



Universidad Nacional del Comahue  
Centro Regional Universitario Bariloche

***Efectos conjuntos de la radiación  
solar, nutrientes y mezcla vertical  
en el fitoplancton de la región  
Patagónica***

Tesis para optar al título de Doctor en Biología

Lic. Paula Bermejo

Director: Dr. E. Walter Helbling

Co-Directora: Dra. Virginia E. Villafañe

Año: 2019

# Índice:

<b>Agradecimientos</b> .....	5
<b>Listado de tablas y figuras</b> .....	6
<b>Abreviaturas</b> .....	9
<b>Resumen</b> .....	11
<b>Summary</b> .....	13
<b>Capítulo 1: Introducción General</b> .....	15
1.1 Cambio global: .....	16
1.2 Cambio global en los ecosistemas acuáticos .....	19
1.2.1 Impacto en los océanos .....	19
1.2.2 Impacto en los ecosistemas costeros .....	20
1.3 Variables asociadas al cambio global .....	20
1.3.1 Radiación solar .....	20
1.3.2 Capa superficial de mezcla .....	22
1.3.3 Aporte de nutrientes .....	24
1.3.4 Acidificación .....	24
1.4 Los organismos acuáticos frente al cambio global .....	25
1.4.1 Fitoplancton .....	25
1.4.2 Fotosíntesis – Conceptos generales .....	27
1.4.3 Fotosíntesis en el fitoplancton – Interacción con variables ambientales .....	31
1.4.4 Efectos de la RUV y otras variables asociadas al cambio global en el fitoplancton .....	31
1.5 Fundamentación y lineamientos de la Tesis .....	34
1.5.1 Importancia del área de estudio .....	34
1.5.2 Relevancia del tema de estudio .....	36
1.5.3 Hipótesis de trabajo .....	37
1.5.4 Estructura de la Tesis .....	39

## **Capítulo 2: Control abiótico de las floraciones de fitoplancton en ecosistemas marinos**

<b>templados: Un caso de estudio en el Océano Atlántico Sur</b> .....	41
2.1 Introducción: .....	43
2.2 Materiales y métodos.....	44
2.2.1 Área de Estudio .....	44
2.2.2 Datos.....	45
2.2.3 Tratamiento de los datos .....	49
2.3 Resultados y Discusión .....	49
2.4 Conclusiones .....	59

## **Capítulo 3: Respuestas del fitoplancton del estuario del Río Chubut en dos condiciones de CSM:**

<b>Efectos de la radiación solar y nutrientes a corto y largo plazo</b> .....	61
3.1 Introducción .....	62
3.2 Materiales y métodos.....	63
3.2.1 Área de estudio .....	63
3.2.2 Recolección de muestras .....	64
3.2.3 Set-up experimental y protocolo de muestreo .....	65
3.2.4 Análisis y mediciones.....	67
3.2.5 Tratamiento de datos, cálculos y estadística .....	69
3.3 Resultados.....	73
PARTE I: Experimentos con comunidades marinas.....	73
3.3.1 Fotoquímica del FSII.....	75
3.3.2 Crecimiento, cambios en la estructura de tamaños y composición específica de las comunidades.....	90
3.3.3 Resumen .....	94
PARTE 2: Experimentos con comunidades de río .....	95
3.3.4 Fotoquímica del FSII.....	97
3.3.5 Crecimiento, cambios en la estructura de tamaños y composición específica de las comunidades.....	107
3.3.6 Resumen .....	111
3.4 Discusión .....	111

<b>Capítulo 4: Efecto de la radiación solar fluctuante sobre el fitoplancton del estuario del río Chubut, bajo condiciones de cambio global</b> .....	120
4.1 Introducción .....	122
4.2 Materiales y Métodos.....	123
4.2.1 Área de estudio / muestreo .....	123
4.2.2 Set-up experimental .....	124
4.2.3 Mediciones y análisis .....	127
4.3 Resultados.....	130
4.3.1 Características iniciales de los sitios de muestreo.....	130
4.3.2 Comunidad del régimen externo.....	131
4.3.3 Comunidad del régimen interno .....	138
4.4 Discusión.....	145
<b>Capítulo 5: Conclusiones Generales</b> .....	150
5.1 Perspectivas futuras de investigación .....	153
<b>Bibliografía</b> .....	154
<b>Anexo I</b> .....	171

# ***Agradecimientos:***

Hay muchas personas (y animalitos) a los que quiero agradecerles por acompañarme en este camino, y espero no olvidarme de ninguno.

A toda mi familia, que a la distancia siempre me apoyó y me dio fuerzas en los momentos más difíciles: A mi mamá, a mi papá, a mis hermanas y a mis sobrinos, que a pesar de ir a visitarlos poco durante estos años, siempre me ayudaron a recargar las pilas para seguir. A mis perrhijos Moly, Segó, Marrins, Negro y Margui por ser mis compañeros de caminata diaria y mi desconexión total y por brindarme su amor incondicional.

A mis directores Walter y Virginia les agradezco por su ayuda en cada una de las etapas de la tesis y por todo el tiempo que le dedicaron a mi formación profesional. A Maca por su paciencia, sus charlas y por su ayuda en los análisis estadísticos, a Ricarda por aguantarme en la oficina durante el último año, a Ro por ayudarme con los muestreos y por sus charlas de aliento en los momentos críticos y a Fotona por acompañarme con su ronroneo en todos y cada uno de los experimentos.

Pero principalmente quiero agradecerles infinitamente a 3 personas, ya que sin ellas esta etapa hubiera sido mucho más difícil:

A Normita que sin conocerme me abrió las puertas de su hogar en Playa Unión durante los primeros años de mi Tesis, y sin su ayuda hubiera sido casi imposible realizar la parte experimental.

A Cris, que me brindó un lugarcito en su hogar durante casi un año, y además de darme una mano enorme con los experimentos, fue mi amiga, compañera y confidente.

Y por último a mi compañero de la vida, Lucas, que no sólo me ayudó con los análisis estadísticos, con los mapas y con un montón de cosas más, sino que siempre estuvo a mi lado dándome aliento, siendo mi cable a tierra y no dejándome bajar los brazos. ¡Gracias amor! Gracias por acompañarme, apoyarme y aguantarme.

Parte de este proyecto de Tesis estuvo financiado por la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (PICT 2012-0271), por el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) y por la Fundación Playa Unión.

# ***Listado de tablas y figuras:***

Fig. 1.1 Concentración atmosférica de CO <sub>2</sub> a lo largo del tiempo .....	16
Fig. 1.2 Variaciones de temperatura para el año 2017.....	17
Fig. 1.3 Cambio en la temperatura media global esperada para escenarios futuros.....	18
Fig. 1.4 Espectro de radiación solar.....	21
Fig. 1.5 Datos satelitales de la concentración total de Ozono.....	22
Fig. 1.6 Factores que afectan la cantidad y calidad de RUV recibida por organismos acuáticos.....	23
Fig. 1.7 Esquema de la bomba biológica de carbono.....	26
Fig. 1.8 Cloroplasto de organismos autótrofos y fases de la fotosíntesis.....	28
Fig. 1.9 Esquema del Fotosistema II.....	29
Fig. 1.10 Esquema Z de la fotosíntesis.....	30
Fig. 1.11 Esquema resumen de la fase luminosa de la fotosíntesis.....	30
Fig. 1.12 Interacciones de factores externos que afectan la productividad del fitoplancton.....	31
Fig. 1.13 Efectos de la RUV en el fitoplancton.....	32
Fig. 1.14 Concentración promedio de Clorofila- <i>a</i> en el océano.....	34
Fig. 1.15 Mapa del área de estudio y sitios de muestreo.....	35
Fig. 2.1 Mapa del área de estudio destacando los sitios donde se obtuvieron los datos.....	45
Tabla 2.1 Fuentes de datos para el período de referencia y para el año 2015.....	46
Fig. 2.2 Velocidad y dirección del viento para el período de referencia y el año 2015.....	51
Fig. 2.3 Clorofila- <i>a</i> , composición, abundancia y biomasa de fitoplancton.....	53
Fig. 2.4 Precipitación mensual e índice de aerosoles.....	56
Fig. 2.5 Concentración de nutrientes del el agua de mar y río.....	57
Fig. 2.6 Temperatura mensual promedio para el agua de mar y río.....	59
Fig. 3.1 Radiación PAR durante el período de estudio.....	64
Fig. 3.2 Imagen del set-up experimental y diagrama del diseño experimental.....	66
Fig. 3.3 Esquema general de respuestas de Y a lo largo del día.....	70
Fig. 3.4 Irradiancia PAR para los 5 días de los experimentos del régimen externo.....	73
Fig. 3.5 Concentración de Clor- <i>a</i> , porcentaje de abundancia de tamaños y grupos, al inicio de los experimentos del régimen externo.....	74
Fig. 3.6 <i>k</i> en los ciclos diarios del día 1 de los experimentos del régimen externo.....	76

Fig. 3.7 $k$ en los ciclos diarios del día 5 de los experimentos del régimen externo.....	77
Fig. 3.8 $r$ en los ciclos diarios del día 1 de los experimentos del régimen externo.....	78
Fig. 3.9 $r$ en los ciclos diarios del día 5 de los experimentos del régimen externo.....	79
Tabla 3.1 Tabla de ANOVA medidas repetidas para las tasas de inhibición ( $k$ ).....	80
Tabla 3.2 Tabla de ANOVA medidas repetidas para las tasas de recuperación ( $r$ ).....	80
Fig 3.10 $Y_{fin}-Y_{inic}$ en los ciclos diarios del día 1 de los experimentos del régimen externo .....	81
Fig 3.11 $Y_{fin}-Y_{inic}$ en los ciclos diarios del día 5 de los experimentos del régimen externo .....	82
Fig 3.12 $Y_{fin}-Y_{inic}$ del día 1 a lo largo del año, en los experimentos del régimen externo.....	83
Fig 3.13 $Y_{fin}-Y_{inic}$ del día 5 a lo largo del año, en los experimentos del régimen externo.....	84
Tabla 3.3 Tabla de ANOVA medidas repetidas para $Y_{fin}-Y_{inic}$ .....	84
Fig. 3.14 NPQ en los ciclos diarios del día 1 de los experimentos del régimen externo.....	85
Fig. 3.15 NPQ en los ciclos diarios del día 5 de los experimentos del régimen externo.....	86
Fig. 3.16 $ETR_{int}$ en los ciclos diarios del día 1 de los experimentos del régimen externo .....	87
Fig. 3.17 $ETR_{int}$ en los ciclos diarios del día 5 de los experimentos del régimen externo.....	88
Tabla 3.4 Tabla de ANOVA medidas repetidas para $ETR_{int}$ .....	88
Fig. 3.18 Efectos de las variables sobre el ETR en los experimentos del régimen externo.....	89
Fig. 3.19 Abundancia de células en los experimentos del régimen externo .....	90
Fig. 3.20 Tasas de crecimiento en los experimentos del régimen externo .....	91
Fig. 3.21 Proporción relativa de tamaños en los experimentos del régimen externo.....	92
Fig. 3.22 Proporción relativa de grupos en los experimentos del régimen externo .....	93
Fig. 3.23 Irradiancia PAR en los 5 días de los experimentos del régimen interno .....	95
Fig. 3.24 Concentración de Clor- $a$ , porcentaje de abundancia de tamaños y grupos, al inicio de los experimentos del régimen interno .....	96
Fig. 3.25 $k$ en los ciclos diarios del día 1 en los experimentos del régimen interno .....	97
Fig. 3.26 $k$ en los ciclos diarios del día 5 en los experimentos del régimen interno .....	98
Fig. 3.27 $r$ en los ciclos diarios del día 1 en los experimentos del régimen interno .....	98
Fig. 3.28 $r$ en los ciclos diarios del día 1 en los experimentos del régimen interno .....	99
Tabla 3.5 Tabla de ANOVA medidas repetidas para las tasas de inhibición ( $k$ ).....	99
Tabla 3.6 Tabla de ANOVA medidas repetidas para las tasas de recuperación ( $r$ ).....	100
Fig 3.29 $Y_{fin}-Y_{inic}$ en los ciclos diarios del día 1 de los experimentos del régimen interno .....	101
Fig 3.30 $Y_{fin}-Y_{inic}$ en los ciclos diarios del día 5 para los experimentos del régimen interno.....	101
Fig 3.31 $Y_{fin}-Y_{inic}$ del día 1 a lo largo del año, en de los experimentos del régimen interno .....	102

Fig 3.32 $Y_{fin}-Y_{inic}$ del día 5 a lo largo del año, en de los experimentos del régimen interno .....	102
Tabla 3.7 Tabla de ANOVA medidas repetidas para $Y_{fin}-Y_{inic}$ .....	103
Fig. 3.33 NPQ en los ciclos diarios del día 1 de los experimentos del régimen interno.....	104
Fig. 3.34 NPQ en los ciclos diarios del día 5 de los experimentos del régimen interno .....	104
Fig. 3.35 $ETR_{int}$ en los ciclos diarios del día 1 de los experimentos del régimen interno.....	105
Fig. 3.36 $ETR_{int}$ en los ciclos diarios del día 5 de los experimentos del régimen interno.....	106
Tabla 3.8 Tabla de ANOVA medidas repetidas para $ETR_{int}$ .....	106
Fig. 3.37 Efectos de las variables sobre el ETR en los experimentos del régimen interno.....	107
Fig. 3.38 Abundancia de células en los experimentos del régimen interno .....	108
Fig. 3.39 Tasas de crecimiento en los experimentos del régimen interno .....	109
Fig. 3.40 Proporción relativa de tamaños en los experimentos del régimen interno.....	109
Fig. 3.41 Proporción relativa de grupos en los experimentos del régimen interno .....	110
Fig. 4.1 Esquema general de respuestas de Y y obtención de las $Pend_{Max}$ y $Pend_{Min}$ .....	129
Tabla 4.1 Características iniciales de los regímenes externo e interno del estuario.....	131
Fig. 4.2 Concentración de Clor- <i>a</i> , abundancia, tasa de crecimiento y porcentaje de abundancia de grupos en el régimen externo.....	132
Fig. 4.3 Y a lo largo del experimento, $Pend_{Max}/Pend_{Min}$ en los distintos tratamientos, $k_M/k_E$ en los 5 días del experimento del régimen externo.....	134
Fig. 4.4 NPQ a lo largo del experimento del régimen externo.....	135
Fig. 4.5 Concentración de oxígeno e irradiancias PAR, tasas de producción de oxígeno, $Oxi_M/Oxi_E$ a lo largo del experimento del régimen externo.....	137
Fig. 4.6 Tasa de producción de Oxígeno vs. <i>k</i> para el experimento del régimen externo.....	137
Fig. 4.7 Concentración de Clor- <i>a</i> , abundancia, tasa de crecimiento y porcentaje de abundancia de grupos en el régimen interno.....	139
Fig. 4.8 Y a lo largo del experimento, $Pend_{Max}/Pend_{Min}$ en los distintos tratamientos, $k_M/k_E$ en los 5 días del experimento del régimen interno .....	141
Fig. 4.9 NPQ a lo largo del experimento del régimen interno.....	142
Fig. 4.10 Concentración de oxígeno e irradiancias PAR, tasas de producción de oxígeno, $Oxi_M/Oxi_E$ a lo largo del experimento del régimen interno .....	144
Fig. 4.11 Tasa de producción de Oxígeno vs. <i>k</i> para el experimento del régimen interno .....	144

# ***Abreviaturas:***

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ATP: Adenosina trifosfato

CFCs: Compuestos cloro-fluorocarbonados

Clor-*a*: Clorofila-*a*

CPD: Cyclobutane pyrimidine dimers

CSM: Capa superficial de mezcla

DE: Desvío estándar

EFPU: Estación de Fotobiología Playa Unión

ELDONET: European Light Dosimeter Network

ETR<sub>int</sub>: Tasa de transporte electrónico relativo integrado

ETR<sub>Rel</sub>: Tasa de transporte electrónico relativo

FSI: Fotosistema I

FSII: Fotosistema II

IA: Índice de aerosoles

IPCC: Grupo Intergubernamental de Expertos sobre el Cambio Climático

IR: Radiación infrarroja

*k*: Tasa de inhibición

K: Coeficiente de atenuación de la radiación en la columna de agua

K<sub>PAR</sub>: Coeficiente de atenuación de PAR

K<sub>UV</sub>: Coeficiente de atenuación de RUV

MAAs: Mycosporine like amino-acids

NADPH: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

NASA: National Aeronautics and Space Administration

NOAA: National Oceanic and Atmospheric Administration

NPQ: Non-photochemical quenching (disipación no fotoquímica de energía)

OAS: Océano Atlántico Sur

PAR: Photosynthetic active radiation – Radiación solar fotosintéticamente activa

RUV: Radiación ultravioleta

RUV-A: Radiación ultravioleta A

RUV-B: Radiación ultravioleta B

RUV-C: Radiación ultravioleta C

Y: Rendimiento fotoquímico

Z<sub>eu</sub>: Zona eufótica

$\mu_{\text{Cel}}$ : Tasa de crecimiento en función de la abundancia de células

$\mu_{\text{Clor-}a}$ : Tasa de crecimiento en función de la concentración de clorofila-*a*

# ***Resumen:***

El cambio global es un proceso complejo asociado con el incremento en la emisión de gases atmosféricos (principalmente CO<sub>2</sub>) desde la Revolución Industrial. En los ecosistemas acuáticos, estos cambios han desencadenado variaciones en el pH, incremento en los niveles de radiación ultravioleta B (RUV-B) debido no solo a eventos de disminución de ozono estratosférico sino también como consecuencia de un aumento de la temperatura oceánica promedio global, lo que da lugar a una mayor estratificación en la columna de agua. El cambio global ha influenciado los patrones de vientos y lluvias, y en consecuencia ha afectado la densidad del agua y la profundidad de la capa superficial de mezcla (CSM) de los ecosistemas acuáticos. Las zonas costeras, además de sufrir cambios en los patrones climáticos, están expuestas a cambios en el uso del suelo, aumento de actividades tales como los de la agricultura, ganadería e industria y el crecimiento urbano, resultando en una mayor descarga de compuestos orgánicos e inorgánicos a los ríos que luego llegan a las costas. El objetivo general de esta Tesis fue estudiar el efecto combinado de la radiación solar, tanto PAR (visible) como RUV, y la concentración de nutrientes, en distintas condiciones de mezcla vertical sobre la fotosíntesis / productividad primaria y composición / estructura de comunidades naturales del fitoplancton de la región Patagónica. Para lograr este objetivo, se realizaron experimentos de corto y mediano / largo plazo bajo radiación solar con comunidades naturales de los regímenes interno y externo del estuario del río Chubut a lo largo del año, variando las concentraciones de nutrientes y las condiciones de mezcla (profundidad e irradiancias fluctuantes).

Además, se realizó un seguimiento de las variables climatológicas, físicas, químicas y biológicas del estuario, para determinar patrones temporales y la variabilidad de estos factores bióticos y abióticos y su incidencia sobre el fitoplancton en distintas épocas del año, comparando estos resultados con datos históricos, para poder determinar si existieron cambios significativos en las variables y sus posibles causas. Los resultados obtenidos mostraron que durante el año de muestreo (2015) se produjo un retraso en la floración anual de fitoplancton, así como una reducción en su intensidad, destacando claramente la influencia del viento como agente perturbador que puede alterar el equilibrio y la dinámica del fitoplancton (Capítulo 2).

En los experimentos realizados con comunidades naturales a lo largo del año, donde se evaluó la disminución de la profundidad de la CSM junto con un aumento de nutrientes (Capítulo 3), se observaron respuestas diferenciales para ambos extremos del estuario, y para los distintos períodos de la sucesión anual del fitoplancton. A corto plazo, las comunidades del bloom (invierno) del régimen externo generalmente presentaron mayor fotoinhibición que las comunidades del pre- y post-bloom al ser expuestas a una CSM más somera, y el agregado de nutrientes generalmente no tuvo efecto sobre las tasas de inhibición y recuperación del fotosistema II (FSII). Las comunidades del régimen interno, por su parte, mostraron tasas de inhibición y recuperación similares al inicio y al final de los experimentos, y a lo largo del año. Asimismo, luego de 5 días de experimentación se observaron cambios en la composición de las comunidades de ambos regímenes del estuario. En los experimentos realizados con comunidades marinas, generalmente, las células nanoplanctónicas fueron las dominantes, pero se observó un aumento en la proporción de células más grandes (i.e., microplancton), principalmente en aquellos tratamientos que recibieron nutrientes adicionales y fueron expuestos a una CSM somera. Por su parte, en experimentos realizados con comunidades de río se observó siempre dominancia de células nanoplanctónicas.

Los experimentos realizados con comunidades del post-bloom del régimen externo e interno del estuario, donde se evaluó el efecto de un escenario futuro (disminución del pH y aumento de nutrientes) junto con la mezcla vertical (irradiancias fluctuantes) (Capítulo 4), evidenciaron que las muestras de ambos regímenes (independientemente del tratamiento) generalmente sufrieron mayor inhibición crónica en el FSII con el transcurso de los días, haciéndose más evidente a medida que progresaba el experimento, principalmente en la condición futura. Además se observó que este escenario de cambio global, cambia la composición de la comunidad de fitoplancton hacia una dominada por diatomeas o criptofitas con altas tasas de crecimiento, para los regímenes externo e interno, respectivamente.

La variabilidad en las respuestas a lo largo del año y en los distintos extremos del estuario observadas en los Capítulos 3 y 4 puede explicarse por las diferencias en la composición taxonómica de las comunidades, y por su distinta historia lumínica. En base a esta diversidad de respuestas, se espera que en un escenario futuro de cambio global, las comunidades de fitoplancton de ambos extremos del estuario se vean afectadas de manera diferencial a lo largo del año. Por otra parte, los efectos de las variables sobre el fitoplancton variarán según la escala de tiempo considerada. Los resultados obtenidos resaltan la importancia de evaluar el efecto conjunto de variables asociadas al cambio global, y de considerar sus repercusiones en niveles tróficos superiores, teniendo en cuenta que las áreas costeras de la Patagonia (especialmente durante el período de floración) se caracterizan por una alta productividad que sostiene una importante actividad pesquera.

## ***Summary:***

Global change is a complex process related to the increasing emissions of atmospheric gases (mainly CO<sub>2</sub>) since the Industrial Revolution. In the aquatic ecosystems, these changes have triggered variations in pH, enhancements in ultraviolet radiation B (UVR-B) levels not only due to stratospheric ozone depletion events but also as a consequence of an increase in global average ocean temperature, which results in greater stratification of the water column. Global change has influenced also wind and precipitation patterns, and consequently it has affected the water density and the depth of the upper mixed layer (UML) of aquatic ecosystems. Coastal areas, in addition to the undergoing changes in weather patterns, are also exposed to changes in the land use, increased activities such as those in agriculture, livestock and industry and urban growth, resulting in a greater discharge of organic and inorganic compounds into the rivers that then reach the coasts. The main objective of this Thesis was to study the combined effect of solar radiation, both PAR (visible) and UVR, and the concentration of nutrients, under different vertical mixing conditions on photosynthesis / primary productivity and composition / structure of natural phytoplankton communities of the Patagonian region. To achieve this goal, short and mid / long term experiments were carried out with natural communities from the inner and the outer regimes of the Chubut River estuary, under solar radiation throughout the year, varying nutrient concentrations and mixing conditions (depth and fluctuating radiation).

In addition, climatic, physical, chemical and biological variables of the estuary were monitored to determine temporal patterns and the variability of these biotic and abiotic factors and their incidence on phytoplankton communities at different times of the year, comparing these results with historical data, to determine if there were significant changes in these variables and their possible causes. The results obtained showed that during the year of sampling (2015) there was a delay in the annual phytoplankton bloom, as well as a reduction in its intensity, highlighting for the influence of wind as a disturbing agent that can alter the balance and dynamics of phytoplankton (Chapter 2).

In the experiments carried out with natural communities throughout the year, where the decrease in the depth of the UML and an increase of nutrients were evaluated (Chapter 3), differential responses were observed for both ends of the estuary, as well as for the different stages of the annual phytoplankton succession. On short-term basis, bloom communities (winter) from the outer regime generally had greater photoinhibition than the pre- and post-bloom communities when exposed to a shallower UML, and the addition of nutrients generally had no effect on inhibition and recovery rates of photosystem II (PSII). Communities from the inner regime, on the other hand, showed similar inhibition and recovery rates at the beginning and at the end of the experiments, and throughout the year. Moreover, after 5 days of experimentation, changes in the communities' composition were observed for both regimes of the estuary. In the experiments carried out with marine communities, in general, nanoplanktonic cells dominated, but an increase in the proportion of larger cells (i.e., microplankton) was also observed, mainly in those treatments that received additional nutrients and that were exposed to a shallow UML. On the other hand, in experiments carried out with river communities, nanoplanktonic cells always dominated.

The experiments carried out with post-bloom communities of the outer and inner regime of the estuary, where the effect of a future scenario was evaluated (decrease in pH and increase of nutrients) together with vertical mixing (fluctuating irradiances) (Chapter 4), evidenced that the

samples from both regimes (independently of the treatment), generally suffered chronic inhibition of the PSII throughout the days, becoming more evident as the experiment progressed, mainly in the future condition. Also, it was observed that this scenario of global change, modifies the phytoplankton community composition towards one dominated by diatoms or cryptophytes with high growth rates, for the outer and inner regimes, respectively.

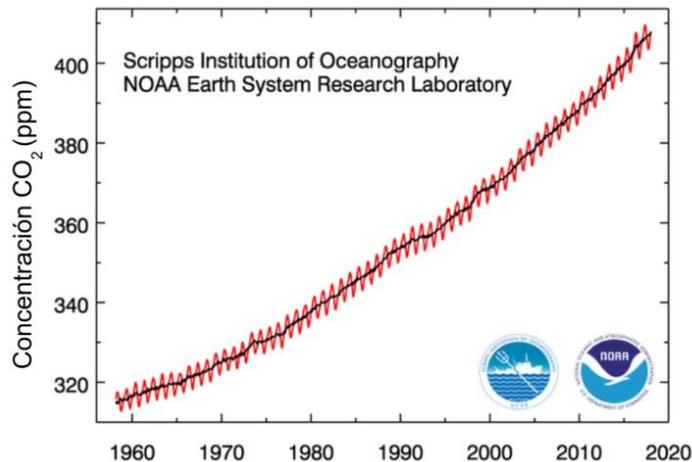
The variability in the responses throughout the year and in both ends of the estuary, such as those observed in Chapters 3 and 4, could be explained by the differences in the taxonomic composition of the communities, and by their different light history. Based on this diversity of responses, it is expected that in a future scenario of global change, phytoplankton communities from both ends of the estuary will be affected differentially throughout the year. Also, the effects of global change variables on phytoplankton will vary according to the time scale considered. The results obtained highlight for the importance of evaluating the combined effect of global change variables, and of considering their repercussions at higher trophic levels, taking into account that the coastal areas of Patagonia (especially during the bloom period) are characterized by high productivity that sustains an important fishing activity.

# **Capítulo 1:**

## ***Introducción General***

## 1.1 Cambio global:

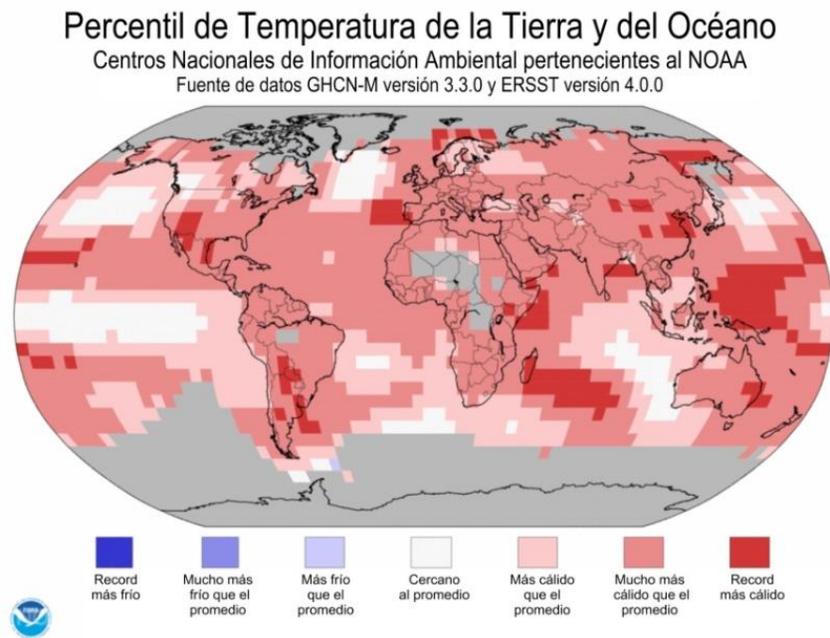
El cambio global se define como un cambio estadísticamente significativo en la distribución de las condiciones climáticas a lo largo del tiempo (IPCC, 2013). En el pasado, se consideraba que los principales factores del cambio global eran la variación solar, el movimiento de las placas tectónicas y las erupciones volcánicas (Alverson y Bradley, 2003); sin embargo, actualmente existe evidencia de que estos cambios están asociados a la demanda creciente de energía, alimentos, bienes, servicios e información, y a la eliminación de sus productos de desecho por parte de la población humana (IPCC, 2013). Dentro de estos últimos, el dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) es el principal producto y su aumento, en los últimos años, proviene principalmente de la quema de combustibles fósiles. Según informes de la National Oceanic Atmospheric Administration (NOAA, 2017; [www.esrl.noaa.gov/gmd/ccgg/trends/](http://www.esrl.noaa.gov/gmd/ccgg/trends/)) la tasa de crecimiento promedio de  $\text{CO}_2$  en los últimos 20 años fue de aproximadamente 2 ppm por año, con una concentración atmosférica de 407 ppm en 2017, lo que implicó un crecimiento del 45% desde el comienzo de la Revolución Industrial (alrededor de 280 ppm en 1750) (Fig. 1.1).



**Fig. 1.1** Concentración atmosférica de  $\text{CO}_2$  (en ppm) registrada en Mauna Loa, Hawái (curva roja) a lo largo del tiempo (1955-2018). La curva negra representa los datos corregidos estacionalmente. Fuente: <https://scripps.ucsd.edu>

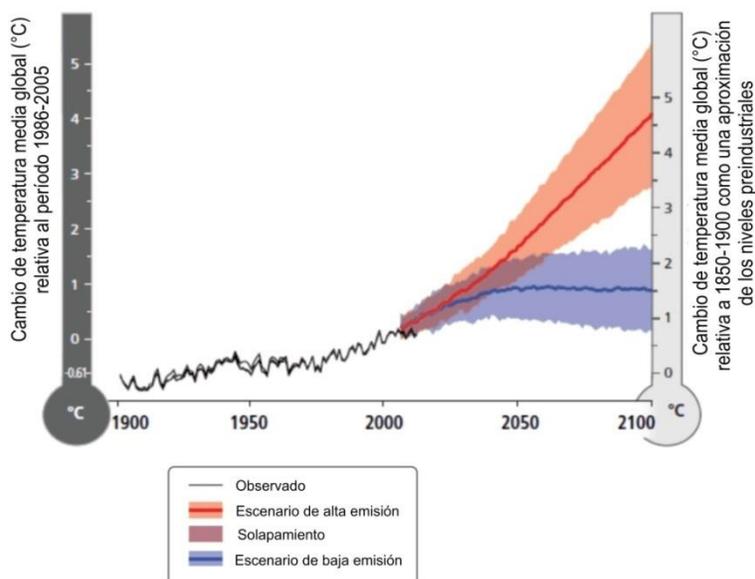
Junto con el incremento del  $\text{CO}_2$ , se registró también un aumento importante en las concentraciones de otros gases tales como el metano ( $\text{CH}_4$ ), óxido nitroso ( $\text{N}_2\text{O}$ ) y gases clorofluorocarbonados (CFCs). Estos gases, junto con el vapor de agua y el ozono ( $\text{O}_3$ ), reciben el nombre de “gases de efecto invernadero” y son los responsables de retener parte de la radiación

que se refleja desde la Tierra hacia el espacio. Si bien el efecto invernadero es un fenómeno natural, el aumento en las concentraciones normales de estos gases altera el balance de energía del sistema climático, generando un aumento de la temperatura atmosférica, causando un calentamiento a nivel global. De hecho el año 2017, fue el 41º año consecutivo (desde 1977) con temperaturas globales terrestres y oceánicas superiores al promedio del siglo XX, estando la temperatura promedio en todo el mundo 0.84°C por encima del promedio del siglo pasado (NOAA, 2017; [www.ncdc.noaa.gov](http://www.ncdc.noaa.gov)) (Fig. 1.2). Más aún, un informe publicado por el Grupo Intergubernamental de Expertos sobre el Cambio Climático (IPCC, 2014) indica que hacia el año 2100 se espera que la temperatura media haya aumentado entre 1.5-5°C, dependiendo del escenario que se considere (Fig. 1.3). Se entiende por “escenarios de cambio climático” a las descripciones de las posibles condiciones futuras que sirven para planificar, analizar y tomar decisiones sobre cuestiones relacionadas a aspectos socio-económicos, climáticos, de impactos o de emisiones de gases (Parson et al., 2007).



**Fig. 1.2** Variaciones de temperatura para el año 2017 respecto al promedio de los últimos 138 años.

Fuente: <http://www.noaa.gov>



**Fig. 1.3** Cambio en la temperatura global promedio (línea negra) desde 1900 a la actualidad, y en la temperatura media global esperada para un escenario futuro de alta (línea roja) o baja emisión (línea azul) de gases de efecto invernadero.

Fuente: IPCC (2014)

Si bien al cambio global se lo asocia inmediatamente con un aumento en la concentración de  $\text{CO}_2$  o de la temperatura, este término engloba un proceso mucho más complejo que abarca cambios a escala planetaria en la tierra, el océano y en la atmósfera, y que también incluye cambios que afectan a la sociedad. Por ejemplo, la emisión antrópica de gases CFCs ha deteriorado parcialmente la capa  $\text{O}_3$  estratosférica (Molina y Rowland, 1974) resultando en alteraciones en la temperatura troposférica y superficial, así como también en la circulación oceánica, en la cobertura de nubes y precipitaciones (Solomon, 1999; Previdi y Polvani, 2014), además de un aumento de la radiación UV-B (RUV-B) en la superficie de la Tierra, principalmente en regiones polares y latitudes medias (Lubin y Jensen, 1995; McKenzie et al., 2011), entre otros efectos. A su vez, el aumento de la temperatura provoca el derretimiento de la capa de nieve, los glaciares y el hielo en las regiones polares, causando cambios en la distribución de plantas y animales, así como también en las comunidades de algas y peces y, por consiguiente, en las redes tróficas (IPCC, 2013). Todos estos cambios son diferentes para las distintas latitudes y así, los modelos climáticos pronostican temperaturas de aire más cálidas y precipitaciones reducidas en algunas regiones, mientras que en otras se espera lo contrario (IPCC, 2013). Particularmente, el cambio global afectará en forma variable los distintos sistemas acuáticos, tal como se describe a continuación.

## **1.2 Cambio global en los ecosistemas acuáticos:**

### **1.2.1 Impacto en los océanos:**

Los océanos son los responsables de producir aproximadamente la mitad del oxígeno que se utiliza para respirar; además de albergar una gran diversidad de organismos y de proporcionar alimento para millones de personas, tienen un inmenso valor social y económico y juegan un rol crucial como reguladores del clima (Sen Gupta y McNeil, 2012). El océano actúa como un importante amortiguador, ya que el 30% del CO<sub>2</sub> de origen antrópico (Canadell et al., 2007) y del 80% del calor extra que ingresa a la superficie terrestre debido al efecto invernadero (Levitus et al., 2012) son secuestrados y almacenados en él. El exceso de CO<sub>2</sub> reacciona con el agua para formar ácido carbónico, reduciendo el pH del agua y la saturación de aragonita (Gattuso y Hansson, 2011) con un efecto importante sobre los organismos, especialmente en los calcificadores marinos (Doney et al., 2009). Debido al exceso de CO<sub>2</sub>, el pH promedio del agua superficial del océano ha disminuido en aproximadamente 0.1 unidades desde la época pre-industrial, desde 8.21 a 8.10 aproximadamente (Raven et al., 2005), y se espera que continúe disminuyendo en 0.3-0.4 unidades de pH hacia finales del siglo (Orr et al., 2005). Aunque es evidente la importancia de estudiar el efecto de la acidificación en los océanos, la inclusión de este tema como agenda fue sólo reciente. De hecho, no se menciona la acidificación como un potencial problema en los tres primeros informes del IPCC publicados en 1990, 1995 y 2001, y sólo se hizo una breve mención en el informe de 2007; recién se discutió extensamente en la última edición publicada en 2014 (IPCC, 2014).

Otro de los efectos del cambio global está asociado a la absorción de calor por parte del océano la cual ha causado su expansión térmica, contribuyendo al aumento global del nivel del mar (Mikolajewicz et al., 1990; Domingues et al., 2008). Además, el aumento en la temperatura del agua ha generado una mayor estratificación de la columna de agua, lo que causa una disminución en la profundidad de la capa superficial de mezcla (CSM) y una pycnoclina más fuerte (i.e., mayor gradiente) lo cual puede afectar de manera directa o indirecta a los organismos que viven en ella (Doney, 2006; Hallegraeff, 2010). En estas condiciones, los organismos estarán expuestos a mayores niveles de radiación solar y a una menor disponibilidad de nutrientes provenientes de aguas profundas ya que éstos no podrán atravesar la pycnoclina (Häder et al., 2011).

### **1.2.2 Impacto en los ecosistemas costeros:**

Si bien los ecosistemas costeros representan solo una pequeña fracción (~ 5%) de la superficie total del océano, se encuentran entre los más productivos de la Tierra (Uitz et al., 2010; Rousseaux y Gregg, 2014). Incluyen las aguas costeras, pelágicas, estuarinas, y aquellas cercanas a las orillas de los grandes lagos y mares interiores, así como una porción de tierra cercana a la costa, donde las actividades humanas y procesos naturales afectan y se ven afectados por lo que ocurre en las aguas. Por lo tanto el cambio global constituye solo una de las muchas presiones que estos ecosistemas enfrentan (Halpern et al., 2008). El cambio en el uso del suelo, el aumento de actividades tales como la agricultura, ganadería e industria, el crecimiento urbano en áreas cercanas a la costa, junto con los cambios en los patrones climáticos, resultan en una mayor descarga de compuestos orgánicos e inorgánicos a los ríos que luego llegan a las costas (Foley et al., 2005) que se espera que se intensifique durante las próximas décadas (Cloern et al., 2016). Las áreas costeras, además, presentan condiciones ambientales muy variables, tales como de luz, temperatura, salinidad, entre otras, lo que las convierte en sistemas modelo particularmente interesantes para evaluar las respuestas de los organismos en un escenario de cambio global. Teniendo en cuenta lo descrito anteriormente, y dada la cantidad de variables que se verán modificadas y/o influenciadas en un escenario de cambio global, esta Tesis, en particular, se enfocará en los efectos de algunas de ellas: la radiación solar (calidad y cantidad, i.e., esta última al variar la CSM), los nutrientes y la mezcla vertical (i.e., fluctuación de la radiación); además en un estudio puntual, se incluirá también el pH. Las variables analizadas en este trabajo se describen a continuación.

### **1.3 Variables asociadas al cambio global:**

#### **1.3.1 Radiación solar:**

La principal fuente de energía en la Tierra es aquella proveniente del Sol. La radiación solar es utilizada por los organismos autótrofos para realizar fotosíntesis; sin embargo, sólo una parte es aprovechable para este proceso, la radiación visible o fotosintéticamente activa (PAR, Photosynthetic Active Radiation) que comprende las longitudes de onda del espectro electromagnético en el rango 400-700 nm (Fig. 1.4). El rango de longitudes de onda comprendido entre 100-400 nm constituye la radiación ultravioleta (RUV). Dentro de este rango, se encuentra la radiación ultravioleta C (RUV-C) que posee mayor energía y por lo tanto comprende las longitudes

de onda más cortas (100-280 nm) pero no alcanza la superficie de la Tierra ya que es absorbida por completo por el  $O_2$  y el  $O_3$  estratosféricos. Las longitudes de onda en el rango de 280-315 nm comprenden la radiación ultravioleta B (RUV-B) que son filtradas de manera eficiente pero no completamente por el  $O_3$ ; finalmente, aquellas entre 315-400 nm corresponden a la radiación ultravioleta A (RUV-A), las cuales son mayormente transmitidas a la superficie terrestre. Por último, la región comprendida entre los 700-2100 nm se denomina radiación infrarroja (IR) (Fig. 1.4).

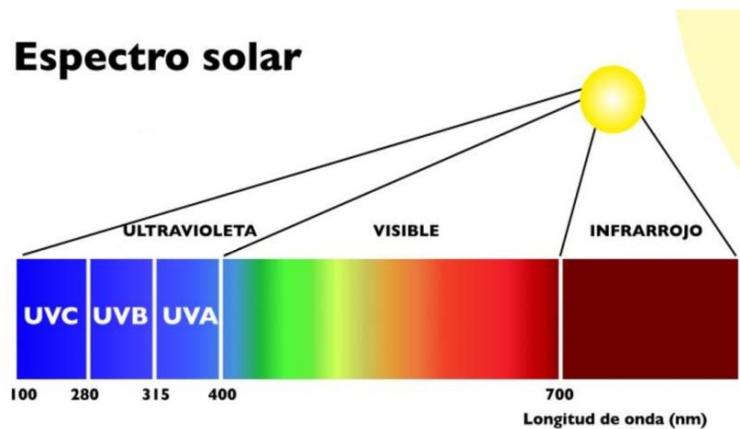
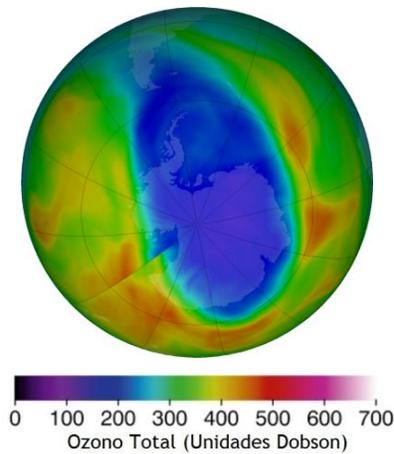


Fig. 1.4 Espectro de radiación solar.

Fuente: <https://sites.google.com/site/amparotecnologiatcs>

Los niveles de radiación (en todas sus longitudes de onda) que alcanzan la superficie terrestre son muy variables dependiendo de la latitud y altitud, la época del año, la presencia de nubes, aerosoles y la concentración de  $O_3$  (Madronich, 1993). La capa de  $O_3$  se ha visto reducida por un aumento en las concentraciones atmosféricas de gases CFCs de origen antrópico (Cicerone et al., 1974), lo que ha causado un incremento en los niveles de RUV-B que llegan a la superficie terrestre (Crutzen, 1992; Previdi y Polvani, 2014). Esta disminución en las concentraciones de  $O_3$  estratosférico i.e., "agujero de ozono", que fue descubierta en 1985 (Farman et al., 1985) afecta las zonas polares (principalmente Antártida) y las latitudes medias (Atkinson et al., 1989; McKenzie et al., 2011). De hecho, la zona Patagónica recibe niveles de RUV relativamente mayores durante la primavera austral (Orce y Helbling, 1997; Helbling et al., 2005) dada su proximidad al "agujero de ozono" (Fig. 1.5).



**Fig. 1.5** Datos satelitales de la concentración total de ozono. El color azul indica la zona afectada por el “agujero de ozono” el 16 de septiembre del 2017. Fuente: <https://www.nasa.gov>

### **1.3.2 Capa superficial de mezcla:**

La radiación solar dentro de la columna de agua disminuye exponencialmente con la profundidad. La atenuación de la radiación solar ocurre en forma diferencial para las distintas bandas del espectro electromagnético: La radiación PAR penetra más profundamente que la RUV y delimita la profundidad de la columna de agua donde la producción a través de la fotosíntesis supera la respiración, la cual se denomina “zona eufótica” ( $Z_{eu}$ ), y su límite inferior se define como la profundidad en la cual se registra el 1% de la radiación PAR que hay en superficie (Marra et al., 2014). La atenuación de la RUV depende de las propiedades intrínsecas del cuerpo de agua, del material disuelto y particulado, y de la concentración de fitoplancton (Kirk, 2003; Boss et al., 2007), atenuándose la RUV-B más rápidamente que la RUV-A (Fig. 1.6).

A diferencia de las aguas oceánicas, las costeras son más turbias debido a las altas concentraciones de material orgánico e inorgánico que entra al sistema principalmente por escorrentía terrestre (Bauer et al., 2013). La cantidad de material orgánico e inorgánico (tanto disuelto como particulado) está fuertemente influenciado por las actividades antrópicas, y sus incrementos se deben principalmente a la urbanización y al uso de la tierra (Palleiro et al., 2013; Cloern et al., 2016). Por su parte, la materia orgánica disuelta coloreada, que se genera a través de la degradación microbiana de macroalgas y plancton, reduce la exposición de los organismos a la RUV (Arrigo y Brown, 1996; Hudson et al., 2007).

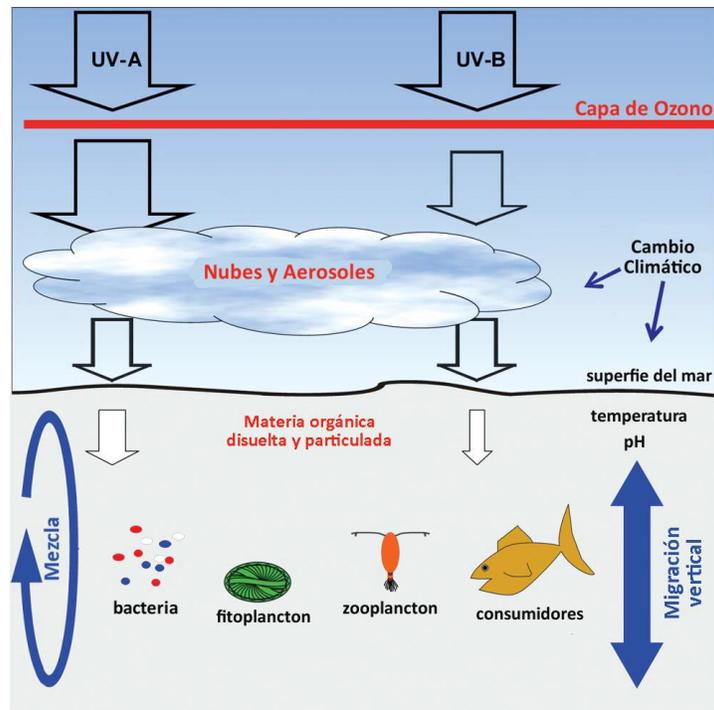


Fig. 1.6 Principales factores que afectan la cantidad y calidad de la RUV recibida por organismos acuáticos.

Fuente: Häder et al. (2011).

La parte de la columna de agua donde la temperatura y la salinidad, y por consiguiente la densidad, permanecen homogéneas se denomina capa superficial de mezcla (CSM). La profundidad de la CSM varía de un cuerpo de agua a otro dependiendo de la temperatura, la salinidad, la época del año, las condiciones meteorológicas y la latitud (Neale et al., 2003). Asimismo, el viento es uno de los factores más importantes que afecta la CSM, ya que la mezcla que produce condiciona su profundidad (Pollard et al., 1972), y modula la irradiancia media que reciben los organismos que viven en ella (Helbling et al., 1994). Además, la mezcla vertical provoca que los organismos se muevan dentro de la CSM, exponiéndolos así a regímenes lumínicos fluctuantes. El viento además puede resuspender el material particulado, aumentando así la atenuación de la radiación solar en la columna de agua. Las regiones cercanas a los trópicos tienen en general CSMs más cálidas y más someras que las de zonas templadas o cercanas a los polos, ya que estas últimas poseen menores temperaturas y fuertes vientos que favorecen la formación de CSMs más profundas (Sverdrup et al., 1942; Neale et al., 2003). En particular, la zona Patagónica está caracterizada por presentar grandes variaciones en la velocidad del viento y en la temperatura a lo largo del año (Villafañe et al., 2004), modulando así la profundidad y las características de la CSM. Asimismo, en zonas costeras y estuarinas, las características ópticas de

la columna de agua se ven influenciadas por la descarga de los ríos, lo que induce cambios en la atenuación de la radiación con la profundidad.

### **1.3.3 Aporte de nutrientes:**

El crecimiento urbano en áreas cercanas a la costa, sumado al incremento de las actividades agrícolas e industriales, ejerce una presión importante sobre el estado ecológico de las aguas estuarinas y costeras (Conley et al., 2009). El aumento excesivo de nutrientes ha sido identificado como la principal causa de la degradación de la calidad del agua de los ecosistemas costeros (Nixon, 1995, Diaz y Rosenberg, 2008) y se espera que se intensifique en las próximas décadas (Cloern et al., 2016). Este aporte excesivo de nutrientes de origen antrópico (N y P principalmente) puede causar eutrofización, el cual es un fenómeno global que se define como un aumento en la tasa de producción primaria y en la acumulación de materia orgánica (Nixon, 1995), y que generalmente produce cambios negativos en la calidad y química del agua y de los sedimentos, así como también en la trama trófica (Rabalais et al., 2009). Esto, junto a modificaciones hidrológicas, incluida la construcción de diques aguas arriba, y la extracción de agua superficial y subterránea para el uso agrícola y/o urbano, altera los caudales y las trayectorias del agua, las tasas de sedimentación y las propiedades ópticas de los cuerpos de agua, afectando en forma negativa su calidad (Bricker et al., 1999). Todos estos cambios, sumados a factores climáticos tales como el calentamiento global, tormentas más extremas, inundaciones y sequías interactúan fuertemente, afectando la descarga de nutrientes con efectos sobre la productividad primaria y la composición de comunidades de los ecosistemas estuarinos y costeros (Jeppesen et al., 2010; Paerl et al., 2014).

### **1.3.4 Acidificación:**

Si bien la absorción de CO<sub>2</sub> por parte del océano ayuda a moderar el cambio climático, la química asociada i.e., la hidrólisis del CO<sub>2</sub> en el agua de mar, aumenta la concentración de iones hidrógeno y carbonato, y por lo tanto disminuye el pH del agua y aumenta el nivel de saturación de carbonato de calcio. Si estas tendencias de aumento de CO<sub>2</sub> continúan, las estructuras externas de carbonato de calcio de organismos marinos tales como los corales y algunas especies de fitoplancton se verán afectadas (Orr et al., 2005).

El estudio de la acidificación en los ecosistemas acuáticos tomó relevancia sólo muy recientemente (Riebesell y Gattuso, 2014) y se han observado resultados contrastantes, ya que

por ejemplo, la acidificación del océano puede dificultar el crecimiento y la fotosíntesis de muchos organismos fotosintéticos (Wu et al., 2008), sin embargo en otros casos no se han encontrado efectos negativos (Riebesell y Tortell, 2011). Además, se ha visto que los diferentes grupos de fitoplancton muestran respuestas distintas frente a la acidificación (Beardall et al., 2014; Häder y Gao, 2015), y se supone que los factores múltiples de estrés, tales como por ejemplo la RUV y la temperatura, modulan sus efectos, aunque todavía hay muy poca información al respecto (Riebesell y Gattuso, 2014).

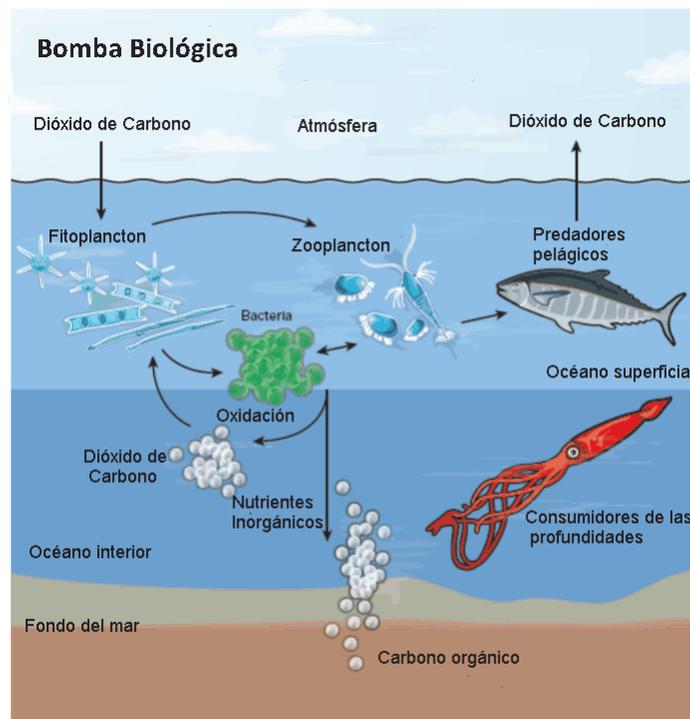
#### ***1.4 Los organismos acuáticos frente al cambio global:***

Es evidente que el cambio global afectará las propiedades físicas y químicas tanto de los ecosistemas terrestres como de los acuáticos (Ballaré et al., 2011; Häder et al., 2011). Algunos de los efectos observados como consecuencia del cambio global incluyen la extinción de especies (Thomas et al., 2004), cambios en la fenología y fisiología de animales y plantas, en la distribución de especies tanto altitudinal como latitudinalmente, así como también en la estructura de las comunidades (Walther, 2010). En los ecosistemas acuáticos, se ha visto que las variables asociadas al cambio global afectarán tanto su funcionamiento como directamente a los organismos. Por ejemplo, el aumento de la temperatura y la acidificación pueden producir la decoloración de los corales y detener el crecimiento de los mismos (Anthony et al., 2008), y la exposición a la RUV solar puede reducir la productividad primaria, afectar la reproducción y el desarrollo y aumentar las tasas de mutaciones en fitoplancton, macroalgas, huevos y larvas de peces y en otros animales acuáticos (Häder et al., 2007). Como se mencionó anteriormente, en esta Tesis se enfocará en principalmente en los efectos de la RUV, la profundidad de la CSM / mezcla vertical y los nutrientes en un escenario de cambio global sobre el fitoplancton, el cual constituye la base de la cadena trófica de los ecosistemas acuáticos.

