolet radiation in surface waters. *Microbial Ecology* 57:667-674
- Sommer U, Lengfellner K (2008) Climate change and the timing, magnitude, and composition of the phytoplankton spring bloom. *Global Change Biology* 14:1199-1208
- Spolaore P, Joannis-Cassan C, Duran E, Isambert A (2006) Commercial applications of microalgae. *Journal of Bioscience Bioengineering* 101 87-96
- Stal LJ (1995) Physiological ecology of cyanobacteria in microbial mats and other communities. *New Phytologist* 131:1-32
- Stal LJ (2007) Cyanobacteria: Diversity and versatility, clues to life in extreme environments. En: Seckbach J (ed) *Algae and Cyanobacteria in extreme environments*, Book 11. Springer Netherlands
- Stanier RY, Kunisawa MM, Cohen-Bazre G (1971) Purification and properties of unicellular blue-green algae (order Chlorococcales). *Bacteriological Reviews* 35:171-201
- Stanier RY, Sistrion WR, Hansen TA, Whitton BA, Castenholz RW, Pfenning N, Gorlenko VN, Kondratieva EN, Eimhjellen KE, Whittenbury R, Gherna RL, Trüper HG (1978) Proposal to place the nomenclature of the Cyanobacteria (Blue-green algae) under the rules of the International Code of Nomenclature of Bacteria. *International Journal of Systematic Bacteriology* 28:335-336
- Steinberg CEW, Hartmann HM (1988) Planktonic bloom-forming Cyanobacteria and the eutrophication of lakes and rivers. *Freshwater Biology* 20:279-287
- Stulp BK, Stam WT (1984) Growth and morphology of *Anabaena* strains (Cyanophyceae, Cyanobacteria) in cultures under different salinities. *British Phycological Journal* 19:281 - 286
- Tandeau de Marsac N (1977) Occurrence and nature of chromatic adaptation in cyanobacteria. *Journal of Bacteriology* 130:82-91