##### ***1.4.1 Fitoplancton:***

El plancton comprende aquellos organismos que se desplazan pasivamente en los ecosistemas acuáticos, y si bien puede cambiar su profundidad a través de la natación activa o cambios en la flotabilidad, sus movimientos dependen mayormente de las corrientes (Hays et al., 2005). El fitoplancton comprende un grupo de organismos fotosintéticos microscópicos, que se encuentra en la base de la trama trófica de los ecosistemas acuáticos, y si bien representa sólo el 1% de la biomasa fotosintética del planeta, es responsable del 45% de la producción primaria anual global

(Field et al., 1998). Los ecosistemas marinos constituyen un gran sumidero de carbono y secuestran la misma cantidad de CO<sub>2</sub> que los ecosistemas terrestres (Falkowski, 2012), absorbiendo alrededor de 26 millones de toneladas de CO<sub>2</sub> antrópico por día (Zepp et al., 2007), por lo tanto, juegan un papel clave en la regulación de la concentración atmosférica de CO<sub>2</sub> y en el ciclo de carbono del planeta. Parte del exceso de CO<sub>2</sub> debido a las actividades antrópicas se elimina de la atmósfera mediante la llamada bomba biológica (Volk y Hoffert, 1985; Passow y Carlson, 2012). El CO<sub>2</sub> es capturado por el fitoplancton de la capa superior de los océanos a través del proceso de fotosíntesis, y cuando estos organismos mueren o son consumidos por consumidores primarios o secundarios, este material se hunde lentamente el mar (Falkowski, 2012) (Fig. 1.7).



**Fig. 1.7** Esquema de la bomba biológica. Fuente: Falkowski, (2012).

Aunque es evidente la importancia ecológica y los beneficios asociados a la presencia de estos organismos, también pueden ser responsables de fenómenos tales como los blooms o floraciones de algas nocivas que, en ambientes marinos, involucran especies de dinoflagelados del género *Alexandrium* y *Gymnodinium*, entre otros (Anderson, 1997; Smayda, 1997a). Se denomina floración o bloom de fitoplancton al incremento rápido o acumulación de, generalmente, una o un

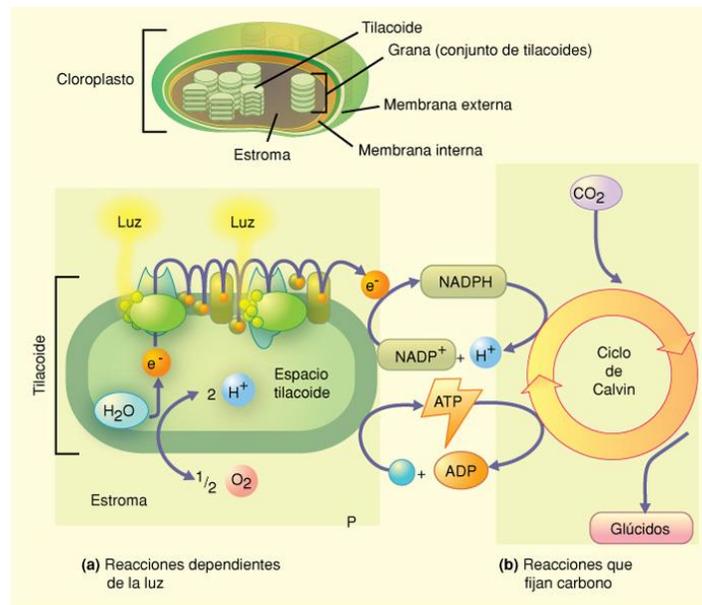
número limitado de especies (Smayda, 1997b). Este fenómeno ocurre bajo condiciones particulares de radiación, nutrientes (requisitos esenciales para la fotosíntesis; Platt y Sathyendranath, 1988) y temperatura, entre otros (Paerl, 1988; Toseland et al., 2013). Cuando estos organismos agotan los nutrientes y comienzan a morir, su descomposición puede llevar al agotamiento del oxígeno en el agua (hipoxia / anoxia) y, como consecuencia, a la muerte masiva de peces y otros organismos (Paerl y Huisman, 2008).

Existen evidencias de que el plancton es un indicador más sensible del cambio global que las variables ambientales involucradas (radiación, temperatura, etc.) debido a que las respuestas no lineales de las comunidades pueden amplificar las alteraciones del ambiente (Taylor et al., 2002). Además, la mayor parte del flujo de materia orgánica hacia niveles tróficos superiores depende de estos organismos, por lo cual, todo cambio potencial en su estado fisiológico y ecológico provocado por el cambio global, tendrá un impacto directo o indirecto sobre el resto de la trama trófica (Häder et al., 2015). Sin embargo, la respuesta del fitoplancton a la combinación de dos o más variables ambientales (como por ejemplo aquellas de cambio global) es especie-específica y además varía desde interacciones antagónicas, sinérgicas, ausencia de interacción o aditivas (Thompson, 1999; Crain et al., 2008; Carvalho et al., 2009) por lo cual no se pueden realizar generalizaciones a partir de estudios realizados con otros organismos o ecosistemas; además, las variables de cambio global afectan de manera diferencial a los distintos blancos celulares y procesos. Por lo tanto en esta Tesis se decidió centrar los estudios, principalmente, en el efecto interactivo de variables asociadas al cambio global sobre la fotosíntesis y crecimiento, y cambios en la estructura de tamaños y composición de las comunidades.

#### **1.4.2 Fotosíntesis – Conceptos generales:**

La fotosíntesis es el proceso que realizan los organismos autótrofos (entre ellos el fitoplancton) por el cual la materia inorgánica se transforma en materia orgánica gracias a la energía que aporta la radiación solar. Los cloroplastos son los encargados de capturar la energía proveniente del Sol a través de la clorofila u otros pigmentos accesorios. Este proceso consta de dos fases: a) La fase lumínica o fotoquímica, que se produce en los tilacoides, en la cual la energía lumínica es transformada en energía química, y ésta es almacenada en forma de NADPH y ATP. El agua cede los primeros electrones de la reacción, liberando oxígeno como producto de la misma. b) La fase enzimática u oscura (ya que no requiere la presencia de luz) que se produce en el estroma, en la cual el poder reductor del NADPH y el potencial energético del grupo fosfato del ATP se utilizan

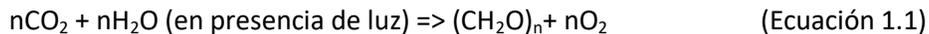
para la síntesis de hidratos de carbono a partir de la reducción del CO<sub>2</sub>. El estroma (fase acuosa encerrada por la membrana interna) contiene la mayoría de las enzimas requeridas para las reacciones de fijación de carbono de la fase oscura (Fig. 1.8).



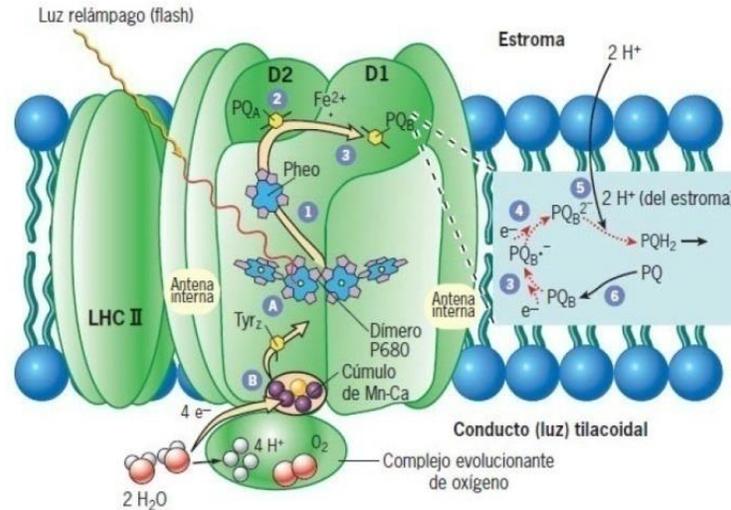
**Fig. 1.8** Cloroplasto típico de los organismos fotosintéticos. Se diferencian las dos fases del proceso de fotosíntesis: (a) La fase fotoquímica en la membrana tilacoidal y (b) La fase enzimática en el estroma.

Fuente: <http://www.virtual.unal.edu.co>

El proceso de fotosíntesis se resume en la siguiente ecuación:



Los fotosistemas son complejos proteicos situados en las membranas tilacoidales de los organismos autótrofos donde se agrupan los pigmentos fotosintéticos, como la clorofila, entre otros, y son los responsables de captar la energía del sol y transformarla en energía útil. Los fotosistemas poseen dos componentes: 1) Un complejo antena, compuesto por gran cantidad de pigmentos, principalmente clorofila, responsable de captar la energía luminosa y transformarla en energía química que luego se transfiere y circula hacia el centro de reacción y, 2) Un centro de reacción, formado por moléculas de proteínas que rodean a la clorofila a y b, y por un aceptor primario de electrones (Fig. 1.9).



**Fig. 1.9** Esquema del Fotosistema II.

Fuente: <http://www.virtual.unal.edu.co>

Existen dos fotosistemas: a) El fotosistema I (FS I), también llamado P700 y, b) El fotosistema II (FS II) o P680. La absorción de un fotón por cualquiera de las clorofilas antena genera la excitación del centro de reacción por transferencia de excitones. Si bien todas las moléculas de pigmento de un fotosistema pueden absorber fotones, sólo unas pocas de clorofila asociadas al centro de reacción participan en la transferencia de la energía lumínica a energía química. Los fotones captados por los fotosistemas producen el transporte de electrones a través de una cadena redox, que van desde el FS II hacia el FS I, siendo el último transportador de esta cadena, una enzima (NADP reductasa) que transforma  $\text{NADP}^+$  en NADPH. Esta ruta para el movimiento de los electrones entre ambos fotosistemas se denomina esquema Z (Fig. 1.10) y se repite miles de veces dentro de una membrana tilacoidal.

La energía liberada por el flujo de electrones se utiliza de manera indirecta para impulsar la síntesis de ATP por parte de la ATP sintetasa (Fig. 1.11). Estas moléculas sintetizadas durante la fase lumínica se utilizarán luego en la fase oscura para reducir el  $\text{CO}_2$  a un azúcar, a partir del cual se sintetizarán luego otras moléculas orgánicas. Las reacciones de fijación de carbono se realizan en el estroma de la célula por medio del Ciclo de Calvin-Benson-Bassham (CBB).

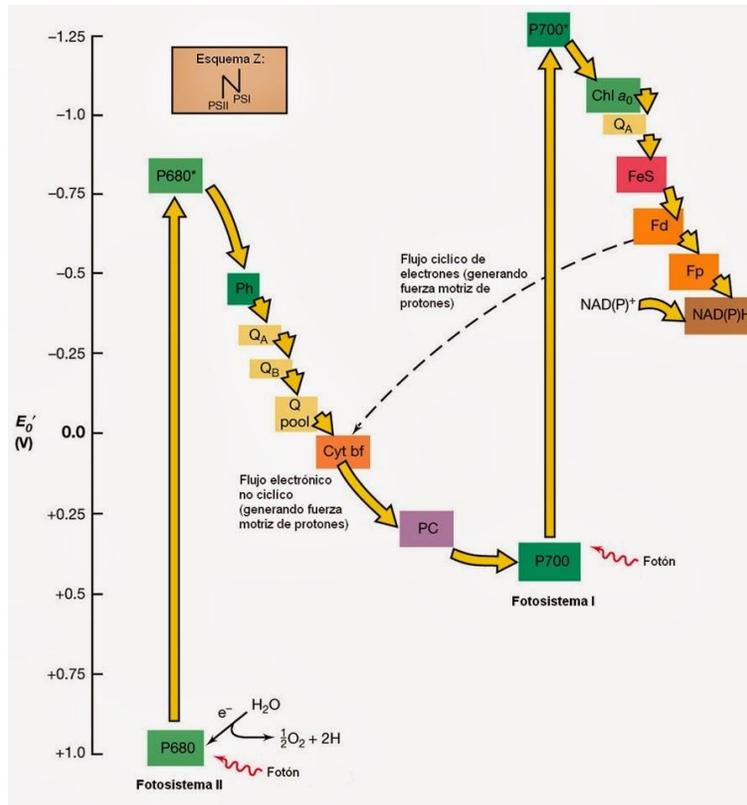


Fig. 1.10 Esquema Z de la fotosíntesis.

Fuente: <http://www.biologia.edu.ar>

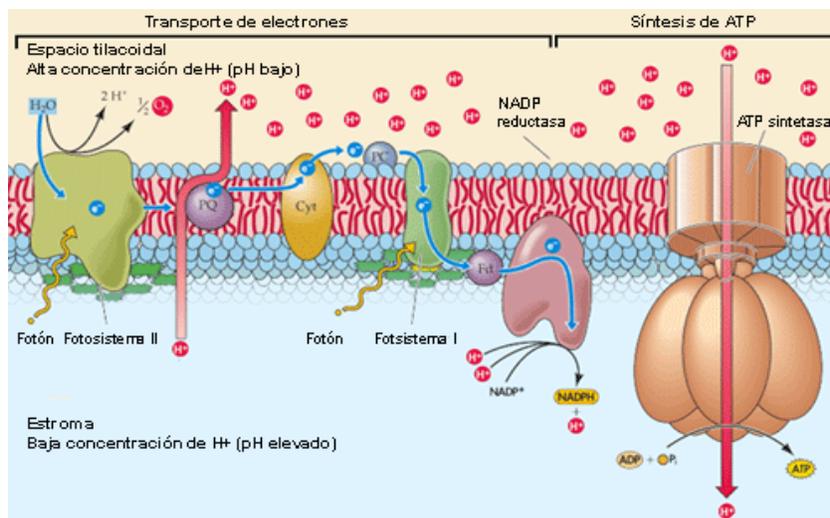
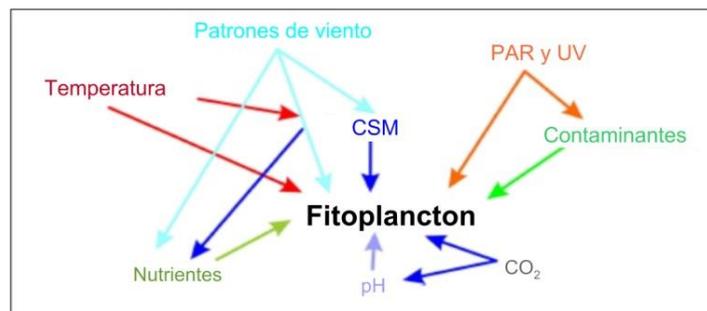


Fig. 1.11 Esquema resumen de la fase luminosa de la fotosíntesis.

Fuente: <http://www.biologia.edu.ar>

### 1.4.3 Fotosíntesis en el fitoplancton – Interacción con variables ambientales:

El crecimiento y desarrollo de los organismos fitoplanctónicos (y de todos los organismos autótrofos en general) dependen básicamente de la incorporación de carbono como resultado final de la fotosíntesis. En estos organismos, las variaciones en las condiciones de radiación y de nutrientes pueden afectar significativamente el proceso fotosintético en escalas temporales cortas, y a más largo plazo, puede además producir alteraciones en la estructura y composición de las comunidades. Las condiciones de radiación y nutrientes a su vez, están fuertemente influenciadas por la mezcla vertical, por lo cual resulta obvia la necesidad de estudiar los efectos de estas tres variables (radiación, mezcla vertical y nutrientes) sobre el fitoplancton. Además, todas estas variables están de alguna forma influenciadas por actividades humanas, por lo que los organismos fitoplanctónicos también están afectados por el cambio global (Behrenfeld et al., 2006; Häder y Gao, 2015) (Fig. 1.12). Por ejemplo, Laufkoetter et al. (2013) demuestran que la productividad del fitoplancton ha disminuido en algunas regiones en un 8.5% entre 1960-2006 debido a una mayor estratificación, o a un aumento en la mezcla vertical asociada a mayores intensidades de viento. Por su lado, Falkowski y Oliver (2007) predicen una disminución de la productividad primaria en los océanos de alrededor del 50% durante el presente siglo debido al cambio global.

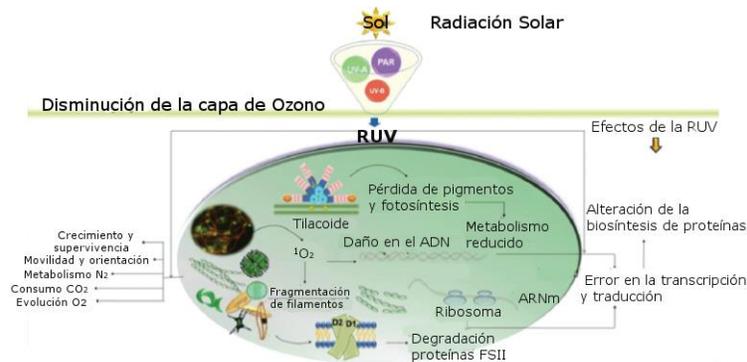


**Fig. 1.12** Interacciones entre factores externos que afectan la productividad del fitoplancton. Fuente: Häder y Gao (2015).

### 1.4.4 Efectos de la RUV y otras variables asociadas al cambio global en el fitoplancton:

Una de las variables asociadas al cambio global que mayor impacto tiene sobre el fitoplancton es la RUV. En particular la RUV-B, que representa sólo una pequeña fracción de la radiación solar total, puede ser extremadamente perjudicial dañando biomoléculas y estructuras celulares, impidiendo que se desarrollen reacciones enzimáticas, además de producir cambios en las

respuestas fisiológicas de los organismos (Richa et al., 2014; Häder et al., 2015) (Fig. 1.13). El daño puede ser causado por impactos directos sobre las estructuras celulares o por la formación de especies reactivas de oxígeno (oxígeno singlete,  $^1O_2$ ) (Zhang et al., 2013).



**Fig. 1.13** Efectos de RUV en biomoléculas, componentes celulares y fisiología del fitoplancton.

Fuente: Modificada de Häder (2015).

Algunos de los efectos de la RUV sobre el aparato fotosintético incluyen daños en la estructura de los tilacoides y pérdida de pigmentos fotosintéticos (Gupta et al., 2008; Häder et al., 2015). Además, la RUV puede descomponer la proteína D1 de la cadena de transporte electrónico del FS II (Häder et al., 2011) y dañar sus mecanismos de reparación (Wu et al., 2012). También, puede afectar negativamente a las reacciones enzimáticas, como la absorción de  $CO_2$  y la producción del  $O_2$ , e interferir con el metabolismo del  $N_2$  (Srivastava et al., 2014), además de dañar el ADN y la maquinaria genética de las células (Cadet et al., 2014). La RUV también puede causar efectos positivos, ya que el fitoplancton es capaz de utilizar la RUV-A para reparar el daño en el ADN (Buma et al., 2003) o puede ser utilizada como fuente de energía para realizar fotosíntesis cuando la radiación visible es limitante (Barbieri et al., 2002).

El fitoplancton ha desarrollado estrategias básicas para minimizar los efectos negativos de la RUV, tales como la migración vertical que puede ser a través de movimientos impulsados por flagelos o cambiando la flotabilidad mediante la producción de vacuolas de gas (Roy, 2000; Halac et al., 2014), además de estrategias para sintetizar y/o bioacumular compuestos que absorben RUV (por ejemplo, mycosporine-like amino acids, MAAs) evitando daños en moléculas vitales (Favre-Bonvin et al., 1987; Oren y Gunde-Cimerman, 2007), o para reparar el daño producido en el ADN (Rastogi et al., 2014) o en la proteína D1 involucrada en el transporte electrónico (Bouchard et al., 2006). El

proceso de reparación de la proteína D1 puede incrementarse debido al aumento de temperatura (Li et al., 2012), mientras que la baja concentración de nutrientes puede dificultarlo (Doyle et al., 2005). Estas estrategias o mecanismos estarán también afectados en un escenario de cambio global. Por ejemplo, y dado que el calentamiento global provoca una disminución de la profundidad de la CSM, el fitoplancton está expuesto a mayores niveles de radiación, pero al mismo tiempo, las mayores temperaturas favorecen la fotorreparación del daño causado por la RUV-B (Helbling et al., 2011). Estos procesos de reparación pueden activarse cuando los organismos son transportados hacia el límite inferior de la CSM, dependiendo de la profundidad y de la velocidad de mezcla (Neale et al., 1998). Por otra parte, se ha observado que las concentraciones limitantes de nutrientes pueden alterar las respuestas fisiológicas y ecológicas del fitoplancton a la exposición elevada de PAR y RUV, al calentamiento, a la acidificación y a otros factores de estrés de origen antrópico (Häder y Gao, 2018).

Por otro lado, se espera que los efectos de las variables asociadas al cambio global sean distintos de acuerdo a la escala temporal considerada. Así, los efectos de la RUV en forma individual o en conjunto con otras variables, evaluados en lapsos de horas (corto plazo), son diferentes de aquellos determinados después de varios días (mediano/largo plazo) (Villafañe et al., 1995b; Villafañe et al., 2014; Cabrerizo et al., 2017a). Esto se debe a que algunas especies poseen la capacidad de aclimatarse a las nuevas condiciones ambientales, lo que resulta en cambios estables a largo plazo que reflejan una mejor respuesta después de un lapso de exposición prolongado (Hüner et al., 1998). Estas respuestas varían según las especies, por lo que la sensibilidad especie-específica modulará la respuesta a mediano/largo plazo (Sobrino y Neale, 2007; Wong et al., 2007; Helbling et al., 2015b).

Debido a esta variedad de respuestas, y a la interacción entre las variables, es necesario realizar estudios que permitan determinar los efectos de múltiples factores de estrés, tanto a corto como a largo plazo en las comunidades fitoplanctónicas, para evaluar y potencialmente predecir los efectos del cambio global en los ecosistemas acuáticos. Existen relativamente pocos trabajos relacionados con esta temática particular, y se tiene muy poco conocimiento del grado de interacción entre cada una de estas variables sobre las comunidades autotróficas de zonas costeras. Esto sorprende, ya que se sabe que estas variables, al menos individualmente, pueden afectar significativamente no solo los procesos fisiológicos (Häder y Gao, 2018), sino también alterar la estructura de tamaños y composición específica de las comunidades fitoplanctónicas

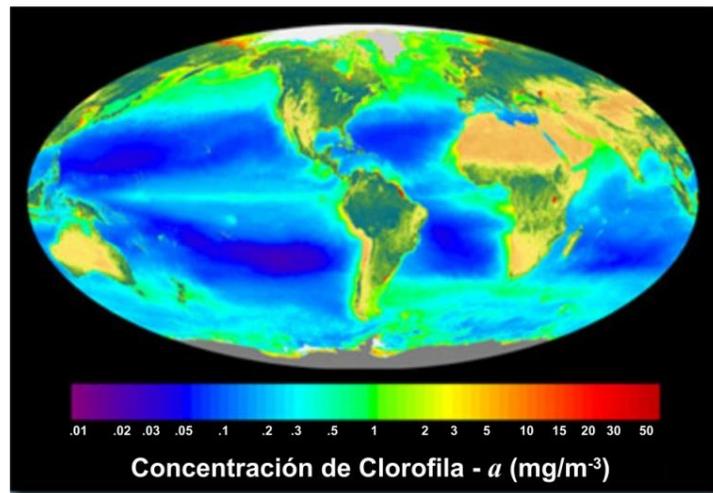
(Harrison y Smith, 2009; Zhu et al., 2010), con consecuencias que pueden propagarse en los niveles tróficos superiores de la trama alimentaria (Hessen et al., 1997; Calbet et al., 2014).

Por tal motivo, se planteó este trabajo de Tesis, que tiene como Objetivo General *estudiar el efecto combinado de la radiación solar, tanto PAR como RUV, y la concentración de nutrientes, en distintas condiciones de mezcla vertical (profundidad e irradiancia fluctuante) sobre la fotosíntesis / productividad primaria y composición / estructura de comunidades naturales del fitoplancton de la región Patagónica.*

## **1.5 Fundamentación y lineamientos de la Tesis:**

### **1.5.1 Importancia del área de estudio:**

El área de estudio seleccionada para esta Tesis se encuentra en la región Patagónica, en la costa de la provincia de Chubut. Las áreas costeras del Mar Argentino, y en especial la costa Chubutense son muy productivas (Fig. 1.14) y juegan un papel clave como áreas de reproducción y cría de especies de interés ecológico y económico. El fitoplancton de la costa Patagónica representa el sustento de peces (por ejemplo, merluza) e invertebrados de alto valor comercial (camarón, langostino, entre otros) (Caille et al., 1997) que mantienen una pesquería muy importante (Skewgar et al., 2007).

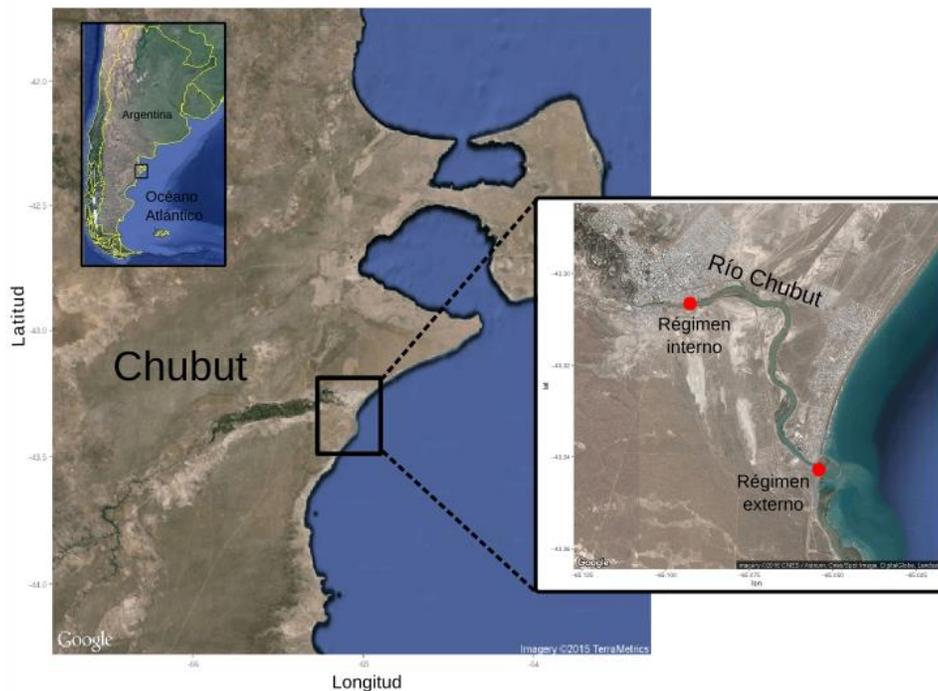


**Fig. 1.14** Concentración promedio de Clor-*a* en el océano durante el período de septiembre 1997 - agosto 2000.

Fuente: <https://oceancolor.gsfc.nasa.gov>

Sin embargo, esta área se encuentra poco estudiada en comparación con otras partes del océano del mundo. Otra de las razones para la elección del área de estudio se debe a su gran importancia

desde un punto de vista fotobiológico, ya que recibe normalmente altos niveles de RUV y se encuentra periódicamente bajo la influencia de eventos de disminución de ozono (Fig. 1.5) (Helbling et al., 2005). Otra de las particularidades de la zona de estudio (y de la Patagonia en general) es la presencia de fuertes vientos durante la mayor parte del año (Villafañe et al., 2004) que condicionan la profundidad de la CSM. De hecho, la mezcla producida por el viento afecta las irradiancias (intensidad y régimen fluctuante) a la que estarán expuestos los organismos fitoplanctónicos (Helbling et al., 2005). Estos fuertes vientos (preponderantemente del Oeste) hacen que algunos fenómenos naturales que ocurren en otros sitios (por ejemplo erupciones volcánicas en la cordillera) afecten las aguas costeras, tal como ocurrió con las cenizas del volcán Puyehue que fueron transportadas eólicamente hacia la zona propuesta de estudio (Villafañe et al., 2013), modificando significativamente las propiedades ópticas del agua. En particular, el área de estudio seleccionada para este trabajo de Tesis es el estuario del río Chubut (Fig. 1.15) que desemboca en las aguas costeras de Bahía Engaño (43°S 65°O) en el Océano Atlántico Sur (OAS).



**Fig. 1.15** Mapa del área de estudio. Los círculos rojos representan los sitios de muestreo en el régimen interno y externo del estuario del río Chubut.

Los estuarios son sitios de especial interés ecológico, ya que presentan condiciones únicas en cuanto a sus propiedades físicas, químicas y biológicas, debido a que comprenden la zona de transición entre el río y el mar. Presentan tres secciones claramente distinguibles: el régimen interno (agua de río), central (mezcla de agua dulce y marina) y externo (marina) (Hansen y Rattray, 1965). La combinación de estas dos masas de agua (i.e., agua de río y mar) crea un sistema complejo y sus propiedades dependen de una amplia gama de factores que incluyen el rango de mareas, la entrada de agua dulce, la geografía (profundidad y área del estuario), el clima (especialmente precipitación y viento) y el aporte de compuestos químicos (nutrientes y contaminantes) que ingresan desde la tierra (Simpson et al., 1990). Además, las características ópticas de la columna de agua son diferentes entre los regímenes externos e internos, ya que el agua de río presenta, en general, una mayor atenuación de la radiación solar que el agua de mar y por lo tanto condiciona la capacidad de aclimatación del fitoplancton en aguas más turbias (Helbling et al., 2013; Helbling et al., 2015a). En el estuario del río Chubut, los coeficientes de atenuación para PAR ( $K_{PAR}$ ) varían entre 4-5  $m^{-1}$  para el extremo interno y el río tiene, en la zona de estudio, una profundidad media de 1 m (Helbling et al., 2010, 2015a). La CSM comprende toda la profundidad del río debido a la turbulencia y a la topografía del fondo. Por otra parte, en el régimen externo, los  $K_{PAR}$  varían entre 1-2  $m^{-1}$  (Helbling et al., 2010, 2015a), y la profundidad varía entre 0.5 y 6 m para el sitio de muestreo del régimen externo, dependiendo de las mareas. Además, en trabajos anteriores Helbling et al. (2010) determinó que durante la bajante no había estratificación para ninguna altura de la marea, mientras que en la creciente se observaba estratificación en alturas de mareas entre 1.4-4 m. Dadas las características particulares de estos ecosistemas, en esta Tesis se trabajó con comunidades de fitoplancton recolectadas de los dos sitios contrastantes del estuario del Río Chubut i.e., con comunidades marinas recolectadas en el régimen externo y de agua dulce recolectadas en el régimen interno (Fig. 1.15). Se eligió trabajar con estas dos comunidades, ya que es claro que su composición taxonómica será muy distinta en ambos extremos del estuario y por lo tanto, también lo serán sus respuestas frente a un escenario de cambio global, tal como se simula en esta Tesis.

### **1.5.2 Relevancia del tema de estudio:**

Como ya se mencionó anteriormente, algunos de los efectos del cambio global en los ecosistemas acuáticos son el aumento de la temperatura, lo que genera una estratificación más pronunciada y una disminución en la profundidad de la CSM, exponiendo a los organismos fitoplanctónicos que

viven en las capas superiores de la columna de agua, a una mayor radiación PAR y RUV (Behrenfeld et al., 2006; Gao et al., 2012). Además los cambios en la velocidad y dirección del viento, como consecuencia del cambio global, también alteran la profundidad de la CSM en muchos cuerpos de agua (Beardall y Raven, 2004; Häder et al., 2015). Estos cambios en los patrones climáticos aumentan la cantidad de nutrientes de origen terrestre que llegan de forma eólica o fluvial, y junto con el aumento de la descarga de contaminantes industriales y municipales, así como el uso excesivo de fertilizantes en la agricultura, contribuyen a aumentar las concentraciones de nutrientes que recibirán los organismos fitoplanctónicos de las aguas costeras, produciendo potencialmente cambios en la formación, intensidad y momento de ocurrencia de los blooms (Carstensen et al., 2007; 2015). Por lo tanto, el estuario del río Chubut puede considerarse un área de estudio modelo para estudiar precisamente estos aspectos.

### **1.5.3 Hipótesis de trabajo:**

Diversos estudios demostraron que la radiación solar (en especial la RUV) puede inhibir la fotosíntesis del fitoplancton, y que la mezcla vertical, inducida por el viento, puede aumentar o disminuir esta inhibición, dependiendo de diversos factores, entre ellos la transparencia del cuerpo de agua. Por otra parte, se ha demostrado que el agregado de nutrientes tiene un papel clave en la fisiología del fitoplancton, permitiendo a las especies una mejor aclimatación para contrarrestar los potenciales efectos negativos de la exposición a la radiación solar. Es decir que las condiciones atmosféricas (i.e., viento) condicionan la estructura de la columna de agua y por lo tanto determinan la profundidad de la CSM y la irradiancia que recibe el fitoplancton. Es por eso que la primera hipótesis de la Tesis plantea:

*H1: En condiciones de alta intensidad y duración de viento, no se desarrolla el bloom invernal de fitoplancton, característico de la región Patagónica.*

Por otra parte, el aumento en la cantidad de nutrientes que son volcados a cursos de aguas y terminan en las zonas costeras, favorecen en distinto grado al fitoplancton, por lo cual se desprende la segunda hipótesis:

*H2) El aporte de nutrientes actúa en forma antagónica con la RUV y una CSM poco profunda, contrarrestando los efectos negativos de los mismos sobre la eficiencia fotoquímica a corto plazo.*

La respuesta de los organismos a la radiación, mezcla vertical y aporte de nutrientes, puede variar de acuerdo al lapso de tiempo considerado, debido a procesos de aclimatación, por lo que se hace necesario realizar estudios a largo plazo (días). Dado que se esperan cambios en la composición taxonómica y distribución de tamaños en comunidades de fitoplancton, las especies que presenten mecanismos de fotoprotección se aclimatarán a la radiación y serán más tolerantes a la RUV. Los nutrientes, dentro de la columna de agua, dependen de la CSM y, en general, son mejor utilizados por células pequeñas debido a su mayor relación superficie/volumen, pero con un agregado extra de nutrientes, las células más grandes comenzarían a tomar ventaja de ellos. En base a esto, se propone la tercera hipótesis:

*H3) El aporte de nutrientes, conjuntamente con una CSM poco profunda selecciona, a largo plazo, células grandes (i.e., microplancton) aclimatadas a altas irradiancias.*

Sin embargo, el impacto de los factores considerados variará a lo largo del año, debido a las condiciones meteorológicas y de radiación solar, por eso se plantea la cuarta hipótesis:

*H4) El impacto conjunto de la radiación solar, CSM poco profunda y aumento de nutrientes es: H4a) mayor en invierno que en verano, y Hb) mayor en el río que en el mar.*

La utilización de nutrientes depende del tamaño celular, favoreciéndose las células pequeñas debido a su mayor relación superficie / volumen (Reynolds & Walsby 1975). Al ser estos nutrientes incorporados a la célula, su concentración en la capa límite (i.e., en contacto con la superficie alrededor de la célula) puede disminuir drásticamente. En condiciones donde los nutrientes son aportados en forma continua, la mezcla vertical (i.e., irradiancias fluctuantes) favorecerá la renovación de los nutrientes en la capa límite de las células (i.e., alrededor de las células), beneficiando a las más grandes. En base a lo expresado anteriormente, se propone la quinta hipótesis:

*H5) Las condiciones futuras de cambio global de bajo pH, altos nutrientes y RUV, junto a la fluctuación de radiación dentro de la CSM, cambia la composición taxonómica y estructura de*

*tamaños de la comunidad fitoplanctónica, beneficiando a células más resistentes y de mayor tamaño, y con mayores tasas fotosintéticas.*

#### **1.5.4 Estructura de la Tesis:**

El **Capítulo 1** es una Introducción general, donde se desarrollan conceptos básicos sobre el cambio global en la atmósfera y en los ecosistemas acuáticos, y provee un marco teórico y antecedentes sobre los efectos de algunas variables asociadas a este proceso en comunidades de fitoplancton, enfocando especialmente en aquellas sobre las que se trabajó en esta Tesis (radiación, mezcla vertical y nutrientes).

Para lograr un entendimiento del funcionamiento de los ecosistemas, como así también para poder predecir las consecuencias de las diversas variables en el futuro, tal como podría ocurrir en un escenario de cambio global, se hace necesario obtener una línea de base acerca de las condiciones actuales bajo las cuales se encuentran los organismos. Por lo tanto, se realizó un seguimiento de las variables climatológicas físicas, químicas y biológicas del estuario, para determinar patrones temporales y la variabilidad de estos factores bióticos y abióticos, y su incidencia sobre el fitoplancton en distintas épocas del año. Más aún, resulta de especial interés comparar patrones actuales con aquellos obtenidos en el pasado, para poder determinar si existieron cambios significativos y sus posibles causas. Estos resultados se presentan en el **Capítulo 2**, para los dos extremos del estuario del río Chubut, poniendo especial énfasis en cambios históricos en la sucesión anual del fitoplancton y la importancia del viento en condicionar el bloom de invierno (*H1*).

El grupo de investigación de la EFPU viene realizando estudios enfocados a analizar los efectos interactivos de diversas variables asociadas al cambio global sobre distintos aspectos de la ecología y metabolismo del fitoplancton (Barbieri et al., 2002; Marcoval et al., 2008; Helbling et al., 2015a; Villafañe et al., 2017), encontrando una gran variabilidad en las respuestas, no sólo debido a la especie-especificidad de ellas, sino también a la presencia de distintos mecanismos de aclimatación. Estos resultados, si bien proporcionan una línea de base sumamente importante, no permiten, *a priori*, realizar generalizaciones a distintas especies y/o comunidades. Por lo tanto, en esta Tesis se explora por primera vez los efectos combinados de tres variables, i.e., radiación solar, nutrientes y profundidad de la CSM, en forma simultánea, considerando asimismo efectos a corto y a largo plazo en los dos extremos del estuario del río Chubut a lo largo de la sucesión anual. En el

**Capítulo 3** se presentan estos resultados, respondiendo las hipótesis *H2*, *H3* y *H4* planteadas en esta Tesis.

En el **Capítulo 4** se evalúan los efectos combinados de la radiación solar, nutrientes y mezcla vertical (comparando irradiancias fijas vs. fluctuantes) en las respuestas fotoquímicas a corto y largo plazo, así como los cambios en la composición y estructura de comunidades fitoplanctónicas de verano para ambos extremos del estuario. Además en este capítulo se incluyó otra variable asociada al cambio global como es el pH. En este capítulo, se responde la hipótesis *H5*.

En el **Capítulo 5** se presentan las conclusiones generales, y se plantean nuevos interrogantes que han surgido durante el desarrollo de esta Tesis.

## **Capítulo 2:**

# ***Control abiótico de las floraciones de fitoplancton en ecosistemas marinos templados: Un caso de estudio en el Océano Atlántico Sur***

Este capítulo es traducción del trabajo de respaldo de esta Tesis que se encuentra publicado como:  
Bermejo, P., E.W. Helbling, C. Durán-Romero, M.J. Cabrerizo & V.E. Villafañe. 2018. Abiotic control of phytoplankton blooms in temperate coastal marine ecosystems: A study case in the South Atlantic Ocean. *Science of the Total Environment*, 612: 894-902. Anexo 1.

## **2.1 Introducción:**

Los ecosistemas costeros se caracterizan por su gran biodiversidad y por sus fuertes gradientes de radiación solar, temperatura y nutrientes (entre otros), convirtiéndolos en sitios de especial interés ecológico (Cloern et al., 2014). Las zonas costeras representan una pequeña fracción del área oceánica total (alrededor del 5%), sin embargo constituyen uno de los ecosistemas más productivos en la Tierra (Uitz et al., 2010; Rousseaux y Gregg, 2014), brindando también servicios de gran valor (UNEP, 2006). Entre estos servicios, el alimento (como capturas pesqueras) es uno de los más importantes, alcanzando  $\sim 80$  millones de ton año<sup>-1</sup> en el mundo, con una gran proporción de capturas en áreas templadas costeras (FAO, 2012). En particular, las aguas costeras del Océano Atlántico Sur (OAS) se encuentran entre las más productivas del mundo (Longhurst, 1998; Skewgar et al., 2007). Son importantes para la cría y reclutamiento de diversas especies de interés comercial (e.g., merluza, langostino y camarón; Boschi, 1997), y para la cría de varias especies emblemáticas (e.g., ballena franca austral, orca y pingüino de Magallanes; IWC, 2013).

La alta producción, riqueza y biodiversidad de especies en el OAS se mantiene por densas floraciones (o blooms) de fitoplancton que ocurren a lo largo de toda la plataforma continental (Villafañe et al., 2004; Romero et al., 2006; Guinder et al., 2015) o en el talud (Saraceno et al., 2005; Painter et al., 2010; Balch et al., 2014). Estas floraciones pueden verse afectadas directa o indirectamente por diversos factores (e.g., la mezcla vertical, radiación solar, temperatura y nutrientes; Behrenfeld y Boss, 2014), incluyendo aquellos de origen antrópico. En particular, existe una gran preocupación acerca del impacto del aporte excesivo de nutrientes orgánicos e inorgánicos a través de los ríos (a su vez asociado a las actividades humanas; Cloern et al., 2014) o en forma de polvo atmosférico (Jickells y Moore, 2015). Estas entradas de nutrientes pueden producir un aumento en la biomasa y cambios en la estructura de las comunidades de fitoplancton hacia taxa que pueden ser de baja calidad nutricional, no comestibles o incluso tóxicos para los consumidores (Smith et al., 1999; Fauchot et al., 2005; Carstensen et al., 2007). Todas estas variables pueden afectar en distinta medida la dinámica de los ecosistemas costeros, así como el funcionamiento de la sucesión anual de fitoplancton y, particularmente, el desarrollo y el momento en que ocurren las floraciones. A partir de los primeros trabajos de Sverdrup (Sverdrup, 1953) sobre las potenciales causas que originan las floraciones, se han puesto grandes esfuerzos para desarrollar una teoría general; sin embargo, aún hoy existen muchas incertidumbres con respecto a: 1) los requerimientos específicos que desencadenan estos eventos de crecimiento

masivo, 2) cuándo y cómo se desencadenan y, 3) qué factores (bióticos o abióticos) influyen en su duración e intensidad.

Se sabe que las floraciones usualmente responden a cambios en factores físicos que se producen en las zonas costeras (e.g., mareas), en la atmósfera (viento), o en la superficie de la tierra (precipitación y escorrentía del río) (Paerl et al., 1996; Carstensen et al., 2015). También se sabe que algunos factores abióticos afectan directamente el inicio y el desarrollo de las floraciones de fitoplancton, tales como la luz, nutrientes (requisitos esenciales para la fotosíntesis) y temperatura (catalizador de varias reacciones enzimáticas involucradas en las reacciones de captura de CO<sub>2</sub>) (Toseland et al., 2013). El viento (velocidad y dirección) también puede influir en la magnitud y la duración de las floraciones de fitoplancton ya que condiciona la estratificación y profundidad de la capa superficial de mezcla (CSM) la cual, a su vez, controla la disponibilidad de luz para la fotosíntesis (Yin et al., 2004; Fitch y Moore, 2007). Para el caso particular de las zonas costeras del OAS Villafañe et al. (2004) propusieron que las floraciones de fitoplancton se desencadenan bajo las condiciones calmas de viento, características del invierno. En cambio, los fuertes vientos predominantes durante la primavera y el verano mantienen a las células circulando dentro de una capa de mezcla relativamente profunda y con poca iluminación y, por lo tanto, el crecimiento de fitoplancton es más limitado en el pre- y post-bloom (Villafañe et al., 2004; Helbling et al., 2005).

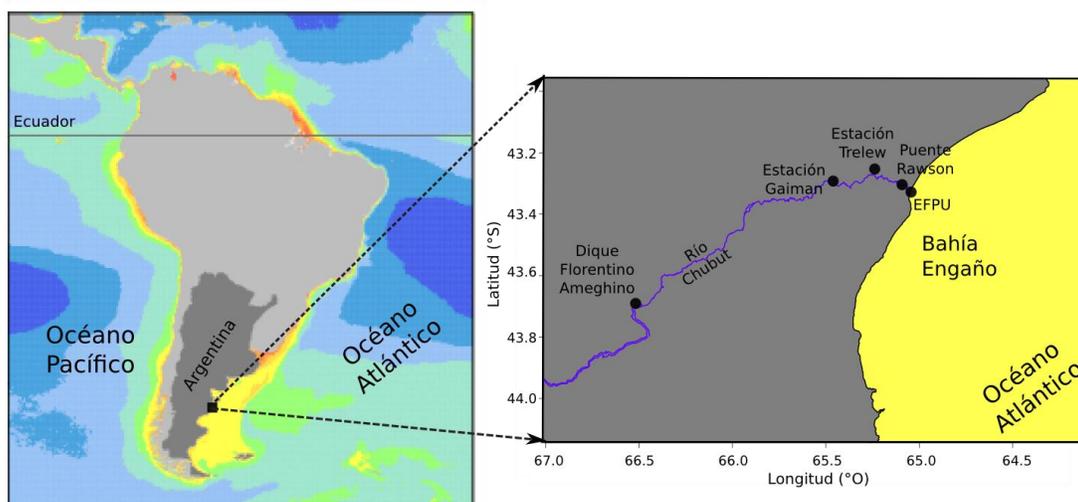
Durante el año 2015 se observó un cambio en el patrón de viento (en comparación con años anteriores) en el área de Bahía Engaño (zona costera ubicada en la Provincia de Chubut, Patagonia, Argentina). Esto dio la oportunidad de estudiar su influencia en el inicio y desarrollo de las floraciones fitoplanctónicas, utilizando a Bahía Engaño como un ecosistema modelo para el OAS costero. Para lograr este objetivo se compararon los patrones de viento, así como otras variables abióticas (radiación solar, temperatura, nutrientes, etc.) del año 2015 con un período de referencia (2001-2014), para evaluar su impacto en la dinámica del fitoplancton. Este trabajo tiene una importancia obvia, ya que al entender las relaciones entre los cambios en los factores abióticos y la dinámica de las floraciones de fitoplancton, se podrán predecir sus impactos futuros en la producción secundaria y, en última instancia, en la economía regional.

## **2.2 Materiales y métodos:**

### **2.2.1 Área de Estudio:**

Bahía Engaño se encuentra ubicada en la desembocadura del Río Chubut (Patagonia, Argentina) (Fig. 2.1). El caudal del Río Chubut está regulado por el Dique Florentino Ameghino, ubicado 150

km río arriba de la desembocadura (Fig. 2.1). Las ciudades más grandes de la zona (Trelew, Rawson, Gaiman, Dolavon, ~150,000 habitantes en total, [www.indec.gov.ar](http://www.indec.gov.ar)) están emplazadas entre el dique y la desembocadura del río, en una zona fértil llamada Valle Inferior del Río Chubut. En este valle el río se divide en varios canales de riego que abastecen de agua a las chacras destinadas a actividades agrícolas y a cría de animales. Alrededor del 80% de la producción hortícola de la Provincia de Chubut se encuentra a lo largo del margen del Río Chubut, en los últimos 100 km antes de llegar al mar. En la última década, el uso de la tierra destinada a actividades agrícolas se duplicó y consecuentemente, el uso de agroquímicos (principalmente compuestos organoclorados y organofosforados) sin un control adecuado se incrementó (Antolini, 2012; Kopprio et al., 2015). Las industrias pesqueras también vierten sus desechos cerca de la desembocadura del río alcanzando, en última instancia Bahía Engaño (Chiarandini Fiore et al., 2013). Por lo tanto el área de estudio, en su totalidad, puede considerarse altamente impactada por actividades de origen antrópico.



**Fig. 2.1** Mapa del área de estudio en el cual se muestran los distintos sitios donde se obtuvieron los datos.

## 2.2.2 Datos:

### *Datos meteorológicos:*

Los datos correspondientes al período de referencia (2001-2014) y al año 2015 para las distintas variables meteorológicas (Tabla 2.1) se adquirieron de la siguiente manera: La temperatura, humedad, dirección y velocidad de viento se obtuvieron continuamente (un dato por minuto) con

una estación meteorológica (Tecmes, model TS, Argentina) instalada de forma permanente (desde el año 2001) en el techo de la Estación de Fotobiología Playa Unión (EFPU; Fig. 2.1). Los datos de precipitaciones se obtuvieron de la base de datos SIPAS (Sistema de Información Patagonia Sur, sipas.inta.gob.ar) perteneciente al Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA, Trelew; ~15 km río arriba del puente de Rawson, Fig. 2.1).

Variable / Período	Frecuencia datos / n° observaciones	Fuentes
Radiación solar (2001-2015)	Cada minuto	Base de datos EFPU (efpu.org.ar)
Temperatura atmosférica (2001-2015)	Cada minuto	Base de datos EFPU (efpu.org.ar)
Dirección / velocidad del viento (2001-2015)	Cada minuto	Base de datos EFPU (efpu.org.ar)
Precipitaciones (2001-2015)	Mensual	Base de datos SIPAS (sipas.inta.gob.ar)
Caudal del río (2001-2015)	Diario	Base de datos BDHI (bdhi.hidricosargentina.gov.ar)
Temperatura del agua (mar / río) (1986-2015)	Mar: n=162 Río: n=105	Helbling (1989); Villafañe et al., (2004); Helbling et al., (2005; 2010); Spinelli et al., (2016); Cabrerizo et al., (2017b); EFPU no publicados.
Nutrientes (mar / río) (1986-2015)	Mar: n=94 Río: n=76	Helbling (1989; 2005); EFPU no publicados
Clor- <i>a</i> (1986-2015)	n=194	Helbling (1989); Barbieri et al., (2002); Helbling et al., (2005; 2010); Villafañe et al., (2004; 2008); Spinelli et al., (2016); Cabrerizo et al., (2017b); EFPU no publicados.
Composición / abundancia de fitoplancton / biomasa de C	n=90	Sastre et al., (1994); Villafañe et al., (2004; 2008); Spinelli et al., (2016); EFPU no publicados.

**Tabla 2.1** Fuentes de datos utilizados en este estudio para el período de referencia (2001-2014) y para el año 2015, que incluyen dosis de radiación solar (PAR, RUV-A y RUV-B), temperatura (aire, agua de mar y río), viento (velocidad y dirección), precipitaciones, caudal del río, nutrientes, Clor-*a* y abundancia y composición de fitoplancton.

La radiación solar incidente se registra continuamente (desde 1999) utilizando un radiómetro de filtro de banda ancha perteneciente a la Red Europea de Dosímetros (ELDONET, Real Time Computers, Alemania) que mide radiación fotosintéticamente activa (PAR, 400-700 nm), radiación ultravioleta A (RUV-A, 315-400 nm) y radiación ultravioleta B (RUV-B, 280-315 nm) cada segundo, promediando y almacenando los datos cada minuto. El instrumento está ubicado de forma

permanente en el techo de la EFPU y se calibra rutinariamente (una vez al año) usando un procedimiento de calibración solar (Ruggaber et al., 1994; Björn y Murphy, 1985). En este trabajo sólo se utilizaron datos correspondientes al período de referencia (2001 - 2014) y al año 2015.

Los valores diarios del índice de aerosoles promediados por área (IA) para el área de Bahía Engaño se obtuvieron de la base de datos de National Aeronautics and Space Administration (NASA) (Acker y Leptoukh, 2007). Los datos se obtuvieron por el Total Ozone Mapping Spectrometer - Earth Probe (TOMS - EP; 2001-2004) con una resolución de cuadrícula global de  $1 \times 1.25$  grados, y por el Instrumento de Monitoreo del Ozono (OMI; 2005-2015) con una resolución de cuadrícula global de  $1 \times 1$  grados. Sólo se consideraron los valores positivos del IA, dado que representan los aerosoles absorbentes (i.e., polvo atmosférico).

#### *Datos hidrológicos y química del agua:*

Los datos del caudal del Río Chubut, tanto para el año 2015 como para el período de referencia, se obtuvieron de la Estación Gaiman (ubicada 40 km río arriba del puente de Rawson, Fig. 2.1) perteneciente a la Base de Datos Hidrológica Integrada ([bdhi.hidricosargentina.gov.ar](http://bdhi.hidricosargentina.gov.ar)) de la Secretaría de Recursos Hídricos (Argentina). Los datos físicos (i.e., temperatura del agua) y químicos (i.e., nutrientes) correspondientes al período de referencia, se obtuvieron de distintas fuentes ya publicadas, y no publicadas de nuestro grupo de investigación (Tabla 2.1). Durante el año 2015, se recolectaron muestras de agua superficial ( $\sim 0.5$  m de profundidad) cada 10-15 días en dos sitios: 1) En el régimen externo (Bahía Engaño, en la desembocadura del Río Chubut y durante marea alta, con salinidad  $> 31$ ), y 2) En el régimen interno del estuario (Puente de Rawson, con salinidad  $< 1$ ; Fig. 2.1) para determinar las características físicas (temperatura y conductividad) y químicas (nutrientes) de ambos cuerpos de agua. La temperatura y la conductividad se midieron *in situ* utilizando una sonda multi-paramétrica (Yellow Spring Instruments, modelo XLM 600, USA). Las muestras para la caracterización química de macronutrientes ( $\text{NO}_3^- + \text{NO}_2^-$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$  y  $\text{SiO}_3^{2-}$ ) se llevaron inmediatamente a la EFPU (ubicada a 10 min de ambos sitios de muestreo), y se las colocaron en botellas de 100 ml de polietileno de alta densidad y se las congeló a  $-20^\circ\text{C}$  hasta su posterior análisis. Las muestras se analizaron usando las técnicas espectrofotométricas descritas por Strickland y Parsons (1972).

### *Datos de fitoplancton:*

Debido a la escasez de datos biológicos en el área, utilizamos un período de referencia extendido (desde 1986 hasta 2014), incluyendo todos los datos disponibles de concentración de Clorofila-a (Clor-a), composición taxonómica y abundancia de células de fitoplancton. Estos datos se obtuvieron de diferentes fuentes publicadas, así como de fuentes no publicadas de nuestro grupo de investigación (Tabla 2.1). Durante 2015, la concentración de Clor-a, los datos taxonómicos y de abundancia de fitoplancton se obtuvieron de la siguiente manera: Se recolectaron muestras de agua superficial (triplicados) en los sitios antes mencionados (régimen interno y externo del estuario) utilizando un recipiente lavado previamente con HCl 1 N; las muestras se pre-filtraron con una malla de 200  $\mu\text{m}$  para eliminar el zooplancton de mayor tamaño y se colocaron en bidones de policarbonato de 5 l (previamente lavados con HCl 1N) para su posterior análisis. Para determinar la concentración de Clor-a, se filtraron alícuotas de 100-250 ml con filtros Munktell GF/F (25 mm de diámetro) y los filtros se colocaron en tubos de centrifuga de 15 ml. A continuación se agregaron 5 ml de metanol absoluto a cada tubo (Holm-Hansen y Riemann, 1978) y los mismos se pusieron en un sonicador durante 20 min a 20 °C, completando la extracción luego de 40 min más en la oscuridad. Al finalizar el período de extracción, las muestras se centrifugaron a 2000 rpm durante 20 min y se escaneó el sobrenadante (250 a 750 nm) utilizando un espectrofotómetro (Hewlett Packard modelo HP 8453E, USA). La concentración de Clor-a se calculó usando la ecuación de Porra (2002).

Las muestras para la identificación y recuento de fitoplancton se colocaron en botellas de vidrio color caramelo de 250 ml y se fijaron con formaldehído al 20% (concentración final 0.4 % en la muestra) o en solución ácida de Lugol (1% vol vol<sup>-1</sup>) en caso de tratarse de muestras de mar o río, respectivamente. Al momento del análisis, se dejaron sedimentar sub-muestras de 10 - 25 ml durante 24 hs en cámaras Utermöhl y, en el caso de las muestras marinas, se agregó una gota de Rosa de Bengala para poder distinguir mejor el material orgánico de los detritos. Las especies se contaron e identificaron utilizando un microscopio invertido (Leica, modelo DM IL, Alemania) siguiendo la técnica descrita en Villafañe y Reid (1995). Las especies contadas e identificadas se clasificaron según su tamaño, en micro (>20  $\mu\text{m}$ ) y nanoplancton (2-20  $\mu\text{m}$ ). Los biovolúmenes de las células de fitoplancton se calcularon de acuerdo a Hillebrand et al. (1999), luego fueron convertidos en contenido de carbono (i.e., biomasa) usando las ecuaciones de Strathmann (1967), considerando la abundancia de células en las muestras. Villafañe et al. (1993) observaron una buena correlación entre el C orgánico particulado, obtenidos a partir de biovolúmenes, con datos

obtenidos utilizando un analizador de CHN (POC, particulate organic carbon). Sin embargo, en distintas situaciones hay que considerar que el contenido de C de una célula puede variar dependiendo de la relación radiación: nutrientes, y que el aporte del C del fitoplancton al POC puede variar temporal y espacialmente (Villafane et al., 1993). El porcentaje de microplancton se obtuvo como el número de células de microplancton relativo al total de células ( $\times 100$ ), o por la biomasa (como carbono) en la fracción microplánctónica en comparación con la biomasa total. Los resultados obtenidos con ambos métodos de cálculo fueron similares, por lo que se decidió trabajar con los datos basados en los recuentos celulares.

### **2.2.3 Tratamiento de los datos:**

Los datos biológicos (i.e., Clor-*a*, biomasa como carbono, abundancia de células y porcentaje de microplancton y diatomeas) se presentan como diagramas de caja, por lo tanto, se muestran las medianas, el primer y tercer cuartil, junto con el 1.5 del rango intercuartílico (RIC) y los valores atípicos. Asimismo, se calcularon los valores medios mensuales y las desviaciones estándar (DE) para la temperatura atmosférica, del agua de río y mar, para el caudal del río, precipitaciones e IA, tanto para el período de referencia como para el año 2015. Con los datos de viento se calculó la media de días por año (i.e., frecuencia) que tuvieron la misma velocidad máxima de viento (con un intervalo de  $1 \text{ km h}^{-1}$ ) durante el período de floración (invierno), tanto para el período de referencia como para el año 2015.

La normalidad y la homocedasticidad de los datos se comprobaron usando los test de Shapiro-Wilks y Barlett, respectivamente (Zar, 1999). Como los datos no siguieron una distribución normal, las diferencias estadísticas entre los datos correspondientes al año 2015 y el período de referencia se establecieron utilizando la prueba U no paramétrica de Mann-Whitney.

### **2.3 Resultados y Discusión:**

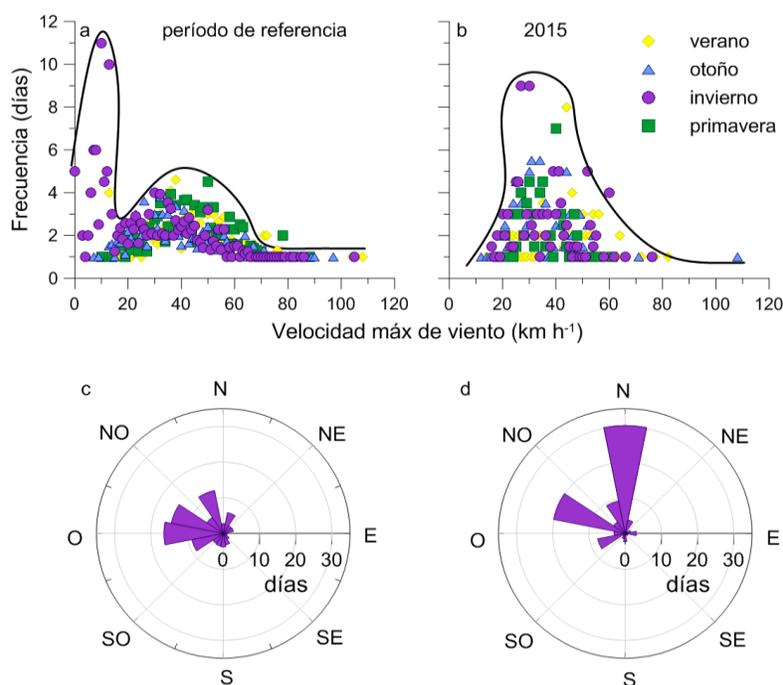
Una de las características más importantes del OAS es que está expuesto a vientos intensos casi todo el año (Gaiero et al., 2003; Gassó y Stein, 2007) y, por lo tanto, la parte superior de la columna de agua en la zona de la plataforma continental está en general bien mezclada y presenta una CSM profunda (Neale et al., 2003). Sin embargo, existe una heterogeneidad temporal en los patrones de viento, siendo éstos más fuertes durante la primavera y el verano, y menos intensos y con menor variabilidad durante el invierno (Villafañe et al., 2004; Helbling et al., 2005). Para calcular el número de días por año (frecuencia) con una cierta velocidad del viento, se utilizaron

los datos de viento correspondientes al período de referencia, y se observó, durante el invierno, una clara curva bimodal (Fig. 2.2a). El primer pico de la curva muestra días calmos, con velocidades máximas bajas de viento ( $< 15 \text{ km h}^{-1}$ ) durante el invierno y con una dirección predominante del oeste (Fig. 2.2a, c); durante este período hubo más de 11 días con una velocidad máxima de aproximadamente  $10 \text{ km h}^{-1}$ . El segundo pico de la curva corresponde a altas velocidades de viento (más de 5 días con velocidades máximas de viento de aproximadamente  $40\text{-}45 \text{ km h}^{-1}$ ) en su mayoría durante la primavera y el verano, coincidiendo con lo determinado previamente por Villafañe et al. (2004) y Helbling et al. (2005). Durante el año 2015, sin embargo, se observó una curva unimodal (Fig. 2.2b) que presentó hasta 10 días de vientos fuertes con velocidades de aproximadamente  $30\text{-}35 \text{ km h}^{-1}$ . Por lo tanto, los días calmos característicos del invierno del período de referencia (Fig. 2.2a) desaparecieron por completo y, en cambio, durante el invierno de 2015 la velocidad máxima del viento siempre fue  $> 15 \text{ km h}^{-1}$  y con una dirección predominante del norte (Fig. 2.2d).

El viento es un factor esencial que controla la dinámica del fitoplancton, como se determinó en los primeros trabajos de Sverdrup (1953) y en otros estudios que proponen que los vientos fuertes podrían retrasar el inicio de las floraciones, mientras que las condiciones más calmas podrían promover su formación (Arrigo et al., 1998, Collins et al., 2009, Ferreira et al., 2015). Algunos trabajos previos (Fitch y Moore, 2007) indican que la biomasa de fitoplancton y las floraciones en el Océano Austral alcanzan su punto máximo a bajas velocidades del viento ( $< 18 \text{ km h}^{-1}$ ) mientras que por encima de este umbral se impide su inicio (Weise et al., 2002). Por lo tanto, los cambios observados en el patrón de viento durante el 2015 (Fig. 2.2) proporcionaron una oportunidad única para analizar el impacto que podría tener en la floración de fitoplancton de invierno en el área de estudio.

La concentración de Clor-*a* (Fig. 2.3a), la biomasa del fitoplancton (Fig. 2.3b) y la abundancia de células (Fig. 2.3c) muestran un patrón claro, con la floración de fitoplancton en el invierno para el período de referencia alcanzando su pico máximo en el mes de junio, y con los períodos de pre- y post-bloom durante el otoño y primavera-verano, respectivamente. La mediana de Clor-*a*, biomasa del fitoplancton y abundancia de células durante el pico de floración fueron de ca.  $30 \mu\text{g Clor-}a \text{ l}^{-1}$ ,  $\sim 450 \mu\text{g C l}^{-1}$  y  $3 \times 10^3 \text{ cél ml}^{-1}$ , respectivamente, aunque previamente se reportaron valores  $> 100 \mu\text{g Clor-}a \text{ l}^{-1}$  y  $> 5 \times 10^3 \text{ cél ml}^{-1}$  en dos años particulares (2000-2001, Helbling et al., 2005). Fuera del período de floración de invierno, la concentración de Clor-*a*, biomasa y abundancia de fitoplancton permanecieron relativamente bajas, con valores  $< 10 \mu\text{g de Clor-}a \text{ l}^{-1}$ ,

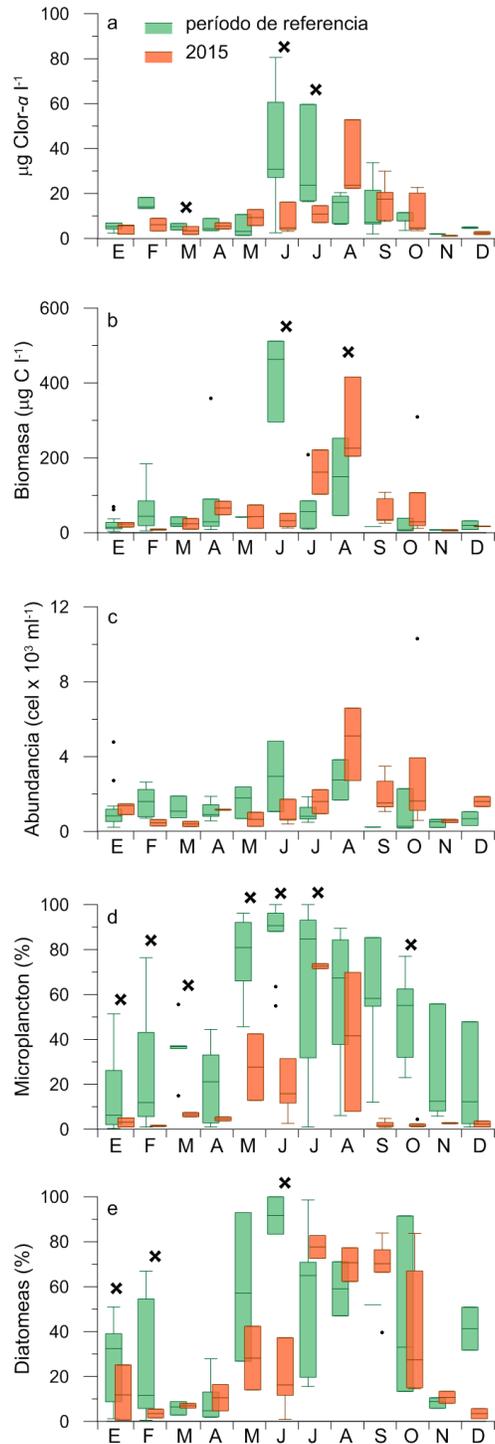
<math>50 \mu\text{g C l}^{-1}</math> y <math>2 \times 10^3 \text{ cél ml}^{-1}</math> (Fig. 2.3a-c) aunque algunos meses tuvieron valores ligeramente más altos (principios de la primavera).



**Fig. 2.2** Velocidad y dirección del viento para el período de referencia (2001-2014) y para el año 2015. (a, b) Frecuencia media (número de días) de la velocidad máxima del viento ( $\text{km h}^{-1}$ ) para verano, otoño, invierno y primavera. (c, d) Frecuencia media (número de días) para cada dirección del viento durante el invierno de los períodos de referencia y 2015, respectivamente.

Estos patrones en la abundancia de fitoplancton estuvieron a su vez asociados a la estructura de tamaño celular, con células microplanctónicas ( $> 20 \mu\text{m}$ ) dominando la floración de invierno durante el período de referencia (Fig. 2.3d), siendo la diatomea *Odontella aurita* la especie dominante ( $> 80\%$ , Fig. 2.3e). La dominancia de diatomeas microplanctónicas registrada durante la floración de invierno es consistente con otros estudios (Marañón et al., 2012; Harding et al., 2015) que muestran una mayor proporción de diatomeas en comunidades con alta disponibilidad de recursos y biomasa de fitoplancton. Además, el hecho de que estas floraciones en el OAS estén casi completamente dominadas por diatomeas grandes (*Odontella aurita*) concuerda con la idea de que las aguas estuarinas-costeras actúan como “fábricas” productoras de diatomeas que proporcionan gran cantidad de alimento de alto valor nutricional para los consumidores y que regulan el ciclo global de sílice (Agustí et al., 2015). Sin embargo, durante los períodos de pre- y post-bloom, las células nanoplanctónicas ( $2\text{-}20 \mu\text{m}$ , principalmente flagelados no identificados)

fueron las más abundantes (Fig. 2.3d). En un estudio llevado a cabo durante el verano de 2006 en el área de estudio (Villafañe et al., 2008) se registró, utilizando técnicas de HPLC, una gran variedad de picoplancton ( $< 2 \mu\text{m}$ ), siendo las clorofitas y cianobacterias los grupos más representativos y más abundantes, alcanzando más del 30% de la biomasa total de fitoplancton; por lo tanto, y aunque el picoplancton no se evaluó en este estudio, podría ser numéricamente significativo en el área cuando las diatomeas no dominan. Los dinoflagelados nunca contribuyeron significativamente a la abundancia total ( $< 2\%$ , con una concentración máxima de  $\sim 60 \text{ cél ml}^{-1}$ ), pero es importante mencionar que *Alexandrium tamarense*, que se encuentra principalmente en muestras del post-bloom, es responsable de eventos de marea roja (Gayoso, 2001). La baja contribución de dinoflagelados en este estudio y también en un meta-análisis reciente (Carstensen et al., 2015) se puede atribuir al hecho de que éstos son competidores pobres en comparación con las diatomeas de crecimiento rápido, tales como *Odontella aurita*. Además, en un trabajo previo (Smayda y Reynolds, 2003) se reportó que los dinoflagelados no pueden competir con las diatomeas debido a su baja capacidad de absorción de nutrientes y a sus bajas tasas de crecimiento en condiciones en que los nutrientes no son limitantes, tal como es el caso de las aguas costeras. También, en un estudio realizado en el Mar Báltico se propuso que los dinoflagelados contribuyen de manera significativa a la comunidad solo cuando desarrollan estrategias bióticas alternativas para obtener carbono y/o nutrientes distintas de la fotosíntesis, por ejemplo, mixotrofia o interferencia alelopática (Spilling y Markager, 2008). En contraste con la dinámica de fitoplancton descrita anteriormente, durante el año 2015 hubo dos cambios significativos (respecto al período de referencia): el primero estuvo relacionado con los valores significativamente más bajos de *Chl- $\alpha$* , biomasa y abundancia de células durante junio de 2015 comparado con la floración de junio del período de referencia (Fig. 2.3a-c). Además, la floración del 2015 ocurrió más tarde en el invierno (en el mes de agosto; Fig. 2.3a-c). El segundo cambio se relacionó con la estructura de tamaños y la composición de la comunidad fitoplanctónica, donde las células de microplancton y diatomeas contribuyeron por  $< 40\%$  del total durante junio de 2015 comparadas con  $> 80\%$  registrado durante el período de referencia (Fig. 2.3d, e). Además, la floración tardía observada durante agosto de 2015 (Fig. 2.3a-c) estuvo co-dominada por diatomeas nanoplanctónicas tales como especies de *Thalassiosira* (10-20  $\mu\text{m}$  de diámetro) junto con *O. aurita* (Fig. 2.3d, e).



**Fig. 2.3** Diagramas de cajas que muestran la mediana mensual, primer y tercer cuartil, junto con 1.5 del RIC y valores atípicos, tanto para el período de referencia como para el año 2015 para: (a) Concentración de Clor-*a* (en  $\mu\text{g Clor-}a \text{ l}^{-1}$ ), (b) Biomasa de fitoplancton (en  $\mu\text{g C l}^{-1}$ ); (c) Abundancia total de fitoplancton ( $\times 10^3 \text{ cél ml}^{-1}$ ), (d) Porcentaje de microplankton ( $> 20 \mu\text{m}$ ) y, (e) Porcentaje de contribución de diatomeas. La X indica diferencias significativas entre el período de referencia y el año 2015.

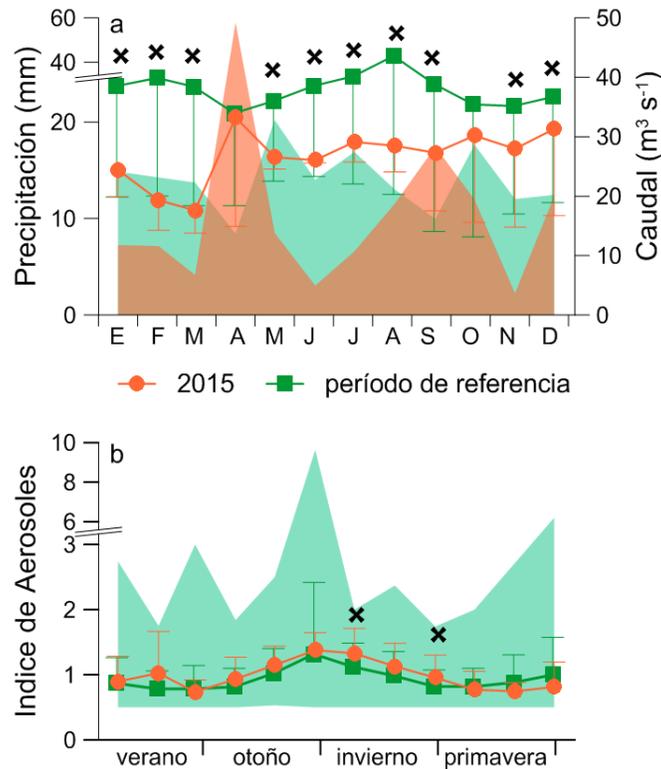
Para el área de estudio se propuso (Villafañe et al., 2004; Helbling et al., 2005) que la estratificación de la columna de agua, con una CSM somera durante el invierno, es el factor clave para el desarrollo de las intensas floraciones de fitoplancton observadas durante el período de referencia. El mecanismo que posibilitó el crecimiento del fitoplancton fue tal que la estratificación resultó en una mayor disponibilidad de radiación solar durante este período de poca luz, permitiendo a las células aprovechar al máximo los nutrientes. En cambio, la intensa mezcla vertical debida a los fuertes vientos, característica de las latitudes medias del OAS, impidió el desarrollo y/o el mantenimiento de la floración durante el resto del año (por ejemplo en primavera y verano). Esto concuerda con un estudio recientemente realizado en 86 sitios estuarino-costeros, que muestra que la ocurrencia de las floraciones no siguen un patrón de respuesta a través de gradientes de temperatura, salinidad o concentración de nutrientes; sino que la dirección del viento y/o velocidad es la variable principal relacionada con su desarrollo y momento de ocurrencia (Carstensen et al., 2015). Las diferencias en la estratificación (debidas a las distintas condiciones del viento) a lo largo de la sucesión anual durante el período de referencia también se observan en la relación  $C/Chlor-a$ , la cual tuvo valores significativamente más altos durante la floración de junio (valor de 18), a pesar de la irradiancia relativamente baja durante el invierno, en comparación con el resto del año ( $< 8$ ). Estos valores, aunque más bajos que en otras partes del océano (i.e., 15-176; Sathyendranath et al., 2009) evidencian una mezcla relativamente profunda durante la mayor parte del año y la historia lumínica de bajas irradiancias de estas células. Sin embargo, en junio de 2015, la relación  $C/Chlor-a$  fue  $< 5$ , respaldando la idea de que los fuertes vientos del norte mezclaron la columna de agua, exponiendo así al fitoplancton a niveles de radiación solar relativamente bajos. Durante agosto de 2015 (período de floración) la irradiancia fue mayor y, por lo tanto, la relación  $C/Chlor-a$  durante este mes también aumentó (valor de ca. 15).

La dinámica del fitoplancton también depende de otras variables, tales como la radiación solar incidente (Platt y Jassby, 1976; Mitchell et al., 1991; Cloern, 1996), temperatura (Sobrinho y Neale, 2007; Yvon-Durocher et al., 2015) y nutrientes (Paerl, 2007; Lancelot y Muylaert, 2011). Por lo tanto, se analizaron y compararon los patrones de estas variables durante 2015 y el período de referencia para determinar si hubo cambios que también podrían explicar la ausencia de la floración durante junio de 2015. Las dosis medias diarias de PAR y RUV solar en superficie durante 2015 fueron comparables a las del período de referencia, a excepción de unos pocos meses (de junio a agosto) los cuales fueron ligera, pero significativamente inferiores en el 2015 (datos no

mostrados). Estas diferencias en las dosis de radiación solar fueron tan pequeñas que no explicarían por sí solas la ausencia de la floración en Junio de 2015, pero sí contribuyeron a la menor irradiancia recibida por las células en la columna de agua. Sin embargo, algunos resultados experimentales y de modelados previos indican que es necesaria una intensidad crítica de luz para desencadenar una floración de fitoplancton (Siegel et al., 2002; Sommer y Lengfellner, 2008).

En la columna de agua, sin embargo, la radiación solar se reduce aún más por la presencia de material orgánico disuelto y suspendido de origen eólico o que llega a través del río, y se espera que estas cantidades aumenten en el futuro debido al crecimiento de las ciudades y sus actividades económicas asociadas (Rabalais et al., 2009; Cloern et al., 2016). En el área de estudio, los valores mensuales de precipitaciones (Fig. 2.4a) registrados durante el 2015 fueron, en general, más bajos que durante el período de referencia, y esto podría estar asociado con el evento de El Niño 2015 que causó, en la región Patagónica, precipitaciones inferiores al promedio (<https://www.ncdc.noaa.gov/sotc/global/201513>). Este patrón también se observó (Fig. 2.4a) en el caudal del río (con la excepción de abril y septiembre de 2015) que tuvo una media anual de  $26.8 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$  (DE = 4.5) y  $37.9 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$  (DE = 2.6) durante el año 2015 y el período de referencia, respectivamente. El caudal del río está controlado por el dique Florentino Ameghino y por esta razón es que existe poca o ninguna correlación entre los promedios mensuales de éste y las precipitaciones. Podría argumentarse que como el caudal del río y las precipitaciones fueron más bajos en 2015 que en el período de referencia, se verterían menores cantidades de materia orgánica disuelta y particulada a las áreas costeras, contrarrestando de alguna manera los niveles de radiación solar más bajos registrados durante el invierno del 2015. Sin embargo, si existió una disminución en la cantidad de materia transportada por el río, no se reflejó en la relación  $C/Clor-a$  (como se mencionó anteriormente) ya que durante junio de 2015 fue baja ( $< 5$ ), evidenciando que las células poseían una historia lumínica previa con bajos niveles de radiación (i.e., estaban aclimatadas a bajas irradiancias). La otra fuente de partículas (aerosoles eólicos: polvo y humo; Acker y Leptoukh, 2007), estimada a través del promedio mensual del IA, varió entre 0.7 y 1.4 (Fig.2.4b) para el año 2015 y el período de referencia; las únicas excepciones fueron julio y septiembre de 2015, cuando los valores del IA fueron significativamente más altos que durante el período de referencia. Sin embargo, un evento particular dio lugar a un valor máximo de ca. 10 en el IA durante el período de referencia en junio de 2011, cuando el volcán Puyehue entró en erupción en la cordillera de los Andes (~700 km al oeste de Bahía Engaño) pero las cenizas alcanzaron rápidamente el área de estudio, ya que los aerosoles en general (y el polvo patagónico

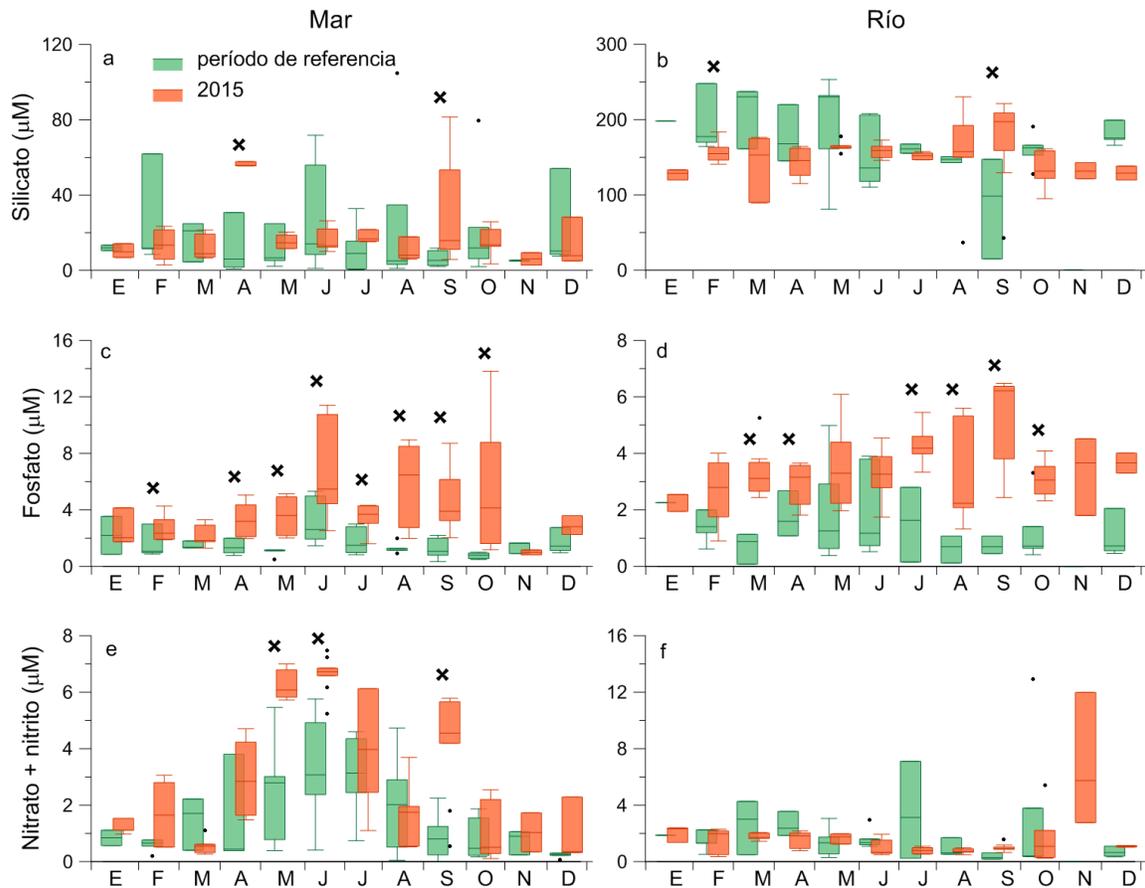
en particular) pueden viajar largas distancias a través de los continentes y mares, como en la región del OAS (Johnson et al., 2011; Li et al., 2010). Este evento resultó en una reducción de los niveles de radiación en el agua en el área de estudio; sin embargo, no afectó la fotosíntesis y el crecimiento durante el período de floración (Villafañe et al., 2013).



**Fig. 2.4** (a) Precipitación mensual (en mm, símbolos y DE) y caudal del río (en  $\text{m}^3 \text{s}^{-1}$ , áreas sombreadas) para los períodos de referencia (verde) y 2015 (naranja); (b) IA para el período de referencia (cuadrados verdes) y el año 2015 (círculos naranjas); el área verde sombreada cubre los valores máximo y mínimo para el período de referencia. La X representa diferencias significativas entre el período de referencia y el año 2015.

Los nutrientes también son esenciales para la fotosíntesis y el crecimiento, y en el OAS costero provienen principalmente de surgencias locales (Pisoni et al., 2014), aportes de los ríos (generalmente asociados a actividades antrópicas como el uso agrícola y de la tierra; Giraud et al., 2008) y por deposición de polvo de origen eólico (Jickells y Moore, 2015; Song et al., 2016). Por lo tanto, se puede argumentar que la reducción en las precipitaciones y el caudal del río durante el 2015 podrían haber disminuido la cantidad de nutrientes que alcanzan las áreas costeras, modificando potencialmente la dinámica de la floración. Sin embargo, y aunque hubo diferencias en las concentraciones de nutrientes entre el 2015 y el período de referencia (Fig. 2.5),

probablemente no fueron los principales responsables de los cambios en la dinámica del fitoplancton.

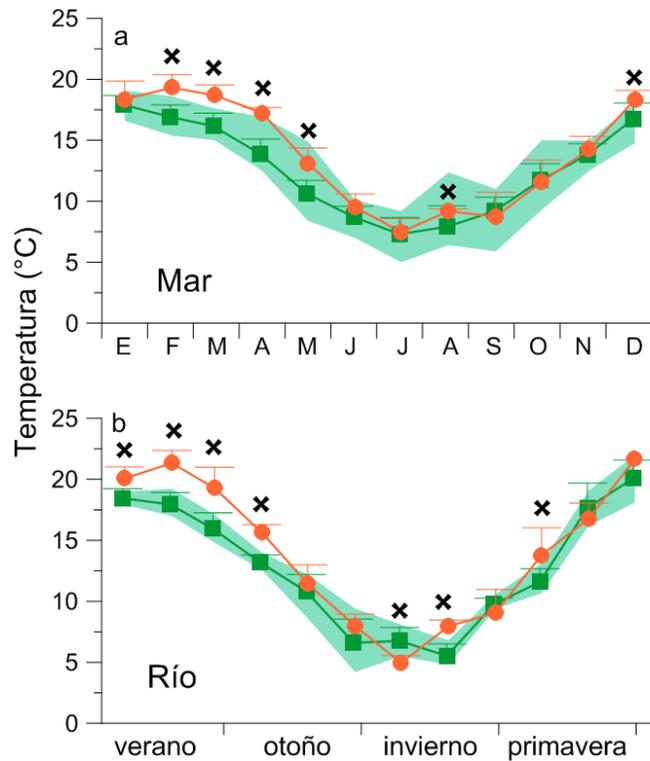


**Fig. 2.5** Diagramas de cajas que muestran la mediana mensual, primer y tercer cuartil, junto con 1,5 del RIC y valores atípicos, tanto para el período de referencia como para el año 2015 para: (a, b) Concentración de silicato (en  $\mu\text{M}$ ), en el mar y río, respectivamente. (c, d) Concentración de fosfato (en  $\mu\text{M}$ ), en el mar y el río, respectivamente. (e, f) Concentración de nitrato + nitrito (en  $\mu\text{M}$ ), en el mar y el río, respectivamente. La X representa diferencias significativas entre el período de referencia y el año 2015.

Las concentraciones de silicato siempre fueron más altas en el río que en el mar (Fig. 2.5a, b) pero se observaron valores elevados en el mar durante abril y septiembre de 2015, coincidiendo con los dos picos del caudal del río (Fig. 2.4a) durante ese año. Este aumento en el silicato, sin embargo, no se reflejó en la dominancia de las diatomeas o en la proporción relativa de microplancton (Fig. 2.2d, e). Para el caso del nitrógeno y del fósforo, pese a su gran variabilidad a lo largo del año (Fig. 2.5c-f), la mayor parte del tiempo se observaron patrones bastante similares durante el período de referencia y el 2015 tanto en el río como en el mar. Esto sugiere poco uso de los nutrientes dentro

del estuario, y que la mayoría de ellos son transportados por el río, alcanzando finalmente el océano. Sin embargo, se determinaron valores significativamente más altos en el 2015 (en comparación con el período de referencia) para el fosfato, tanto en el río como en el mar (Fig. 2.5c, d), y para el nitrito + nitrato en el régimen externo del estuario (Fig. 2.5e), con valores que en ocasiones superaron el máximo registrado durante el período de referencia. Las altas concentraciones de fosfato están probablemente relacionadas con el uso intensivo de la tierra, tales como las actividades agrícolas y el uso excesivo de fertilizantes (Kopprio et al., 2015) principalmente en forma de organofosforados (Antolini, 2012). Por otro lado, las altas concentraciones de nitrógeno observadas en el régimen externo del estuario, que excedieron ampliamente las registradas en el río, podrían provenir de las fábricas procesadoras de pescado (Arvanitoyannis y Kassaveti, 2008) situadas en la desembocadura del Río Chubut (Chiarandini Fiore et al., 2013). Se puede concluir entonces, que los nutrientes no fueron limitantes durante todo el año; más aún, durante el 2015 sus concentraciones fueron en general mayores que durante el período de referencia, por lo tanto, la ausencia de la floración durante junio del 2015 no estuvo directamente relacionada con la disponibilidad de nutrientes.

Finalmente, se evaluaron los patrones de temperatura superficial del agua durante el 2015 y el período de referencia. En el régimen externo del estuario se determinaron temperaturas más altas durante el 2015 en comparación con el período de referencia, principalmente en verano y otoño (Fig. 2.6). El agua de mar fue más cálida durante agosto de 2015 que en el pasado (Fig. 2.6a) y esto coincidió temporalmente con los valores máximos de *Chlor-a* y de abundancias de células observados (Fig. 2.3b, c). Este pequeño, pero significativo aumento de la temperatura durante agosto de 2015 podría explicar parcialmente los cambios en la estructura de tamaños del fitoplancton hacia una mayor proporción de especies pequeñas de nanoplancton (Fig. 2.3d). Esto concuerda con otros estudios (Winder y Hunter, 2008; Lewandowska y Sommer, 2010) que establecieron que la temperatura tiene un papel clave al momento de determinar la estructura de tamaños de la comunidad. En particular, otros estudios llevados a cabo en el OAS (al norte de Bahía Engaño) reportaron cambios en la comunidad de fitoplancton hacia la dominancia de pequeñas diatomeas del género *Cyclotella* y *Thalassiosira*, y estas variaciones estuvieron asociadas a los efectos combinados del aumento de la temperatura del agua y cambios en los patrones de precipitación (Guinder y Molinero, 2013).



**Fig. 2.6** Temperatura superficial mensual (° C) promedio ( $\pm$  DE, líneas verticales) del agua de mar (a) y río (b) durante el período de referencia (cuadrados verdes) y el año 2015 (círculos naranjas). Las áreas sombreadas en verde cubren los valores máximos y mínimos para el período de referencia. La X representa diferencias significativas entre el período de referencia y el año 2015.

## 2.4 Conclusiones:

Las áreas costeras del OAS merecen mucha atención debido a su alta productividad y a su papel clave como áreas de reproducción y cría de especies de interés ecológico y económico. Este área se encuentra poco estudiada en comparación con otras partes del océano mundial, por lo que este trabajo suma información relevante sobre cambios recientes en los patrones de viento y cómo ellos afectan a la dinámica del fitoplancton en este sistema costero. El retraso en la floración anual de fitoplancton en Bahía Engaño durante el año 2015, así como la reducción en su intensidad, destacan claramente la importante influencia de mecanismos físicos como agentes perturbadores que pueden alterar el equilibrio entre la división del fitoplancton y la herbivoría (Behrenfeld y Boss, 2014). En el OAS costero, el viento proporciona por sí mismo el mecanismo necesario para desencadenar o retrasar las floraciones determinando indirectamente la disponibilidad de

radiación en la CSM. Estos cambios en el tiempo y en la intensidad de las floraciones, unidos a modificaciones en la estructura de tamaño en la comunidad de la floración hacia células más pequeñas, pueden alterar las interacciones del ecosistema predador (zooplancton) - presa (fitoplancton), impactando negativamente en la cantidad y calidad de alimento disponible para la comunidad de zooplancton y, por consiguiente, en la transferencia de energía a niveles tróficos superiores.

Este trabajo permite establecer un punto de partida acerca de los patrones temporales y la variabilidad de diferentes factores bióticos y abióticos en las últimas décadas, y constituye el primer paso para comprender los posibles cambios que se esperan para el futuro. A partir del tipo de datos obtenidos hasta el momento (con brechas importantes en el tiempo y en el esfuerzo de muestreo), es evidente la necesidad de implementar nuevos programas de control y de monitoreo más rigurosos a lo largo del tiempo. Estos programas deberían considerar otras variables relacionadas con el clima (por ejemplo, vientos) y/o con actividades humanas (por ejemplo, cantidad de nutrientes de origen antrópico, efluentes provenientes de industrias pesqueras, fertilizantes agrícolas) para obtener predicciones más certeras que permitan a los políticos y gestores ambientales tomar decisiones basadas en evidencias empíricas sólidas.

## **Capítulo 3:**

***Respuestas del fitoplancton del  
estuario del Río Chubut en dos  
condiciones de CSM: Efectos de la  
radiación solar y nutrientes a corto  
y largo plazo***

### **3.1 Introducción:**

El aumento de las actividades agrícola-ganaderas e industriales, sumado a una mayor densidad de población en áreas cercanas a la costa, con un consecuente mayor vertido de desechos, hace que éstas áreas estén recibiendo mayor aporte de nutrientes a través de los ríos (Foley et al., 2005), lo cual se espera que se intensifique durante las próximas décadas (Cloern et al., 2016). De hecho, en un estudio realizado durante el año 2015 en Bahía Engaño (Capítulo 2, Bermejo et al., 2018) ya fue reportado un aumento significativo de nutrientes a comparación con datos históricos. Si bien los sedimentos y materia orgánica disuelta y particulada transportados hacia las aguas costeras por los ríos y vientos alteran el campo lumínico subacuático, con una menor penetración de la radiación (principalmente RUV-B), esta disminución no sería tan importante como el aumento de la radiación solar (PAR y RUV) que se produce en condiciones de mayor estratificación (Williamson et al., 2014). Por lo tanto se esperaría que, en un escenario futuro, las comunidades autótrofas que viven en los primeros metros de la columna de agua, reciban mayor cantidad de radiación solar y de nutrientes.

Si bien existen muchos estudios tendientes a evaluar los efectos individuales de variables asociadas al cambio global sobre los ecosistemas acuáticos, aquellos que evalúan los impactos combinados de dos o más variables son más apropiados, ya que brindan información más certera acerca de los efectos del cambio global que se esperan en el futuro (Boyd et al., 2015). En este sentido, se ha determinado que el aporte de nutrientes generalmente tiende a contrarrestar los efectos negativos de la RUV (Marcoval et al., 2007; Villafañe et al., 2014). Por otra parte, en estudios donde se evaluaron los efectos de la RUV bajo distintas condiciones de mezcla, se observó que no sólo la profundidad de la CSM era importante, sino también que la inhibición de la fotosíntesis por la RUV dependía de qué porción de la zona eufótica se mezcla (Barbieri et al., 2002). Sin embargo, aunque es obvia la importancia evaluar el efecto conjunto de la mezcla vertical, la RUV y el aporte de nutrientes sobre el fitoplancton en un contexto de cambio global, especialmente en áreas costeras, existen pocos trabajos relacionados con esta temática y se tiene muy poco conocimiento del grado de interacción entre estas variables sobre las comunidades fitoplanctónicas. Más aún, la mayoría de los estudios en donde se simulan condiciones futuras son en general puntuales para algún momento del año, sin tener en cuenta la sucesión anual, con respuestas diferenciales por parte del fitoplancton. Es importante también tener en cuenta la escala temporal de experimentación considerada, ya que existen evidencias de que tanto los efectos individuales de la RUV o en conjunto con otras variables, evaluados en lapsos menores a

un día (i.e., estudios de corto plazo), son diferentes de aquellos obtenidos después de varios días (mediano/largo plazo), que involucran procesos de aclimatación (Villafañe et al., 1995c; Villafañe et al., 2014; Cabrerizo et al., 2017a).

En base a estas consideraciones, el objetivo de este capítulo es evaluar los efectos a corto y largo plazo de algunas variables asociadas al cambio global: radiación solar i.e., cantidad (simulando distintas profundidades de CSM) y calidad (PAR solo vs PAR + RUV), y nutrientes sobre la fotosíntesis y estructura de comunidades de fitoplancton del estuario del río Chubut (regímenes interno y externo) a lo largo del año. Los resultados a obtener, acerca de cómo la fotosíntesis y la estructura y composición taxonómica de las comunidades de fitoplancton de latitudes medias es afectada por la exposición a la radiación solar, nutrientes y distintas profundidades de la CSM, proveerá de conocimientos muy importantes para poder evaluar futuros impactos del cambio global no solo en el fitoplancton, sino en la disponibilidad de alimento para los consumidores primarios en estos sistemas. Además, se evaluarán las siguientes hipótesis planteadas como objetivos de la Tesis: H2) *“El aporte de nutrientes actúa en forma antagónica con la RUV y una CSM poco profunda, contrarrestando los efectos negativos de los mismos sobre la eficiencia fotoquímica a corto plazo”*. H3) *“El aporte de nutrientes, conjuntamente con una CSM poco profunda selecciona, a largo plazo, células grandes (i.e., microplancton) aclimatadas a altas irradiancias”*. H4) *El impacto conjunto de la radiación solar, CSM poco profunda y aumento de nutrientes es: H4a) mayor en invierno que en verano, y H4b) mayor en el río que en el mar.*

## **3.2 Materiales y métodos:**

### **3.2.1 Área de estudio:**

El río Chubut nace en la cordillera de los Andes, cruza de Oeste a Este la provincia de Chubut, y desemboca en Bahía Engaño, en el Océano Atlántico, formando un estuario de planicie costera mesomareal (Piccolo y Perillo, 1999). Debido a la interacción entre el río y el mar, el área se caracteriza por poseer propiedades físicas, químicas y biológicas muy variables (Helbling et al., 2010; Bermejo et al., 2018) lo que se traduce en una importante diversidad de fitoplancton, con variaciones significativas en la composición y estructura de tamaños de las comunidades a lo largo del año (Sastre et al., 1998). El estuario del río Chubut se caracteriza por un régimen de mareas semidiurno, con una altura que varía entre 0.5 m y 6 m durante la bajamar y pleamar, respectivamente (Helbling et al., 2010). El estuario es de tipo cuña salina, con el río fluyendo sobre el agua de mar durante la bajante (hacia el mar) y el mar entrando río arriba deteniendo por

completo e incluso invirtiendo el flujo del río durante la creciente (Helbling et al., 1992). La mayor parte del intercambio entre los dos extremos del estuario (agua de río y mar) ocurre durante la pleamar y la bajamar, favoreciendo la mezcla intensa en la columna de agua (Helbling et al., 2010).

### 3.2.2 Recolección de muestras:

Se trabajó con comunidades de fitoplancton recolectadas en los dos extremos del estuario del río Chubut (ver Capítulo 1 - Fig. 1.15): En el régimen externo (Bahía Engaño, en la desembocadura del río; 43° 20' 33" S; 65° 03' 13" O) con salinidades > 31; y en el régimen interno del estuario (Puente de Rawson; 43° 18' 23" S; 65° 05' 31" O), con salinidades < 1. Se realizaron 12 experimentos de tipo factorial (8 experimentos con comunidades marinas, y 4 con comunidades de río). Las muestras marinas fueron recolectadas dos veces por estación del año, con marea alta, en el período octubre de 2014 a octubre de 2015, cada 40-50 días entre cada experimento, mientras que las de río se recolectaron durante marea baja, una vez por estación del año en el período febrero a octubre de 2015. De esta forma los experimentos, distribuidos a lo largo del año, cubrieron un amplio rango de condiciones de radiación solar (Fig. 3.1).

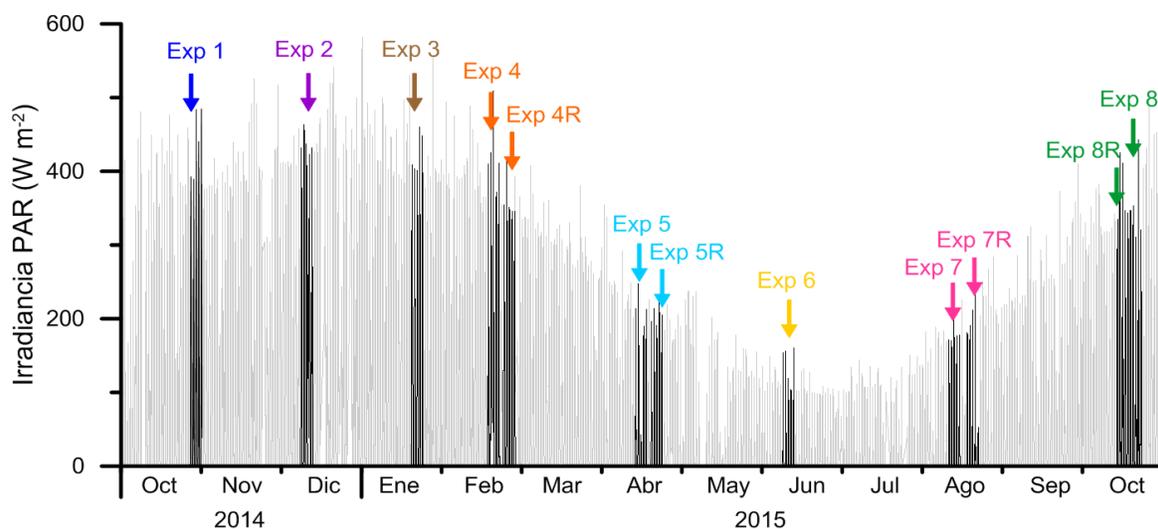


Fig. 3.1 Condiciones de radiación PAR ( $W m^{-2}$ ) sobre el área de estudio, resaltando con color negro el momento en el que se realizaron los experimentos con comunidades marinas (Exp 1 al 8) y de río (Exp 4R, 5R, 7R y 8R).

La tarde anterior al comienzo de los experimentos, se recolectaron muestras superficiales (0.5 m de profundidad) desde la costa, utilizando un recipiente previamente lavado con HCl (1 N). Las muestras de agua se filtraron por una malla de 200  $\mu m$  de poro para eliminar el zooplancton de

mayor tamaño, se las colocaron en 6 bidones de policarbonato (20 l cada uno), y se las trasladaron inmediatamente a la EFPU (a 10 min de ambos sitios de muestreo; Fig. 1.15).

### **3.2.3 Set-up experimental y protocolo de muestreo:**

El set-up experimental fue el siguiente: La mitad de los recipientes (3 bidones) mantuvieron las muestras sin modificar (i.e., tal como se obtuvieron al momento de recolección) y sirvieron como control (concentración de nutrientes ambiente, de aquí en más tratamiento “Amb”), mientras que a la otra mitad se les agregó una cantidad adicional de nutrientes, que representaba un incremento de 3-5 veces la concentración de nutrientes promedio a lo largo del año (de aquí en más tratamiento “+Nut”) y manteniendo una relación N:P promedio a la que había en el ambiente (que oscilaba entre 0.02-2). Los incrementos de concentración en los bidones fueron de 15  $\mu\text{M}$  de  $\text{PO}_4^{3-}$ , 25  $\mu\text{M}$  de  $\text{NO}_3^-$  y 100  $\mu\text{M}$  de  $\text{SiO}_3^{2-}$ , adicionales a la concentración que había en el medio, simulando un escenario futuro de cambio global con un aumento de nutrientes de origen antrópico. La relación N:P medida luego del agregado de nutrientes, en ambos extremos del estuario osciló entre 1-1.6. Luego, se llenaron 12 bolsas de polietileno transparentes a la RUV (microcosmos de 6 l de capacidad, 78% de transmitancia a 280 nm) con 5 l de muestra Amb, y otros 12 con muestra +Nut. Una vez llenas las bolsas (microcosmos) fueron cerradas, adosándose una cánula para facilitar los posteriores muestreos (ver más adelante). A su vez, los microcosmos de cada tratamiento de nutrientes fueron expuestos a dos tratamientos de *calidad* de radiación: 1) P (PAR, >400 nm), 6 microcosmos cubiertos con un filtro que no permite el paso de la RUV (Ultraplan UV OpakDigefra film); y 2) PAB (PAR + UVR, >280 nm), 6 microcosmos sin filtro adicional. Por otro lado, a la mitad de los microcosmos de cada tratamiento antes mencionados se los sometió a dos tratamientos de *cantidad* de radiación, representando dos irradiancias medias diferentes, que simulan dos profundidades distintas de la CSM: 1) Irradiancia media de una CSM profunda: microcosmos que recibieron el 25% de la irradiancia solar (cubiertos con dos mallas de densidad neutra) (25% Irrad), y 2) Irradiancia media de una CSM somera: microcosmos que recibieron el 100% de la irradiancia solar (microcosmos sin cubrir) (100% Irrad) (Fig. 3.2). El 25% de irradiancia solar utilizado para muestras del tratamiento que simulaba una CSM profunda (escenario presente) fue elegido en base a la irradiancia media que recibiría una partícula dentro de la CSM teniendo en cuenta los valores promedios del coeficiente de atenuación (K) y la profundidad de la CSM (z) para el río y mar ( $K_{\text{río}}=4 \text{ m}^{-1}$ ;  $z_{\text{río}}=1\text{m}$ , y  $K_{\text{mar}}=1.5 \text{ m}^{-1}$ ;  $z_{\text{mar}}=3 \text{ m}$ ) (Helbling et al., 2010, 2015). El 100% de irradiancia solar correspondería a una CSM somera extrema en un

escenario futuro de cambio global. Cada tratamiento fue realizado por triplicado, por lo que se colocaron un total de 24 microcosmos bajo radiación solar natural en 8 baños con agua circulante (a la temperatura *in situ* del agua al momento de recolección de las muestras) como control de temperatura (3 microcosmos por baño, Fig. 3.2). Los microcosmos se colocaron en los baños con control de temperatura la noche anterior al inicio del experimento, y se expusieron por 5 días a la radiación solar. Además, se agitaron manualmente cada 1 h durante el día, para evitar que las células de fitoplancton decanten en fondo de los mismos y así recibir irradiancias homogéneas.



**Fig. 3.2** (a) Imagen del set-up experimental en la EFPU, mostrando los baños de agua conteniendo los microcosmos  
(b) Diagrama del diseño experimental con los distintos tratamientos.

El protocolo de muestreo fue el siguiente: Las muestras para medición de parámetros fotoquímicos (fluorescencia de la Clor-*a*, ver más adelante) se obtuvieron cada 1 h desde la salida hasta la puesta de sol, en los días 1, 3 y 5 del experimento. Por simplicidad, se muestran sólo las mediciones realizadas en el día 1 (corto plazo) y 5 (mediano/largo plazo, luego de la aclimatación). Las mediciones comenzaron entre las 6-7 hs y finalizaron alrededor de las 20 hs para los experimentos de verano y primavera, mientras que en otoño e invierno comenzaron entre las 8-9 hs y finalizaron aproximadamente a las 17-18 hs. Debido a que la respuesta de organismos fitoplanctónicos es muy rápida, el instrumento de medición (fluorómetro PAM, ver más adelante) se colocó cercano al lugar de experimentación a fin de evitar demoras entre la recolección de submuestras y la medición correspondiente. Las muestras para los análisis de Clor-*a* y otros pigmentos fotosintéticos se obtuvieron al inicio del experimento (es decir, al momento de recolección de la muestra) y cada mañana durante los 5 días de experimentación. Por su parte, las muestras para análisis de nutrientes se recolectaron al inicio del experimento y luego temprano en la mañana de los días 3 y 5, mientras que aquellas para recuentos y análisis taxonómicos de fitoplancton se obtuvieron al inicio de cada experimento y en la mañana del día 5. Los microcosmos se abrieron

todos los días sólo por la mañana, para la recolección de muestras que requerían mayor cantidad de volumen (Clor-*a*, nutrientes, recuentos celulares). En cambio, para las mediciones de parámetros fotoquímicos (cada 1 hora), las muestras se obtuvieron con una jeringa que se adosaba a una cánula de plástico colocada de manera permanente en los microcosmos.

### **3.2.4 Análisis y mediciones:**

#### *Radiación Solar:*

La radiación solar incidente se midió continuamente a lo largo de cada experimento utilizando un radiómetro ELDONET de banda ancha (Real Time Computers, Inc., Alemania), que mide radiación PAR (400-700 nm), RUV-A (315-400 nm) y RUV-B (280-315 nm). Este instrumento está montado en el techo de la EFPU y adquiere datos cada un minuto.

#### *Temperatura:*

Para cada experimento se midió la temperatura y conductividad *in situ* al momento de recolectar las muestras, utilizando una sonda multiparamétrica (Yellow Spring Instruments, modelo XLM 600, USA). El valor de temperatura medido *in situ* para cada experimento fue aquel utilizado en los baños de control de temperatura en donde se colocaron los microcosmos.

#### *Clorofila y otros pigmentos fotosintéticos:*

Para determinar la concentración inicial de los pigmentos fotosintéticos, se obtuvieron sub-muestras de 100-250 ml de cada bidón de 20 l (3 Amb y 3 +Nut), antes de llenar los microcosmos. Ya en los microcosmos, se obtuvieron sub-muestras de cada uno de ellos a primera hora de la mañana durante todos los días del experimento. Las mismas fueron filtradas a través de filtros GF/F (25 mm de diámetro), congeladas (-20 °C) hasta su análisis y luego procesadas como fue descrito en el Capítulo 2. La concentración de Clor-*a* fue calculada utilizando la ecuación de Porra (2002), luego de realizar un barrido entre 250-750 nm con un espectrofotómetro (Hewlett Packard modelo HP 8453E, USA).

#### *Análisis taxonómicos / recuentos celulares:*

Las muestras para estos análisis se colocaron en botellas de vidrio color caramelo de 250 ml. Las muestras de comunidades marinas se fijaron con formalina neutralizada (0.4% concentración final de formaldehído en la muestra), mientras que las de comunidades de río se utilizó lugol en medio

ácido (1%). La identificación y recuento de fitoplancton se realizó con un microscopio invertido (Leica, modelo DM IL, Alemania), utilizando el procedimiento descrito en Villafañe y Reid (1995) (ver Capítulo 2). Dado que no se utilizaron técnicas específicas para la identificación de flagelados, aquellos que no fueron identificados fueron asumidos como fotosintéticos, por lo cual podría existir una sobreestimación de la abundancia relativa de este grupo.