- Tang EPY, Tremblay R, Vincent WF (1997) Cyanobacterial dominance of polar freshwater ecosystems: Are high-latitude mat-formers adapted to low temperature? *Journal of Phycology* 33:171-181
- Tartarotti B, Sommaruga R (2006) Seasonal and ontogenetic changes of mycosporine-like amino acids in planktonic organisms from an alpine lake. *Limnology and Oceanography* 51:1530-1541
- Thomas CD, Cameron A, Green RE, Bakkenes M, Beaumont LJ, Collingham YC, Erasmus BFN, Ferreira de Siqueira M, Grainger A, Hannah L, Hughes L, Huntley B, van Jaarsveld AS, Midgley GF, Miles L, Ortega-Huerta MA, Townsend Peterson A, Phillips OL, Williams SE (2004) Extinction risk from climate change. *Nature* 427:145-148
- Thyssen M, Ferreyra G, Moreau S, Schloss I, Denis M, Demers S (2011) The combined effect of ultraviolet B radiation and temperature increase on phytoplankton dynamics and cell cycle using pulse shape recording flow cytometry. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 406:95-107
- UNEP (2005) United Nations Environment Programme, Environmental Effects Assessment Panel: Environmental effects of ozone depletion and its interactions with climate change: Progress report. *Photochemical and Photobiological Sciences* 5:13-24
- Urabe J, Nakanishi M, Kawabata K (1995) Contribution of metazoan plankton to the cycling of nitrogen and phosphorus in Lake Biwa. *Limnology and Oceanography* 40:232-241
- Vaishampayan A, Sinha RP, Häder DP, Dey T, Gupta AK, Bhan U, Rao AL (2001) Cyanobacterial biofertilizers in rice agriculture. *The Botanical Review* 67:453-516
- van Donk E, Faafeng BA, De Lange HJ, Hessen DO (2001) Differential sensitivity to natural ultraviolet radiation among phytoplankton species in Arctic lakes (Spitsbergen, Norway). *Plant Ecology* 154:249-259
- Villafañe VE, Banaszak AT, Guendulain-García SD, Strauch SM, Halac SR, Helbling EW (2013) Influence of seasonal variables associated with climate change on photochemical diurnal cycles of marine phytoplankton from Patagonia (Argentina). *Limnology and Oceanography* 58:203-214
- Villafañe VE, Helbling EW, Holm-Hansen O, Chalker BE (1995) Acclimatization of Antarctic natural phytoplankton assemblages when exposed to solar ultraviolet radiation. *Journal of Plankton Research* 17:2295-2306
- Villafañe VE, Janknegt PJ, de Graaff M, Visser RJW, van de Poll WH, Buma AGJ, Helbling EW (2008) UVR-induced photoinhibition of summer marine phytoplankton communities from Patagonia. *Marine Biology* 154:1021-1029
- Villafañe VE, Sundbäck K, Figueroa FL, Helbling EW (2003) Photosynthesis in the aquatic environment as affected by UVR. In: Helbling EW, Zagarese HE (eds) *UV effects in aquatic organisms and ecosystems*. Royal Society of Chemistry
- Vincent WF (2002) Cyanobacterial dominance in the Polar Regions. In: Whitton BA, Potts M (eds) *The ecology of Cyanobacteria*. Springer Netherlands
- Vincent WF, Roy S (1993) Solar ultraviolet-B radiation and aquatic primary production: damage, protection, and recovery. *Environmental Review* 1:1-12
- Vitousek PM, Mooney HA, Lubchenco J, Melillo JM (1997) Human domination of Earth's ecosystems. *Science* 277:494-499
- Wagner C, Adrian R (2009) Cyanobacteria dominance: Quantifying the effects of climate change. *Limnology and Oceanography* 54:2460
- Walther GR, Post E, Convey P, Menzel A, Parmesan C, Beebee TJC, Fromentin JM, Hoegh-Guldberg O, Bairlein F (2002) Ecological responses to recent climate change. *Nature* 416:389-395
- Wängberg S-A, Andreasson KIM, Gustavson K, Reinthaler T, Henriksen P (2008) UV-B effects on microplankton communities in Kongsfjord, Svalbard – A mesocosm experiment. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 365:156-163
- Waterbury JB (2006) The Cyanobacteria—Isolation, purification and identification. En: Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer KH, Stackebrandt E (eds) *The Prokaryotes*. Springer US
- Weis E, Berry A (1987) Quantum efficiency of photosystem II in relation to the energy dependent quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochimica et Biophysica Acta* 894:198-208