#### *Nutrientes:*

Se recolectó una muestra de 100 ml de cada bidón de 20 l (3 bidones Amb y 3 +Nut), antes de llenar los microcosmos y también de cada microcosmos durante el experimento. Las muestras para el análisis de macronutrientes ( $\text{NO}_3^- + \text{NO}_2^-$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$  y  $\text{SiO}_3^{2-}$ ) se colocaron sin filtrar en botellas de 125 ml de polietileno de alta densidad y se congelaron a  $-20^\circ\text{C}$  hasta su posterior análisis, que fue realizado usando las técnicas espectrofotométricas descritas en Strickland y Parsons (1972). Cabe aclarar que sólo se midió una fracción del N total ( $\text{NO}_3^- + \text{NO}_2^-$ ) mientras que el P medido fue el P total. Por lo que al mencionar cálculos de relaciones N:P, el valor obtenido va a estar subestimado.

#### *Determinación de parámetros fotosintéticos:*

Para determinar las variaciones del rendimiento cuántico fotoquímico (Y) a lo largo del día, se realizaron ciclos diarios durante cada experimento con comunidades de mar o río, al inicio (día 1) y al final (día 5) i.e., después de la aclimatación a los tratamientos de radiación y profundidad de CSM. La fluorescencia *in vivo* de la Clor-*a* del fotosistema II (FSII) se midió cada una hora con un fluorómetro de pulsos de amplitud modulada (Walz, Water PAM, Effeltrich, Alemania). Con una jeringa se obtuvieron alícuotas de 3 ml de muestra de cada microcosmos, se las colocaron en una cubeta y se midieron 6 veces inmediatamente después del muestreo, sin aclimatación a la oscuridad. El Y se calculó usando las ecuaciones de Genty et al. (1989) y Weis y Berry (1987):

$$Y = \Delta F / F'_m = (F'_m - F_t) / F'_m \quad (\text{Ecuación 3.1})$$

donde  $F'_m$  es la fluorescencia máxima instantánea, inducida por un pulso de luz saturante ( $5300 \mu\text{mol fotonos m}^{-2} \text{s}^{-1}$  en 0.8 s) y  $F_t$  es la fluorescencia del estado basal inducida por una luz actínica ( $\sim 107$  o  $158 \text{ W m}^{-2}$  dependiendo de la época del año) en células adaptadas a la luz. Otro de los parámetros registrados por el equipo es el quenching no fotoquímico (NPQ) de la fluorescencia de

la Clor- $a$ , que refleja la disipación por calor de la energía lumínica absorbida en exceso, y es el mecanismo de fotoprotección a corto plazo más importante activado por intensidades de PAR en niveles de saturación. El NPQ se calculó usando la siguiente ecuación (Schreiber et al., 1994):

$$\text{NPQ} = (F_m - F'_m) / F'_m \quad (\text{Ecuación 3.2})$$

donde  $F_m$  es la fluorescencia máxima cuando todos los centros de reacción se encuentran cerrados.

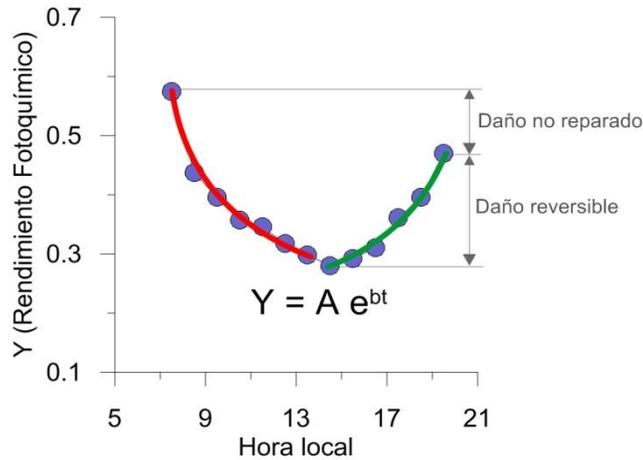
### **3.2.5 Tratamiento de datos, cálculos y estadística:**

Los experimentos fueron de tipo factorial, con 2 tratamientos de calidad de radiación (PAB; P) x 2 tratamientos de nutrientes (Amb; +Nut) x 2 tratamientos de cantidad de radiación incidente (100% Irrad; 25% Irrad) (Fig. 3.2b). Los tratamientos se realizaron por triplicado (8 tratamientos, 24 microcosmos). Los resultados de todas las variables medidas se expresaron como la media y el desvío estándar.

Las tasas de inhibición ( $k$ ;  $\text{min}^{-1}$ ) y de recuperación ( $r$ ;  $\text{min}^{-1}$ ) de Y para cada tratamiento, se estimaron como la disminución (desde la mañana hasta el mediodía) y el aumento (desde el mediodía hasta el atardecer), respectivamente, de los valores de Y obtenidos durante los ciclos diarios, aplicando un ajuste exponencial en función del tiempo:

$$Y = A e^{bt} \quad (\text{Ecuación 3.3})$$

donde Y es el rendimiento fotoquímico del FSII, A es una constante, t es el tiempo y b representa la tasa de cambio (inhibición ( $k$ ) o recuperación ( $r$ )). En la Fig. 3.3 se representa un esquema general de respuestas de Y a lo largo del día. Cuando esta tasa es negativa, se considera que representa la inhibición de Y, mientras que si es positiva se considera que representa la recuperación de este parámetro. Los valores absolutos más altos de  $k$  y  $r$  indican mayores tasas de inhibición o recuperación, respectivamente. Para realizar cada ajuste, se consideraron las mediciones correspondientes del ciclo diario incluidas en la tendencia decreciente, línea roja en la Fig. 3.3 ( $k$ ), o creciente, línea verde en la Fig. 3.3 ( $r$ ) del Y.



**Fig. 3.3** Esquema general de respuestas de Y a lo largo del día y cálculo de las tasas de inhibición ( $k$ ) y recuperación ( $r$ ). Además se muestran los daños reversibles y no reparado a lo largo del día solar a partir de los datos de Y.

Para todos los tratamientos de cada experimento, se calculó el daño no reparado en las células (Fig. 3.3) es decir, aquel que no pudo ser reparado a lo largo del día solar. Para ello se compararon los valores de Y obtenidos en la última medición del ciclo diario (cuando ya se había ocultado el sol) ( $Y_{fin}$ ) con los valores de Y medidos en el tiempo inicial ( $Y_{inic}$ ), utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Daño no reparado} = Y_{fin} - Y_{inic} \quad (\text{Ecuación 3.4})$$

Por lo tanto, los valores positivos ( $> 0$ ) indican que a lo largo del ciclo diario se recuperaron más de lo que se inhibieron, mientras que valores negativos ( $< 0$ ) indican que las muestras no alcanzaron a repararse totalmente a lo largo del día solar.

La tasa de transporte electrónico relativo ( $ETR_{Rel}$ ; en  $\mu\text{mol electrones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), que representa el flujo de electrones a través de la cadena de transporte electrónico y es indicativo de la tasa de fotosíntesis, se calculó a partir de la siguiente ecuación:

$$ETR_{Rel} = Y * \text{Absortancia} * \text{Irradiancia PAR} * 0.5 \quad (\text{Ecuación 3.5})$$

en la cual se consideró como 1 el valor de absortancia. El valor 0.5 en la Ecuación 3.5 corresponde a la relación promedio entre los centros de reacción del FSII y los centros de reacción de FSI. Para los tratamientos que recibieron 100% Irrad, los valores de irradiancia PAR utilizados en los cálculos de ETR coincidieron con aquellos obtenidos por el radiómetro al momento de la medición de Y, mientras que para los tratamientos que recibieron 25% Irrad, los valores de PAR utilizados en la

Ecuación 3.5 fueron los obtenidos por el radiómetro y multiplicados por 0.25. Cabe aclarar, que los microcosmos se encontraban sobre la superficie del agua, y la parte superior de los mismos estaban cubiertos por una fina película de agua. Por consiguiente, en la parte superior de los microcosmos llegaba casi la totalidad de la radiación, mientras que en el fondo la radiación que llegaba era menor. Sin embargo, es importante mencionar que la irradiancia que recibieron las células era menor a la que recibieron los microcosmos, dependiendo de la transmitancia de las bolsas (alrededor del 85%) y de la concentración de fitoplancton. Debido a ello y a fin de lograr una irradiancia homogénea dentro de los microcosmos, éstos se agitaron cada 1 hora antes de realizar las mediciones de los parámetros fotosintéticos. Por consiguiente, existe una pequeña sobreestimación en los cálculos de ETR, pero esta es similar para todos los tratamientos, por lo cual no afectaría las diferencias observadas entre tratamientos.

A fin de comparar las respuestas en los distintos días, se calculó el transporte electrónico diario o integrado ( $ETR_{int}$ ; en  $\text{mol m}^{-2}$ ) para lo cual se integraron los valores de  $ETR_{Rel}$  en función del tiempo utilizando la siguiente ecuación:

$$ETR_{int} = \int_{t_i}^{t_f} ETR_{Rel} dt \quad (\text{Ecuación 3.6})$$

donde  $t_i$  y  $t_f$  son los tiempos en los cuales se comenzaron y finalizaron las mediciones de  $Y$ , respectivamente (i.e., inicio y final de ciclo diario). Los valores de  $ETR_{int}$  surgen de calcular el área bajo la curva de una función que ajusta los valores de  $ETR_{Rel}$ , utilizando para ello un entorno gráfico.

Para calcular los efectos individuales de las variables de cambio global estudiadas (Rad, Nut, Irrad) e interactivos triples (Rad x Nut x Irrad) sobre la tasa de transporte electrónico, se utilizaron los valores de  $ETR_{int}$  utilizando las siguientes fórmulas:

$$\text{Efectos individuales: } (\text{Tratamiento}_{\text{Individual}} - \text{Control}) / \text{Control} * 100 \quad (\text{Ecuación 3.7})$$

donde Control representa los valores de  $ETR_{int}$  en muestras bajo el tratamiento P, con concentración de nutrientes ambiente (Amb) y 25% Irrad (CSM profunda), y  $\text{Tratamiento}_{\text{Individual}}$  representa los valores de  $ETR_{int}$  para: (i) muestras bajo el tratamiento PAB, nutrientes Amb y 25% de Irrad para efectos de RUV, (ii) muestras bajo el tratamiento P, agregado de nutrientes (+Nut) y

25% Irrad para efectos de Nutrientes y, (iii) muestras bajo el tratamiento P, nutrientes Amb y 100% Irrad (CSM somera).

Los efectos interactivos triples se determinaron de la siguiente manera:

$$\text{Efectos triples: } (\text{Tratamiento}_{\text{Triple}} - \text{Control}) / \text{Control} * 100 \quad (\text{Ecuación 3.8})$$

donde Control representa los valores de  $\text{ETR}_{\text{int}}$  para muestras bajo el tratamiento P, con concentración de nutrientes ambiente (Amb) y 25% Irrad, y  $\text{Tratamiento}_{\text{Triple}}$  representa los valores de  $\text{ETR}_{\text{int}}$  para: muestras bajo el tratamiento PAB, agregado de nutrientes (+Nut) y 100% de Irrad. Además se calculó la suma de los efectos individuales (Rad + Nut + Irrad) para cada experimento, con el fin de compararlo con el efecto interactivo triple (Rad x Nut x Irrad) y poder determinar de esta forma si existe sinergismo o antagonismo. Para calcular el desvío estándar de los efectos individuales e interactivos (%), se utilizó propagación de errores.

Las tasas de crecimiento en función de la cantidad de células ( $\mu_{\text{Cel}}$ , en  $\text{dia}^{-1}$ ) para los distintos tratamientos de cada experimento se calcularon siguiendo la siguiente ecuación:

$$\mu_{\text{Cel}} = \ln (N_5 / N_1) / (t_5 - t_1) \quad (\text{Ecuación 3.9})$$

donde  $N_1$  y  $N_5$  son las abundancias de fitoplancton al inicio y al final de los experimentos, y  $t_1$  y  $t_5$  son los días 1 y 5 de los experimentos respectivamente.

Las tasas de crecimiento en función de la Clor- $a$  ( $\mu_{\text{Clor-}a}$ ;  $\text{dia}^{-1}$ ) se calcularon tomando el valor del exponente de un ajuste exponencial a partir de las concentraciones de Clor- $a$  obtenidas para cada microcosmos a lo largo del experimento.

Tanto para los datos de  $k$ ,  $r$ , daño no reparado,  $\text{ETR}_{\text{int}}$  y tasas de crecimiento, y con el fin de determinar diferencias entre los tratamientos de radiación, nutrientes e irradiancia dentro de cada experimento, se realizó un ANOVA de tres vías de medidas repetidas con un límite de confianza del 95% (Zar, 1999). La normalidad y homocedasticidad se verificó para cada conjunto de datos antes de la aplicación del ANOVA. Cuando se determinaron diferencias significativas, se realizó una prueba post hoc de Tukey.

### 3.3 Resultados:

#### **PARTE I: Experimentos con comunidades marinas**

##### *Radiación Solar:*

Los datos de irradiancia PAR ( $\text{W m}^{-2}$ ) medidos durante los 5 días en cada uno de los experimentos realizados con comunidades marinas se muestran en la Fig. 3.4. Se observó gran variabilidad a lo largo del año, con valores de irradiancia PAR que superaron los  $400 \text{ W m}^{-2}$  al mediodía durante el verano, mientras que se registraron valores inferiores a  $200 \text{ W m}^{-2}$  al mediodía en invierno. Las condiciones de radiación fueron no sólo variables entre, sino también dentro de los experimentos, con días totalmente soleados y otros con presencia de nubes.

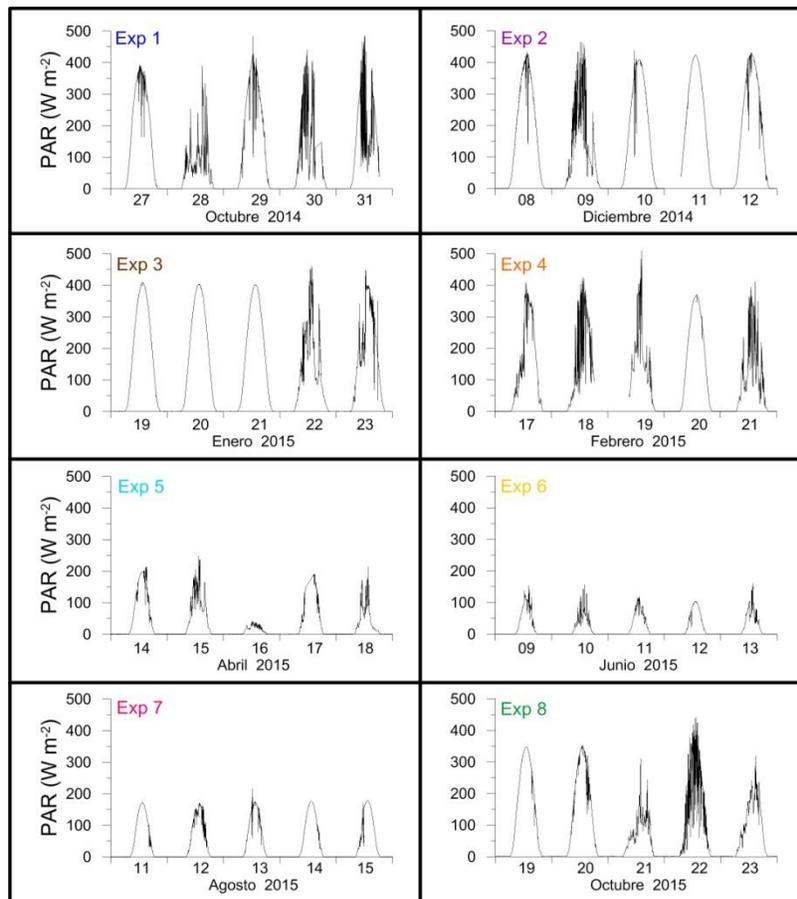
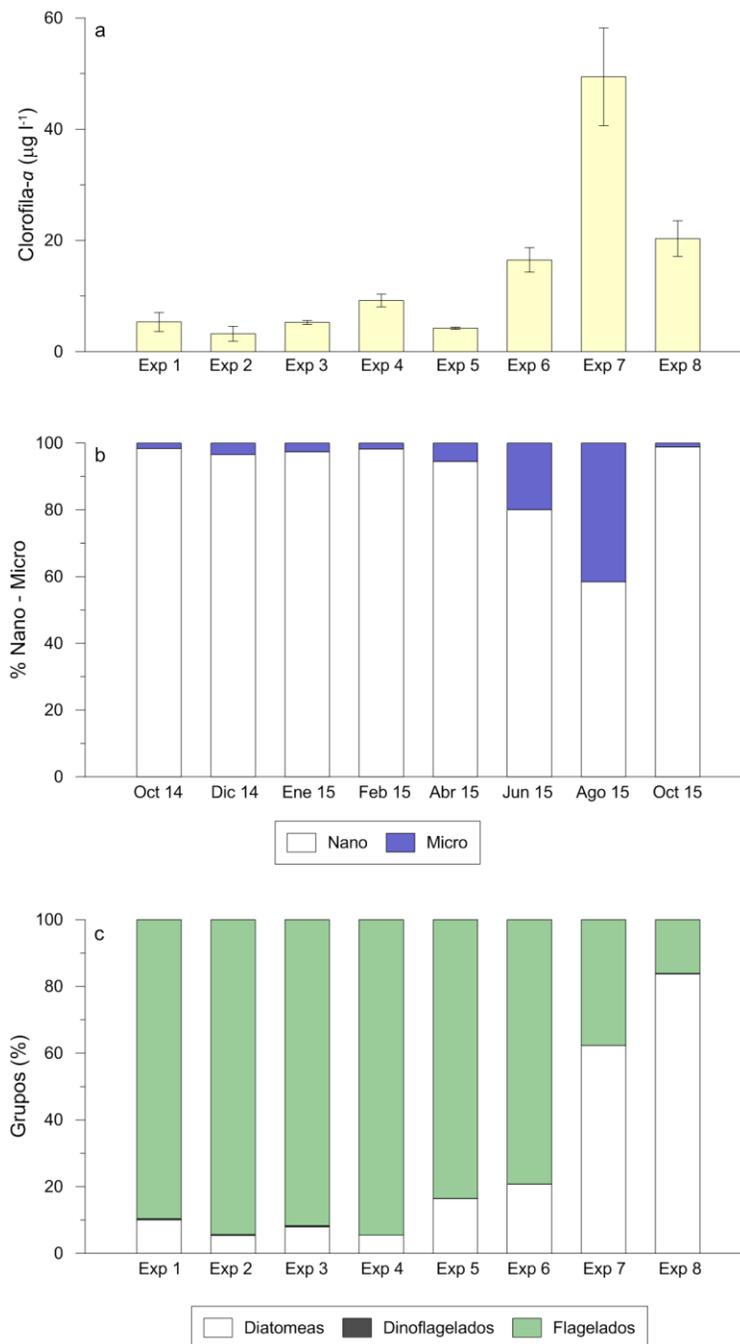


Fig. 3.4 Irradiancia PAR ( $\text{W m}^{-2}$ ) durante los 5 días de los distintos experimentos realizados con comunidades marinas.

*Clorofila-a y composición de las comunidades:*

Durante la mayor parte del período de estudio (Exp 1 al 5) se observaron valores bajos de Clor-*a*, < 8  $\mu\text{g l}^{-1}$ , pero su concentración aumentó hacia junio 2015, destacándose un período de alta concentración de Clor-*a* en el Exp 7-agosto 2015, con valores > 50  $\mu\text{g l}^{-1}$  (Fig. 3.5a).



**Fig. 3.5** (a) Concentración de Clor-*a* ( $\mu\text{g l}^{-1}$ ), (b) Porcentaje (basado en abundancia) de microplancton y nanoplancton, (c) Porcentaje (basado en abundancia) de los distintos grupos, para las muestras iniciales de los experimentos realizados con comunidades marinas.

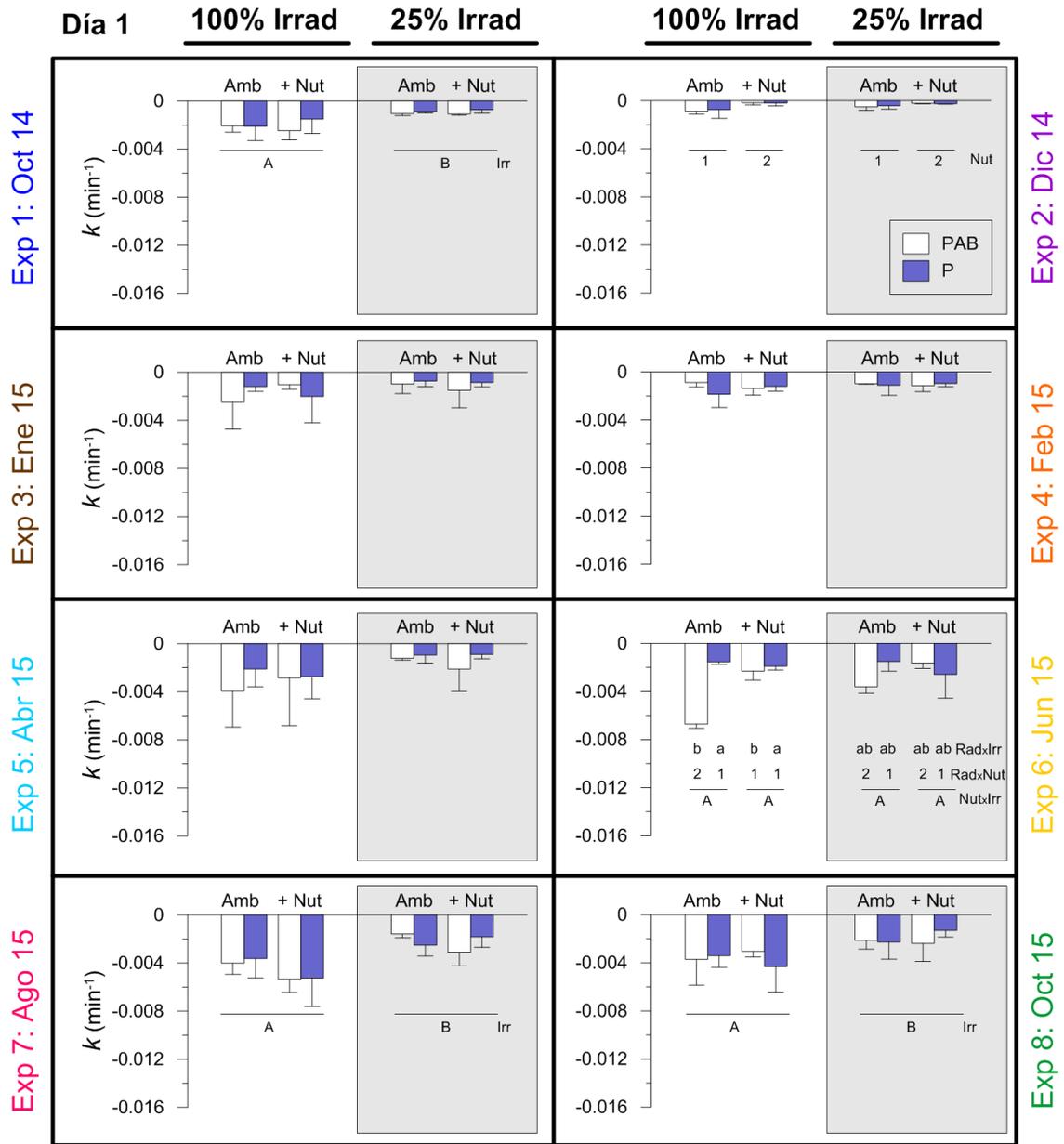
Si bien todos los experimentos estuvieron dominados (en abundancia) por células nanoplanctónicas ( $< 20 \mu\text{m}$ ), en el período donde las concentraciones de Clor-*a* fueron bajas, las células de menor tamaño representaron  $> 95\%$  del total, siendo en su mayoría flagelados no identificados (Fig. 3.5b, c). Sin embargo, durante el Exp 7-agosto 2015, se registró un aumento en la cantidad de células de mayor tamaño (microplancton,  $>20 \mu\text{m}$ ) que alcanzaron  $> 40\%$  del total (Fig. 3.5b). Este experimento coincide con el período del bloom de fitoplancton (descrito en el Capítulo 2), que estuvo dominado por diatomeas ( $\sim 62\%$  del total) (Fig. 3.5c), siendo la especie dominante *Odontella aurita* y otras pequeñas del género *Thalassiosira*. Por otra parte, en octubre 2015, estas diatomeas de pequeño tamaño llegaron a alcanzar  $> 80\%$  del total (Fig. 3.5b, c). En el resto de los experimentos las diatomeas representaron menos del  $15\%$  del total, siendo las diatomeas pequeñas de  $10\text{-}20 \mu\text{m}$  del género *Thalassiosira* las más abundantes. Los dinoflagelados nunca contribuyeron significativamente a la abundancia total ( $< 1\%$ , con una concentración máxima de  $\sim 20 \text{cél ml}^{-1}$ ) en las comunidades estudiadas a lo largo del año.

### **3.3.1 Fotoquímica del FSII:**

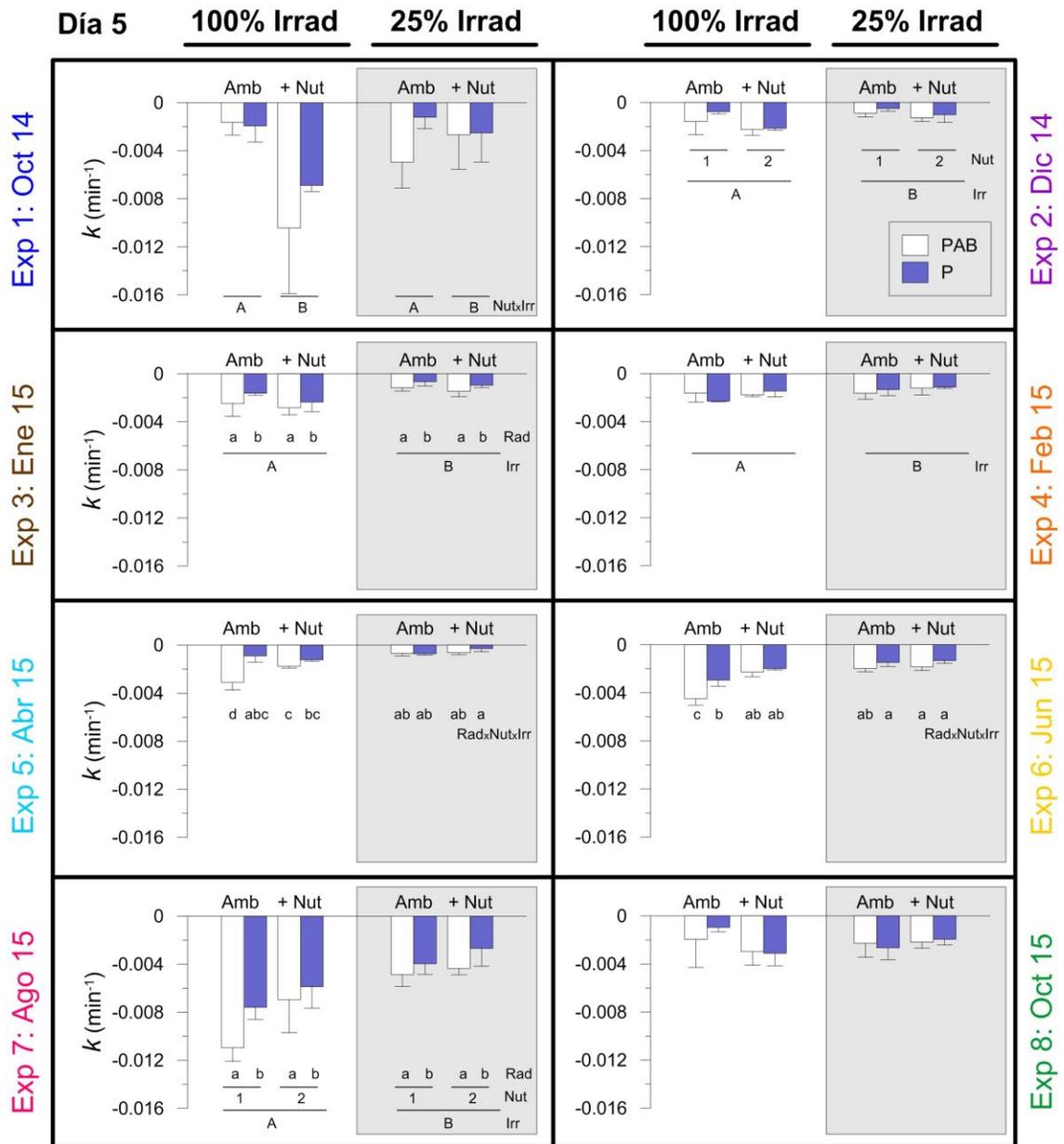
#### Ciclos diarios:

##### *Tasas de inhibición (k) y recuperación (r):*

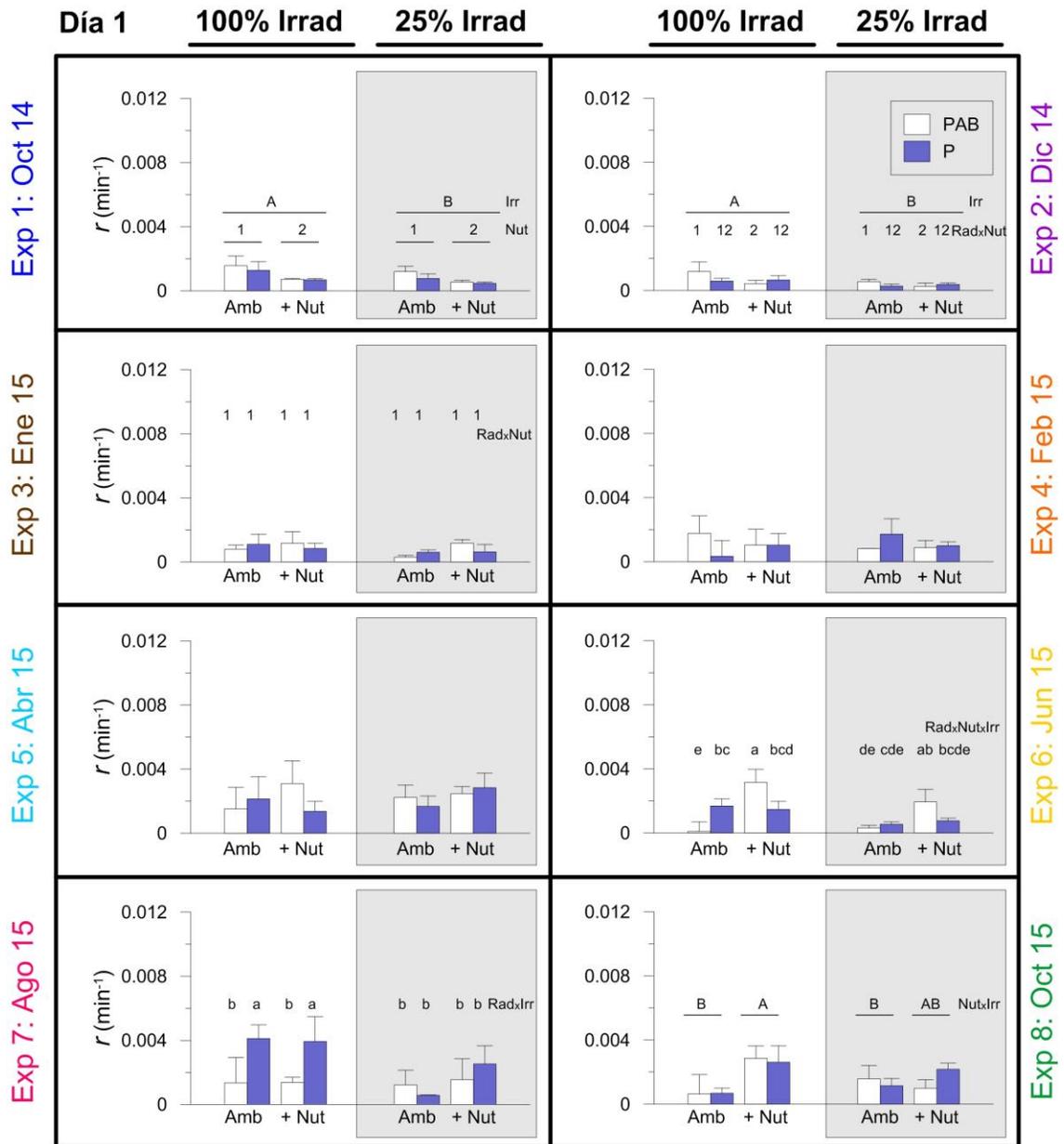
Como patrón general, se observó que las *k* fueron mayores a las *r* (en valores absolutos) y en todos los experimentos se observó inhibición. Por otra parte durante los ciclos diarios del día 1, los experimentos que registraron mayor inhibición coincidieron con aquellos de mayor concentración de Clor-*a* (Fig. 3.6), los cuales mostraron además, mayores *k* para los tratamientos expuestos a una CSM más somera ( $100\%$  Irrad). En general, al inicio de todos los experimentos, o bien no se observaron diferencias entre los tratamientos, o el efecto de la irradiancia fue el más importante. Para los ciclos diarios del día 5 (luego de la aclimatación), si bien la exposición a mayores niveles de irradiancia siempre produjo mayores *k*, se observó también en algunos experimentos que el aporte de nutrientes contribuyó a la inhibición, mientras que en otros casos la disminuyó. A su vez, los experimentos que mostraron mayores *k*, también mostraron mayores *r* (Figs. 3.8 y 3.9; Tablas 3.1 y 3.2).



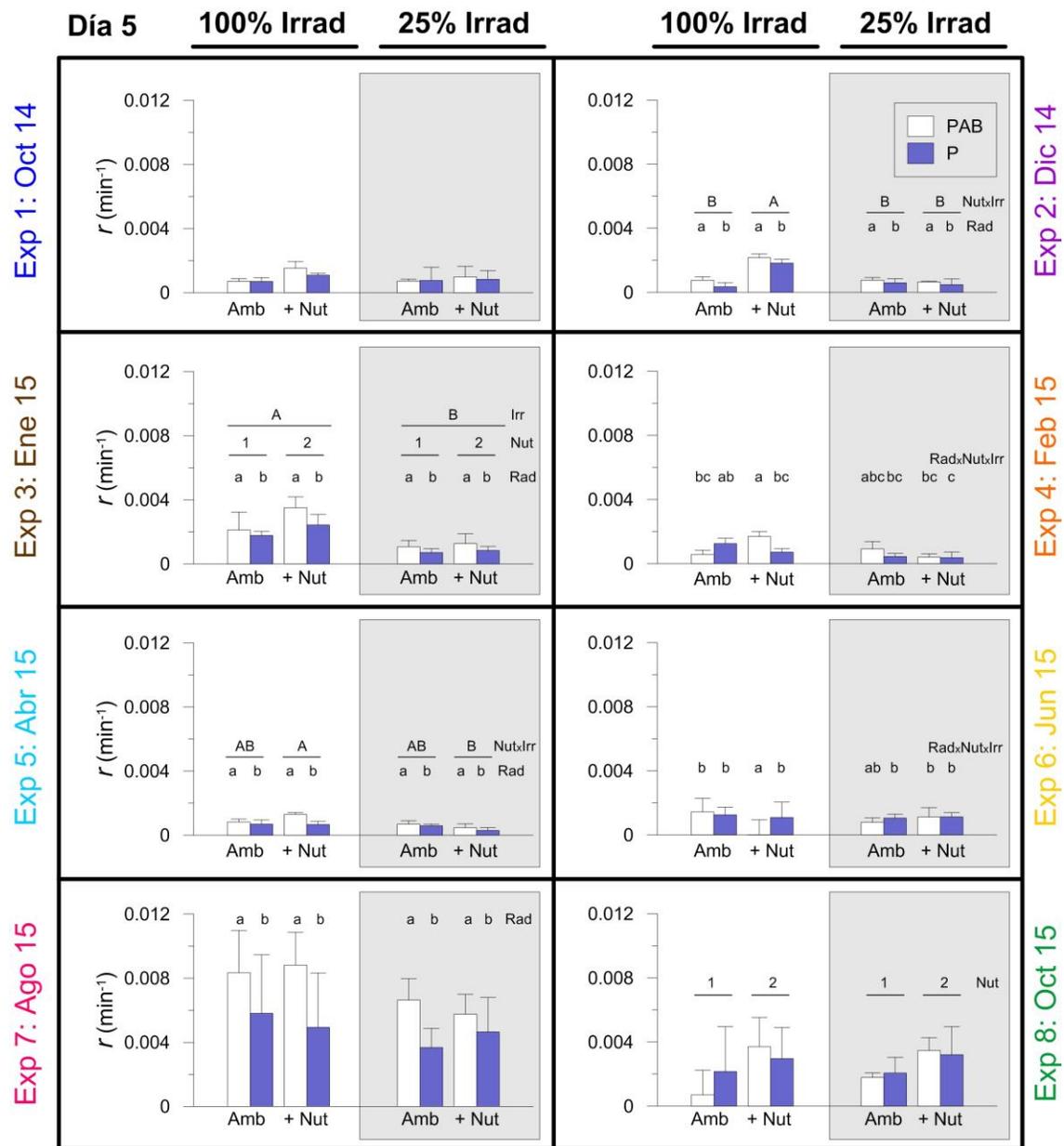
**Fig. 3.6** Tasas de inhibición ( $k$ ; en  $\text{min}^{-1}$ ), en los ciclos diarios de los días 1 de los experimentos realizados con comunidades marinas. Las barras blancas y azules corresponden a los tratamientos PAB y P, respectivamente. Para cada experimento, se indica qué variable o interacción entre variables resultó significativa, y las diferencias entre tratamientos dentro de cada experimento se indican con distintas letras minúsculas, mayúsculas o números ( $p < 0.05$ ) según el test de Tukey. En algunos casos, si bien las variables individuales y/o interacción de las mismas fueron significativas al realizar el ANOVA, el test de Tukey no detectó las diferencias entre tratamientos.



**Fig. 3.7** Tasas de inhibición ( $k$ ; en  $\text{min}^{-1}$ ), en los ciclos diarios de los días 5 de los experimentos realizados con comunidades marinas. Las barras blancas y azules corresponden a los tratamientos PAB y P, respectivamente. Para cada experimento, se indica qué variable o interacción entre variables resultó significativa, y las diferencias entre tratamientos dentro de cada experimento se indican con distintas letras minúsculas, mayúsculas o números ( $p < 0.05$ ) según el test de Tukey.



**Fig. 3.8** Tasas de recuperación ( $r$ ; en  $\text{min}^{-1}$ ), en los ciclos diarios de los días 1 de los experimentos realizados con comunidades marinas. Las barras blancas y azules corresponden a los tratamientos PAB y P, respectivamente. Para cada experimento, se indica qué variable o interacción entre variables resultó significativa, y las diferencias entre tratamientos dentro de cada experimento se indican con distintas letras minúsculas, mayúsculas o números ( $p < 0.05$ ) según el test de Tukey. En algunos casos, si bien las variables individuales y/o interacción de las mismas fueron significativas al realizar el ANOVA, el test de Tukey no detectó las diferencias entre tratamientos.



**Fig. 3.9** Tasas de recuperación ( $r$ ; en  $\text{min}^{-1}$ ), en los ciclos diarios de los días 5 de los experimentos realizados con comunidades marinas. Las barras blancas y azules corresponden a los tratamientos PAB y P, respectivamente. Para cada experimento, se indica qué variable o interacción entre variables resultó significativa, y las diferencias entre tratamientos dentro de cada experimento se indican con distintas letras minúsculas, mayúsculas o números ( $p < 0.05$ ) según el test de Tukey.

	Exp 1	Exp 2	Exp 3	Exp 4	Exp 5	Exp 6	Exp 7	Exp 8
Día	20.61***	56.61***	3,25	6.34*	4.73*	5.93*	117.57***	2,17
Día x Radiacion	1,63	2,07	0,56	0,44	0,01	7.52*	11.19**	0,06
Día x Nutrientes	8.51**	23.59**	1,15	0,88	0,30	1,07	37.50***	0,86
Día x Irradiancia	1,31	6.92*	2,39	0,33	0,29	1,88	11.80**	4,42
Día x Radiacion x Nutrientes	0,04	0,39	0,96	0,36	0,02	21.65***	3,49	0,00
Día x Radiacion x Irradiancia	0,05	0,09	0,33	0,00	0,34	6.71*	0,90	0,87
Día x Nutrientes x Irradiancia	10.91**	4,15	1,34	0,02	0,04	0,05	10.86**	0,96
Día x Radiacion x Nutrientes x Irradiancia	2,17	0,39	2,21	0,10	0,03	0,10	0,09	0,11

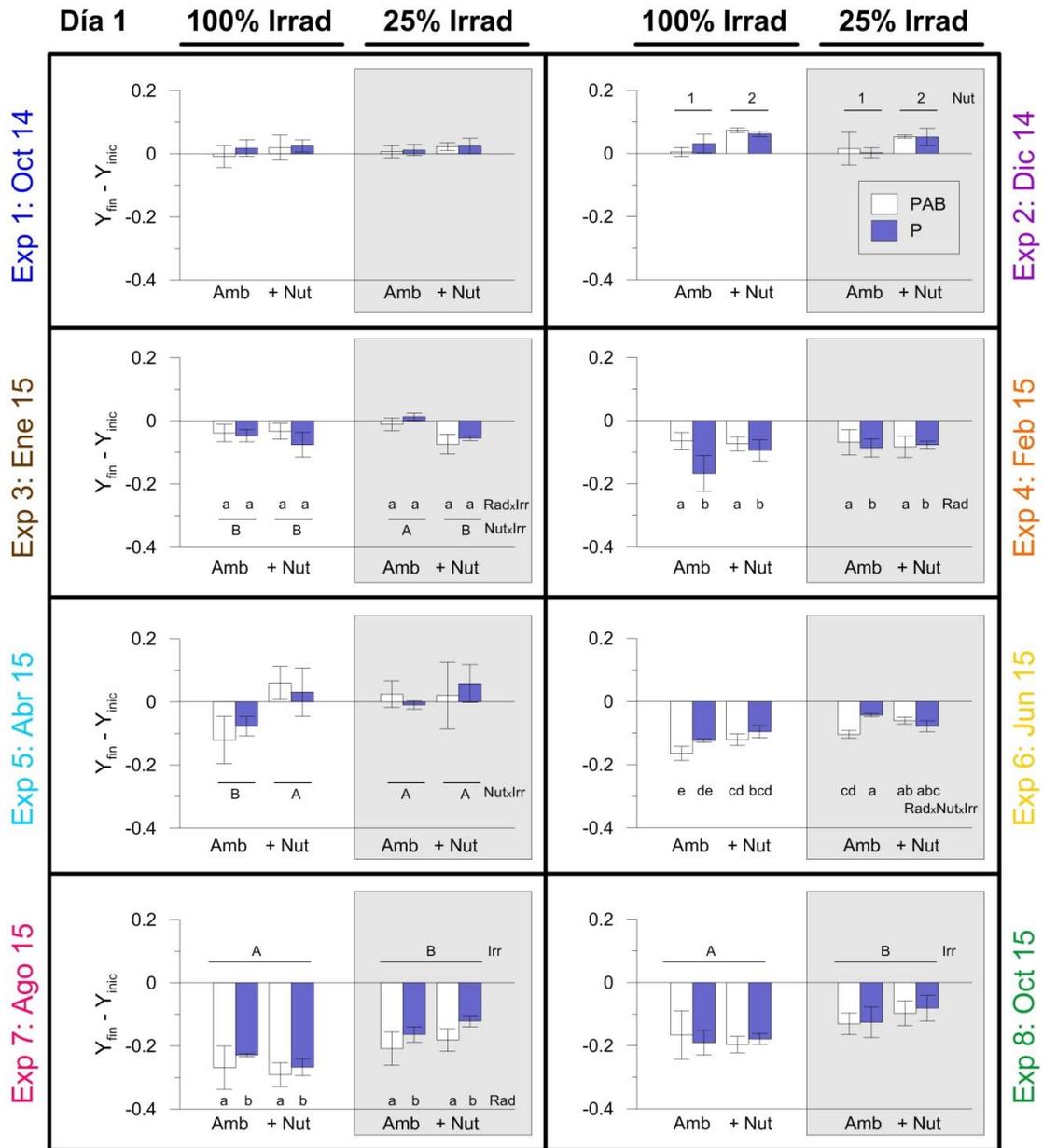
**Tabla 3.1** Resultados de ANOVA de tres vías de medidas repetidas para los efectos individuales e interactivos de la radiación, nutrientes e irradiancia entre días en las tasas de inhibición (*k*). El nivel de significancia se estableció en un valor de  $p < 0.05$ . Los números representan los valores del estadístico F y los asteriscos \*, \*\* y \*\*\*  $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$  y  $p < 0.001$ , respectivamente.

	Exp 1	Exp 2	Exp 3	Exp 4	Exp 5	Exp 6	Exp 7	Exp 8
Día	0.02	42.57***	30.09***	2.77	51.19***	4.70*	97.60***	7.08*
Día x Radiacion	0.11	1.32	2.30	0.10	0.02	5.04*	24.85***	0.00
Día x Nutrientes	25.26***	49.62***	1.10	0.27	1.91	24.24***	0.56	0.55
Día x Irradiancia	0.53	5.85*	13.62**	3.02	2.36	8.66**	0.50	0.47
Día x Radiacion x Nutrientes	2.38	5.31*	0.27	1.97	0.27	22.88***	0.08	2.17
Día x Radiacion x Irradiancia	0.43	0.15	0.44	3.98	0.07	0.24	5.17*	0.34
Día x Nutrientes x Irradiancia	2.93	51.66***	3.80	0.17	0.90	8.00*	0.37	0.99
Día x Radiacion x Nutrientes x Irradiancia	0.03	0.45	0.47	10.37**	2.96	9.64**	0.18	0.01

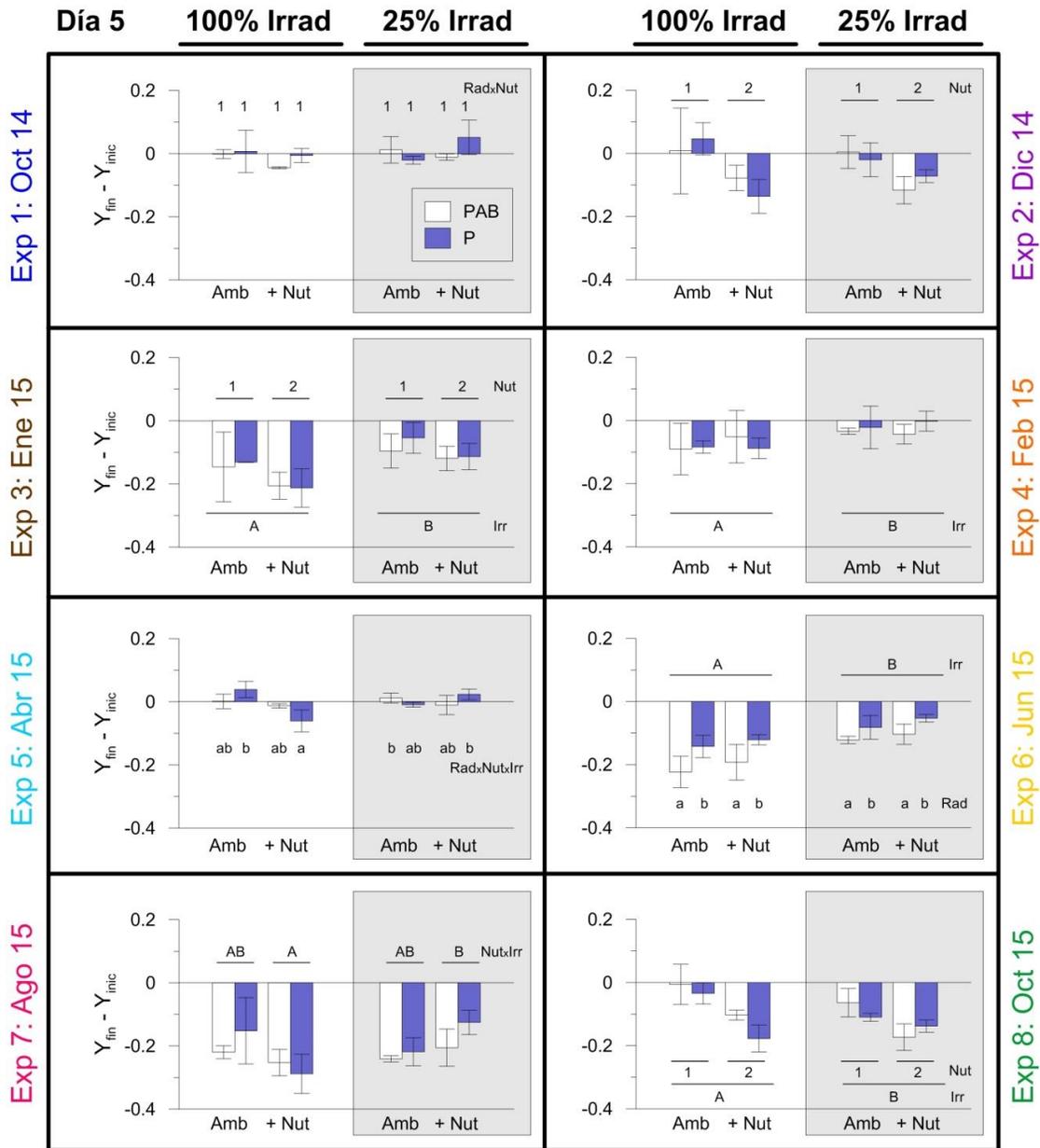
**Tabla 3.2** Resultados de ANOVA de tres vías de medidas repetidas para los efectos individuales e interactivos de la radiación, nutrientes e irradiancia entre días en las tasas de recuperación (*r*). El nivel de significancia se estableció en un valor de  $p < 0.05$ . Los números representan los valores del estadístico F y los asteriscos \*, \*\* y \*\*\*  $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$  y  $p < 0.001$ , respectivamente.

#### *Daño no reparado a lo largo del día:*

En los primeros experimentos realizados, los valores de  $Y_{fin}-Y_{inic}$  al día 1 fueron  $> 0$ , mientras que a partir de Enero, mostraron  $Y_{fin}-Y_{inic} < 0$ , con valores absolutos cercanos 0.2 aproximándose al período de bloom (Fig. 3.10). Dentro de cada experimento las respuestas fueron muy variables aunque, generalmente, las muestras que recibieron el 100% Irrad tuvieron menores valores que aquellas bajo 25% Irrad. Durante los ciclos diarios del día 5 se observó que, además de la irradiancia, la variable Nut también tuvo efecto sobre los valores de  $Y_{fin}-Y_{inic}$  (Fig. 3.11). Por otro lado, en los experimentos donde se observaron diferencias entre el inicio y el final de los experimentos (Tabla 3.3), los ciclos diarios del día 5 mostraron, generalmente, mayor daño no reparado.

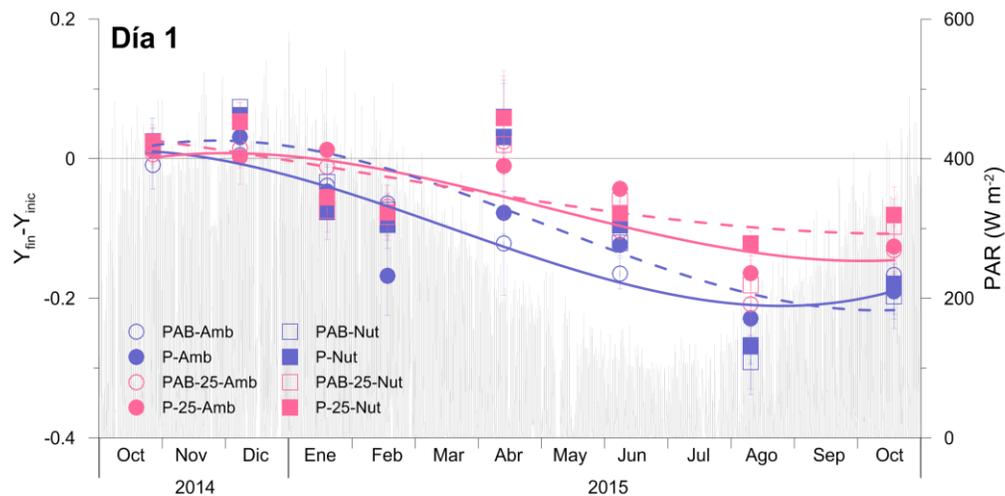


**Fig. 3.10** Diferencias entre los valores de Y al final y al inicio ( $Y_{fin} - Y_{inic}$ ) de los ciclos diarios correspondientes al día 1, calculados para los experimentos realizados con comunidades marinas. Las barras blancas y azules corresponden a los tratamientos PAB y P, respectivamente. Para cada experimento, se indica qué variable o interacción entre variables resultó significativa, y las diferencias entre tratamientos dentro de cada experimento se indican con distintas letras minúsculas, mayúsculas o números ( $p < 0.05$ ) según el test de Tukey. En algunos casos, si bien las variables individuales y/o interacción de las mismas fueron significativas al realizar el ANOVA, el test de Tukey no detectó las diferencias entre tratamientos.

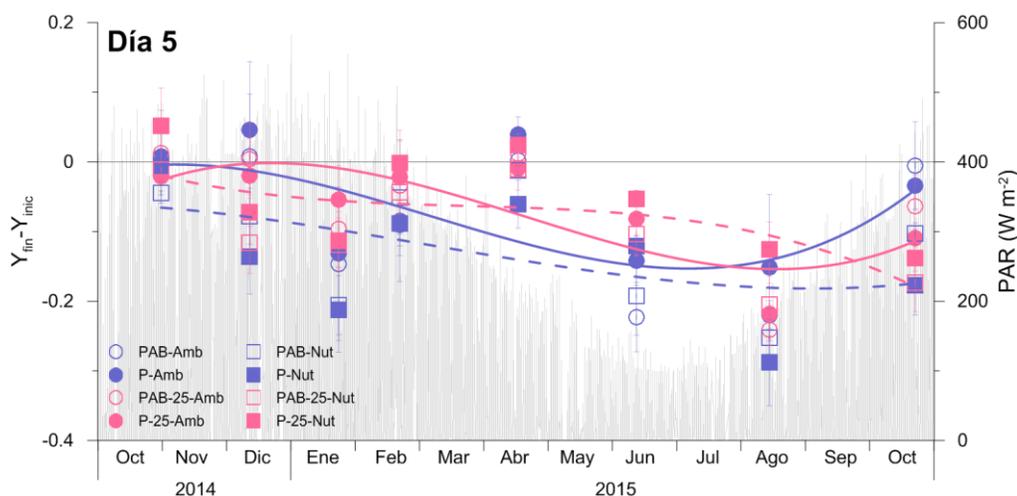


**Fig. 3.11** Diferencias entre los valores de Y al final y al inicio ( $Y_{fin}-Y_{inic}$ ) de los ciclos diarios correspondientes al día 5, calculados para los experimentos realizados con comunidades marinas. Las barras blancas y azules corresponden a los tratamientos PAB y P, respectivamente. Para cada experimento, se indica qué variable o interacción entre variables resultó significativa, y las diferencias entre tratamientos dentro de cada experimento se indican con distintas letras minúsculas, mayúsculas o números ( $p < 0.05$ ) según el test de Tukey. En algunos casos, si bien las variables individuales y/o interacción de las mismas fueron significativas al realizar el ANOVA, el test de Tukey no detectó las diferencias entre tratamientos.

Los valores de  $Y_{fin}-Y_{inic}$  se comportaron de manera similar a los de la radiación solar recibida a lo largo del año, es decir, con valores más altos en primavera-verano, disminuyendo hacia el invierno, y con un aumento nuevamente hacia la primavera (Figs. 3.12 y 3.13). En los primeros experimentos y durante el ciclo diario del día 1, no se observó diferencia significativa entre los distintos tratamientos de irradiancia o nutrientes, sin embargo esta diferencia se hizo evidente hacia el invierno, con una tendencia hacia un mayor daño no reparado para las muestras expuestas al 100% Irrad (Fig. 3.12). Por otra parte, durante el día 5, no hubo tendencias tan marcadas y los resultados fueron más variables, pero con mayor daño no reparado en la época cercana al bloom (Fig. 3.13).



**Fig. 3.12** Valores de  $Y_{fin}-Y_{inic}$  correspondientes a los ciclos diarios del día 1 de todos los experimentos realizados con comunidades marinas. Los símbolos sin y con relleno corresponden a los dos tratamientos de calidad de radiación (PAB y P respectivamente), mientras que los círculos y cuadrados corresponden a los dos tratamientos de nutrientes (Amb y +Nut, respectivamente). Los símbolos azules y rosa corresponden a los dos tratamientos de irradiancia (100% y 25% respectivamente). Las curvas continuas rosa y azul corresponden a ajustes polinómicos de los datos correspondientes al 25% y 100% de irradiancias con concentración Amb, respectivamente, mientras que las curvas con líneas discontinuas rosa y azul corresponden a ajustes polinómicos de los datos correspondientes al 25% y 100% de irradiancias con concentración +Nut, respectivamente. Además se incluyeron los datos de irradiancia solar PAR ( $W m^{-2}$ ).



**Fig. 3.13** Valores de  $Y_{fin}-Y_{inic}$  correspondientes a los ciclos diarios del día 5 de todos los experimentos realizados con comunidades marinas. Los símbolos sin y con relleno corresponden a los dos tratamientos de calidad de radiación (PAB y P respectivamente), mientras que los círculos y cuadrados corresponden a los dos tratamientos de nutrientes (Amb y +Nut, respectivamente). Los símbolos azules y rosa corresponden a los dos tratamientos de irradiancia (100% y 25% respectivamente). Las curvas continuas rosa y azul corresponden a ajustes polinómicos de los datos correspondientes al 25% y 100% de irradiancias con concentración Amb, respectivamente, mientras que las curvas con líneas discontinuas rosa y azul corresponden a ajustes polinómicos de los datos correspondientes al 25% y 100% de irradiancias con concentración +Nut, respectivamente. Además se incluyeron los datos de irradiancia solar PAR ( $W m^{-2}$ ).

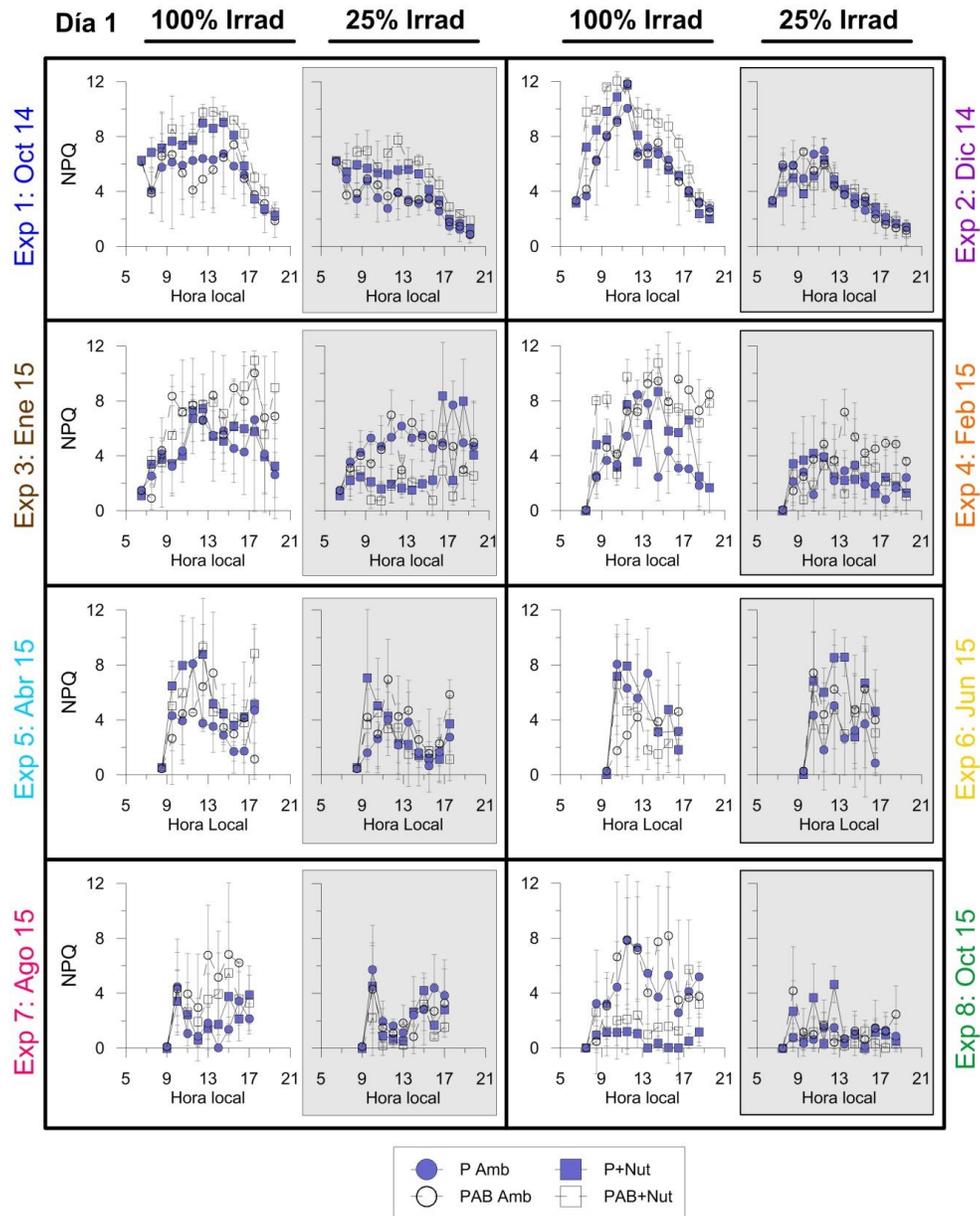
	Exp 1	Exp 2	Exp 3	Exp 4	Exp 5	Exp 6	Exp 7	Exp 8
Día	3.65	44.93***	84.03***	8.65**	0.00	21.50***	0.08	61.26***
Día x Radiacion	0.33	0.00	0.57	2.41	0.02	6.19*	0.13	7.77*
Día x Nutrientes	1.09	40.81***	0.70	0.02	15.93***	0.13	0.27	89.58***
Día x Irradiancia	0.90	0.00	8.88**	1.58	1.77	3.46	7.57*	100.23***
Día x Radiacion x Nutrientes	4.87*	0.00	0.05	1.41	0.07	3.08	0.23	0.15
Día x Radiacion x Irradiancia	0.01	0.48	0.45	0.07	0.09	0.49	0.10	1.94
Día x Nutrientes x Irradiancia	2.66	1.19	4.04	0.18	9.33**	1.22	3.17	0.02
Día x Radiacion x Nutrientes x Irradiancia	0.50	1.36	0.28	1.63	0.00	2.36	1.89	11.72**

**Tabla 3.3** Resultados de ANOVA de tres vías de medidas repetidas para los efectos individuales e interactivos de la radiación, nutrientes e irradiancia entre días en el daño no reparado ( $Y_{fin}-Y_{inic}$ ). El nivel de significancia se estableció en un valor de  $p < 0.05$ . Los números representan los valores del estadístico F y los asteriscos \*, \*\* y \*\*\*  $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$  y  $p < 0.001$ , respectivamente.

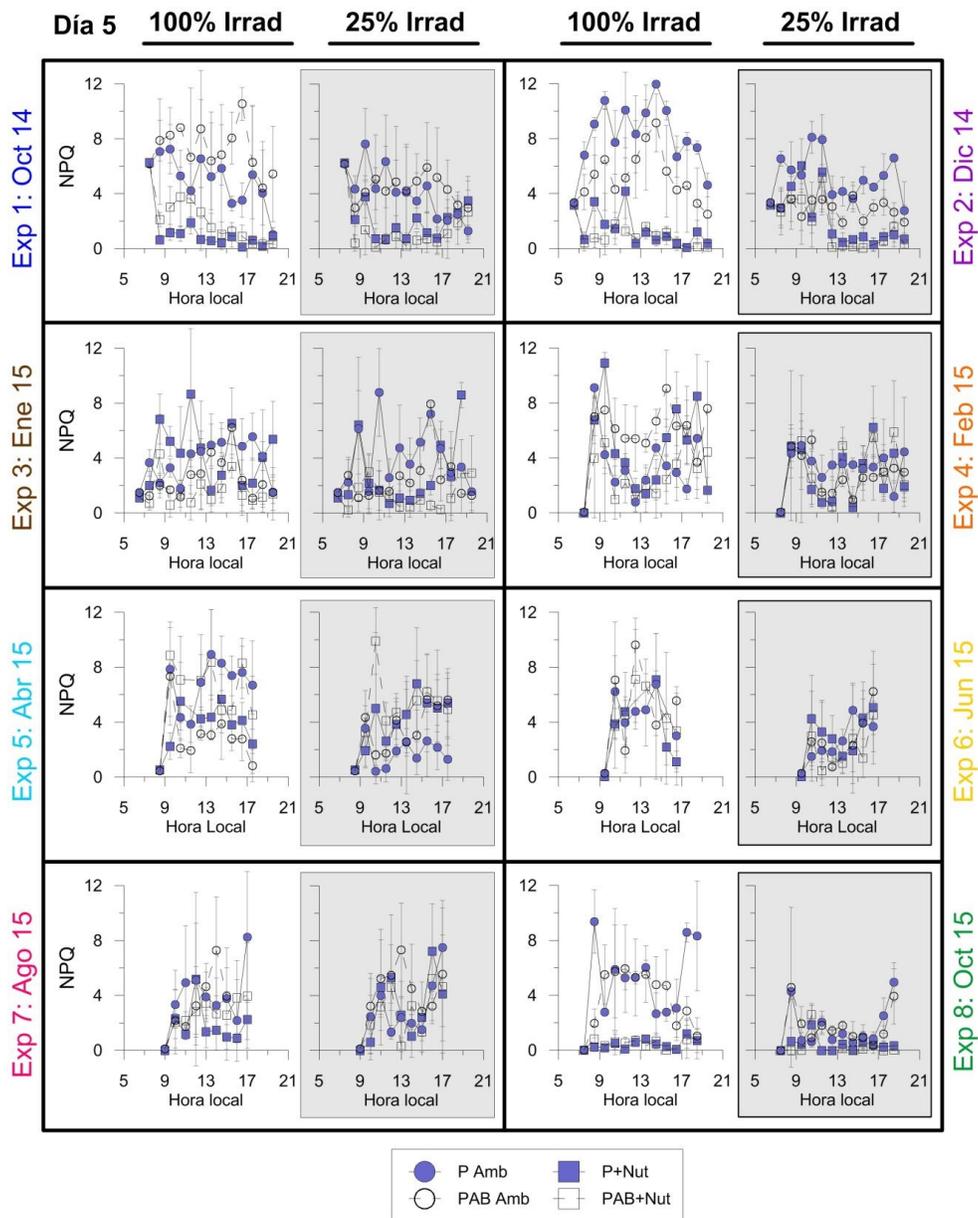
#### Quenching no fotoquímico (NPQ):

El patrón general de NPQ (Figs. 3.14, 3.15) fue de un aumento hacia el mediodía y disminuyendo hacia el atardecer. Las muestras expuestas a 25% Irrad presentaron valores de NPQ inferiores que aquellas que recibieron el 100% Irrad para ambos ciclos diarios. Para el día 1, las muestras que recibieron 100% Irrad, y además recibieron el espectro completo de radiación solar disiparon mayor cantidad de energía en forma de calor, sobre todo hacia la primavera y verano,

coincidiendo con la época de mayores irradiancias solares (Fig. 3.14). Por otra parte se registraron, en la mayoría de los casos, menores valores de NPQ hacia el último día de experimentación. Para este mismo día, a su vez, las muestras +Nut exhibieron menor disipación de energía por calor que las Amb (Fig. 3.15).



**Fig. 3.14** NPQ en los ciclos diarios del día 1 de los experimentos realizados con comunidades marinas. Los símbolos blancos y azules corresponden a los tratamientos PAB y P, respectivamente. Los círculos corresponden a los tratamientos de concentración de nutrientes ambiente (Amb), mientras que los cuadrados corresponden a tratamientos con agregado adicional de nutrientes (+Nut).

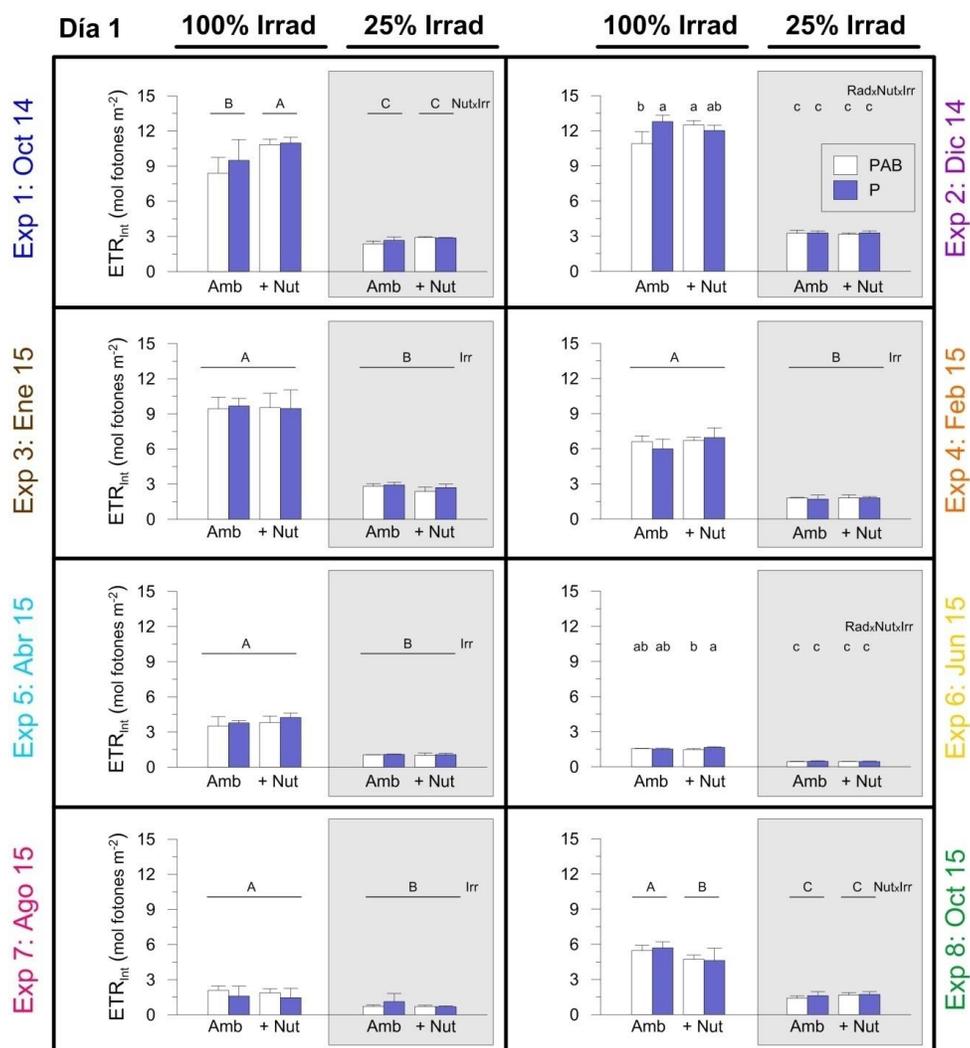


**Fig. 3.15** NPQ en los ciclos diarios del día 5 de los experimentos realizados con comunidades marinas. Los símbolos blancos y azules corresponden a los tratamientos PAB y P, respectivamente. Los círculos corresponden a los tratamientos de concentración de nutrientes ambiente (Amb), mientras que los cuadrados corresponden a tratamientos con agregado adicional de nutrientes (+Nut).

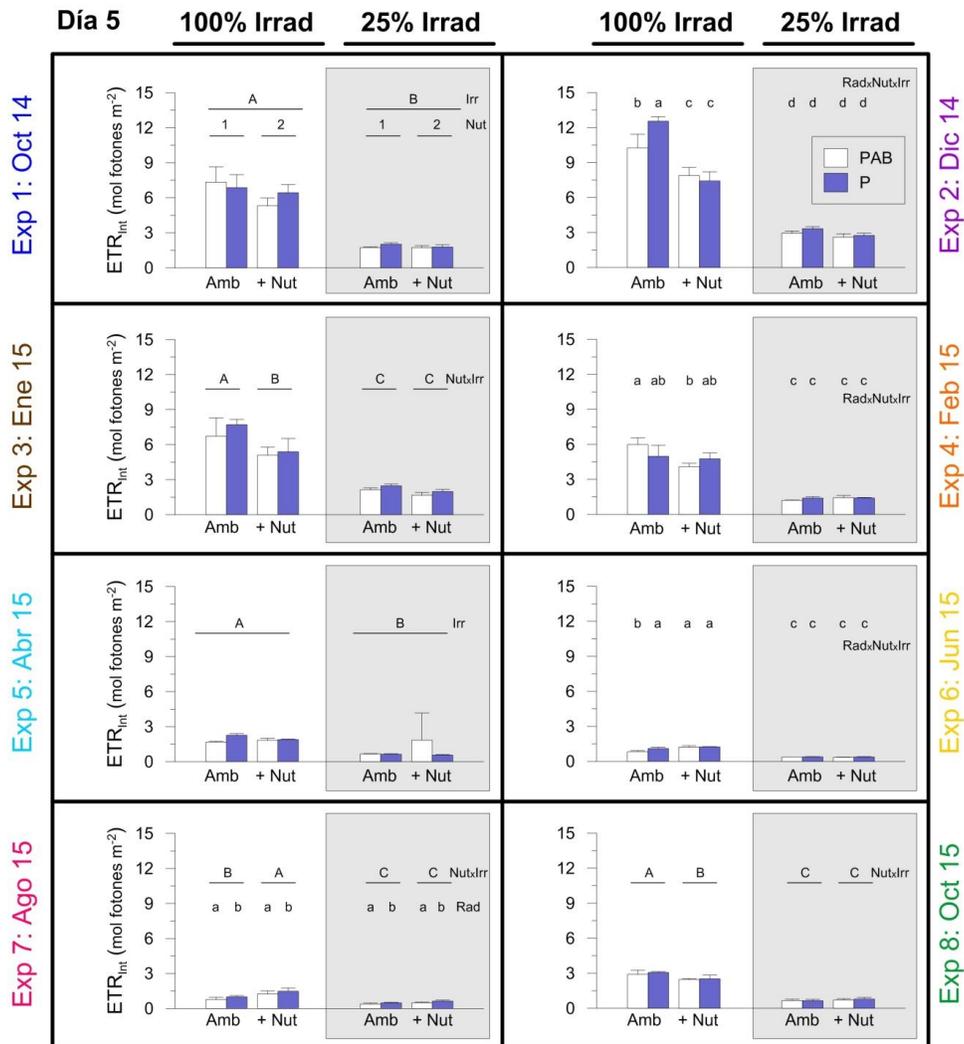
*Tasa de transporte electrónico del FSII:*

Los  $ETR_{int}$  fueron significativamente mayores para los tratamientos expuestos al 100% Irrad respecto a los 25% Irrad, independientemente del tratamiento de radiación o de nutrientes (Figs. 3.16 y 3.17). Esta diferencia se hizo mucho más notoria en primavera y verano, coincidiendo con

altos valores de radiación solar. Por otro lado, se observó diferencia entre días (Tabla 3.4) y la  $ETR_{int}$  fue mayor al inicio que al final de los experimentos, luego de la aclimatación. Más aún, durante los ciclos diarios correspondientes al día 5 de los experimentos, además de la irradiancia, también los nutrientes tuvieron un efecto importante sobre las  $ETR_{int}$  aunque las respuestas fueron variables (Fig. 3.17).



**Fig. 3.16** Tasa de transporte electrónico integrada -  $ETR_{int}$  (mol electrones  $m^{-2}$ ) de los ciclos diarios de los días 1 de los experimentos realizados con comunidades marinas. Las barras blancas y azules corresponden a los tratamientos PAB y P, respectivamente. Para cada experimento, se indica qué variable o interacción entre variables resultó significativa, y las diferencias entre tratamientos dentro de cada experimento se indican con distintas letras minúsculas, mayúsculas o números ( $p < 0.05$ ) según el test de Tukey.



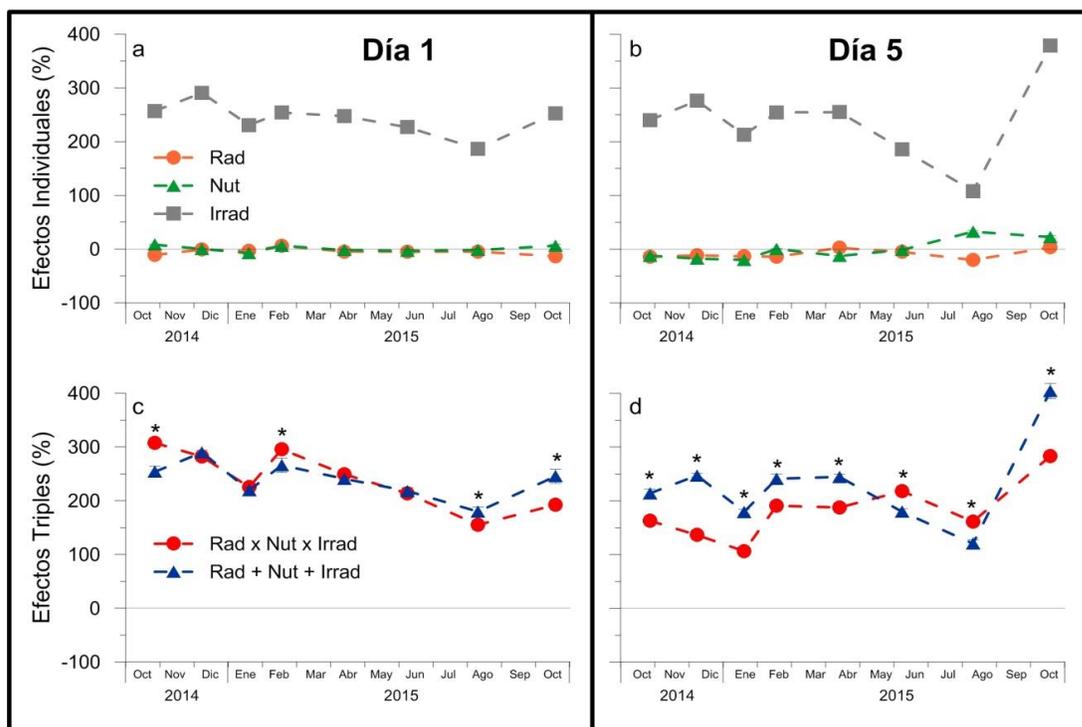
**Fig. 3.17** Tasa de transporte electrónico integrada -  $ETR_{int}$  (mol electrones  $m^{-2}$ ) de los ciclos diarios de los días 5 de los experimentos realizados con comunidades marinas. Las barras blancas y azules corresponden a los tratamientos PAB y P, respectivamente. Para cada experimento, se indica qué variable o interacción entre variables resultó significativa, y las diferencias entre tratamientos dentro de cada experimento se indican con distintas letras minúsculas, mayúsculas o números ( $p < 0.05$ ) según el test de Tukey.

	Exp 1	Exp 2	Exp 3	Exp 4	Exp 5	Exp 6	Exp 7	Exp 8
Día	203.63***	164.19***	133.76***	130.68***	27.17***	128.08***	320.91***	290.37***
Día x Radiacion	0.2	0.8	0.9	0.20	0.87	0.80	3.57	0.02
Día x Nutrientes	37.21***	105.91***	8.96**	18.54***	0.02	6.54*	45.79***	0.69
Día x Irradiancia	71.51***	96.97***	60.74***	46.24***	20.90***	60.46***	113.58***	59.33***
Día x Radiacion x Nutrientes	4.63*	0.7	0.2	0.53	1.65	5.69*	0.66	0.45
Día x Radiacion x Irradiancia	0.3	0.0	0.5	0.12	0.76	0.27	0.59	0.15
Día x Nutrientes x Irradiancia	20.08***	70.21***	6.69*	21.29***	1.80	7.70*	16.39***	1.73
Día x Radiacion x Nutrientes x Irradiancia	4.2	0.0	0.0	2.55	0.12	8.06*	0.47	0.00

**Tabla 3.4** Resultados de ANOVA de tres vías de medidas repetidas para los efectos individuales e interactivos de la radiación, nutrientes e irradiancia entre días en las tasas de transporte de electrones (ETR). El nivel de significancia se estableció en un valor de  $p < 0.05$ . Los números representan los valores del estadístico F y los asteriscos \*, \*\* y \*\*\*  $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$  y  $p < 0.001$ , respectivamente.

### Efectos sobre la tasa de transporte electrónica integrada:

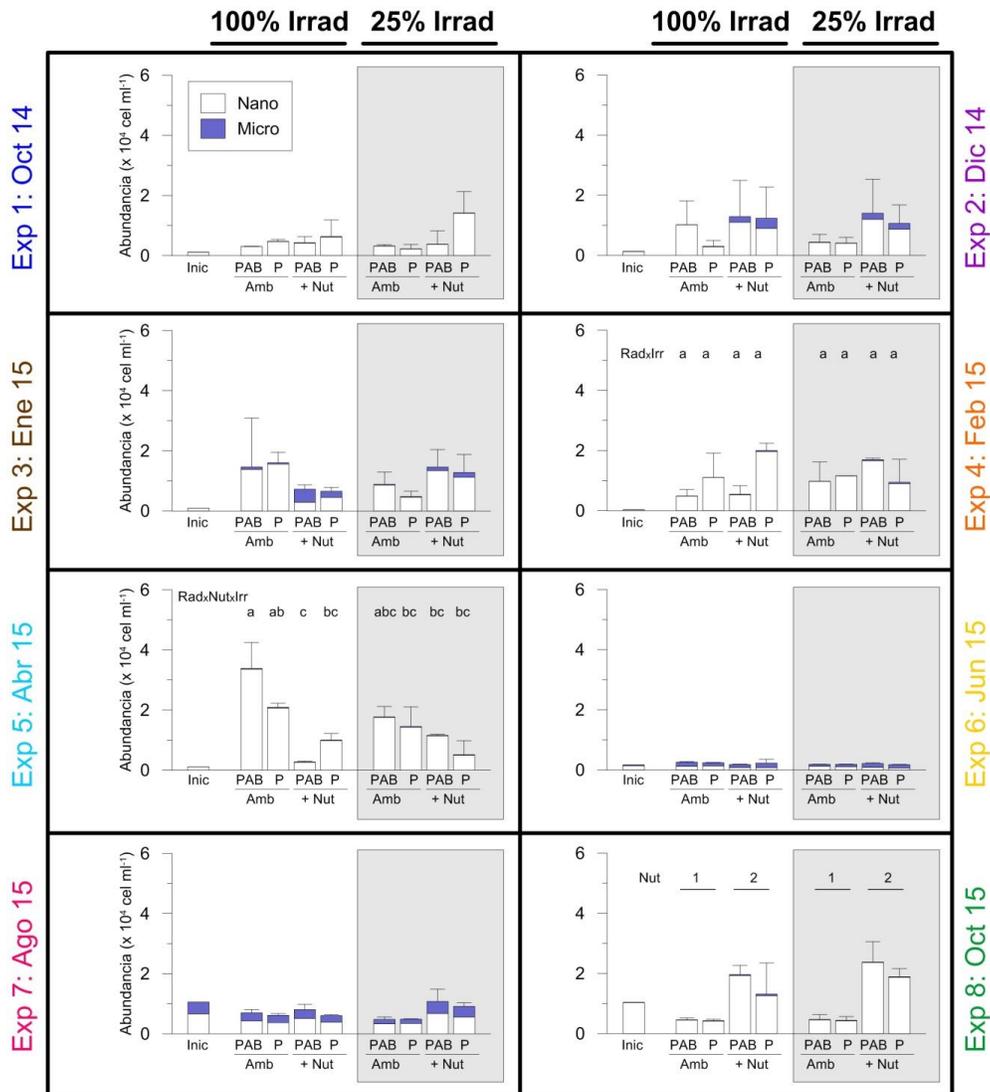
Se calcularon los efectos individuales (Rad, Nut, Irrad), la suma de los mismos (Rad + Nut + Irrad) y los efectos interactivos triples (Rad x Nut x Irrad) para las  $ETR_{int}$  durante los días 1 y 5 de cada experimento (Fig. 3.18). Por lo general, las variables individuales Rad y Nut tuvieron un efecto casi nulo sobre la  $ETR_{int}$  al principio y al final de la experimentación. Por el contrario, el efecto individual de la irradiancia (aumento de un 25% al 100% de irradiancia recibida) fue el más importante sobre el  $ETR_{int}$  (Fig. 3.18a, b). Por último, se compararon los efectos interactivos de las tres variables (Rad x Nut x Irrad) respecto de la suma de los efectos individuales (Rad + Nut + Irrad) (Fig. 3.18c, d). Durante los ciclos diarios del día 1, se observaron valores similares tanto en los efectos interactivos como en la suma de los individuales para la mitad del período de experimentación, con reducción de los mismos hacia la época del bloom (agosto 2015) (Fig. 3.18c). Por otra parte, durante los ciclos diarios correspondientes al día 5, luego de la aclimatación, las respuestas fueron un poco diferentes ya que, en general el efecto interactivo (Rad x Nut x Irrad) fue inferior a la suma de los efectos por separado (Rad + Nut + Irrad) (Fig. 3.18d), a excepción de los experimentos de junio y agosto de 2015.



**Fig. 3.18** (a, b) Efectos individuales (Rad, Nut, Irrad) (%), (c, d) Efectos triples interactivos (Rad x Nut x Irrad; círculos) y suma de los efectos individuales (Rad + Nut + Irrad; triángulos) (%), a lo largo del período de estudio para los  $ETR_{int}$  de los días 1 y 5, respectivamente. Los asteriscos indican diferencias significativas entre el efecto interactivo y la suma de los efectos individuales ( $p < 0.05$ ).

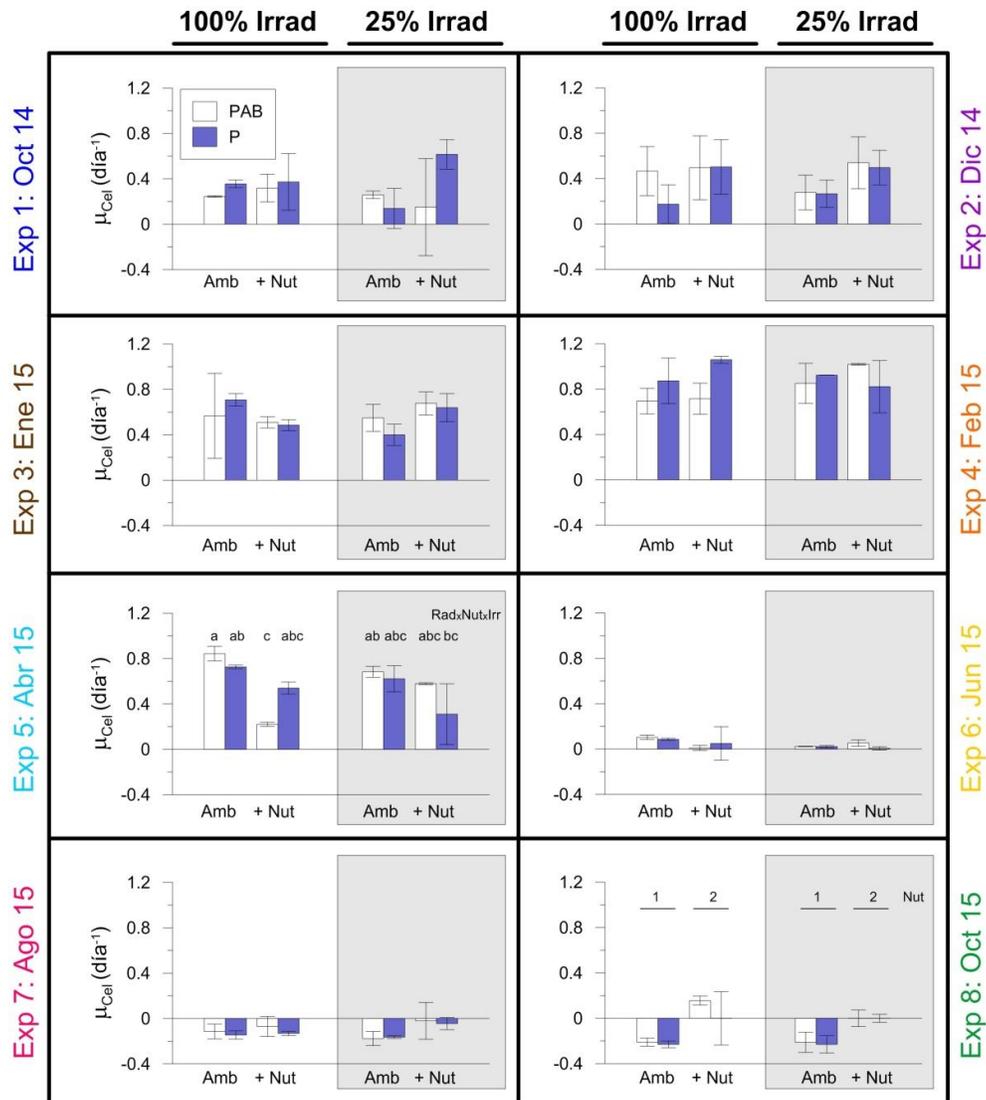
### 3.3.2 Crecimiento, cambios en la estructura de tamaños y composición específica de las comunidades:

Las concentraciones iniciales de células fitoplanctónicas durante los experimentos de largo plazo variaron entre  $0.2$  y  $1.2 \times 10^4$  cél  $\text{ml}^{-1}$ . A lo largo de los 5 días de experimentación, y en la mayoría de los casos, se observó un aumento en la abundancia de células, pero ésta fue muy variable entre los tratamientos (Fig 3.19).



**Fig. 3.19** Abundancia de células ( $\times 10^4$  cél  $\text{ml}^{-1}$ ) al inicio y para cada uno de los tratamientos al final de los experimentos realizados con comunidades marinas. Para cada experimento, se indica qué variable o interacción entre variables resultó significativa, y las diferencias entre tratamientos dentro de cada experimento se indican con distintas letras minúsculas, mayúsculas o números ( $p < 0.05$ ) según el test de Tukey. En algunos casos, si bien las variables individuales y/o interacción de las mismas fueron significativas al realizar el ANOVA, el test de Tukey no detectó las diferencias entre tratamientos.

Las tasas de crecimiento en función de la Clor-*a* ( $\mu_{\text{Clor-}a}$ ) fueron similares a las obtenidas en base a recuentos celulares ( $\mu_{\text{cel}}$ ), por lo cual se muestran sólo los datos de estas últimas. Salvo algunas excepciones, generalmente no hubo diferencias en las  $\mu_{\text{cel}}$  entre los tratamientos, aún en aquellos que recibieron nutrientes adicionales (Fig. 3.20). Por otro lado, las  $\mu_{\text{cel}}$  para todos los tratamientos de los primeros 5 experimentos fueron superiores a las observadas en aquellos cercanos al bloom, en los cuales se obtuvieron valores cercanos a 0, o incluso negativos.



**Fig. 3.20** Tasas de crecimiento en función de la abundancia de células ( $\text{día}^{-1}$ ) calculadas para todos los tratamientos en los experimentos realizados con comunidades marinas. Las barras blancas y azules corresponden a los tratamientos PAB y P, respectivamente. Para cada experimento, se indica qué variable o interacción entre variables resultó significativa, y las diferencias entre tratamientos dentro de cada experimento se indican con distintas letras minúsculas, mayúsculas o números ( $p < 0.05$ ) según el test de Tukey.

Las células nanoplanctónicas (< 20 µm) fueron dominantes tanto al inicio como al final de cada experimento, a excepción de aquellos realizados en junio y agosto (y un tratamiento puntual en enero), en el cual las células de mayor tamaño (microplancton, > 20 µm) contribuyeron por > 50% del total en algunos tratamientos al día 5 (Fig. 3.21). Aunque en casi todos los experimentos hubo algunas variaciones en los porcentajes de tamaños hacia el final de los mismos, éstas fueron generalmente pequeñas y tendieron hacia un aumento en la abundancia de las células microplanctónicas (Fig. 3.21).

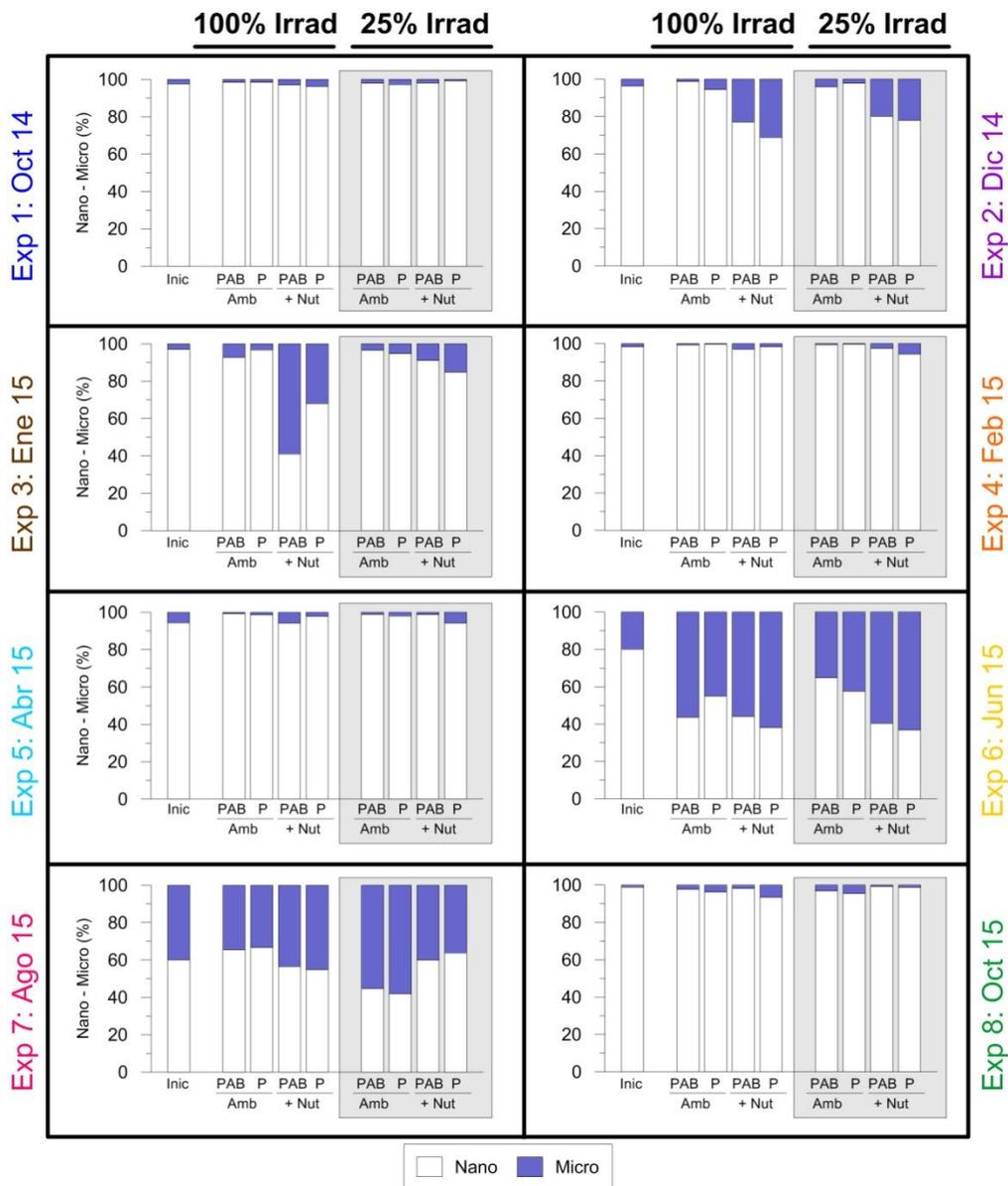


Fig. 3.21 Proporción relativa (%) de nano- y microplancton para cada uno de los tratamientos al inicio y al final de los experimentos realizados con comunidades marinas.

Por otra parte, al inicio de los experimentos predominaron los flagelados, excepto en los experimentos de agosto y octubre de 2015, cuando se registró una dominancia de diatomeas (Fig. 3.22), siendo la especie más representativa *Odontella aurita*.

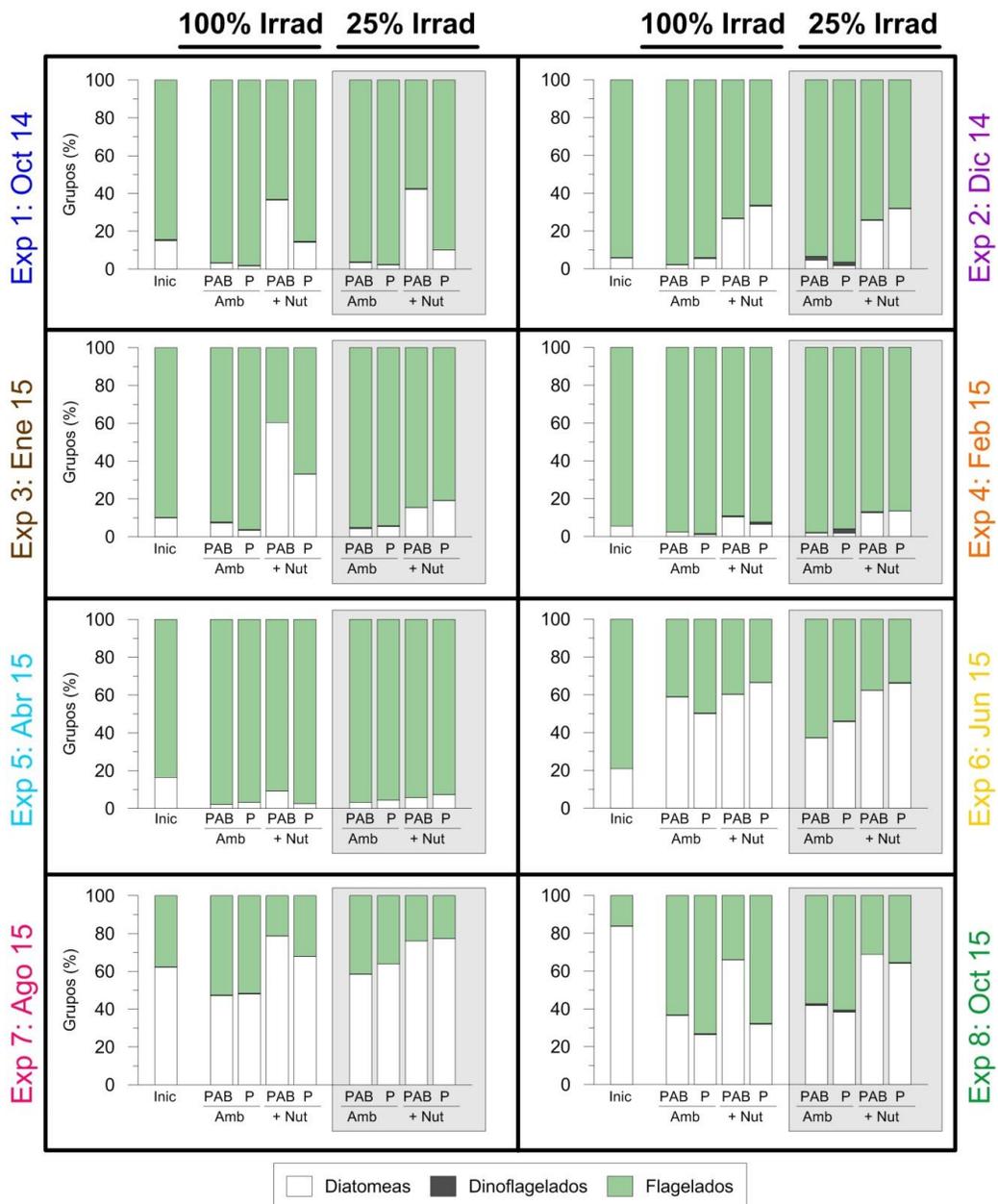


Fig. 3.22 Proporción (%) de los diferentes grupos de fitoplancton al inicio y al final de los experimentos realizados con comunidades marinas.

Luego de 5 días de experimentación se observaron algunos cambios en las proporciones relativas de cada grupo para los distintos tratamientos. Por ejemplo, las muestras Amb presentaron mayor

proporción relativa de flagelados que las +Nut, y este patrón se observó independientemente del tratamiento de irradiancia recibido (25 o 100%). Por otra parte, los dinoflagelados nunca representaron más del 2% del total de las células (Fig. 3.24), siendo algunas de las especies encontradas *Alexandrium tamarense*, *Gymnodinium* spp., *Prorocentrum micans* y *Protoperdinium*spp. En el período del pre- y post-bloom, las diatomeas nanoplanctónicas que generalmente predominaron pertenecieron al género *Thalassiosira* y también se encontraron células pennadas de 10-20 mm, mayormente del género *Navicula*. Entre las diatomeas de mayor tamaño, las más abundantes fueron generalmente *Nitzschia longissima*, *Asterionellopsis glacialis* y *Leptocylindrus* spp.

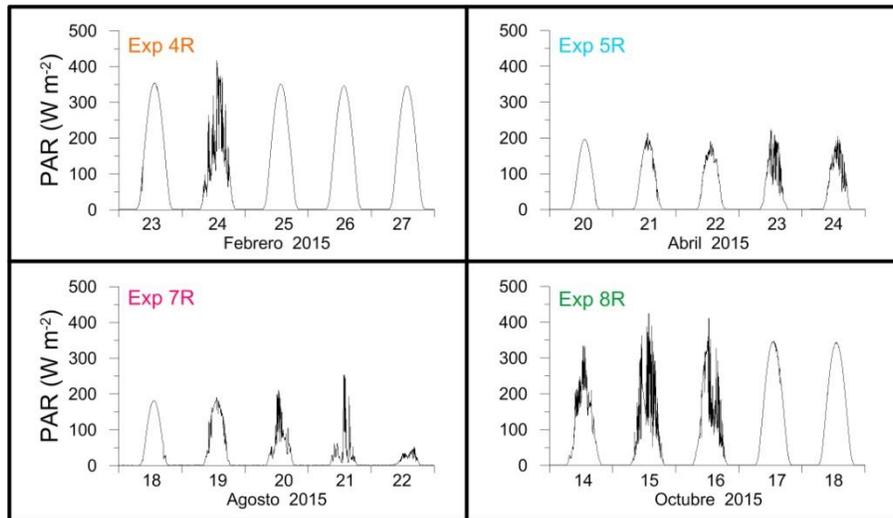
### **3.3.3 Resumen:**

En los experimentos realizados con comunidades naturales a lo largo del año se observaron respuestas diferenciales para los distintos períodos de la sucesión anual del fitoplancton. A corto plazo (día 1), las comunidades del bloom (invierno) generalmente presentaron mayor fotoinhibición que las comunidades del pre- y post-bloom al ser expuestas a una CSM más somera, y el agregado de nutrientes y la RUV generalmente no tuvieron efecto sobre las tasas de inhibición y recuperación del FSII. Por otra parte, en el transcurso de los días de experimentación (día 5), el fitoplancton del régimen externo mostró una mayor sensibilidad a la radiación y sufrió más daño en los centros de reacción del FSII, exhibiendo menores valores de NPQ y ETR, independientemente del tratamiento (respecto al día 1). De las 3 variables evaluadas (RUV, nutrientes e irradiancia) sobre el ETR, solo la irradiancia tuvo un efecto significativo. Asimismo, el efecto interactivo de las 3 variables en el ETR fue similar a la suma de las variables por separado al inicio del experimento, mientras que al final se observaron diferencias, actuando de forma sinérgica durante el bloom (i.e., el efecto interactivo fue mayor que el de la suma de las variables individuales), y de forma antagónica (i.e., el efecto interactivo fue menor que el de la suma de las variables individuales) en el resto el año. Las células nanoplanctónicas fueron las dominantes al inicio de los experimentos, pero luego de 5 días se observó una mayor proporción de células más grandes (i.e., microplancton), principalmente en aquellos tratamientos que recibieron nutrientes adicionales y fueron expuestos a una CSM somera, evidenciando una mejor aclimatación a la radiación y aprovechamiento de los nutrientes por parte de las células de mayor tamaño.

## **PARTE 2: Experimentos con comunidades de río**

### *Radiación Solar:*

Los datos de irradiancia PAR ( $\text{W m}^{-2}$ ) observados en cada uno de los experimentos realizados con comunidades de río (Fig.3.23) presentaron gran variabilidad a lo largo del año, con valores  $\sim 350 \text{ W m}^{-2}$  al mediodía durante primavera y verano, y con valores  $< 200 \text{ W m}^{-2}$  al mediodía durante otoño e invierno. A su vez, las condiciones de radiación dentro de cada experimento fueron muy variables, con algunos días totalmente soleados y otros con alta cobertura por nubes.

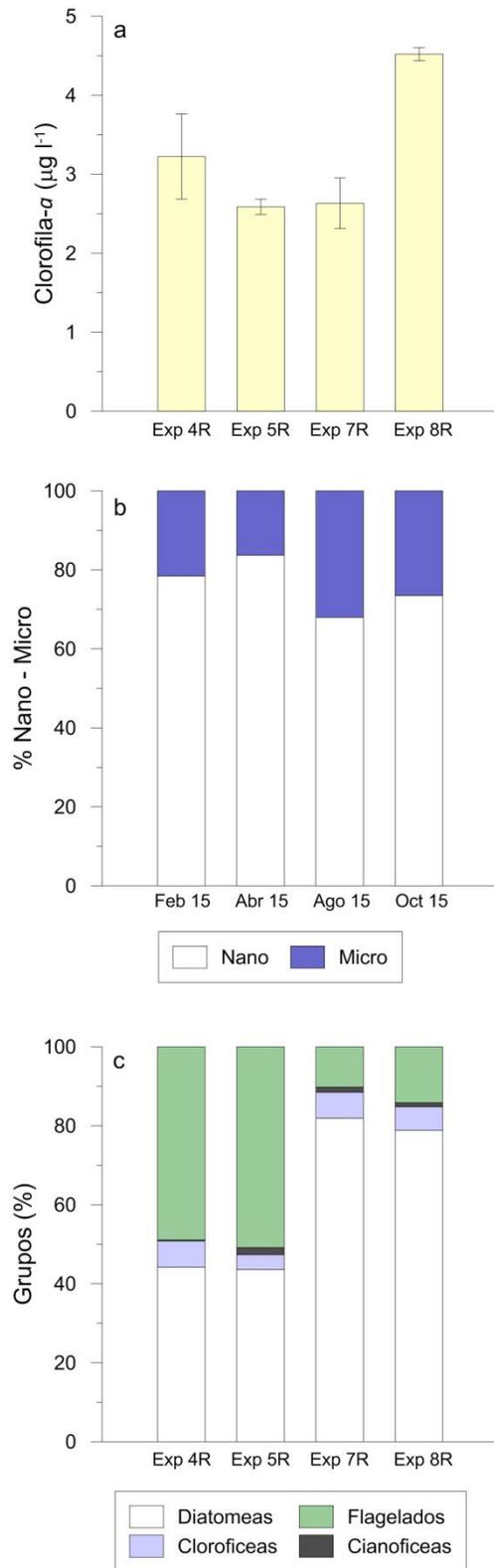


**Fig. 3.23** Irradiancia PAR ( $\text{W m}^{-2}$ ) durante los 5 días de los distintos experimentos realizados con comunidades de río.

### *Clorofila y composición de las comunidades:*

Durante el período de estudio se observaron valores bajos de Clor-*a*,  $< 5 \mu\text{g l}^{-1}$  (Fig. 3.24a) con dominancia de células nanoplanctónicas, representando  $\sim 70\text{-}80\%$  del total (Fig. 3.24b).

Los Exp 4R y 5R (febrero y abril 2015, respectivamente) estuvieron co-dominados por diatomeas y flagelados (entre los que se incluyen criptofíceas, crisofíceas flageladas, además de otros flagelados no identificados) (Fig. 3.24c). Los flagelados más abundantes fueron aquellos del género *Rhodomonas* y *Ochromonas*; por su parte, *Cyclotella* spp. y *Cocconeis placentula* dominaron en el grupo de las diatomeas. Los experimentos 7R y 8R estuvieron dominados por diatomeas nanoplanctónicas, que representaron  $\sim 80\%$  del total (Fig. 3.24c) entre las cuales, *Cyclotella* spp. fue la más abundante.