- Wellburn AR (1994) The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *Journal of Plant Physiology* 144:307-313
- Wenzel MT, Díaz MM (2008) Cyanophyta del Parque Nacional Nahuel Huapi (Argentina), II. *Darwiniana* 46 (1):51-65
- Whitton B, Potts M (2002a) The ecology of cyanobacteria: Their diversity in time and space, Vol. Kluwer Academic Publishers
- Whitton BA (2002) Soils and rice-fields. En: Whitton BA, Potts M (eds) *The ecology of Cyanobacteria*. Springer Netherlands
- Whitton BA, Potts M (2002b) Introduction to the Cyanobacteria. En: Whitton BA, Potts M (eds) *The ecology of cyanobacteria*. Springer Netherlands
- Wiltshire KH, Manly BFJ (2004) The warming trend at Helgoland Roads, North Sea: phytoplankton response. *Helgoland Marine Research* 58:269-273
- Williamson CE, Salm C, Cooke SL, Saros JE (2010) How do UV radiation, temperature, and zooplankton influence the dynamics of alpine phytoplankton communities? *Hydrobiologia* 648:73-81
- Williamson CE, Saros JE, Schindler DW (2009) Sentinels of change. *Science* 323:887-888
- Williamson CE, Stemberger RS, Morris DP, Frost TM, Paulsen SG (1996) Ultraviolet radiation in North American lakes: Attenuation estimates from DOC measurements and implications for plankton communities. *Limnology and Oceanography* 41:1024-1034
- Winder M, Schindler DE (2004) Climatic effects on the phenology of lake processes. *Global Change Biology* 10:1844-1856
- Winder M, Reuter JE, Schladow SG (2009) Lakewarming favours small-sized planktonic diatom species. *Proceedings of the Royal Society B*. 276, 427–435
- Winder M, Sommer U (2012) Phytoplankton response to a changing climate. *Hydrobiologia* DOI 10.1007/s10750-012-1149-2
- Wrona FJ, Prowse TD, Reist JD, Hobbie JE, Lévesque LMJ, Vincent WF (2006) Climate change effects on aquatic biota, ecosystem structure and function. *Ambio* 35:359-369
- Wu H, Gao K, Villafañe VE, Watanabe T, Helbling EW (2005) Effects of solar UV radiation and photosynthesis of the filamentous cyanobacterium, *Arthrospira platensis*. *Applied and Environmental Microbiology* 71:5004-5013
- Wu Z, Song L, Li R (2008) Different tolerances and responses to low temperature and darkness between waterbloom forming cyanobacterium *Microcystis* and a green alga *Scenedesmus*. *Hydrobiologia* 596:47-55
- Wulff A, Roleda MY, Zacher K, Wiencke C (2008) UV radiation effects on pigments, photosynthetic efficiency and DNA of an Antarctic marine benthic diatom community. *Aquatic Biology* 3:167-177
- Xue L, Li S, Sheng H, Feng H, Xu S, An L (2007) Nitric oxide alleviates oxidative damage induced by enhanced ultraviolet-B radiation in cyanobacterium. *Current Microbiology* 55:294-301
- Yang Z, Kong F, Shi X, Zhang M, Xing P, Cao H (2008) Changes in the morphology and polysaccharide content of *Microcystis aeruginosa* (cyanobacteria) during flagellate grazing. *Journal of Phycology* 44:716-720
- Zaccaro MC, Kato A, Zulpa G, Storni MM, Steyerthal N, Lobasso K, Stella AM (2006) Bioactivity of *Scytonema hofmanni* (Cyanobacteria) in *Lilium alexandrae* in vitro propagation. *Electronic Journal of Biotechnology* 9:0-0
- Zapomělová E, Hrouzek P, Řeháková K, Šabacká M, Stibal M, Caisová L, Komárková J, Lukešová A (2008) Morphological variability in selected heterocystous cyanobacterial strains as a response to varied temperature, light intensity and medium composition. *Folia Microbiologica* 53:333-341
- Zar JH (1999) *Biostatistical analysis*, Vol. Prentice Hall, Englewood Cliffs, NJ
- Zarrouk C (1966) Contribution a l'étude du cyanophycée. Influence de divers facteurs physiques et chimiques sur la croissance et la photosynthese de *Spirulina maxima* (Setch et Gardner) Geitl. Ph.D Thesis, University of Paris, Paris, France,

- Zhou W, Yin K, Yuan X, Ning X (2009) Comparison of the effects of short-term UVB radiation exposure on phytoplankton photosynthesis in the temperate Changjiang and Subtropical Zhujiang estuaries of China. *Journal of Oceanography* 65:627-638
- Zhu Z, Arp PA, Mazumder A, Meng F, Bourque CPA, Foster NW (2005) Modeling stream water nutrient concentrations and loadings in response to weather condition and forest harvesting. *Ecological Modelling* 185:231-243
- Zubkov MV, Fuchs BM, Tarran GA, Burkill PH, Amann R (2003) High rate of uptake of organic nitrogen compounds by *Prochlorococcus* cyanobacteria as a key to their dominance in oligotrophic oceanic waters. *Applied and Environmental Microbiology* 69:1299-1304
- Zulpa de Caire G, Storni de Cano M, Zaccaro de Mulé MC, Palma RM, Colombo K (1997) Exopolysaccharide of *Nostoc muscorum* (Cyanobacteria) in the aggregation of soil particles. *Journal of Applied Phycology* 9:249-253
- Zulpa de Caire GZ, Storni de Cano MS, Palma RM, Zaccaro de Mulé CZ (2000) Changes in soil enzyme activities following additions of cyanobacterial biomass and exopolysaccharide. *Soil Biology and Biochemistry* 32:1985-1987

Anexo 1

Artículo de Respaldo