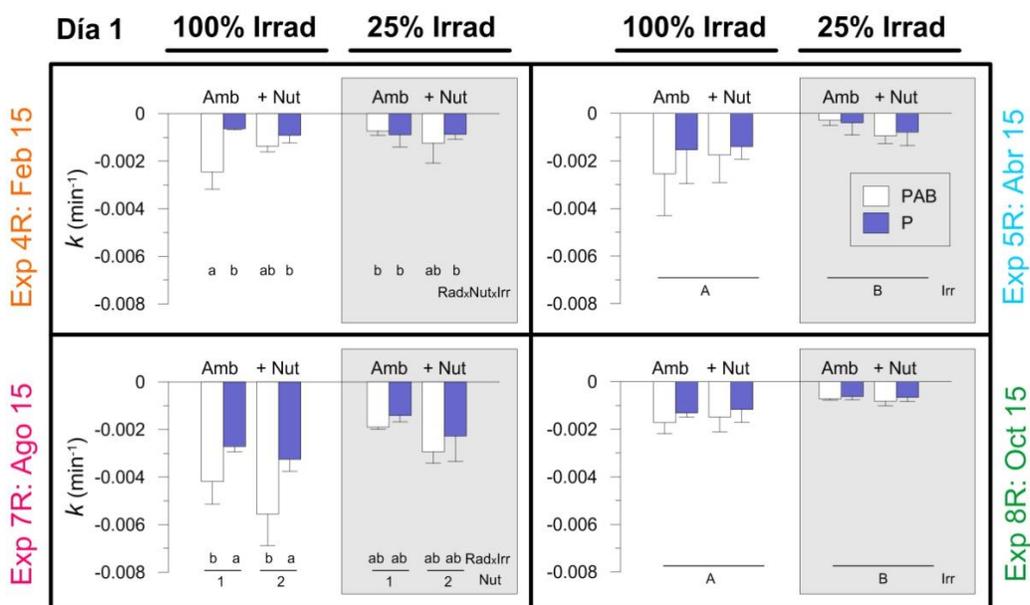
**Fig. 3.24** (a) Concentración de Clor-*a* ( $\mu\text{g l}^{-1}$ ), (b) Abundancia de micro- y nanoplancton (%), (c) Abundancia de grupos (%) para las muestras iniciales de los experimentos realizados con comunidades del río.

### 3.3.4 Fotoquímica del FSII:

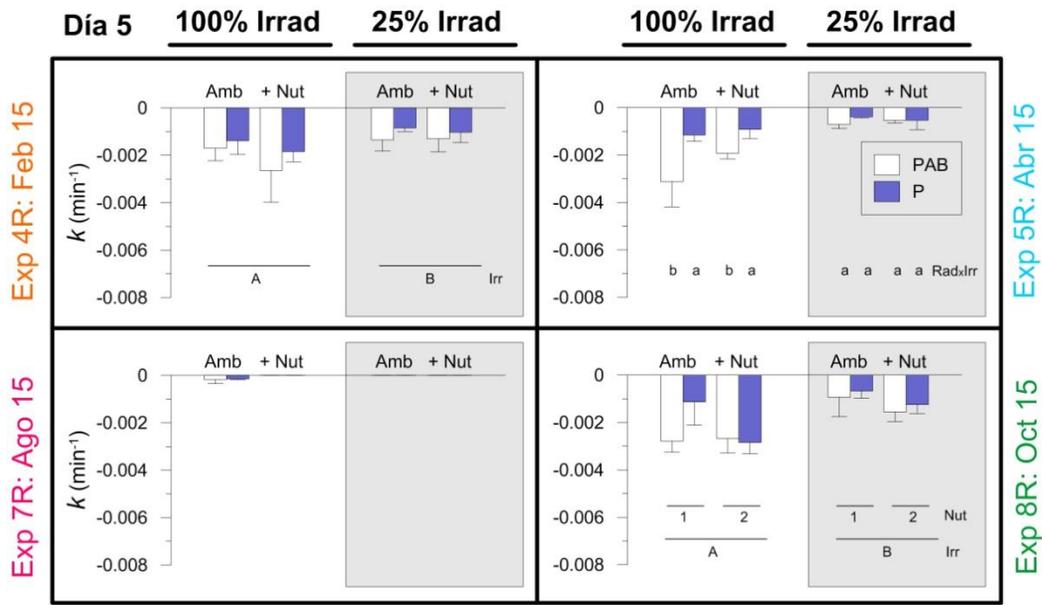
#### Ciclos diarios:

#### Tasas de inhibición ( $k$ ) y recuperación ( $r$ ):

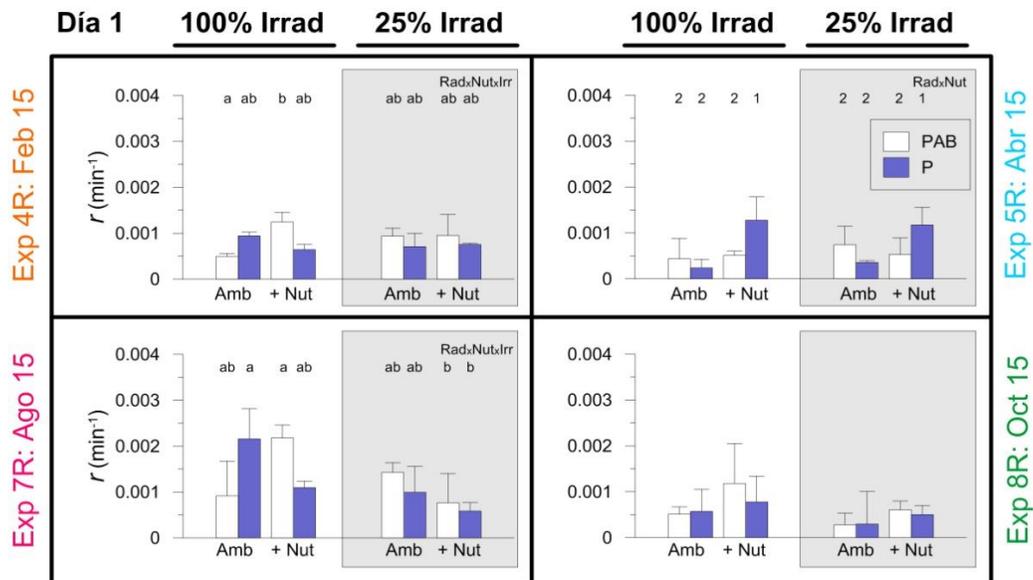
Si bien los valores absolutos de  $k$  fueron más altos que los de  $r$ , por lo general, los experimentos con mayores  $k$  también presentaron mayores  $r$  (Figs. 3.25-3.28; Tablas 3.5 y 3.6). En agosto, el último día de experimentación fue un día lluvioso con muy bajas irradiancias y debido a que los datos de  $Y$  a lo largo del día solar no siguieron la forma típica observada en la Fig. 3.3, en algunas muestras no se pudo calcular  $k$  ni  $r$ . Por otro lado, los tratamientos expuestos a una CSM somera (100% Irrad), se inhibieron más que aquellos expuestos al 25% Irrad, tanto en el día 1 como en el 5. Sin embargo, las diferencias en las  $r$  no fueron tan evidentes entre los distintos tratamientos de irradiancias hacia el inicio de los experimentos, y se observó interacción de esta variable con los nutrientes y calidad de radiación (Fig. 3.27). Por otra parte, las  $k$  fueron similares y las  $r$  fueron generalmente mayores luego de la aclimatación, y hacia el día 5 sí se observaron efectos de la irradiancia.



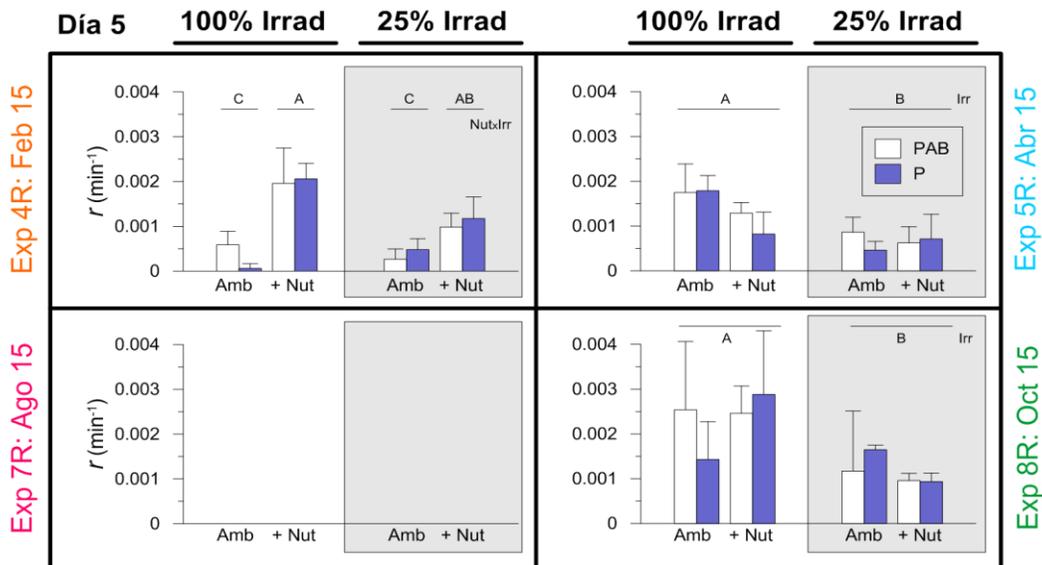
**Fig. 3.25** Tasas de inhibición ( $k$ ; en  $\text{min}^{-1}$ ) en los ciclos diarios de los días 1 de los experimentos realizados con comunidades de río. Las barras blancas y azules corresponden a los tratamientos PAB y P, respectivamente. Para cada experimento, se indica qué variable o interacción entre variables resultó significativa, y las diferencias entre tratamientos dentro de cada experimento se indican con distintas letras minúsculas, mayúsculas o números ( $p < 0.05$ ) según el test de Tukey.



**Fig. 3.26** Tasas de inhibición ( $k$ ; en  $\text{min}^{-1}$ ) en los ciclos diarios de los días 5 de los experimentos realizados con comunidades de río. Las barras blancas y azules corresponden a los tratamientos PAB y P, respectivamente. Para cada experimento, se indica qué variable o interacción entre variables resultó significativa, y las diferencias entre tratamientos dentro de cada experimento se indican con distintas letras minúsculas, mayúsculas o números ( $p < 0.05$ ) según el test de Tukey.



**Fig. 3.27** Tasas de recuperación ( $r$ ; en  $\text{min}^{-1}$ ) en los ciclos diarios de los días 1 de los experimentos realizados con comunidades de río. Las barras blancas y azules corresponden a los tratamientos PAB y P, respectivamente. Para cada experimento, se indica qué variable o interacción entre variables resultó significativa, y las diferencias entre tratamientos dentro de cada experimento se indican con distintas letras minúsculas, mayúsculas o números ( $p < 0.05$ ) según el test de Tukey.



**Fig. 3.28** Tasas de recuperación ( $r$ ; en  $\text{min}^{-1}$ ) en los ciclos diarios de los días 5 de los experimentos realizados con comunidades de río. Las barras blancas y azules corresponden a los tratamientos PAB y P, respectivamente. Para cada experimento, se indica qué variable o interacción entre variables resultó significativa, y las diferencias entre tratamientos dentro de cada experimento se indican con distintas letras minúsculas, mayúsculas o números ( $p < 0.05$ ) según el test de Tukey.

	Exp 4R	Exp 5R	Exp 8R
Día	5.08*	0,04	32.56***
Día x Radiacion	0,18	1,15	1,33
Día x Nutrientes	1,92	0,82	10.69**
Día x Irradiancia	1,14	0,01	5.34*
Día x Radiacion x Nutrientes	0,67	0,25	3,50
Día x Radiacion x Irradiancia	1,66	0,59	0,22
Día x Nutrientes x Irradiancia	3,66	0,10	0,99
Día x Radiacion x Nutrientes x Irradiancia	3,83	0,02	3,35

**Tabla 3.5** Resultados de ANOVA de tres vías de medidas repetidas para los efectos individuales e interactivos de la radiación, nutrientes e irradiancia entre días en las tasas de inhibición ( $k$ ). El nivel de significancia se estableció en un valor de  $p < 0.05$ . Los números representan los valores del estadístico F y los asteriscos \*, \*\* y \*\*\*  $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$  y  $p < 0.001$ , respectivamente.

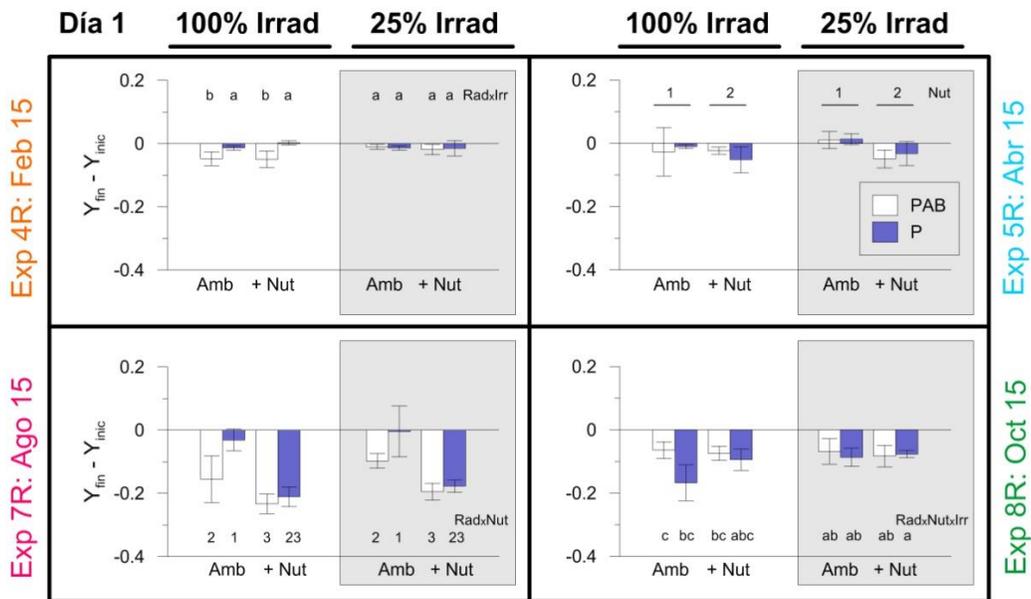
	Exp 4R	Exp 5R	Exp 8R
Día	0,85	11.97**	22.71***
Día x Radiacion	0,21	3,16	0,01
Día x Nutrientes	36.27***	12.68**	0,24
Día x Irradiancia	4,44	14.33**	2,77
Día x Radiacion x Nutrientes	6.08*	5.25*	0,68
Día x Radiacion x Irradiancia	3,16	0,23	0,21
Día x Nutrientes x Irradiancia	5.74*	4.88*	1,01
Día x Radiacion x Nutrientes x Irradiancia	6.85*	1,13	1,46

**Tabla 3.6** Resultados de ANOVA de tres vías de medidas repetidas para los efectos individuales e interactivos de la radiación, nutrientes e irradiancia entre días en las tasas de recuperación ( $r$ ). El nivel de significancia se estableció en un valor de  $p < 0.05$ . Los números representan los valores del estadístico F y los asteriscos \*, \*\* y \*\*\*  $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$  y  $p < 0.001$ , respectivamente.

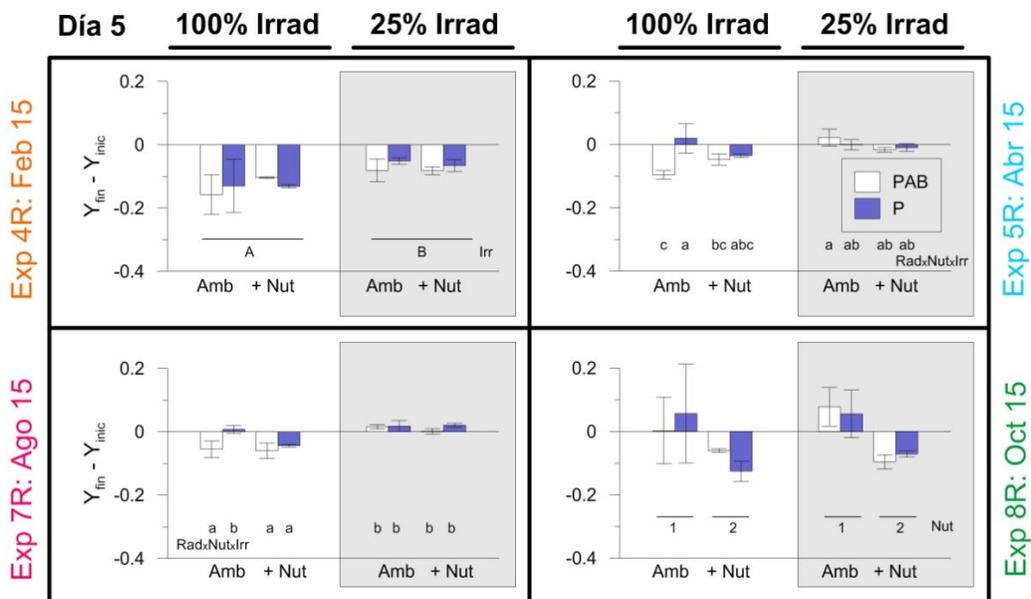
#### *Daño no reparado:*

Durante el día 1, y en la mayoría de los casos, los valores de  $Y_{fin}-Y_{inic}$  fueron  $< 0$ , lo que implica que las muestras no lograron recuperarse totalmente y sufrieron un daño que no pudo ser reparado a lo largo del día solar. Este daño no reparado fue más marcado en los experimentos de agosto y octubre pero las respuestas variaron entre los distintos tratamientos y no se observaron patrones claros entre las variables para los distintos experimentos (Fig. 3.29, Tabla 3.7). Por otra parte, luego de la aclimatación, las muestras bajo 25% Irrad, tuvieron generalmente menor daño no reparado que aquellas bajo 100% Irrad (Fig. 3.30).

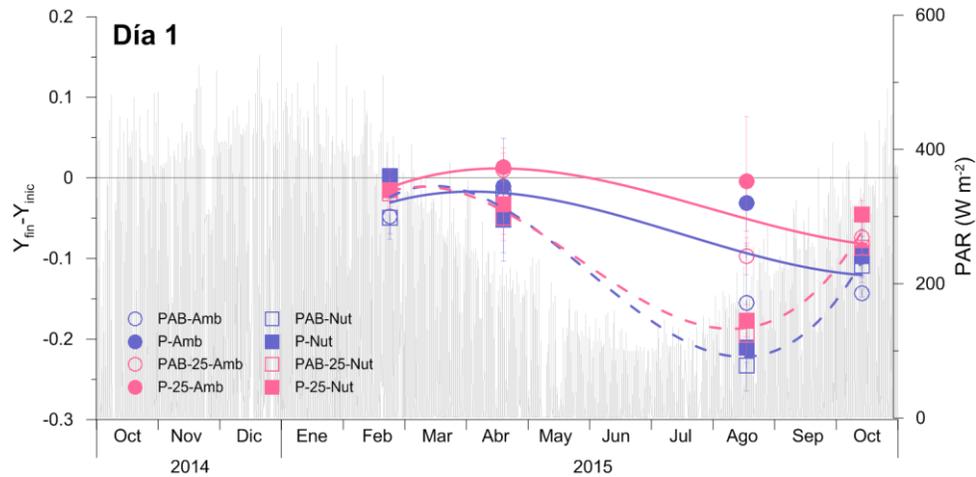
En todos los experimentos, tanto para el día 1 como para el día el 5, las muestras expuestas al 100% Irrad tuvieron mayor daño no reparado a lo largo del día que las muestras expuestas al 25% Irrad, para cada tratamiento de nutrientes. Sin embargo, las curvas de los ajustes polinómicos fueron distintas para ambos días de experimentación: Al inicio de los experimentos los ajustes correspondientes a los tratamientos +Nut siguieron el patrón de la radiación solar, con una marcada disminución en los valores de  $Y_{fin}-Y_{inic}$  (i.e., mayor daño no reparado) hacia el invierno y un aumento hacia la primavera, sin embargo para los tratamientos Amb la disminución en los valores de  $Y_{fin}-Y_{inic}$  fue más leve, con mayor daño no reparado hacia la primavera (Fig. 3.31). Por su parte, en el día 5, los patrones observados fueron los opuestos al día 1, con un aumento en los valores de  $Y_{fin}-Y_{inic}$  (i.e., menor daño no reparado) hacia la primavera en los tratamientos Amb, mientras que los tratamientos +Nut mostraron mayores valores hacia el invierno (Fig. 3.32).



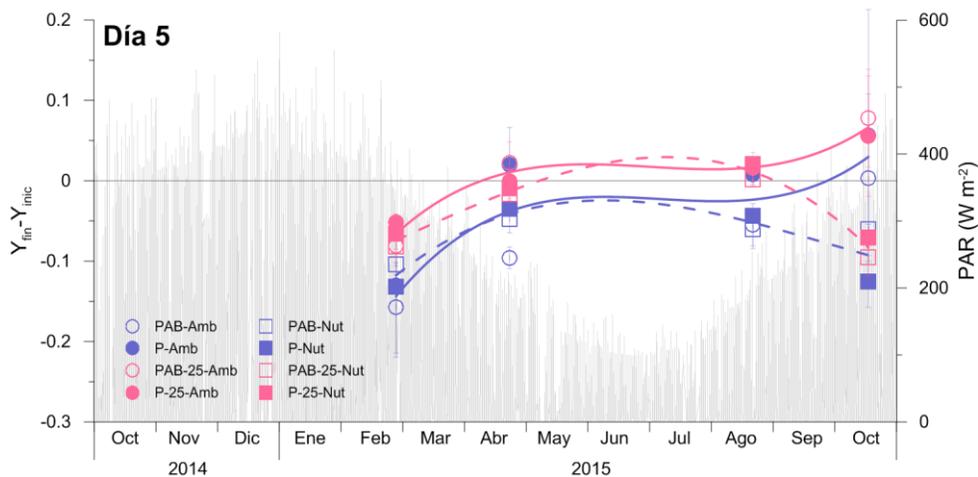
**Fig. 3.29** Diferencias entre los valores de Y al final y al inicio ( $Y_{fin}-Y_{inic}$ ) de los ciclos diarios correspondientes al día 1, calculados para todos los tratamientos de los experimentos realizados con comunidades de río. Las barras blancas y azules corresponden a los tratamientos PAB y P, respectivamente. Para cada experimento, se indica qué variable o interacción entre variables resultó significativa, y las diferencias entre tratamientos dentro de cada experimento se indican con distintas letras minúsculas, mayúsculas o números ( $p < 0.05$ ) según el test de Tukey.



**Fig. 3.30** Diferencias entre los valores de Y al final y al inicio ( $Y_{fin}-Y_{inic}$ ) de los ciclos diarios correspondientes al día 5, calculados para todos los tratamientos de los experimentos realizados con comunidades de río. Las barras blancas y azules corresponden a los tratamientos PAB y P, respectivamente. Para cada experimento, se indica qué variable o interacción entre variables resultó significativa, y las diferencias entre tratamientos dentro de cada experimento se indican con distintas letras minúsculas, mayúsculas o números ( $p < 0.05$ ) según el test de Tukey.



**Fig. 3.31** Valores de  $Y_{fin}-Y_{inic}$  correspondientes a los ciclos diarios del día 1 para todos los experimentos realizados con comunidades de río. Los símbolos sin y con relleno corresponden a los dos tratamientos de calidad de radiación (PAB y P respectivamente), mientras que los círculos y cuadrados corresponden a los dos tratamientos de nutrientes (Amb y +Nut, respectivamente). Los símbolos azules y rosa corresponden a los dos tratamientos de irradiancia (100% y 25% respectivamente). Las curvas continuas rosa y azul corresponden a ajustes polinómicos de los datos correspondientes al 25% y 100% de irradiancias con concentración Amb, respectivamente, mientras que las curvas con líneas discontinuas rosa y azul corresponden a ajustes polinómicos de los datos correspondientes al 25% y 100% de irradiancias con concentración +Nut, respectivamente. Además se incluyeron los datos de irradiancia solar PAR ( $W m^{-2}$ ).



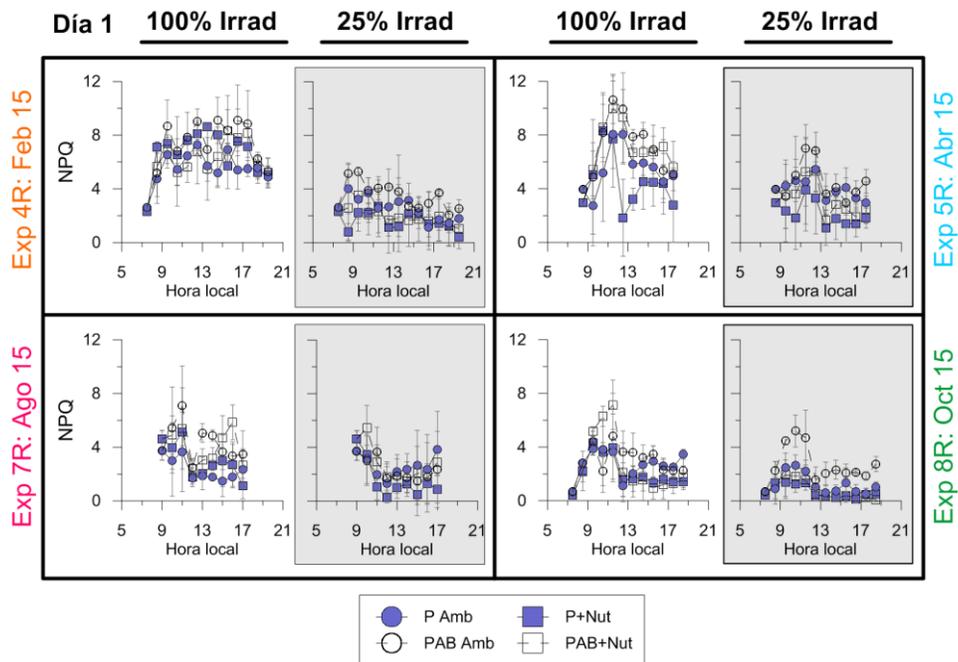
**Fig. 3.32** Valores de  $Y_{fin}-Y_{inic}$  correspondientes a los ciclos diarios del día 5 para todos los experimentos realizados con comunidades de río. Los símbolos sin y con relleno corresponden a los dos tratamientos de calidad de radiación (PAB y P respectivamente), mientras que los círculos y cuadrados corresponden a los dos tratamientos de nutrientes (Amb y +Nut, respectivamente). Los símbolos azules y rosa corresponden a los dos tratamientos de irradiancia (100% y 25% respectivamente). Las curvas continuas rosa y azul corresponden a ajustes polinómicos de los datos correspondientes al 25% y 100% de irradiancias con concentración Amb, respectivamente, mientras que las curvas con líneas discontinuas rosa y azul corresponden a ajustes polinómicos de los datos correspondientes al 25% y 100% de irradiancias con concentración +Nut, respectivamente. Además se incluyeron los datos de irradiancia solar PAR ( $W m^{-2}$ ).

	Exp 4R	Exp 5R	Exp 7R	Exp 8R
Día	65.30***	0,01	167.46***	19.25***
Día x Radiacion	0,29	1,97	4,07	0,48
Día x Nutrientes	0,17	1,44	34.77***	21.00***
Día x Irradiancia	5.95*	1,81	0,41	0,20
Día x Radiacion x Nutrientes	1,41	0,33	3,58	0,52
Día x Radiacion x Irradiancia	2,81	5.66*	0,08	0,12
Día x Nutrientes x Irradiancia	0,31	0,14	0,59	0,15
Día x Radiacion x Nutrientes x Irradiancia	0,43	0,99	0,24	0,33

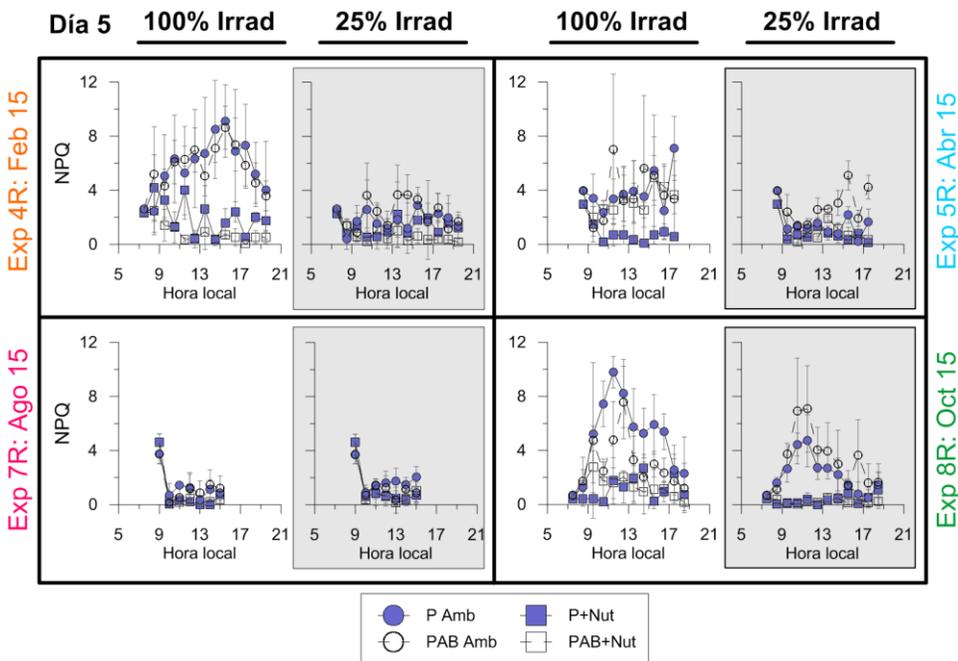
**Tabla 3.7** Resultados de ANOVA de tres vías de medidas repetidas para los efectos individuales e interactivos de la radiación, nutrientes e irradiancia entre días en el daño no reparado ( $Y_{fin}-Y_{inic}$ ). El nivel de significancia se estableció en un valor de  $p < 0.05$ . Los números representan los valores del estadístico F y los asteriscos \*, \*\* y \*\*\*  $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$  y  $p < 0.001$ , respectivamente.

#### *Quenching no fotoquímico (NPQ):*

El patrón de NPQ para los experimentos con comunidades del río fue de un aumento al mediodía, y luego una disminución hacia la tarde-noche (Figs. 3.33 y 3.34). En ambos días (días 1 y 5), las muestras bajo 25% Irrad presentaron valores de NPQ menores que aquellas que bajo el 100% Irrad. Al inicio de los experimentos, y para la mayoría de los casos, las muestras expuestas al tratamiento PAB disiparon mayor cantidad de energía en forma de calor que las muestras bajo el tratamiento P (Fig. 3.33). Por otro lado, en el día 5, las muestras bajo el tratamiento Amb tuvieron valores de NPQ mayores que las +Nut, para la misma calidad y cantidad de radiación (Fig. 3.34).



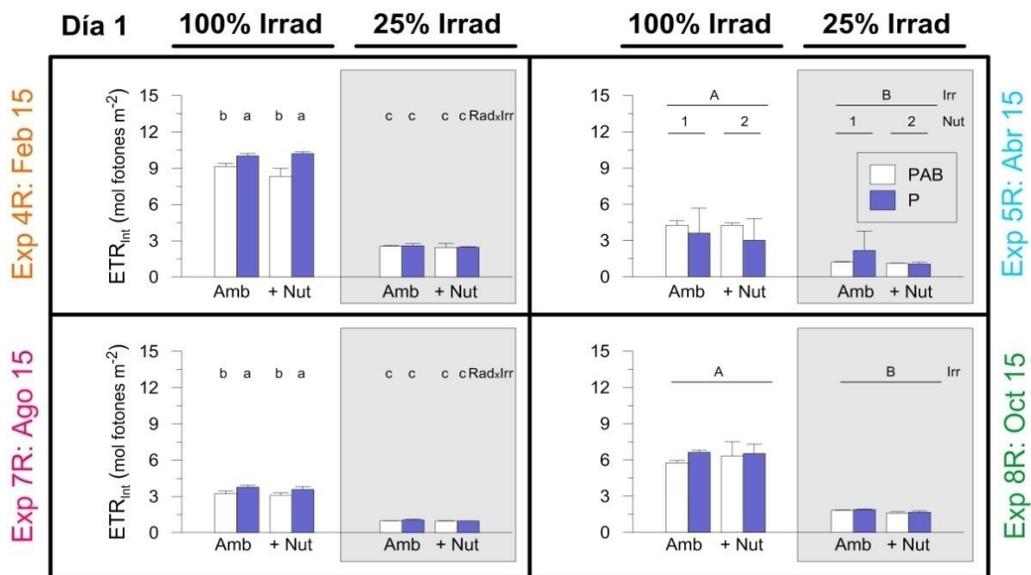
**Fig. 3.33** NPQ en los ciclos diarios del día 1 de los experimentos realizados con comunidades de río. Los símbolos blancos y azules corresponden a los tratamientos PAB y P, respectivamente. Los círculos corresponden a los tratamientos de concentración de nutrientes ambiente (Amb), mientras que los cuadrados corresponden a tratamientos con agregado adicional de nutrientes (+Nut).



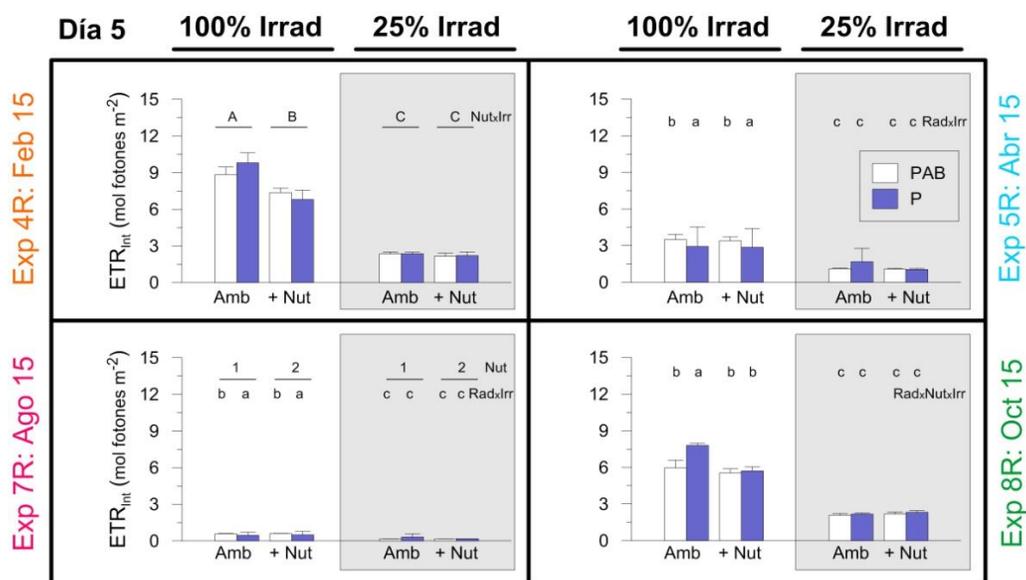
**Fig. 3.34** NPQ en los ciclos diarios del día 5 de los experimentos realizados con comunidades de río. Los símbolos blancos y azules corresponden a los tratamientos PAB y P, respectivamente. Los círculos corresponden a los tratamientos de concentración de nutrientes ambiente (Amb), mientras que los cuadrados corresponden a tratamientos con agregado adicional de nutrientes (+Nut).

*Tasa de transporte electrónico del FSII:*

Los  $ETR_{int}$  de los ciclos diarios al inicio del experimento y luego de la aclimatación (Figs. 3.35 y 3.36, Tabla 3.8) fueron significativamente mayores bajo 100% Irrad respecto a aquellos que recibieron el 25% Irrad, aunque en algunos casos también se observaron diferencias entre tratamientos de nutrientes o de calidad de radiación. En los casos que se observaron diferencias en el  $ETR_{int}$  entre tratamientos de nutrientes, aquellos que recibieron nutrientes adicionales mostraron menores valores que los expuestos a la concentración del ambiente. Por otro lado, dentro de cada experimento, los  $ETR_{int}$  fueron, generalmente, similares al inicio y al final para cada tratamiento.



**Fig. 3.35** Tasa de transporte electrónico integrada -  $ETR_{int}$  (en mol electrones  $m^{-2}$ ) en los ciclos diarios de los días 1 de los experimentos realizados con comunidades del río. Las barras blancas y azules corresponden a los tratamientos PAB y P, respectivamente. Para cada experimento, se indica qué variable o interacción entre variables resultó significativa, y las diferencias entre tratamientos dentro de cada experimento se indican con distintas letras minúsculas, mayúsculas o números ( $p < 0.05$ ) según el test de Tukey.



**Fig. 3.36** Tasa de transporte electrónico integrada -  $ETR_{int}$  (mol electrones  $m^{-2}$ ) en los ciclos diarios de los días 5 de los experimentos realizados con comunidades del río. Las barras blancas y azules corresponden a los tratamientos PAB y P, respectivamente. Para cada experimento, se indica qué variable o interacción entre variables resultó significativa, y las diferencias entre tratamientos dentro de cada experimento se indican con distintas letras minúsculas, mayúsculas o números ( $p < 0.05$ ) según el test de Tukey.

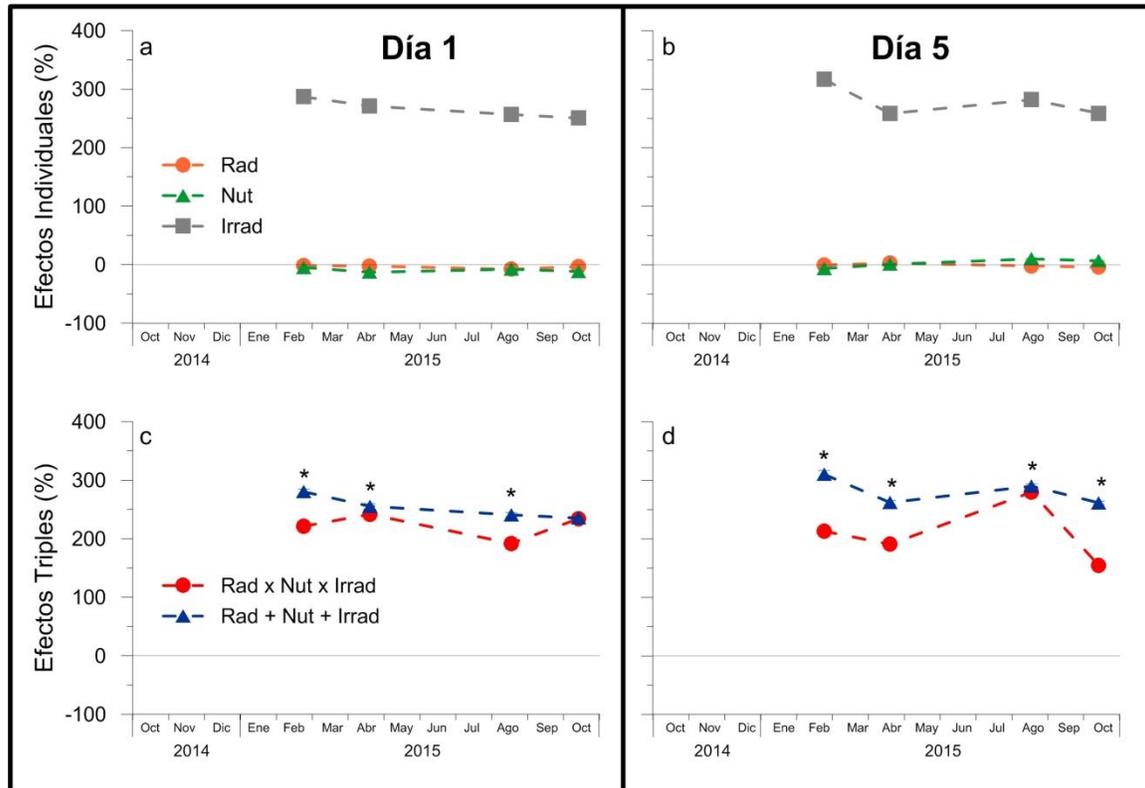
	Exp 4R	Exp 5R	Exp 7R	Exp 8R
Día	43.12***	173.82***	3207.63***	4.42
Día x Radiación	6.95*	16.21***	16.73***	2,25
Día x Nutrientes	19.45***	6.43*	4,10	10.10**
Día x Irradiancia	19.17***	119.90***	953.67***	7.96*
Día x Radiación x Nutrientes	7.88*	6.15*	0,20	1,83
Día x Radiación x Irradiancia	6.68*	19.438***	11.79**	1,44
Día x Nutrientes x Irradiancia	17.31***	0,24	1,15	25.92***
Día x Radiación x Nutrientes x Irradiancia	8.64**	3,86	0,02	2,29

**Tabla 3.8** Resultados de ANOVA de tres vías de medidas repetidas para los efectos individuales e interactivos de la radiación, nutrientes e irradiancia entre días en las tasas de transporte de electrones (ETR). El nivel de significancia se estableció en un valor de  $p < 0.05$ . Los números representan los valores del estadístico F y los asteriscos \*, \*\* y \*\*\*  $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$  y  $p < 0.001$ , respectivamente.

*Efectos sobre la tasa de transporte electrónica integrada:*

Las variables individuales Rad y Nut tuvieron un efecto casi nulo sobre la  $ETR_{int}$  de las comunidades de río para ambos días de experimentación. Por el contrario, el efecto individual de Irrad fue el más importante sobre  $ETR_{int}$ , con valores superiores al 250% tanto para el día 1 como el 5 (Fig. 3.37a, b). Además, se compararon los efectos interactivos de las tres variables (Rad x Nut x Irrad) respecto de la suma de los efectos individuales (Rad + Nut + Irrad) (Fig. 3.37c, d) y tanto para los

ciclos diarios del día 1 (a excepción de octubre) como para los del día 5, el efecto interactivo triple fue significativamente menor al de la suma de los efectos de las variables por separado (Fig. 3.37c, d).



**Fig. 3.37** (a, b) Efectos individuales (Rad, Nut, Irrad) (%), (c, d) Efectos triples interactivos (Rad x Nut x Irrad; círculos) y suma de los efectos individuales (Rad + Nut + Irrad; triángulos) (%), a lo largo del período de estudio para los ETR<sub>int</sub> de los días 1 y 5, respectivamente. Los asteriscos indican diferencias significativas entre el efecto interactivo y la suma de los efectos individuales ( $p < 0.05$ )

### 3.3.5 Crecimiento, cambios en la estructura de tamaños y composición específica de las comunidades:

Las concentraciones iniciales de células variaron entre  $0.2-0.5 \times 10^4$  cel ml<sup>-1</sup> (Fig. 3.38). A lo largo de los 5 días de experimentación, en todos los microcosmos se observó un aumento en la abundancia de células, con mayores concentraciones en los tratamientos que contenían nutrientes adicionales (Fig. 3.38). El aumento en la concentración de células fue especialmente notable en el experimento de verano (febrero) alcanzando valores superiores a  $1 \times 10^5$  cel ml<sup>-1</sup> para algunos tratamientos.

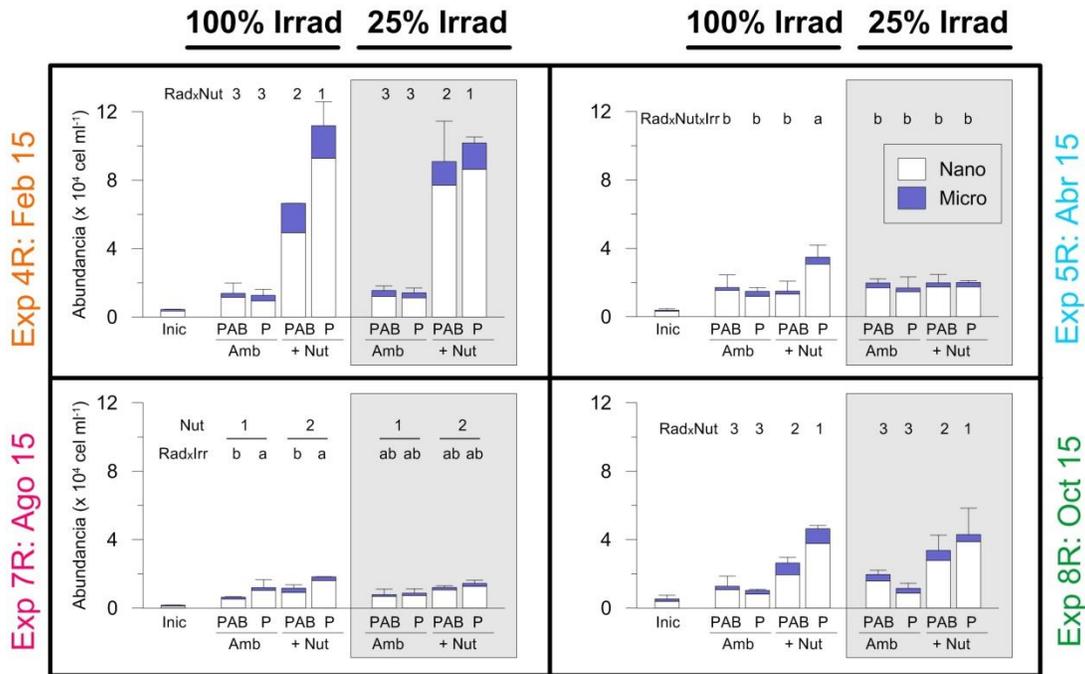


Fig. 3.38 Abundancia de células (x 10<sup>4</sup> cél ml<sup>-1</sup>) al inicio, y para cada uno de los tratamientos al final de los 4 experimentos realizados con comunidades de río. Para cada experimento, se indica qué variable o interacción entre variables resultó significativa, y las diferencias entre tratamientos dentro de cada experimento se indican con distintas letras minúsculas, mayúsculas o números ( $p < 0.05$ ) según el test de Tukey.

Las tasas de crecimiento  $\mu_{\text{Cel}}$  (Fig. 3.39) y  $\mu_{\text{Clor-}a}$  fueron similares y siguieron el mismo patrón, por lo que sólo se muestran las primeras. Los tratamientos Amb mostraron menores  $\mu_{\text{Cel}}$  que los +Nut y se observó, en algunos casos, interacción con la calidad de radiación. En todos los experimentos, las células nanoplanctónicas dominaron tanto al inicio como al final de cada uno (Fig. 3.40), representando > 70% del total. Si bien hubo pequeñas variaciones en los porcentajes de tamaños entre los tratamientos al finalizar los experimentos, estas no fueron significativas.

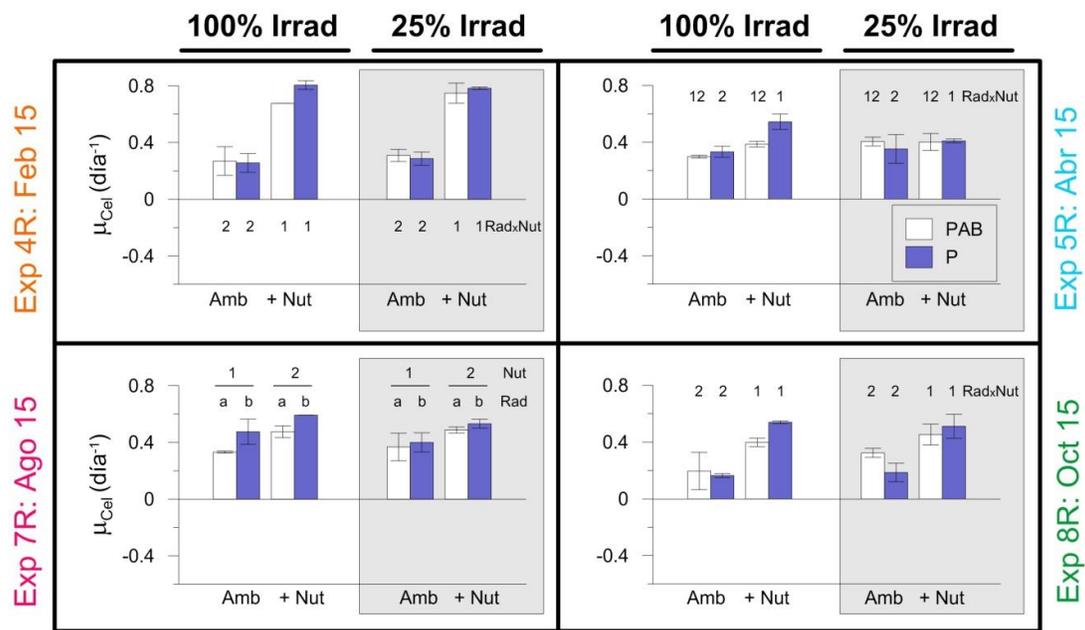


Fig. 3.39 Tasas de crecimiento en función de la abundancia de células ( $\text{día}^{-1}$ ) calculadas para todos los tratamientos de los experimentos realizados con comunidades de río. Las barras blancas y azules corresponden a los tratamientos PAB y P, respectivamente. Para cada experimento, se indica qué variable o interacción entre variables resultó significativa, y las diferencias entre tratamientos dentro de cada experimento se indican con distintas letras minúsculas, mayúsculas o números ( $p < 0.05$ ) según el test de Tukey.

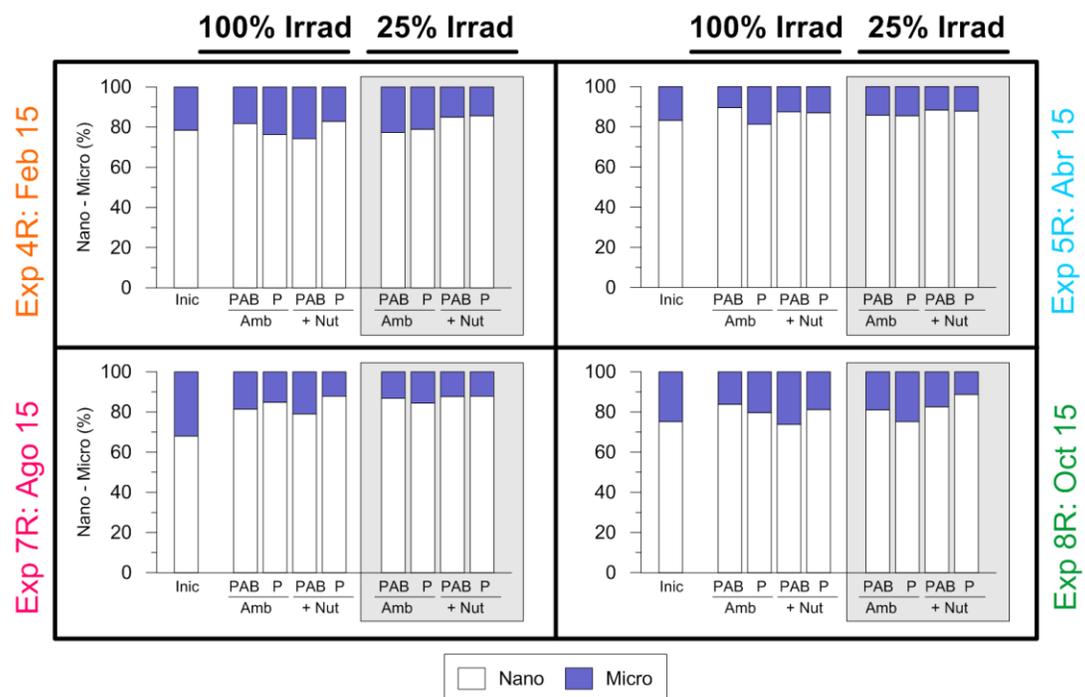
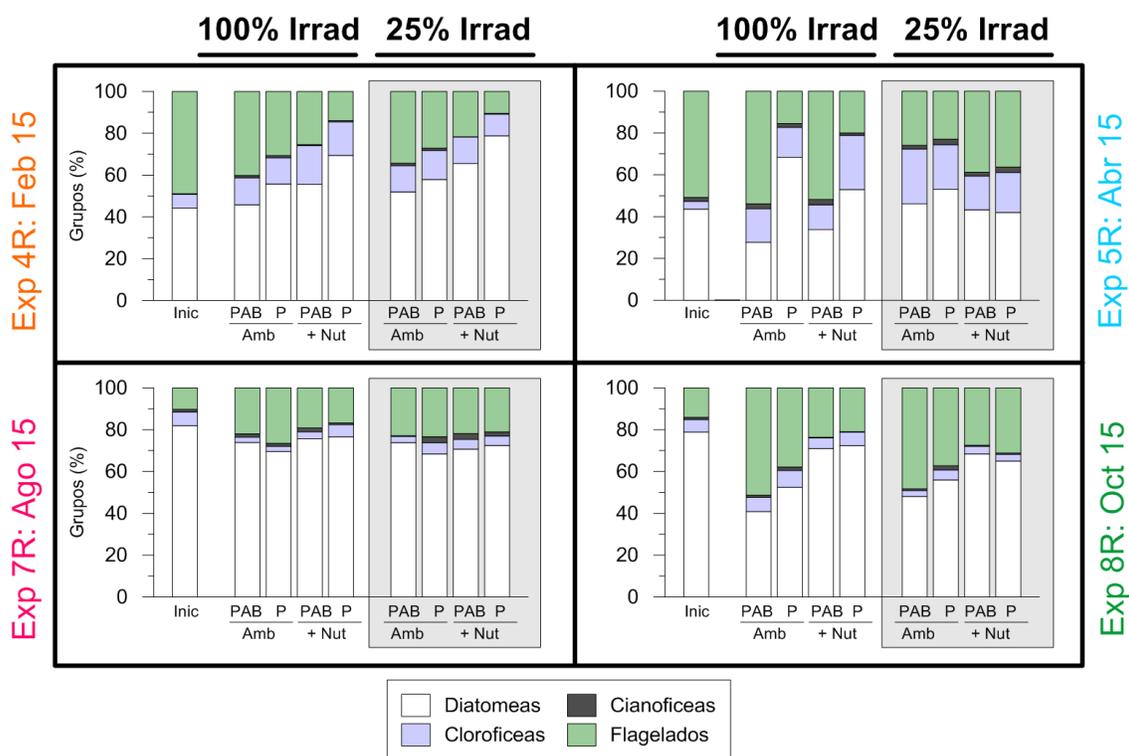


Fig. 3.40 Proporción relativa (%) de nano- y microplankton para cada uno de los tratamientos al inicio y al final de los experimentos realizados con comunidades de río.

Al inicio de los experimentos generalmente dominaron las diatomeas, aunque en algunos casos se observó co-dominancia con flagelados (Fig. 3.41). Luego de 5 días de aclimatación, se observaron algunos cambios en las proporciones relativas de cada grupo, pero generalmente las muestras que pertenecían al mismo tratamiento de calidad de radiación y nutrientes tenían también una composición taxonómica similar, independientemente del tratamiento de irradiancia recibido (Fig. 3.41). Dentro del grupo de las diatomeas, en todos los experimentos las más abundantes fueron las céntricas pertenecientes al género *Cyclotella* spp., aunque también se encontraron otras especies tales como *Aulacoseira granulata*, *Cocconeis placentula*, *Navicula* spp. y *Nitzschia* spp. Dentro de los flagelados (entre los que se incluyen criptofíceas, crisofíceas, además de otros no identificados), los más abundantes fueron aquellos del género *Rhodomonas* y *Ochromonas*. Por otra parte, dentro del grupo de las clorofíceas, *Monoraphidium* spp., *Chlorella* spp. y *Scenedesmus* spp. fueron las más representativas.



**Fig. 3.41** Proporción (%) (basado en la abundancia) de los diferentes grupos fitoplanctónicos al inicio y al final de los experimentos realizados con comunidades de río.

### **3.3.6 Resumen**

Las comunidades del régimen interno tuvieron tasas de inhibición y recuperación similares a lo largo del año. Tanto a corto como a largo plazo, la fotoinhibición fue mayor en los tratamientos expuestos a una capa más somera (100% Irrad) que aquellos expuestos al 25% Irrad, mientras que el agregado de nutrientes y la RUV generalmente no tuvieron efecto. Por otra parte, al inicio de los experimentos las muestras que recibieron el espectro completo de radiación disiparon mayor cantidad de energía como calor que aquellas que recibieron sólo irradiancias PAR. Al final, no se observó efecto de RUV pero sí de los nutrientes, con mayor disipación de energía como calor para las muestras del tratamiento ambiente. Con respecto al ETR se registraron mayores valores para las muestras expuestas al 100% de irradiancia y además, los ETR fueron similares al inicio y al final de los experimentos. Al evaluar el efecto individual de las 3 variables (RUV, nutrientes e irradiancia) sobre el ETR, solo la irradiancia tuvo un efecto significativo. Por otra parte, el efecto interactivo de las 3 variables en el ETR fue menor a la suma de las variables por separado tanto al inicio como al final de los experimentos. Por último, en todos los experimentos se observó aumento en la abundancia de células hacia el final, para todos los tratamientos. Además, las comunidades de río fueron dominadas por células nanoplanctónicas tanto al inicio como hacia el final de los experimentos, generalmente sin cambios en la proporción de tamaños y grupos taxonómicos.

### **3.4 Discusión:**

Las distintas respuestas que experimentan los organismos fitoplanctónicos a lo largo del año están, en gran medida, relacionadas con los cambios en la composición de las comunidades, que a su vez están asociadas a las condiciones ambientales. Algunos estudios han demostrado que existe dependencia entre el tamaño celular y la inhibición fotosintética (Laurion y Vincent, 1998, Helbling et al., 2001a) y que si bien hay variabilidad en las respuestas, las células pequeñas son en general más resistentes a la RUV que las células grandes, debido a una más rápida velocidad de aclimatación gracias a su mayor relación superficie / volumen (Villafañe et al., 2004). Esto concuerda con los resultados observados en los experimentos aquí presentados para las comunidades del régimen externo, donde las células microplanctónicas que dominaron en el período del bloom fueron las más inhibidas y mostraron mayor daño no reparado a lo largo del día (Figs. 3.6, 3.7, 3.10-3.13).

Además de que la variabilidad en las respuestas fotoquímicas a lo largo del año pueda explicarse por las diferencias en la composición taxonómica de las comunidades (ya que las respuestas a la RUV, cambios en la CSM y/o las condiciones de nutrientes tienen un importante componente especie-específico (Häder et al., 2011)), éstas también parecen estar relacionadas con diversas condiciones fisiológicas. Un ejemplo de dichas condiciones variables es aquella que ocurre por cambios en la CSM, tal como ocurre en la zona de estudio. Durante el período de verano, las células están aclimatadas a altos niveles de radiación (Fig. 3.4), como lo indican los valores absolutos más bajos de  $k$  en el día 1 de experimentación (Fig. 3.6) y los valores de  $Y_{fin}-Y_{inic}$  más cercanos a 0 (Figs. 3.10, 3.12); por el contrario, y durante el inicio de la floración (Exp 6 y 7, Fig. 3.5a), las células están aclimatadas a las bajas irradiancias (Fig. 3.4) características del invierno, mostrando mayores inhibiciones (Fig. 3.6) y valores más negativos de  $Y_{fin}-Y_{inic}$  (Figs. 3.10, 3.12). En la primavera, y a pesar de que la irradiancia en la superficie es alta (Exp 8; Fig. 3.4), las células parecen estar aclimatadas a irradiancias relativamente bajas debido a la mezcla profunda que ocurre en esa época del año como resultado de los fuertes vientos (Fig. 3.6, 3.10, 3.12; Villafañe et al., 2004; Bermejo et al., 2018). Sin embargo, en las condiciones experimentales, el fitoplancton se expuso a niveles de radiación más altos, ya que los microcosmos se colocaron bajo una película fina de agua y no se mezclaron dentro de una CSM. Por lo tanto, las células no experimentaron regímenes de radiación fluctuante tal como se encontraban en las condiciones naturales. Así, los microcosmos correspondientes al tratamiento 100% Irrad se incubaron en una CSM muy poco profunda, recibiendo altos niveles de radiación (como se espera en un escenario futuro de cambio global), lo cual sería responsable de los valores altos de inhibición. Una situación similar ocurrió con las muestras de los experimentos de junio y agosto (inicio de la floración y floración), ya que las muestras estaban aclimatadas a condiciones de baja radiación (debido a bajos niveles de radiación solar en el invierno) e inmediatamente se expusieron a niveles de radiación más altos debido al set-up experimental. Las comunidades de invierno están dominadas principalmente por diatomeas, que poseen frústulos de silicio con cualidades ópticas similares al cuarzo, y por lo tanto, son altamente transparentes a la RUV, lo que permite que estas longitudes de onda alcancen el ADN celular y lo dañen (Karentz et al., 1991). Por lo tanto, la aclimatación a bajas irradiancias, junto con células altamente transparentes a la radiación se traduce en una mayor sensibilidad a la RUV (Llabrés y Agustí, 2010). Esto explica, en parte, la inhibición observada en estos experimentos y las diferencias más acentuadas entre los tratamientos expuestos al 25% Irrad y 100% Irrad, donde en estos últimos la inhibición fue mayor. Por otra parte, la mayor inhibición

observada al inicio de los experimentos pueden deberse a que los procesos de aclimatación tomarían más tiempo (Van de Poll y Buma, 2009) y no se ven reflejados en las mediciones realizadas en los ciclos diarios correspondientes al día 1. Sin embargo, luego de 5 días de aclimatación a las nuevas condiciones, generalmente no se observaron cambios evidentes, como menores tasas de inhibición ni mayores tasas de recuperación (Figs. 3.7, 3.9). Esto coincide con otros estudios realizados en zonas costeras de Canadá, donde se vio que, a medida que los nutrientes se volvieron limitantes dentro de los microcosmos (i.e., comparando los días 1 y 5, independientemente de si se trataba del tratamiento Amb o +Nut), el fitoplancton mostró una mayor sensibilidad a la radiación y sufrió más daño en los centros de reacción del FSII (Bouchard et al., 2008), como efectivamente ocurrió en los experimentos aquí descritos. Por otra parte, si bien los valores de irradiancias PAR durante los períodos experimentales se encontraron dentro de los valores previamente determinados para el área (Helbling et al., 2005; 2010) durante el período de abril a noviembre de 2015 se observó una mayor relación RUV-B/RUV-A respecto a años anteriores, y durante los meses de agosto a noviembre se registraron además menores valores en la concentración de O<sub>3</sub> estratosférico (datos no mostrados); por lo tanto, las muestras durante este período podrían haber estado expuestas a niveles de radiación comparativamente más altos que los habituales, especialmente en el rango de RUV-B.

Por otro lado, no hubo generalmente un efecto del aumento de nutrientes sobre el FSII en el día 1 de los experimentos (Figs. 3.6, 3.8, 3.12), y esto está relacionado con el hecho de que las especies necesitan tiempo para aclimatarse a las nuevas condiciones experimentales. Asimismo, hacia el final de los experimentos, si bien en muchos de éstos empezó a observarse un efecto de los nutrientes, y en algunos casos interactuando con la calidad y cantidad de radiación, no se observaron patrones claros en los valores de  $k$  y  $r$ . Esto ya fue visto en diversos trabajos, donde el efecto conjunto de la RUV y el incremento de nutrientes tienen resultados muy variables: Algunos estudios muestran un mejor rendimiento de FSII (Marcoval et al., 2007; Harrison y Smith, 2013), otros autores reportan una mayor sensibilidad a la RUV en condiciones de alta concentración de nutrientes (Ogbebo y Ochs, 2008), mientras que en otro estudio se evidenciaron aún más los efectos de la RUV cuando los nutrientes eran limitantes (Carrillo et al., 2008). Por otra parte, también se ha observado que el efecto perjudicial del exceso de radiación puede depender no tanto de la disponibilidad de nutrientes externos, sino también del estado nutricional previo que poseían las células (Korbee et al., 2012). Para la zona de estudio, la concentración de nutrientes (PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> y NO<sub>2</sub><sup>-</sup> + NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) generalmente es más alta durante el período anterior y al inicio de la floración

(datos no mostrados, Helbling et al., 1992). Por el contrario, durante la primavera, luego de la floración, los nutrientes (principalmente N) por lo general se agotan, y la disminución en la tasa fotosintética sugiere una mayor sensibilidad a la RUV solar para esta comunidad. Sin embargo, aunque en el invierno las concentraciones de nutrientes son mayores que en el resto del año (datos no mostrados), las menores tasas fotosintéticas observadas para esta comunidad se podrían explicar también por variaciones en las concentraciones de los distintos tipos de nutrientes (es decir, cambios en la relación C:N:P particulado de las algas (aunque no fueron evaluadas en esta Tesis), que a su vez podrían limitar el crecimiento del fitoplancton a lo largo del año), y a las diferencias especie-específicas en los mecanismos de reparación y protección hacia la RUV (Xenopoulos y Frost, 2003).

Existen dos mecanismos empleados por el fitoplancton para hacer frente a la exposición a la RUV, la fotoprotección y la fotorreparación. El fitoplancton puede utilizar mecanismos de fotorreparación, ya sea exclusivamente, o asociados a los mecanismos de fotoprotección o a mecanismos de reparación, tales como la reparación por escisión de nucleótidos (Karentz et al., 1991). Se ha demostrado que el daño del material genético (ADN) debido a la RUV, ocurre como consecuencia de la formación de CPDs (cyclobutane pyrimidine dimers) (Karentz et al., 1991; Buma et al., 1997); la fotorreparación, por su parte, es un proceso dependiente de la temperatura, ya que está asociado a la actividad enzimática, y por lo tanto, es menos efectivo a bajas temperaturas (Bouchard et al., 2006). Si bien los daños en el ADN y la inhibición fotosintética son producidos sobre blancos celulares relativamente independientes (i.e., el ADN y el aparato fotosintético), se puede inferir que existen mecanismos que afectan ambos procesos simultáneamente (Helbling et al., 2001b). Por consiguiente, se podría pensar que las bajas temperaturas del agua registradas en invierno afectarían los procesos de reparación del ADN de las comunidades de este período (coincidentes con el bloom), y esto estaría relacionado con los mayores valores absolutos de  $k$  (Figs. 3.6, 3.7) y mayor daño no reparado en la fotosíntesis (Figs. 3.10, 3.11), junto con menores valores de ETR para estas comunidades (Figs. 3.16, 3.17). A su vez, la disminución de la eficiencia fotoquímica observada en muestras expuestas en una CSM somera (Figs. 3.10-3.13), también puede estar asociada a estos procesos, coincidiendo con un estudio realizado por Helbling et al. (2001a) en una zona costera cercana al área de estudio, donde se registró que el daño de la RUV sobre las células era mayor cuando las muestras eran incubadas a menores profundidades.

Por otro lado, los mecanismos de fotoprotección no dependen de la temperatura y por ejemplo, la síntesis de compuestos fotoprotectores (MAAs o carotenoides) puede estar asociada a la

disponibilidad de nutrientes (Litchman et al., 2002), principalmente N (Sommaruga, 2010). Para prevenir el daño, algunas especies de fitoplancton sintetizan estos compuestos, y su concentración está correlacionada positivamente con el nivel de exposición a la RUV (Sommaruga y Garcia-Pichel, 1999; Laurion et al., 2002). Las células microplanctónicas (especialmente las diatomeas céntricas) son las sintetizadoras más comunes de compuestos que absorben RUV (MAAs) (Helbling et al., 1996), en cambio, las células pequeñas (nanoplancton) generalmente no contienen tales compuestos debido al elevado costo de energía que implicaría su síntesis (Garcia-Pichel, 1994). Si bien en este estudio no se cuantificó la concentración de compuestos fotoprotectores, algunos estudios previos llevados a cabo en el área de estudio (Villafañe et al., 2004) no detectaron cantidades significativas de ellos en ninguna de las comunidades estudiadas a lo largo del año. Otros mecanismos de fotoprotección incluye el quenching no fotoquímico (NPQ), que consiste en la regulación de la absorción de radiación para proteger al FSII contra el exceso de la misma mediante la desactivación de moléculas de Clor-*a* excitada por conversión interna al estado fundamental, es decir, por disipación de calor. En condiciones de altas irradiancias o de baja temperatura se produce un desequilibrio energético entre las reacciones fotoquímicas, el transporte electrónico y el metabolismo, lo que conduce a una mayor presión de excitación de FSII (Derks et al., 2015). Esta mayor presión de excitación se evidenció en los altos valores de NPQ al inicio del experimento, sobre todo en muestras expuestas al tratamiento de 100% Irrad (Fig. 3.14). Los altos valores de NPQ en todos los experimentos, se encuentran comúnmente en especies estuarinas, debido al campo lumínico altamente dinámico al que están expuestas (Goss y Jakob, 2010). Sin embargo, hacia el final de los experimentos, se observó en algunos casos, una disminución de los valores de NPQ en muestras enriquecidas con nutrientes (Fig. 3.15), lo cual concuerda con trabajos que muestran que el cambio en la regulación del NPQ puede verse asociado al estado nutricional de las células (Staeher et al., 2002).

A pesar de las mayores tasas de inhibición junto con altos valores de NPQ en los tratamientos expuestos a una CSM somera, los experimentos mostraron que los ETR (Figs. 3.16, 3.17) fueron superiores en estos tratamientos; debido a que el ETR depende de la irradiancia PAR a la que están expuestas las células (Ecuación 3.6), y estas muestras recibieron irradiancias 4 veces superiores a las muestras expuestas a una CSM más profunda (25% Irrad). Sin embargo, si bien los ETR<sub>int</sub> fueron inferiores en estos últimos, los valores de ETR no se redujeron en forma equivalente, sino que en algunos casos se redujeron al tercio o a la mitad. Además, debido a la relación directa entre ETR y la radiación, y debido a los mayores Y observados en los experimentos de verano, es de esperar

que los ETR fueran mayores en estos experimentos respecto a las otras estaciones. Como ya se mencionó, las condiciones de altas irradiancias (características del verano, o aquellas como las impuestas en la CSM somera-100% Irrad) o la baja temperatura (característica del invierno) conducen a una mayor presión de excitación de FSII. En una escala de tiempo corta (minutos), el fitoplancton puede aclimatarse para compensar la exposición a una alta presión de excitación del FSII reduciendo la eficiencia de transferencia de energía, ya sea desviando energía del FSII al FSI a través de estados transitorios, o disipando el exceso de energía en forma de calor (NPQ). En una escala de tiempo más larga (días), la aclimatación fotosintética a la alta presión de excitación del FSII puede ocurrir como consecuencia de una reducción en el tamaño de la antena del FSII (Hüner et al., 1998). Estos mecanismos producen cambios en el fotosistema, lo que reduciría la eficiencia fotosintética y el ETR. En concordancia con esto, se observaron menores valores de  $ETR_{int}$  (Fig. 3.17) durante el último día de los experimentos, coincidiendo con menores valores de NPQ.

Por otra parte, el agregado de nutrientes no se tradujo en mayores abundancias ni tasas de crecimiento (Figs. 3.19, 3.20), lo cual podría deberse a la baja relación N:P adicionada, o a que la escala temporal y el momento en que los nutrientes son recibidos en el medio condicionan el crecimiento y los cambios en la biodiversidad (Helbling et al., 2005; Marcoval et al., 2007). En este último trabajo particularmente se vio que si el pulso de nutrientes y la exposición a la radiación (como podría ocurrir en una menor CSM) coincidían, la utilización de nutrientes no era tan efectiva para el crecimiento, y parte de la energía era utilizada en el proceso de aclimatación a la radiación, disminuyendo así las tasas de crecimiento. Por último, la utilización de nutrientes, con el posterior crecimiento de la célula, depende del tamaño celular y favorece a las células pequeñas debido a su mayor relación superficie / volumen (Reynolds y Walsby, 1975), y esto coincide con los resultados obtenidos en estos experimentos, donde tanto al inicio como al final, los tratamientos Amb estuvieron dominados por células nanoplactónicas (principalmente flagelados) mientras que, en los tratamientos +Nut, las células más grandes comenzaron a tomar ventaja de ellos, principalmente diatomeas (Figs. 3.21, 3.22). A su vez, las diferencias en las tasas de crecimiento observadas a lo largo del año, pueden deberse a la aclimatación a la radiación o a diferencias en los factores fisicoquímicos, tales como la temperatura, nutrientes, entre otros (Doyle et al., 2005). Por último, se debe considerar que en estos experimentos se eliminó el zooplancton, los cuales ejercen una presión diferencial sobre el fitoplancton dependiendo del tipo de tamaño de los mismos, los cuales afectarán en mayor o menor medida a los distintos tamaños de las células fitoplanctónicas.

Si bien este Capítulo se centró principalmente en el estudio de las comunidades del régimen externo, también se trabajó con comunidades provenientes del régimen interno del estuario del río Chubut para poder así realizar una comparación entre las mismas: por un lado, el régimen externo (marino) es más transparente que el interno (río), con coeficientes medios de atenuación  $K_{PAR}$  que varían a lo largo del año entre 1-2  $m^{-1}$  y 4-6  $m^{-1}$  para el agua de mar y río, respectivamente; mientras que la diferencia entre los coeficientes de atenuación correspondientes a la RUV ( $K_{UV}$ ) entre estos dos cuerpos de agua es aún más pronunciada (Helbling et al., 2010). Estas diferencias en la penetración de la radiación para ambos ambientes haría pensar que las comunidades fitoplanctónicas marinas están aclimatadas a intensidades lumínicas más altas y, por lo tanto, podrán contrarrestar de manera más efectiva los efectos negativos de la RUV y de las mayores intensidades de PAR al ser expuestas en una CSM somera (100% Irrad), mientras que las comunidades de río, al estar aclimatadas a bajas condiciones de radiación, serán más sensibles. Sin embargo, las  $k$  y  $r$  (y por lo tanto el daño no reparado a lo largo del día) al inicio y al final de los experimentos fueron bastante similares para ambas comunidades (Figs. 3.6-3.13, 3.25-3.32). Esto podría comprenderse teniendo en cuenta que la zona Patagónica está expuesta constantemente a fuertes intensidades de vientos (Helbling et al., 2005), por lo cual las células de ambos extremos del estuario en su ambiente natural están constantemente circulando dentro de la CSM. Sin embargo, la topografía del fondo tiene un efecto significativo en la profundidad de la CSM, ya que aunque el  $k_{PAR}$  en el régimen interno del estuario es más alto ( $\sim 4m^{-1}$ ), la profundidad es menor (1m) y esto provocaría que las células de fitoplancton estén expuestas a irradiancias medias similares a las del régimen externo, que posee menores  $k_{PAR}$  ( $\sim 1 m^{-1}$ ) pero CSM mucho más profundas (6 m) (Helbling et al., 2015a). Sin embargo, como la RUV se atenúa mucho más rápido en las aguas del régimen interno, sus comunidades estarían menos aclimatadas a altos niveles de radiación para estas longitudes de onda, y ésto podría traducirse en las mayores  $k$  para los tratamientos PAB al inicio del experimento, principalmente en los expuestos a 100% Irrad (Fig. 3.25), junto con mayores valores de NPQ (Fig. 3.33). Por otra parte, en los experimentos con comunidades del río, el NPQ fue generalmente mayor en el día 1 que en el 5 (Figs. 3.33, 3.34), haciéndose más evidente esta disminución hacia el final de los experimentos en los tratamientos +Nut. Estos resultados coinciden con estudios realizados en un estuario en el sur de Brasil (Villafañe et al., 2014), donde se encontraron valores más altos de NPQ al comienzo del experimento (es decir, en células no aclimatadas) o en condiciones menos favorables (es decir, concentración de nutrientes ambiente en comparación con la adición de ellos) después de unos

días de aclimatación. Al evaluar los ETR relativos e integrados de las comunidades de río se observaron, al igual que para los experimentos con comunidades de mar, valores mayores en los experimentos de verano y primavera coincidente con mayores irradiancias y dosis solares (Figs. 3.35, 3.36). Sin embargo, a diferencia de las comunidades marinas, y hacia el final de los experimentos, en las de río no se observó reducción en los ETR (a excepción del experimento de invierno que mostró muy bajas dosis de radiación hacia el último día). Estos resultados sugieren que las comunidades de río se aclimataron mejor a las nuevas condiciones impuestas, y además presentaron mayores tasas de crecimiento y abundancias al final de los (Figs. 3.38, 3.39). Esto ocurre porque las comunidades del régimen interno estuvieron dominadas siempre por células pequeñas nanoplanctónicas, lo que les confiere ventajas en la captación de luz y nutrientes debido a su mayor relación superficie/volumen (Reynolds et al., 1997), tal como ocurre al comparar los distintos tratamientos en los experimentos realizados con comunidades marinas.

Al evaluar el efecto individual de las variables estudiadas (i.e., radiación, nutrientes e irradiancias) en todos los experimentos, el efecto de la irradiancia (i.e., la disminución de la profundidad de la CSM) fue el más importante, mientras que la RUV y la adición de nutrientes no afectaron al ETR. Por otro lado, al evaluar el efecto combinado de las tres variables, las respuestas del fitoplancton marino mostraron respuestas muy variables a corto plazo y luego de la aclimatación a las nuevas condiciones que se esperarían en un escenario de cambio global (Fig. 3.18c, d). Generalmente el efecto interactivo fue similar a la suma de las variables por separado al inicio del experimento, mientras que al final se observaron diferencias, actuando de forma sinérgica durante el bloom y de forma antagónica en el resto del año. Estas respuestas diferenciales a lo largo del año podrían estar asociadas a la distinta composición específica de las comunidades, así como también a las distintas concentraciones de nutrientes que condicionan el estado nutricional de las células, o a las distintas temperaturas del agua a lo largo del año. Las bajas temperaturas del agua registradas durante el bloom podrían incluso afectar los procesos de reparación del daño en el ADN producido por la RUV y esto, junto con una mayor irradiancia solar recibida al exponer a las células a una CSM somera, podría asociarse a mayor daño no reparado a lo largo del día en el Y, junto con menores ETR. Por otro lado, hacia el final de los experimentos, luego de la aclimatación a las nuevas condiciones que se esperarían en un escenario de cambio global, en la mayoría de los experimentos con comunidades marinas (a excepción de junio y agosto), se observó un efecto antagónico de la interacción de las 3 variables (Rad x Nut x Irrad) en el ETR (Fig. 3.18d). Esto puede deberse a que luego de varios días las células pueden aclimatarse a las nuevas condiciones,

ocurriendo para ello, ciertos cambios en el fotosistema, como por ejemplo degradación de los pigmentos o reducción de la antena del FSII (Hüner et al., 1998), reduciendo la eficiencia fotosintética y el ETR. Por otra parte las comunidades de río tuvieron comportamientos similares al inicio y al final del experimento y a lo largo del año, mostrando antagonismo entre las variables, donde el efecto interactivo no fue beneficioso para el fitoplancton (Fig. 3.37c, d).

Los experimentos en donde se evalúan 3 variables de forma conjunta son bastante complejos debido a la variabilidad de respuestas y a veces resulta difícil encontrar patrones claros que permitan obtener conclusiones generales. Sin embargo, es evidente que en un escenario futuro de cambio global, la disminución en la profundidad de la CSM será un factor clave tanto para las comunidades marinas como las de río, a lo largo del año. Esta mayor estratificación asociada a una capa más somera perjudicará a las células fitoplanctónicas causando mayor fotoinhibición y disminución en la tasa de transporte de electrones del FSII, mientras que el agregado de nutrientes y la RUV no mostrarían efectos tan marcados para contrarrestarlos. Además las comunidades de fitoplancton se verán afectadas de manera diferencial a lo largo del año, con una mejor aclimatación por parte de las comunidades de río, mientras que las marinas, principalmente en invierno, serán las más perjudicadas debido a la menor temperatura del agua y a la mayor abundancia de células microplanctónicas con una alta proporción de diatomeas. Este estudio resalta entonces, la importancia de evaluar el efecto conjunto de estas variables asociadas al cambio global, aunque también se deberían considerar las repercusiones en niveles tróficos superiores.

## **Capítulo 4:**

***Efecto de la radiación solar  
fluctuante sobre el fitoplancton del  
estuario del río Chubut, bajo  
condiciones de cambio global***

Este capítulo es una traducción del trabajo que se encuentra en preparación para ser enviado a la revista *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*: Bermejo, P., C. Durán-Romero, V.E. Villafañe y E.W. Helbling. 2019. Effect of fluctuating solar radiation regime on phytoplankton from the Chubut River estuary under global change conditions.

#### **4.1 Introducción:**

Las variables abióticas pueden interactuar entre sí de forma sinérgica o antagónica (Crain et al., 2008) de manera que las respuestas a las condiciones de mezcla pueden ser diferentes al combinarse con otras. En particular, resulta de interés evaluar los efectos combinados de los regímenes fluctuantes de radiación (a través de la mezcla vertical) con otras variables abióticas que se espera que se modifiquen en el futuro (i.e., en un escenario de cambio global y / u otras presiones antrópicas), tales como la acidificación, temperatura y entrada de nutrientes (IPCC, 2013; Häder y Gao, 2015). Bajo mayores temperaturas, los cuerpos de agua estarán más estratificados, de modo que el fitoplancton circulará dentro de una CSM menos profunda, exponiendo a los organismos a fluctuaciones más rápidas y a niveles de radiación más altos, incluyendo de RUV. Por ejemplo, Carrillo et al. (2015) observaron que los efectos negativos de la RUV en la producción primaria eran más intensos con una mayor estratificación, con importantes consecuencias para el ciclo del carbono. En general, los estudios que consideran los efectos combinados de la radiación solar fluctuante con variables de cambio global son escasos, pero Helbling et al. (2013) encontraron que bajo concentraciones incrementadas de nutrientes, la mezcla vertical interactuaba con la RUV reduciendo su efecto inhibitorio sobre la producción primaria en lagos claros, pero la aumentaba en lagos opacos. Los efectos de la RUV en la fotosíntesis bajo condiciones de mezcla fueron evaluados por Barbieri et al. (2002) quienes obtuvieron diferentes respuestas no solo dependiendo de la comunidad de fitoplancton estudiada a lo largo del año, sino también de qué porción de la zona eufótica ( $Z_{eu}$ ) se mezclaba. Otros estudios realizados con comunidades de fitoplancton del mar del Sur de China, mostraron que la RUV solar inhibía la fotosíntesis del fitoplancton en la columna de agua y que ésta disminuía con la profundidad; sin embargo, la fotosíntesis era estimulada por la RUV cuando la velocidad de la mezcla era rápida (Helbling et al., 2003). Asimismo, otros estudios realizados con cianobacterias determinaron que la RUV fluctuante actuaba de forma sinérgica con el aumento de la turbidez, haciendo más notoria la inhibición de la fotosíntesis a medida que la columna de agua se oscurecía (Helbling et al., 2015b). Por su parte, los efectos combinados de la acidificación y la mezcla fueron estudiados por Hoppe et al. (2015) quienes observaron que la acidificación solo reducía el crecimiento de *Chaetoceros debilis* bajo radiación fluctuante, pero no bajo un régimen de luz constante. Finalmente, Jin et al. (2013) encontraron que la acidificación y la mezcla rápida o la radiación solar fluctuante actuaban de forma sinérgica, reduciendo la fijación de carbono en el cocolitofórido *Geophyrocapsa oceanica*. Sin embargo, la mayoría de los estudios consideraron los

efectos a corto plazo de la mezcla vertical sobre el fitoplancton y sólo algunos pocos los han considerado a mediano o largo plazo (Diehl et al., 2002; Fouilland et al., 2003; Galí et al., 2013), los cuales involucran procesos de aclimatación.

Este tipo de estudios multivariados reviste especial importancia para las zonas templadas de la Patagonia que están expuestas a fuertes vientos durante gran parte del año (Helbling et al., 2005) que no sólo mezclan la columna de agua, sino que también afectan y condicionan la sucesión anual y la floración de fitoplancton (Capítulo 2, Bermejo et al., 2018). En particular, los efectos combinados de la acidificación y los aportes de nutrientes fueron evaluados en comunidades del post-bloom del estuario del río Chubut, donde se encontró un aumento en la producción primaria (Villafañe et al., 2015; Durán-Romero et al., 2017) y un cambio en la composición de la comunidad hacia diatomeas relativamente grandes después de cinco días de aclimatación a las condiciones futuras simuladas experimentalmente. Siguiendo con esta línea de investigación, en este trabajo se utilizará también el estuario del río Chubut como ecosistema modelo para evaluar los efectos de un escenario futuro (con un aumento de nutrientes y acidificación) y su interacción con los regímenes de radiación fluctuantes, en la fotosíntesis, estructura y crecimiento de las comunidades de fitoplancton de los regímenes interno (río) y externo (mar). Particularmente, se evaluará la H5) planteada como objetivo de esta Tesis: *“Las condiciones futuras de cambio global de bajo pH, altos nutrientes y RUV, junto a la fluctuación de radiación dentro de la CSM, cambia la composición taxonómica y estructura de tamaños de la comunidad fitoplanctónica, beneficiando a células más resistentes y de mayor tamaño, y con mayores tasas fotosintéticas”*.

## **4.2 Materiales y Métodos:**

### **4.2.1 Área de estudio / muestreo:**

El área de estudio es el estuario del Río Chubut, la cual ya fue descrita en los capítulos anteriores (ver sección 2.2.1 y 3.2.1, Fig. 2.1). Se realizaron dos experimentos idénticos, con muestras superficiales recolectadas en el régimen externo e interno (ambos sitios de muestreo se muestran en la Fig. 1.15). Dichos experimentos tuvieron una duración de 5 días cada uno, y se realizaron en el período del 11-15 y del 16-20 de febrero de 2016 (régimen externo e interno, respectivamente). La recolección de muestras se realizó la noche anterior al comienzo de los experimentos, durante la marea alta para experimentos realizados con comunidades marinas, y durante marea baja para aquellos realizados con las de río. Las muestras se pre-filtraron (malla de 200  $\mu\text{m}$ ) para eliminar el zooplancton de mayor tamaño y se colocaron en bidones de 20 l, previamente lavados con HCl

(1N), y se llevaron inmediatamente al laboratorio de la Estación de Fotobiología Playa Unión (EFPU), a 10-15 min de ambos sitios de muestreo.

#### **4.2.2 Set-up experimental:**

Una vez en el laboratorio, el agua se distribuyó en 12 recipientes transparentes a la RUV (de 10 l de capacidad; Cubitainers Nalgene®, de polietileno de baja densidad; ver características en Villafañe et al., 2015) que se utilizaron como microcosmos. En estos experimentos se utilizó un enfoque de tipo cluster (Boyd et al., 2010), con dos condiciones contrastantes que incluyeron todos los factores (Villafañe et al., 2015): Seis microcosmos se llenaron con agua que poseía las condiciones actuales (condición Presente), con pH y macronutrientes tal como se encontraban en el medio natural (Tabla 4.1). Los otros seis microcosmos se llenaron con agua que se manipuló para representar las condiciones esperadas en el futuro, con mayor acidificación y aumento en la concentración de nutrientes (condición Futuro). Para crear estas condiciones futuras, se agregaron a cada microcosmos 0.3 ml de solución de  $\text{NaNO}_3$  7.5% p/v, 3.6 ml de solución  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0.5% p/v y 10 ml de solución  $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$  3%p/v, con el fin de lograr concentraciones de 25  $\mu\text{M}$  de  $\text{NaNO}_3$ , 15  $\mu\text{M}$  de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  y 100  $\mu\text{M}$  de  $\text{Na}_2\text{SiO}_3$ , adicionales a la concentración que había en el medio, y así simular los potenciales aumentos de estos nutrientes (Capítulo 2, Bermejo et al., 2018). El agua se acidificó reduciendo  $\sim 0.5$  unidades de pH hasta lograr un valor de 7.65 para el agua de mar (el nivel esperado para el final del siglo (IPCC, 2013) y de 8 para el agua de río, mediante el agregado de  $\text{CO}_3^{2-}$  (como  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ),  $\text{HCO}_3^-$  (como  $\text{NaHCO}_3$ ) y  $\text{HCl}$  (0.1N) para aumentar el  $\text{pCO}_2$  y el carbono inorgánico disuelto (DIC) (Gattuso et al., 2010).

Se colocaron tres microcosmos de cada condición (Presente y Futuro) en dos bandejas (una para cada condición experimental) a una profundidad fija (0.45 m y 0.37 m de profundidad para los microcosmos de mar y río, respectivamente, tratamiento Estático) en un tanque exterior (1 m de profundidad; 3 m de diámetro), sujetas de un poste horizontal en el tanque. Los otros tres microcosmos de cada condición experimental se colocaron en dos bandejas móviles también sujetas a un poste horizontal, y sometidas a mezcla vertical (tratamiento Mezcla) (ver más adelante). El set-up y profundidad de las bandejas fijas fueron definidos en base al coeficiente de atenuación de PAR ( $K_{\text{PAR}}$ ) del agua del tanque, a fin de que la irradiancia media recibida en ambos tratamientos, Estático y Mezcla, sea la misma. El  $K_{\text{PAR}}$  utilizado fue similar al encontrado en el mar y en el río, 1.4 y 3.0  $\text{m}^{-1}$ , respectivamente, y se logró por medio del agregado de sedimentos recolectados del lecho del río Chubut al tanque. El set-up inicial se realizó en aproximadamente

dos horas y terminó después de la puesta del sol; por lo tanto, las muestras no recibieron radiación solar hasta la mañana siguiente, cuando comenzaron las mediciones / recolección de muestras (ver más adelante). Durante cada experimento, la temperatura del tanque se controló mediante la circulación de agua y se mantuvo a aquella medida *in situ*, es decir, 19.5°C y 20.5°C para los experimentos de agua de mar y río, respectivamente.

Durante el día, las bandejas correspondientes al tratamiento Mezcla se movieron manualmente dentro de la columna de agua: Cada 10 min se movieron verticalmente 20 cm hacia abajo o hacia arriba (es decir, hacia la superficie o hacia el fondo del tanque). Por lo tanto, un ciclo de mezcla vertical (superficie-fondo-superficie) se completó en dos horas, a una velocidad de 1 m h<sup>-1</sup>. La velocidad de mezcla vertical fue elegida en base a datos de velocidad del viento reportados para el área (Helbling et al., 2005; Bermejo et al., 2018) y en base a experiencias anteriores (Barbieri et al., 2002; Villafañe et al., 2007). Todos los días se repitieron 6 ciclos, desde la salida hasta la puesta del sol, ca. 7:30 a las 19:30 hs. Todas las mañanas, y antes del amanecer, se recolectó una muestra de 1 l de cada microcosmos, que se fraccionó y utilizó para determinar nutrientes (días 1, 3 y 5), concentración de Clor-*a* (días 1 a 5), abundancia y composición taxonómica (días 1 y 5), así como para evaluar la respuesta fotoquímica del FSII y la evolución de oxígeno durante ciclos diarios, tal como se describe a continuación.

#### *Parámetros fotoquímicos del FSII*

Se colocaron dos sub-muestras (50 ml) de cada una de las condiciones experimentales (Presente y Futuro, tanto Estático como Mezcla) en tubos de cuarzo (24 en total), y a continuación se pusieron en bandejas de aluminio, manteniendo los mismos tratamientos Mezcla y Estático que en los microcosmos originales (i.e., tal como se describió para los microcosmos). Se implementaron dos tratamientos de radiación, a) PAB: 12 tubos expuestos al espectro completo de radiación solar (> 280 nm), y b) P: 12 tubos donde la RUV fue filtrada (tubos cubiertos con filtro Ultraphan 395) y las muestras recibieron sólo PAR (> 395 nm). Este procedimiento y set-up se repitieron cada día durante los 5 días del experimento, y de esta forma se determinaron los parámetros de fluorescencia en muestras con distintos grados de aclimatación a las condiciones de Presente y Futuro (como así también a los tratamientos Estático o Mezcla). Cada día, se midieron los parámetros de fluorescencia de la Clor-*a* desde el amanecer hasta el atardecer (7:30 a 19:30 hs). Para tal fin, se obtuvieron alícuotas de 2-3 ml de cada tubo, cada dos horas (en el caso de las muestras del tratamiento Mezcla, el momento de muestreo se realizó cada vez que las muestras

terminaron un ciclo completo y estaban en la superficie). Para estas mediciones se usó un fluorómetro de amplitud modulada de pulsos (Walz, modelo Water-ED PAM, Alemania). Los valores del rendimiento fotoquímico (Y) se midieron seis veces para cada alícuota, midiendo la fluorescencia instantánea ( $F'_m$ ) inducida por un pulso de saturación ( $\sim 5300 \mu\text{mol}$  de fotones  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$  en 0.8 s) y la fluorescencia del estado estacionario ( $F_t$ ) inducida por una luz actínica (c.a.,  $500 \mu\text{mol}$  de fotones  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) en células aclimatadas a la luz. Para calcular el Y se utilizó la ecuación de Genty (1989):

$$Y = \Delta F / F'_m = (F'_m - F_t) / F'_m \quad (\text{Ecuación 4.1})$$

Otro de los parámetros registrados por el fluorómetro de amplitud modulada de pulsos es el quenching no fotoquímico (NPQ) de la fluorescencia de la Clor-*a*, que refleja la disipación por calor de la energía lumínica absorbida en exceso, y es el mecanismo de fotoprotección a corto plazo más importante activado por intensidades de PAR en niveles de saturación. El NPQ se calculó usando la siguiente ecuación (Schreiber et al., 1994):

$$\text{NPQ} = (F_m - F'_m) / F'_m \quad (\text{Ecuación 4.2})$$

donde  $F_m$  es la fluorescencia máxima cuando todos los centros de reacción se encuentran cerrados.

#### *Evolución de oxígeno:*

A partir de las muestras recolectadas diariamente, se obtuvieron sub-muestras de 30 ml que se colocaron en botellas de teflón (transparentes a la RUV), evitando la presencia de burbujas. Las botellas se colocaron en bandejas de aluminio (junto con los tubos para mediciones de parámetros de fluorescencia la Clor-*a*) y se sometieron a los mismos tratamientos (i.e., Estático y Mezcla) que los microcosmos correspondientes. Estas muestras (12 en total) recibieron todo el espectro de la radiación solar, es decir RUV y PAR. La concentración de oxígeno se midió continuamente desde las 7:30 a las 19:30 hs utilizando un sistema de optodes (Mini 10PreSensGmbH, Alemania) con diez fibras ópticas midiendo en simultáneo. Dado que el set-up contaba con 12 muestras para medir, 9 canales del optode midieron en forma automática registrando datos cada 11 seg, mientras que con la otra fibra óptica se midió en forma alternada (i.e., cada 10 seg) las otras 3 muestras

(Estáticas). De esta manera, se obtuvo un total de 3900 datos por día para cada muestra. Para las mediciones de oxígeno se trabajó solo con el tratamiento PAB (12 tubos expuestos al espectro completo de radiación solar), ya que el sistema de optodes cuenta sólo con 10 canales, y no era posible realizar mediciones a intervalos de minutos en las muestras del tratamiento Mezcla, sin tener que sacarlas a la superficie para medirlas manualmente. Es por esto que se decidió trabajar sólo con 12 muestras y utilizar 9 canales que medían continuamente (de los cuales 6 canales medían las muestras del tratamiento Mezcla y 3 canales medían las muestras del tratamiento Estático) y el último canal se fue alternando manualmente entre 3 muestras del tratamiento Estático. Todos los días, y antes de comenzar las mediciones, se realizó una calibración del sistema con dos puntos (0% y 100% de concentración de oxígeno) y se corrigió por presión atmosférica y temperatura de la columna de agua. Los datos obtenidos fueron concentración de oxígeno que luego se convirtieron a tasas de oxígeno.

#### **4.2.3 Mediciones y análisis:**

##### *Radiación solar:*

La radiación solar sobre el área de estudio se midió de forma continua, utilizando un radiómetro ELDONET de banda ancha (Real Time Computers, Alemania) instalado permanentemente en el techo de la EFPU, tal como fuera descrito en el Capítulo 2. El perfil vertical de radiación solar en la columna de agua del tanque se determinó al mediodía con un espectrorradiómetro sumergible (OceanOptics, modelo HR 2000CG UV-NIR, USA) que tiene una fibra óptica de 10 m y un colector coseno. El  $K_{PAR}$  se calculó a partir de la pendiente de la regresión lineal del logaritmo natural de la disminución de PAR vs. la profundidad. La atenuación de la columna de agua fue ajustada diariamente a fin de mantener los  $K_{PAR}$  de mar y río a los valores *in situ*.

##### *Variación químicas:*

El pH en los microcosmos se midió diariamente en la mañana utilizando un pHmetro (Hanna Instruments, modelo HI 2211, USA). El pH se ajustó diariamente añadiendo HCl 0.1N de acuerdo con el requerimiento de cada microcosmos, con el fin de mantener un pH de 7.65 y de 8 en la condición Futuro de los experimentos con agua de mar y de río, respectivamente.

Las concentraciones de  $NO_3^- + NO_2^-$ ,  $PO_4^{3-}$  y  $SiO_3^{2-}$  en las muestras de agua de mar y río se obtuvieron a partir de sub-muestras de 100 ml, las cuales se congelaron (-20°C) hasta su análisis,

que se llevaron a cabo siguiendo los métodos descritos en Strickland y Parsons (1972), utilizando un espectrofotómetro de arreglo de diodos (Hewlett Packard, modelo 8453E, USA).

#### *Concentración de Clor-a:*

Se obtuvieron sub-muestras (100-200 ml) que se filtraron en filtros Whatman GF/F (25 mm de diámetro) y se congelaron (-20°C) hasta el posterior análisis. Para determinar la concentración de Clor-a, las muestras se descongelaron y se colocaron en tubos de centrifuga (15 ml) con 5 ml de metanol absoluto. Las muestras se sonicaron (20 min, 20 ° C) y se mantuvieron en la oscuridad (1 h, 20 ° C). Luego, las muestras se centrifugaron (15 min a 2000 rpm) y se realizó un espectro de absorción de las mismas entre 250 y 750 nm con un espectrofotómetro de arreglo de diodos (Hewlett Packard, modelo HP 8453E, USA). Para calcular la concentración de Clor-a se usó la ecuación de Porra (2002).

#### *Caracterización y abundancia de fitoplancton:*

Las muestras se colocaron en frascos de vidrio color caramelo de 70 ml y se fijaron con formalina neutralizada (concentración final 0.4% de formaldehído) o solución de ácido de Lugol (1% vol vol<sup>-1</sup>) para mar y río, respectivamente. Para los recuentos se dejaron sedimentar 10-25 ml durante 24 h en cámaras de sedimentación (Hydro-BiosGmbH, Alemania). Las sub-muestras de agua de mar se tñieron con Rosa de Bengala para distinguir mejor el material orgánico de los detritos. Las especies de fitoplancton se contaron e identificaron utilizando un microscopio invertido (Leica, modelo DM IL, Alemania) siguiendo la técnica descrita por Villafañe y Reid (1995).

#### *Tratamiento de los datos:*

Las tasas de crecimiento específicas en función de la abundancia total de células ( $\mu_{\text{Cel}}$ ; dia<sup>-1</sup>) para los distintos tratamientos de cada experimento se calcularon siguiendo la siguiente ecuación:

$$\mu_{\text{Cel}} = \ln (N_5 / N_1) / (t_5 - t_1) \quad (\text{Ecuación 4.3})$$

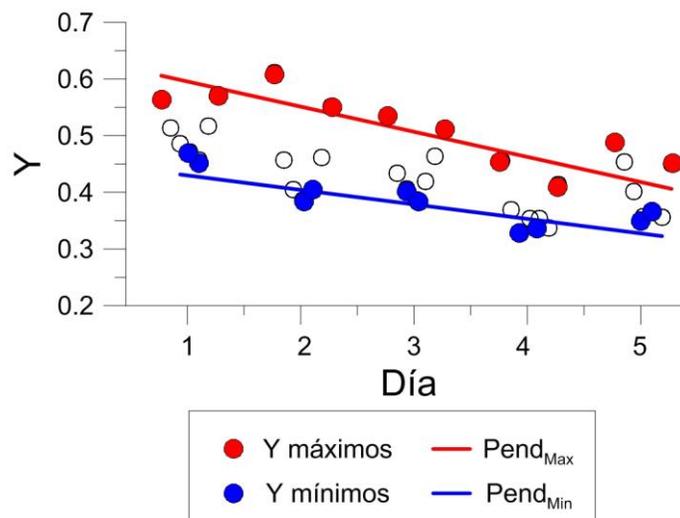
donde  $N_1$  y  $N_5$  son las concentraciones de fitoplancton al inicio y al final de los experimentos, y  $t_1$  y  $t_5$  son los días 1 y 5 de los experimentos, respectivamente.

Las tasas de crecimiento en función de la Clor-*a* ( $\mu_{\text{Clor-}a}$ ;  $\text{día}^{-1}$ ) se obtuvieron a partir del valor del exponente de un ajuste exponencial, para el cual se utilizaron las concentraciones de Clor-*a* obtenidas para cada microcosmos a lo largo del experimento.

Las tasas de crecimiento obtenidas a partir de los valores de Clor-*a* y de las concentraciones celulares presentaron los mismos patrones, por lo cual se representan solamente aquellas obtenidas a partir de la abundancia.

Las tasas de inhibición ( $k$ , en  $\text{s}^{-1}$ ) y recuperación ( $r$ , en  $\text{s}^{-1}$ ) de  $Y$  se calcularon diariamente ajustando una función exponencial a los valores de  $Y$  durante los ciclos diarios, tal como se describió en el Capítulo 3. Cuando esta tasa fue negativa (disminución de los valores de  $Y$ ) se consideró como inhibición, mientras que si fue positiva (aumento de los valores de  $Y$ ) se consideró como recuperación. Los valores de  $k$  y  $r$  se calcularon tanto para los tratamientos Estático ( $k_E$  y  $r_E$ ) como de Mezcla ( $k_M$  y  $r_M$ ).

Los valores máximos de  $Y$  obtenidos temprano en la mañana y hacia el final de la tarde de cada ciclo diario se ajustaron con una función lineal para cada tratamiento, obteniéndose la pendiente ( $\text{Pend}_{\text{Max}}$ ) (Fig. 4.1). Los valores de  $Y$  medidos temprano en la mañana corresponden a las muestras iniciales o a aquellas que se recuperaron durante la noche, mientras que los valores de  $Y$  medidos en la tarde corresponden las que se recuperaron después de un ciclo solar de exposición. Se realizó un ajuste similar utilizando los valores mínimos de  $Y$  obtenidos al mediodía para cada tratamiento, que generalmente corresponden a muestras más inhibidas, y se ajustó con una regresión lineal para obtener el valor de la pendiente ( $\text{Pend}_{\text{Min}}$ ) (Fig. 4.1).



**Fig. 4.1** Esquema general de respuestas de  $Y$  a lo largo del experimento y obtención de las  $\text{Pend}_{\text{Max}}$  y  $\text{Pend}_{\text{Min}}$ .

Asimismo, se normalizaron los datos de concentración de oxígeno por concentración de Clor-*a* y se calcularon diariamente las tasas de producción de oxígeno (en  $\mu\text{mol O}_2 \mu\text{g Clor-}a^{-1} \text{s}^{-1}$ ) como la pendiente de la regresión lineal entre la concentración de oxígeno normalizada por Clor-*a* vs. el tiempo. Luego se calculó la relación entre las tasas de oxígeno para las muestras bajo los tratamientos Mezcla ( $\text{Oxi}_M$ ) y Estático ( $\text{Oxi}_E$ ).

#### *Análisis estadísticos:*

Las muestras incubadas en los microcosmos y expuestas a los tratamientos Mezcla y Estático se realizaron por triplicados para cada condición (Presente o Futuro). Las sub-muestras para la determinación de los parámetros de fluorescencia, concentración de oxígeno, nutrientes, concentración de pigmentos y análisis taxonómicos se extrajeron de cada microcosmos, por lo que también se obtuvieron muestras por triplicado para cada una de ellas. La normalidad y la homocedasticidad de los conjuntos de datos se analizaron usando las pruebas de Shapiro-Wilks y Barlett, respectivamente (Zar, 1999).

Los valores de *k* y *r* entre los tratamientos PAB y P para cada día del experimento se compararon por medio de la prueba t-student. También se compararon las pendientes ( $\text{Pend}_{\text{Max}}$  y  $\text{Pend}_{\text{Min}}$ ) obtenidas para ambos tratamientos de radiación, y como no existieron diferencias significativas entre ellas, se presentan sólo los resultados que corresponden a los tratamientos expuestos al espectro de radiación solar completo (i.e., PAB) para simplificar las figuras. Las diferencias entre  $k_M/k_E$  y  $\text{Oxi}_M/\text{Oxi}_E$  para las condiciones Presente y Futuro a lo largo del experimento se analizaron usando un ANOVA de dos vías de medidas repetidas (RM-ANOVA). Para determinar las diferencias entre tratamientos para  $\text{Pend}_{\text{Max}}/\text{Pend}_{\text{Min}}$ , abundancia de células o tasas de crecimiento, se utilizaron ANOVA de 2 vías. En todos los casos, si el ANOVA indicaba diferencias significativas en los factores individuales o en las interacciones, se realizó una prueba *a posteriori* de Tukey.

### **4.3 Resultados:**

#### **4.3.1 Características iniciales de los sitios de muestreo:**

Las características iniciales promedio de las muestras obtenidas en los dos extremos del estuario se muestran en la Tabla 4.1. El agua de mar (régimen externo) fue más fría, más salina y con pH más bajo que el agua de río (régimen interno). Los nutrientes mostraron diferencias significativas entre los dos extremos del estuario: el régimen externo tuvo una concentración ca. tres veces

mayor de  $\text{NO}_3^- + \text{NO}_2^-$  en comparación con la del régimen interno; sin embargo, las concentraciones de  $\text{PO}_4^{3-}$  y  $\text{SiO}_3^{2-}$  fueron mayores (aproximadamente tres y cuatro veces, respectivamente) en el río que en el mar. A pesar de que la concentración de Clor-*a* fue mayor en el régimen externo que en el interno, la abundancia celular fue menor en el primero, siendo en su mayoría células nanoplanctónicas (~ 95%), con flagelados no identificados dominando las muestras. El régimen interno también se caracterizó por poseer en su mayoría células pequeñas de nanoplancton pero estas representaron ca. 60%, con predominio de diatomeas (*Cocconeis placentula* y *Cyclotella* spp.)

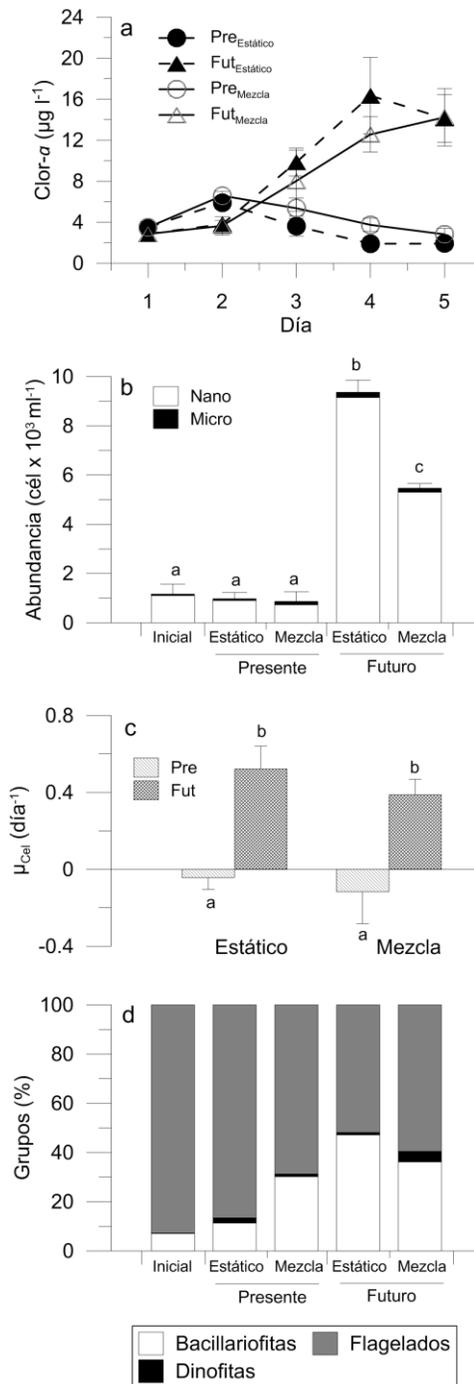
Variable	Régimen externo	Régimen interno
Temperatura	19.5 (0.5)	20.5 (0.5)
Salinidad	32	0.5
pH	8.16 (0.01)	8.55 (0.01)
Nitrato + nitrito ( $\mu\text{M}$ )	1.51 (0.15)	0.54 (0.10)
Fosfato ( $\mu\text{M}$ )	2.02 (0.49)	5.83 (0.56)
Silicato ( $\mu\text{M}$ )	25.37 (9.57)	210.2 (33.58)
Clorofila- <i>a</i> ( $\mu\text{g l}^{-1}$ )	3.5 (0.57)	2.49 (0.03)
Abundancia ( $\text{cel ml}^{-1}$ )	$1.1 (0.41) \times 10^3$	$2.13 (0.72) \times 10^3$
Nanoplancton (%)	94.9 (1.3)	62.9 (6.2)
Grupos dominantes (>50%)	Flagelados no identificados	Diatomeas: <i>Cocconeis placentula</i> ; <i>Cyclotella</i> spp.

**Tabla 4.1** Características iniciales de los regímenes externo e interno del estuario del río Chubut. Los números entre paréntesis representan la desviación estándar (n= 3).

#### 4.3.2 Comunidad del régimen externo:

El crecimiento de la comunidad fue limitado o nulo en la condición Presente, mientras que en la Futuro el crecimiento fue rápido después del segundo día de experimentación, con valores bastante similares (~14  $\mu\text{g Clor-}a \text{ l}^{-1}$ ) al final del experimento, tanto para los tratamientos Estático como Mezcla (Fig. 4.2a). La abundancia de células (Fig. 4.2b) fue de aprox.  $0.8 \times 10^3 \text{cél ml}^{-1}$  para la condición Presente y no hubo diferencias significativas entre los tratamientos Mezcla y Estático, estando ambos dominados por nanoplancton (< 20 $\mu\text{m}$ ). En la condición Futuro, en cambio, se observó luego de 5 días, abundancias significativamente mayores (i.e.,  $9.1$  y  $5.3 \times 10^3 \text{cél ml}^{-1}$  para

los tratamientos Estáticos y Mezcla, respectivamente), y el nanoplancton (flagelados no identificados) también dominó en estas muestras.

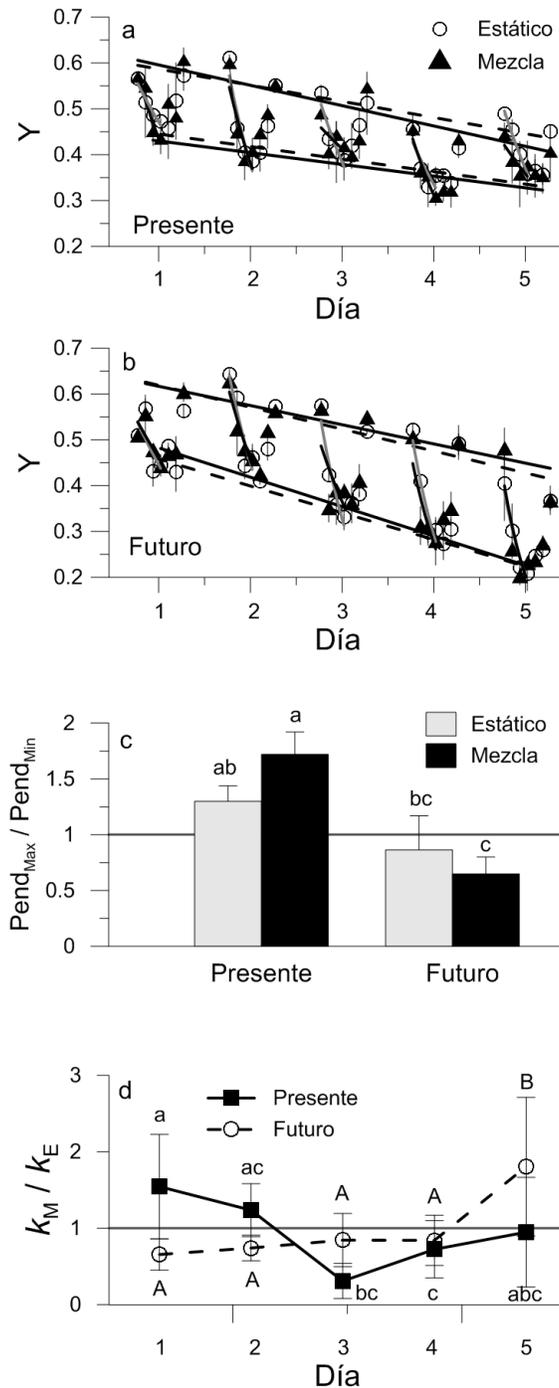


**Fig.4.2** (a) Concentración de Clor-*a* ( $\mu\text{g l}^{-1}$ ) a lo largo del experimento, (b) Abundancia celular ( $\text{cél} \times 10^3 \text{ ml}^{-1}$ ) al inicio y al final del experimento, (c) Tasa de crecimiento en función de la abundancia de células ( $\text{día}^{-1}$ ), (d) Porcentaje (basado en la abundancia) de los distintos grupos taxonómicos al inicio y al final del experimento realizado con la comunidad del régimen externo.

Las  $\mu_{cel}$  calculadas a lo largo del experimento fueron ligeramente negativas para la condición Presente, mientras que en Futuro se observaron valores positivos (Fig. 4.2c). Hacia el final del experimento, se observaron ligeros cambios en la composición taxonómica con respecto a las condiciones iniciales, con una reducción general de la abundancia de flagelados y un aumento en la proporción relativa de diatomeas (Tabla 4.1, Fig. 4.2d) siendo las pennadas e.g., *Nitzschia* spp., *Pseudonitzschia* spp. (40-50  $\mu\text{m}$ ) las más abundantes de este grupo en la condición Presente. En la condición Futuro (Estático y Mezcla) las diatomeas predominantes fueron pequeñas céntricas (10-20  $\mu\text{m}$ ) del género *Thalassiosira*, especialmente en el tratamiento Estático. En el tratamiento Mezcla se observó también un pequeño aumento en la abundancia de dinoflagelados (Fig. 4.2d).

#### *Fotoquímica del FSII:*

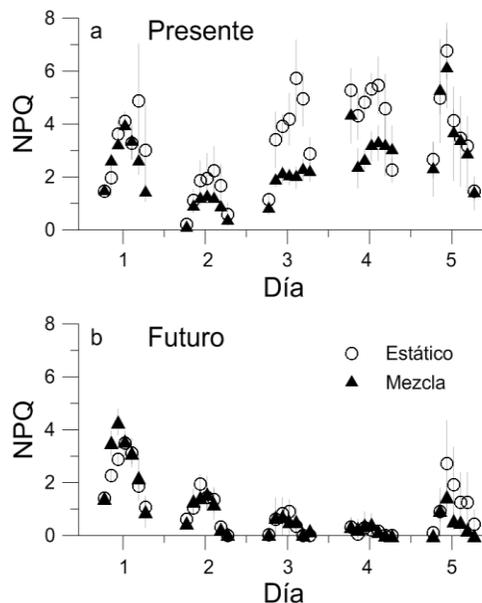
En todas las condiciones / tratamientos, el Y tuvo un patrón típico de disminución hacia el mediodía, cuando las muestras recibieron mayores irradiancias, y aumento nuevamente por la tarde, con una recuperación total o parcial (Fig. 4.3a, b). Este patrón se acentuó a lo largo del experimento principalmente bajo la condición Futuro. La relación ( $\text{Pend}_{\text{Max}}/\text{Pend}_{\text{Min}}$ ) fue  $> 1$  bajo la condición Presente (i.e., para los tratamientos Estático y Mezcla) (Fig. 4.3c), lo que significa que los valores máximos de Y (obtenidos temprano en la mañana o hacia el final de la tarde) disminuyeron más rápidamente que los mínimos (al mediodía) a medida que transcurría el experimento, y que la diferencia entre los valores máximos y mínimos se redujo a medida que avanzó el experimento (Fig. 4.3c). Esto significa que la recuperación del daño reversible a lo largo de cada ciclo diario se redujo en el transcurso del experimento. Por otro lado, en la condición Futuro (tratamientos Estático y Mezcla) tuvieron una relación  $\text{Pend}_{\text{Max}}/\text{Pend}_{\text{Min}} < 1$ , lo que implicó que la diferencia entre los valores máximos y mínimos de Y aumentaron con el transcurso del experimento, es decir que la inhibición diaria fue en aumento pero la recuperación del daño reversible a lo largo de cada ciclo diario también aumentó con los días. Si bien no se encontraron diferencias significativas en las relaciones de las pendientes de inhibición entre las muestras bajo tratamiento Estático y Mezcla, sí se encontraron diferencias en las tasas de inhibición diarias (Fig. 4.3d).



**Fig. 4.3** Rendimiento fotoquímico (Y) a lo largo del experimento para las condiciones (a) Presente y (b) Futuro. Las líneas continuas y discontinuas representan los ajustes lineales para los tratamientos Mezcla y Estático, respectivamente, (c) Relación entre las pendientes de las rectas obtenidas a partir de los valores máximos y mínimos de Y ( $Pend_{Max}/Pend_{Min}$ ) para los distintos tratamientos, (d) Relación entre las tasas de inhibición de los tratamientos de Mezcla y Estático ( $k_M/k_E$ ) a lo largo de los 5 días de duración del experimento realizado con la comunidad del régimen externo. Las letras minúsculas y mayúsculas representan diferencias significativas entre días para las condiciones Presente y Futuro, respectivamente ( $p < 0.05$ ). Las líneas verticales representan las desviaciones estándar.

Una forma de comparar estas inhibiciones es haciendo la relación  $k_M/k_E$  donde un valor  $> 1$  indica una mayor inhibición en las muestras que reciben radiación fluctuante (tratamiento Mezcla), mientras que un valor  $< 1$  indica una mayor inhibición en muestras bajo el tratamiento Estático. Al comienzo del experimento se observaron valores más altos en la relación  $k_M/k_E$  (Fig. 4.3d) en la condición Presente ( $\sim 1.5$ ) que en la Futuro ( $\sim 0.6$ ); sin embargo, hacia el final este patrón se invirtió. Como patrón general, se observó que en la condición Futuro existió una mayor inhibición en las muestras bajo el tratamiento Estático, mientras que en la condición Presente, con el correr del experimento la inhibición también fue mayor en las muestras que recibieron irradiancias fijas respecto a las que recibieron fluctuantes (Fig. 4.3d).

El patrón general del NPQ (Fig. 4.4) fue de un aumento hacia el mediodía y disminuyendo hacia el atardecer, con valores mayores para la condición Presente que para la Futuro. En la condición Presente se observó, a excepción del día 2, un aumento del NPQ a medida que transcurría el experimento, y generalmente las muestras del tratamiento Estático disiparon mayor energía en forma de calor que las del tratamiento Mezcla (Fig. 4.4a). Por el contrario, los microcosmos de la condición Futuro exhibieron menores NPQ a medida que transcurría el experimento, con un leve aumento hacia el último día, sin diferencias, generalmente, entre los tratamientos Estático y Mezcla a lo largo del experimento (Fig. 4.4b).



**Fig. 4.4** NPQ a lo largo del experimento para las condiciones (a) Presente y (b) Futuro. Los círculos y triángulos corresponden a los tratamientos Estático y Mezcla, respectivamente. Las líneas verticales representan las desviaciones estándar.

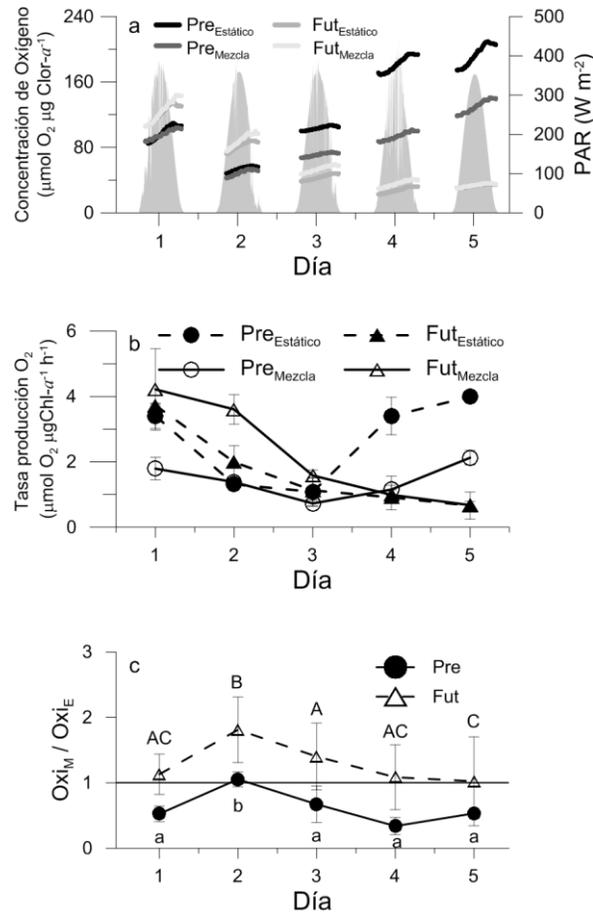
#### *Radiación solar:*

Los niveles de irradiancia a lo largo del día fueron similares durante los 5 días del experimento realizado con la comunidad del régimen externo, con condiciones generalmente soleadas, y presencia de nubes en algunos días, alcanzando valores máximos de  $\sim 400 \text{ W m}^{-2}$  para PAR al mediodía (Fig.4.4a). Las dosis solares fueron similares para los tratamientos Estático y Mezcla (debido al set-up experimental), con valores promedio diarios de PAR de  $4.7 \text{ MJm}^{-2}$ .

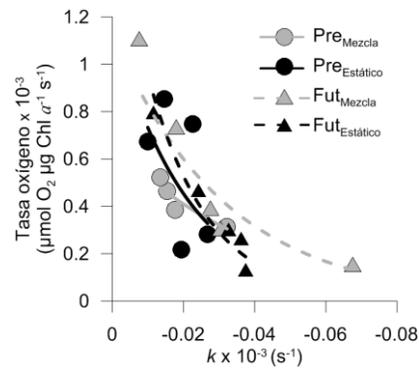
#### *Evolución de oxígeno:*

Todos los tratamientos mostraron un patrón de aumento en la concentración de oxígeno normalizada por Clor-*a* (i.e., producción debida al proceso fotosintético) a lo largo del día (Fig. 4.5a). Las tasas de producción de  $\text{O}_2$  normalizadas por Clor-*a*, inicialmente, fueron ligeramente superiores en la condición Futuro que en la Presente, pero se observó una reducción de las mismas en todos los tratamientos hacia el día 3; sin embargo, en adelante, este patrón se invirtió, con muestras bajo la condición Presente mostrando tasas significativamente más altas, principalmente en el tratamiento Estático (Fig. 4.5b). La relación entre las tasas de producción de oxígeno en muestras expuestas a irradiancias fluctuantes frente a las expuestas a irradiancias fijas ( $\text{Oxi}_M/\text{Oxi}_E$ ) (Fig. 4.5c) para las condiciones Presente y Futuro mostró patrones similares, aumentando hacia el día 2 y luego disminuyendo hasta el final del experimento (Fig. 4.5c). Los valores de  $\text{Oxi}_M/\text{Oxi}_E < 1$  en las muestras bajo la condición Presente, y similar durante todo el experimento (excepto el día 2 con valores de alrededor de 1) indican una menor tasa de producción de oxígeno a lo largo del día para las muestras del tratamiento Mezcla respecto a las del Estático. Por su parte, en la condición Futuro la relación  $\text{Oxi}_M/\text{Oxi}_E$  mostró, al comienzo del experimento, un valor ca. 1, mientras que en el día 2 se produjo un marcado aumento, sin embargo, esta diferencia entre los tratamientos desapareció con el transcurso del experimento (Fig. 4.5c).

Se graficaron las tasas de producción de oxígeno normalizadas por Clor-*a* en función de las tasas de inhibición (*k*) para todos los tratamientos, y se pudo observar que una mayor inhibición en el FSII estaba asociada con menores tasas de producción de oxígeno (Fig. 4.6).



**Fig. 4.5(a)** Concentración de oxígeno ( $\mu\text{mol O}_2 \mu\text{g Chlor-}a^{-1}$ ) e irradiancias PAR ( $\text{W m}^{-2}$ ) a lo largo del experimento, (b) Tasas diarias de producción de oxígeno ( $\mu\text{mol O}_2 \mu\text{g Chlor-}a^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) (c) Relación entre las tasas de producción de oxígeno calculadas diariamente para los tratamientos de Mezcla y Estático ( $\text{Oxi}_M / \text{Oxi}_E$ ) para las condiciones Presente y Futuro, a lo largo del experimento. Las letras minúsculas y mayúsculas representan diferencias significativas entre días para las condiciones Presente y Futuro, respectivamente ( $p < 0.05$ ). Las líneas verticales representan las desviaciones estándar.

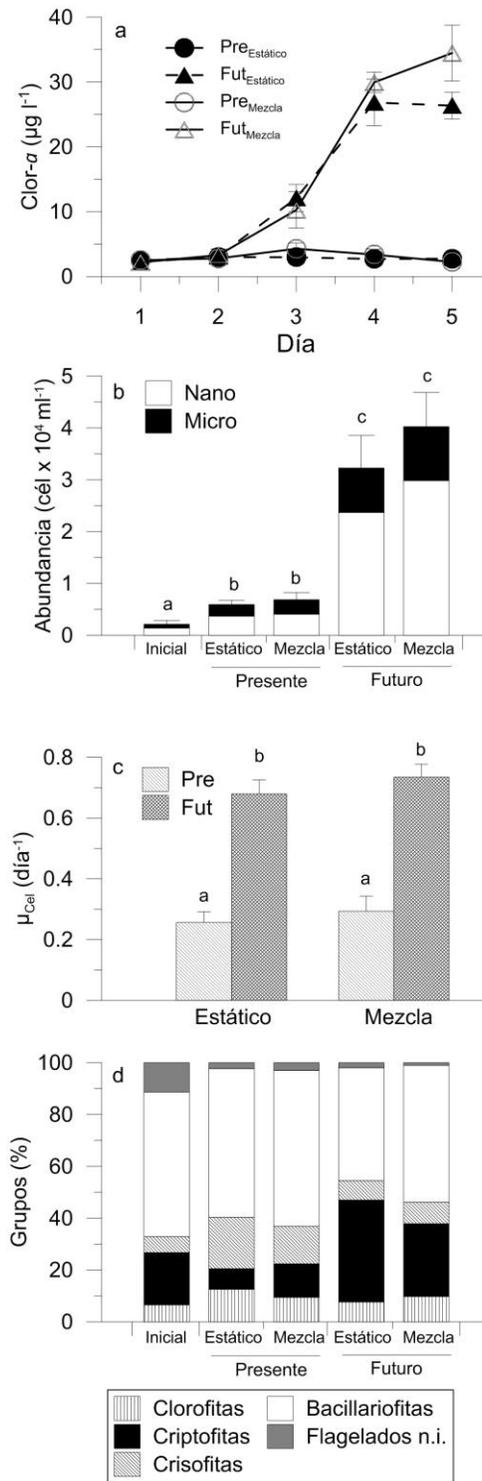


**Fig. 4.6** Tasa de producción de oxígeno en función de las tasas de inhibición ( $k$ ) para los experimentos realizados con la comunidad del régimen externo. Las líneas negras y grises, continuas y discontinuas corresponden a ajustes exponenciales realizados para cada tratamiento.

### **4.3.3 Comunidad del régimen interno:**

Las concentraciones de Clor-*a* (Fig. 4.7a) fueron similares ( $\sim 3\mu\text{g l}^{-1}$ ) a lo largo del experimento bajo la condición Presente, sin diferencias significativas entre los tratamientos Estático y Mezcla; sin embargo, las muestras bajo la condición Futuro tuvieron una fase de latencia de un día, pero luego crecieron rápidamente, alcanzando valores de Clor-*a* de 34.5 y 26.9  $\mu\text{g l}^{-1}$  en los tratamientos Mezcla y Estático, respectivamente. En cuanto a la abundancia celular se observó un incremento respecto a la concentración inicial (Fig. 4.7b), y hacia el final de los experimentos las muestras bajo la condición Presente tuvieron valores significativamente menores ( $\sim 0.6 \times 10^4 \text{cél ml}^{-1}$ ) que las de Futuro ( $3.2\text{-}4 \times 10^4 \text{cél ml}^{-1}$ ), sin diferencias significativas entre las abundancias totales de los tratamientos Estático y Mezcla dentro de cada condición experimental.

A pesar de que la concentración de Clor-*a* en la condición Presente fue similar en ambos tratamientos a lo largo del experimento, se observó un aumento en la abundancia celular, siendo las tasas de crecimiento (Fig. 4.7c) luego de 5 días, similares para los tratamientos Estático y Mezcla, con valores de  $\sim 0.27 \text{ día}^{-1}$ . Por otra parte, en la condición Futuro tampoco se observó diferencias entre los tratamientos Estático y Mezcla, siendo las tasas de crecimiento  $> 0.70 \text{ día}^{-1}$ . La comunidad estuvo siempre dominada por células nanoplanctónicas (Fig. 4.7b), tanto al inicio como al final del experimento, pero con algunos cambios en la proporción relativa de los grupos dominantes hacia el final (Fig. 4.7d). Si bien las diatomeas fueron dominantes en todos los tratamientos ( $> 43\%$ ), hubo un aumento relativo de las criptofitas en la condición Futuro, y una disminución de éstas en el Presente, en relación a las muestras iniciales.



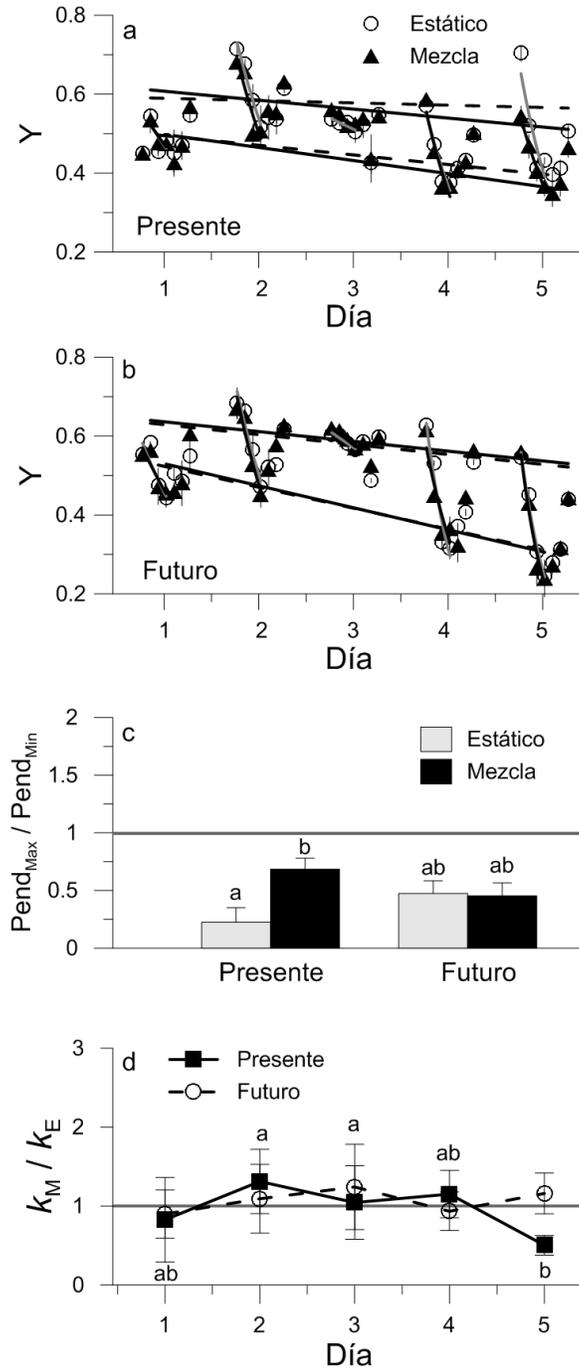
**Fig. 4.7** (a) Concentración de Clor-*a* ( $\mu\text{g l}^{-1}$ ) a lo largo del experimento, (b) Abundancia celular ( $\text{cel} \times 10^4 \text{ ml}^{-1}$ ) al inicio y al final del experimento, (c) Tasa de crecimiento en función de la abundancia de células ( $\text{día}^{-1}$ ), (d) Porcentaje basado en la abundancia de grupos taxonómicos al inicio y al final del experimento realizado con la comunidad del régimen interno.

### *Fotoquímica del FSII:*

El patrón general de Y durante los ciclos diarios fue de una disminución hacia el mediodía y un aumento en la tarde, con una recuperación parcial en la mayoría de los casos (Fig. 4.8a, b). Se observó una mayor inhibición de Y con el transcurso del experimento, especialmente en las muestras de la condición Futuro (con la excepción del día 3 en el que casi no se registró inhibición y recuperación debido a bajos niveles de radiación) (Fig. 4.8b). No hubo diferencias entre las tasas de inhibición ( $k$ ) para los tratamientos Estático y Mezcla para cada condición experimental (Presente y Futuro) a excepción del último día, donde las muestras del tratamiento Estático mostraron mayores inhibiciones que aquellas del tratamiento Mezcla.

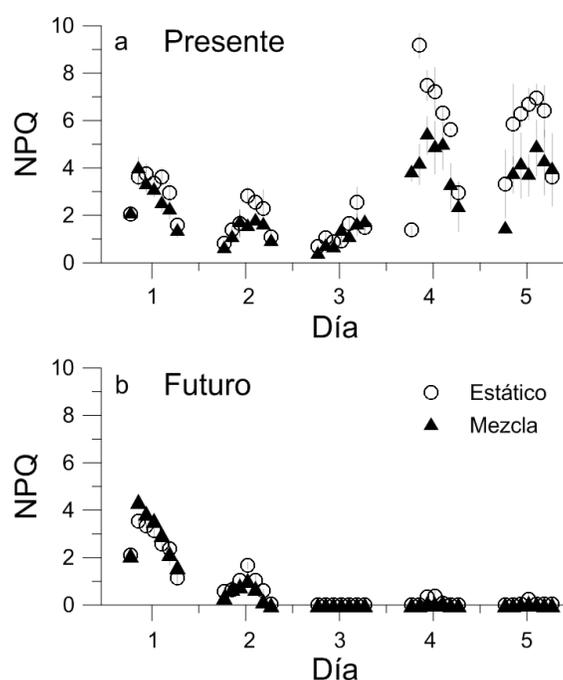
La relación  $Pend_{Max}/Pend_{Min}$  fue  $< 1$  en todas las condiciones / tratamientos, indicando que, con los días, la inhibición diaria fue en aumento, como así también la recuperación del daño reversible. Es decir que la diferencia entre los valores máximos y mínimos de Y aumentó a lo largo del experimento (Fig. 4.8c). Por otra parte, en la condición Presente las muestras bajo el tratamiento Estático mostraron valores de  $Pend_{Max}/Pend_{Min}$  menores que en el tratamiento Mezcla; en la condición Futuro, sin embargo, esta relación fue similar en ambos tratamientos (Fig. 4.8c).

Por otra parte, las muestras bajo la condición Presente tuvieron una inhibición similar en ambos tratamientos ( $k_M/k_E \sim 1$ ) (Fig. 4.8d) en los primeros 4 días del experimento, pero hacia el último día la inhibición bajo el tratamiento Mezcla fue menor que en el Estático ( $k_M/k_E < 1$ ). Las muestras bajo la condición Futuro tuvieron una inhibición similar tanto bajo irradiancias fijas como fluctuantes ( $k_M/k_E \sim 1$ ) durante todo el experimento (Fig. 4.8d).



**Fig. 4.8** Rendimiento fotoquímico (Y) a lo largo del experimento para las condiciones (a) Presente y (b) Futuro. Las líneas continuas y discontinuas representan los ajustes lineales para los tratamientos Mezcla y Estático, respectivamente, (c) Relación entre las pendientes de las rectas obtenidas a partir de los valores máximos y mínimos de Y ( $Pend_{Max}/Pend_{Min}$ ) para los distintos tratamientos, (d) Relación entre las tasas de inhibición de los tratamientos Mezcla y Estático ( $k_M/k_E$ ) a lo largo de los 5 días de duración del experimento realizado con la comunidad del régimen interno. Las letras minúsculas representan diferencias significativas entre días para la condición Presente ( $p < 0.05$ ), en la condición Futuro no se observaron diferencias entre los días. Las líneas verticales representan las desviaciones estándar.

La disipación de energía en forma de calor (NPQ) (Fig. 4.9) en la condición Presente, osciló entre 0.2 y 9 a lo largo del experimento, con una ligera disminución hacia los primeros tres días, y luego con un aumento hacia el final, tanto para el tratamiento Estático como Mezcla. En estos últimos dos días de experimentación, se registró mayor cantidad de energía disipada como calor para los tratamientos Estático (Fig. 4.9a). Por otro lado, las muestras de la condición Futuro se comportaron de manera distinta, con valores de NPQ entre 1 - 4.5 al inicio del experimento, y luego con una importante disminución, llegando a valores ca. 0 en los últimos 3 días de experimentación tanto para el tratamiento Estático como Mezcla (Fig. 4.9b).



**Fig. 4.9** NPQ a lo largo del experimento para las condiciones (a) Presente y (b) Futuro. Los círculos y triángulos corresponden a los tratamientos Estático y Mezcla, respectivamente. Las líneas verticales representan las desviaciones estándar.

#### *Radiación solar:*

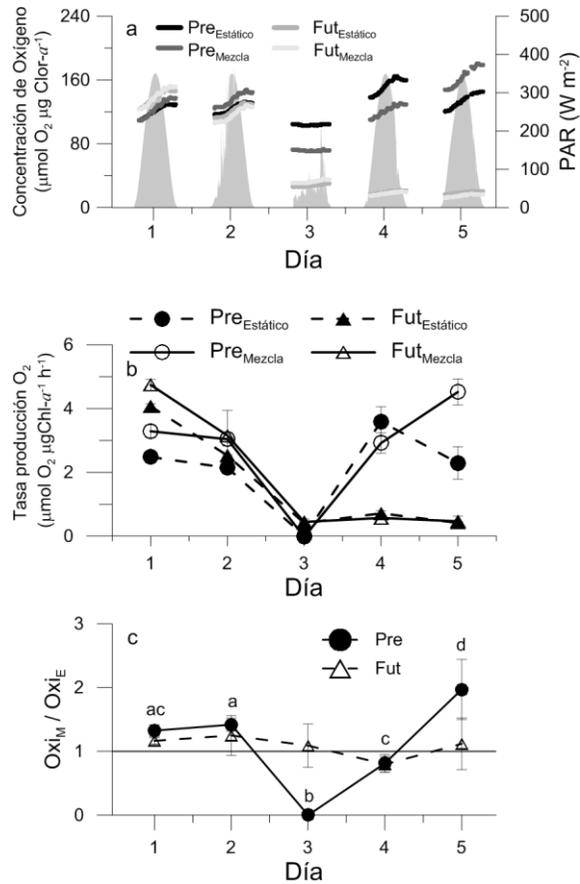
Las condiciones de radiación solar incidente fueron, en general, de cielos despejados con valores máximos de  $\sim 350 \text{ Wm}^{-2}$  para irradiancias PAR al mediodía, a excepción del día 3 que tuvo alta cobertura de nubes y los niveles de radiación fueron muy bajos, con irradiancias PAR al mediodía  $< 70 \text{ W m}^{-2}$  (Fig. 4.10a). Las dosis solares fueron similares para los tratamientos Estáticos y Mezcla (debido al set-up experimental), con valores promedio diarios de PAR de  $2.1 \text{ MJm}^{-2}$ .

### *Evolución de oxígeno:*

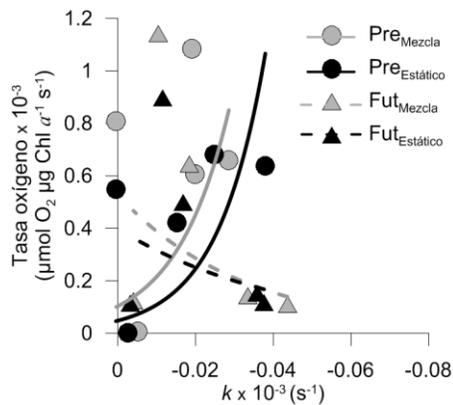
Todos los tratamientos / condiciones mostraron un aumento en la concentración de oxígeno (i.e., producción) a lo largo del día, excepto el día 3 en que las tasas de oxígeno fueron cercanas a cero debido a los muy bajos niveles de radiación (Fig. 4.10a). Para el resto de los días, la concentración de oxígeno normalizada por  $\text{Clor-}a$  fue variable a lo largo del experimento, dependiendo de la condición / tratamiento impuesto a las muestras. Al inicio de los experimentos se obtuvieron valores similares en todas las condiciones / tratamientos ( $\sim 110\text{-}130 \mu\text{mol O}_2 \mu\text{g Clor-}a^{-1}$ ), mientras que a medida que transcurrió el experimento se observaron diferencias entre las condiciones Presente y Futuro (Fig. 4.10a). Las tasas de producción de  $\text{O}_2$  diarias normalizada por  $\text{Clor-}a$  fueron inicialmente mayores en la condición Futuro que en la Presente, y a su vez dentro de cada condición, los tratamientos Mezcla mostraron tasas más elevadas. Sin embargo, disminuyeron en todos los tratamientos hasta valores cercanos a 0 para el día 3 (coincidente con bajas irradiancias solares), pero hacia el final, se observó un aumento importante en la condición Presente, principalmente en el tratamiento Mezcla (Fig 4.10b).

La relación entre las tasas de producción de oxígeno en muestras expuestas a irradiancias fluctuantes frente a las expuestas a irradiancias fijas ( $\text{Oxi}_M/\text{Oxi}_E$ ) (Fig. 4.10b) fue en general similar a lo largo del experimento en la condición Futuro, con un valor ca. 1, lo que indicó que la tasa de producción de oxígeno fue similar en los dos tratamientos. En los días 1 y 2, y bajo la condición Presente, los valores fueron ligeramente  $> 1$ , pero en el día 3, esta relación se redujo a ca. 0, coincidiendo con los muy bajos niveles de radiación durante este día. Luego,  $\text{Oxi}_M/\text{Oxi}_E$  aumentó, alcanzando valores  $\sim 2$ , lo que significó mayor producción de oxígeno en muestras bajo el tratamiento Mezcla respecto a aquellas bajo el tratamiento Estático (Fig. 4.10b).

Al comparar las tasas de producción de  $\text{O}_2$  con la inhibición ( $k$ ) en el FSII, se observó que en ambos tratamientos de la condición Futuro, la producción de  $\text{O}_2$  disminuía con la inhibición, mientras que en los tratamientos de la condición Presente ocurría lo opuesto (aunque los ajustes no fueron muy robustos para estos tratamientos) (Fig. 4.11).



**Fig. 4.10** (a) Concentración de oxígeno ( $\mu\text{mol O}_2 \mu\text{g Chlor}^{-1} \text{a}^{-1}$ ) e irradiancias PAR ( $\text{W m}^{-2}$ ), (b) Tasas diarias de producción de oxígeno ( $\mu\text{mol O}_2 \mu\text{g Chlor}^{-1} \text{a}^{-1} \text{h}^{-1}$ ), (c) Relación entre las tasas de producción de oxígeno calculadas para los tratamientos Mezcla y Estático ( $\text{Oxi}_M / \text{Oxi}_E$ ) para las condiciones Presente y Futuro, a lo largo del experimento. Las letras minúsculas representan diferencias significativas entre días para la condición Presente ( $p < 0.05$ ), en la condición Futuro no se observaron diferencias entre días. Las líneas verticales representan las desviaciones estándar.



**Fig. 4.11** Tasa de producción de oxígeno en función de las tasas de inhibición ( $k$ ) para los experimentos del régimen interno. Las líneas negras y grises, continuas y discontinuas corresponden a ajustes exponenciales realizados para cada tratamiento.

#### **4.4 Discusión:**

##### *Diferencias entre las condiciones Presente y Futuro:*

Se sabe que la radiación solar (tanto PAR como RUV) es una de las variables ambientales más importantes que determinan el rendimiento fotosintético (Y) de los organismos autótrofos. Sin embargo, en estos experimentos no se observaron generalmente diferencias entre los tratamientos de radiación, siendo las longitudes de onda pertenecientes a PAR las que regularon en su mayoría los valores de Y. Existen dos tipos de inhibición fotosintética: la inhibición crónica, debida a la degradación de la proteína D1 (que es un componente estructural de los fotosistemas), y la inhibición dinámica o reversible, que consiste en un mecanismo de protección a través del cual los organismos disipan el exceso de energía a fin de prevenir el fotodaño (Hanelt, 1996). El grado de fotoinhibición depende de varios factores, tales como los niveles de radiación que reciben las células, la sensibilidad diferencial de las especies, y de factores ambientales de estrés, tales como la salinidad y la temperatura, entre otros. Además, el grado de fotoinhibición, está determinado por el equilibrio entre la tasa de daño al FSII y su velocidad de reparación. Algunos trabajos sugieren que la exposición a factores de estrés ambiental, no afectan el fotodaño, pero inhiben la reparación del FSII a través de la supresión de la síntesis de proteínas del FSII (principalmente la proteína D1) (Takahashi y Murata, 2008).

En ambos experimentos de este trabajo se observó que las muestras (independientemente del tratamiento) generalmente sufrieron un daño crónico a lo largo de los días. Esto se evidenció en la disminución de los valores iniciales de Y a medida que progresaba el experimento (Figs. 4.3a, b; 4.8a, b). Además, las diferencias en los valores de Y entre la mañana o el atardecer y los valores al mediodía se hicieron cada vez más evidentes a medida que progresaba la aclimatación, principalmente en los tratamientos pertenecientes a la condición Futuro. En la condición Presente del experimento realizado con la comunidad del régimen externo, por el contrario, si bien se observó un mayor daño crónico con el transcurso de los días, las diferencias entre los valores de Y dentro de cada día se redujeron. Estas diferencias entre las condiciones Presente y Futuro coinciden con los resultados obtenidos en experimentos realizados en otros estuarios (Bouchard et al., 2008) donde se observó que a medida que los nutrientes se volvían limitantes dentro de los microcosmos, el fitoplancton mostraba una mayor sensibilidad a la radiación y sufría más daño en los centros de reacción del FSII. Esta mayor sensibilidad a la radiación para las muestras incubadas en la condición Futuro también podría estar asociada con la acidificación, que puede aumentar la sensibilidad de algunas especies de fitoplancton marino y de río a la RUV (Sobrino et al., 2008).

Además, las diferencias en las respuestas para las condiciones Presente y Futuro de ambos experimentos pueden estar asociadas con los mecanismos de disipación de energía, ya que en el primero se observó un aumento del NPQ a medida que avanzaron los días, mientras que en el último los valores disminuyeron (Figs. 4.4, 4.9). Esta disminución de los valores de NPQ en la condición Futuro concuerda con otros estudios (Villafañe et al., 2014), donde se encontraron valores más altos de NPQ al comienzo del experimento (i.e., en células no aclimatadas) o en condiciones menos favorables después de unos días de aclimatación.

Asimismo, existen otras vías de disipación tales como variación en el tamaño de la antena captadora de energía o la reparación del daño causado en la proteína D1 (Bouchard et al., 2005). Si bien estas respuestas no fueron evaluadas en este trabajo, se conoce que pueden ser vías efectivas ante un posible daño sobre el aparato fotosintético. Debido a que el NPQ disminuyó en la condición Futuro de ambos experimentos a medida que pasaron los días, pero la inhibición continuó siendo importante, esto podría estar indicando un daño importante en la estructura y funcionamiento de los fotosistemas en relación a la cantidad de energía recibida. Dado que la recuperación de los fotosistemas se encuentra relacionada directamente con la síntesis de la proteína D1, y al no observarse una recuperación total del rendimiento fotosintético a lo largo del día, conjuntamente con una disminución en el mismo en el transcurso de los experimentos, se podría pensar que hubo algún tipo de daño en la síntesis de esta proteína, asociado a la formación de especies reactivas de oxígeno (Zhang et al., 2013). Además, se ha observado que el exceso de radiación puede afectar la primera etapa de la fase luminosa de la fotosíntesis responsable de la extracción de los electrones del agua por parte del FSII, produciendo una alteración en la reacción de división de la molécula de agua y provocando una disminución en la producción de oxígeno (Kataria et al., 2014). Las menores tasas de producción de oxígeno obtenidas en los experimentos generalmente estuvieron asociadas a una mayor inhibición (mayores valores absolutos de  $k$ ) en el FSII (Figs. 4.6 y 4.11), a excepción de la condición Presente del régimen interno (aunque los ajustes no fueron muy robustos). El aumento en la fotoinhibición del FSII podría ser producto del impacto directo de un exceso de radiación en el FSII (i.e., aumento del daño y disminución de las tasas de reparación) y por consecuencia indirecta de una alteración en las enzimas involucradas en la ruptura de la molécula de agua (Lavaud et al., 2012).

Por otra parte, los cambios en las comunidades a lo largo del experimento concuerdan con los obtenidos por Villafañe et al. (2015) para comunidades del régimen externo del estuario. En ese trabajo si bien no se evaluaron efectos de la mezcla, se observó que el efecto de un escenario futuro (con condiciones de mayor disponibilidad de nutrientes y acidificación) junto con la radiación solar, cambian la composición de la comunidad de fitoplancton hacia una dominada por diatomeas con altas tasas de crecimiento, como se vio en este trabajo, con un incremento en la proporción de diatomeas céntricas principalmente (Fig. 4.2). Por su parte Durán-Romero et al. (2017) trabajando con comunidades del post-bloom del régimen externo, observaron que si bien hacia el final de los experimentos los flagelados eran los más abundantes, había un incremento en la proporción relativa de diatomeas respecto del inicio cuando las muestras eran sometidas a un escenario futuro. Las mayores tasas de crecimiento y cambios en la composición de comunidades en condiciones de acidificación y aumento de nutrientes (Figs. 4.2c, d; 4.7c, d) también han sido observadas en trabajos experimentales y modelados matemáticos donde se concluye que estas variables pueden alterar la sucesión de fitoplancton, afectando así la dinámica trófica en el futuro (Flynn et al., 2015).

*Diferencias entre irradiancias fijas y fluctuantes:*

Los principales efectos de las irradiancias fluctuantes en el fitoplancton incluyen cambios en la fotoaclimatación (Falkowski y Wirick, 1981; Cullen y Lewis, 1988), con variaciones en la actividad fotosintética y en la fijación de carbono (Helbling et al., 2003; Villafañe et al., 2007), como así también en la composición taxonómica (Huisman et al., 2004). Asimismo, se ha determinado que las respuestas a los regímenes fluctuantes de radiación son también especie-específicas (Huisman et al., 1999). En la comunidad marina, y al comienzo del experimento bajo concentraciones de nutrientes ambiente (condición Presente), las muestras que recibieron irradiancias fluctuantes tuvieron mayores tasas de inhibición y menor producción de oxígeno que si eran expuestas a irradiancias fijas dentro de la CSM (Figs. 4.3d, 4.5b). Estos resultados son opuestos a aquellos obtenidos para comunidades del post-bloom en el área de estudio (Barbieri et al., 2002) pero coinciden con trabajos realizados en Antártida donde se observó mayor fotoinhibición en muestras expuestas a regímenes fluctuantes (Helbling et al., 1994; Neale et al., 1998), debido a que la mezcla vertical poco profunda resultaba en una mayor exposición del fitoplancton a la radiación y esto causaba una disminución de la productividad primaria (Helbling et al. 1994). Por el contrario, en el régimen interno se determinaron, al inicio del experimento, mayores tasas de

inhibición y menor producción de oxígeno en las muestras expuestas a irradiancias fijas (Figs. 4.8d, 4.10b). Estas respuestas diferenciales para ambos experimentos pueden estar asociadas a la distinta composición taxonómica de las comunidades de ambos extremos del estuario (i.e., comunidades dominadas por flagelados en el régimen externo, y por diatomeas en el interno), y a su distinta historia lumínica (comunidades adaptadas a ambientes más transparentes en el régimen externo y a ambientes más turbios en el interno). Algunos estudios realizados con comunidades antárticas han demostrado que, en general, los flagelados son más vulnerables a la RUV que las diatomeas (Villafañe et al., 1995b), mientras que Kopczynska (1992) y Villafañe et al. (1995a) han reportado la presencia de flagelados en áreas de mezcla profunda, por lo que se espera que estos organismos sean más sensibles a la RUV debido a su historia previa lumínica a bajas irradiancias medias, coincidiendo con los resultados obtenidos aquí de mayor inhibiciones en la comunidad marina dominadas por este grupo. Sin embargo, la respuesta de las comunidades de ambos extremos del estuario cambió a medida que avanzaba el experimento, coincidiendo con estudios de mediano plazo donde las incubaciones a irradiancias fijas condujeron a valores de inhibición más bajos (durante el día 1) o más altos (después de varios días) en comparación con las muestras mezcladas (Bertoni et al., 2011). Al final del experimento, las diferentes tasas de inhibición y producción de oxígeno con respecto al comienzo del experimento podrían estar relacionadas con los procesos de aclimatación (Banaszak, 2003) o por los cambios observados en la estructura de las comunidades de fitoplancton (Figs. 4.2d; 4.7d) (Sommaruga, 2003). Por otro lado, el efecto del aporte de nutrientes y la acidificación (i.e., condición Futuro) fue similar a lo largo del experimento (tanto para los tratamientos Estático como Mezcla), con excepción del día 5 en el régimen externo (Figs. 4.3d, 4.5b, 4.8d, 4.10b). Este cambio después de 5 días de exposición podría estar relacionado al hecho de que las células expuestas a acidificación (condición Futuro) experimentan un alto estrés lumínico en comparación con las células en la condición Presente, debido a que los mecanismos de concentración de C inorgánico están regulados negativamente por la acidificación (Hoppe et al., 2015). Esto podría resultar en una menor capacidad para hacer frente a altas irradiancias y podría aumentar la fotoinhibición del FSII bajo irradiancias fluctuantes (Beardall y Giordano, 2002); en cambio, bajo irradiancias constantes, la fotoaclimatación a altos niveles de radiación no sería necesaria (Hoppe et al., 2015).

En base a los resultados presentados aquí, se propone que un escenario de cambio global futuro producirá aumentos significativos en la inhibición fotoquímica del FSII y disminución en la producción de oxígeno, y cambiará la composición de la comunidad de ambos regímenes del

estuario del río Chubut. Sin embargo, y dado que la interacción de estos factores (i.e., radiación solar, agregado de nutrientes, mezcla y acidificación) no se ha examinado previamente por manipulación experimental simultánea, será necesario obtener más información para comprender completamente las respuestas de los organismos autótrofos tanto a corto como a mediano plazo y para las comunidades que se van sucediendo a lo largo de la sucesión anual.

## **Capítulo 5:**

# ***Conclusiones Generales***

Las aguas costeras del Océano Atlántico Sur (OAS) son una de las más productivas del mundo, mantenida por densas floraciones de fitoplancton. Estas floraciones se han asociado a condiciones climáticas calmas que permiten la formación de una capa superficial de mezcla (CSM) poco profunda y bien iluminada. En Bahía Engaño, históricamente, las floraciones de invierno alcanzaban su máxima concentración de Clor-*a* y de abundancia de células en el mes de junio y estaban dominadas casi en su totalidad por la diatomea microplanctónica *Odontella aurita*. Sin embargo, durante el año 2015 se observó un nuevo patrón meteorológico, con muchos días de vientos fuertes de dirección Norte, apartándose de las condiciones calmas observadas en el pasado. Este nuevo patrón de viento fue el factor más importante que afectó a la dinámica del fitoplancton del régimen externo del estuario del Río Chubut, impidiendo el inicio de la floración a inicios del invierno durante el año 2015 que, en cambio, ocurrió hacia el final del mismo (agosto). Además, la floración del año 2015 tuvo una mayor proporción de células nanoplanctónicas (en comparación con los datos históricos) y estuvo co-dominada por *Odontella aurita* y *Thalassiosira* spp. Así, estos resultados permitieron responder a la primera hipótesis planteada:

*H1: En condiciones de alta intensidad y duración de viento, no se desarrollará el bloom invernal de fitoplancton, característico de la región Patagónica.*

En base a los resultados descriptos anteriormente, **no se rechaza la H1**. Estos resultados se muestran en el **Capítulo 2** y sirvieron como línea de base para conocer las condiciones actuales bajo las cuales se encuentra el fitoplancton. Para poder responder otros objetivos e hipótesis planteados en esta Tesis, se hizo necesario realizar experimentos con comunidades naturales a lo largo de la sucesión anual. En el **Capítulo 3** se pusieron a prueba las siguientes hipótesis:

*H2) El aporte de nutrientes actúa en forma antagónica con la RUV y una CSM poco profunda, contrarrestando los efectos negativos de los mismos sobre la eficiencia fotoquímica a corto plazo.*

La **H2 se rechaza** tanto para las comunidades marinas como de río a lo largo del año ya que el agregado de nutrientes no tuvo generalmente efecto sobre las tasas de inhibición y recuperación durante el día 1 de los experimentos, y esto puede estar relacionado con el hecho de que las especies necesitan tiempo para aclimatarse a las nuevas condiciones.

*H3) El aporte de nutrientes, conjuntamente con una CSM poco profunda selecciona, a largo plazo, células grandes (i.e., microplancton) aclimatadas a altas irradiancias.*

Si bien hacia el final de los experimentos realizados con comunidades marinas, en la mayoría de los casos, las células nanoplanctónicas fueron las dominantes, se observó un aumento en la proporción de células grandes (i.e., microplancton), principalmente en aquellos tratamientos que recibieron nutrientes adicionales y que fueron expuestos a una CSM somera. Asimismo, hacia el final de los experimentos realizados con comunidades de río también se observó dominancia de células nanoplanctónicas, pero no se detectó un aumento en la proporción de células de mayor tamaño, e incluso en algunos casos esta se vio reducida. Por lo tanto, la **H3 no se rechaza** para las comunidades del régimen externo (mar), pero **se rechaza** para las comunidades del régimen interno (río).

*H4) El impacto conjunto de la radiación solar, CSM poco profunda y aumento de nutrientes es: H4a) mayor en invierno que en verano, y H4b) mayor en el río que en el mar.*

Para responder a estas hipótesis se considera por un lado la estacionalidad, y por otro lado las diferencias entre las comunidades de río y mar:

Los resultados obtenidos para el régimen externo, mostraron que las células de fitoplancton que dominaron en el período del bloom (i.e., comunidades de invierno) presentaron mayor fotoinhibición y mayor daño no reparado a lo largo del día, que las comunidades del pre- y post-bloom. Las comunidades del régimen interno, por su parte, mostraron tasas de inhibición y de recuperación similares a lo largo del año. En base a estos resultados **no se rechaza la H4a** para las comunidades marinas, pero **se rechaza** para las de río.

Por otro lado, al comparar las respuestas entre las comunidades estudiadas (i.e., mar y río) se observó que las tasas de inhibición y de recuperación (y por lo tanto, el daño no reparado a lo largo del día) al inicio y al final de los experimentos fueron generalmente similares para ambas comunidades. Además, hacia el final de los experimentos, en las comunidades marinas se observó reducción en los ETR, pero este patrón no fue observado en las de río. Los resultados sugieren que las comunidades de río se aclimataron mejor a las nuevas condiciones impuestas y además estas comunidades mostraron tasas de crecimiento y abundancias superiores respecto a las comunidades marinas, hacia el final de los experimentos. En base a esto **se rechaza la H4b**.

Finalmente en el **Capítulo 4** se evaluó la última hipótesis de esta Tesis:

*H5) Las condiciones futuras de cambio global de bajo pH, altos nutrientes y RUV, junto a la fluctuación de radiación dentro de la CSM, cambia la composición taxonómica y estructura de tamaños de la comunidad fitoplanctónica, beneficiando a células más resistentes y de mayor tamaño, y con mayores tasas fotosintéticas.*

Los resultados de los experimentos realizados con comunidades del post-bloom de los regímenes externo e interno del estuario mostraron que tanto al inicio como al final de los experimentos las células nanoplanctónicas fueron las predominantes. Sin embargo se observó que bajo la condición Futuro, la composición de la comunidad de fitoplancton cambia hacia una dominada por diatomeas (con un incremento en la proporción de aquellas de mayor tamaño), acompañado de un leve aumento de los dinoflagelados para el régimen externo, y un aumento en la proporción de criptofitas (i.e., nanoplancton) para el régimen interno, con altas tasas de crecimiento. En base a esto es que **no se rechaza la H5** para las comunidades marinas, pero se **rechaza** para las de río.

### ***5.1 Perspectivas futuras de investigación:***

En base a estos resultados, es evidente la importancia de implementar programas de control y de monitoreo en el estuario del Río Chubut a lo largo del tiempo, considerando variables relacionadas con el clima (e.g., radiación, temperatura, vientos, precipitaciones) y/o con actividades humanas (e.g., cantidad de nutrientes de origen antrópico, efluentes provenientes de industrias pesqueras, fertilizantes agrícolas) para obtener información y datos certeros que permitan a los políticos y gestores ambientales tomar decisiones. Además, resulta necesario realizar experimentos con comunidades fitoplanctónicas de ambos extremos del estuario a lo largo del año donde se evalúen de manera conjunta otras variables (además de las aquí consideradas), tales como la temperatura. Finalmente, es necesario tener en cuenta la interacción de estas comunidades con otros niveles tróficos, para comprender de manera más completa las potenciales respuestas de los ecosistemas acuáticos en un escenario de cambio global.

# ***Bibliografía:***

- Acker, J.G., Leptoukh, G. (2007) Online analysis enhance NASA Earth science data. EOS, Transactions American Geophysical Union 88, 14-17.
- Agustí, S., González-Gordillo, J.I., Vaqué, D., Estrada, M., Cerezo, M.I., Salazar, G., Duarte, C.M. (2015) Ubiquitous healthy diatoms in the deep sea confirm deep carbon injection by the biological pump. Nature Communications 6, 8.
- Alverson, K.D., Bradley, R.S. (2003) Paleoclimate, global change and the future. Springer Science & Business Media, New York, USA.
- Anderson, D.M. (1997) Bloom dynamics of toxic Alexandrium species in the northeastern U.S. Limnology and Oceanography 42, 1009-1022.
- Anthony, K.R.N., Kline, D.I., Diaz-Pulido, G., Dove, S., Hoegh-Guldberg, O. (2008) Ocean acidification causes bleaching and productivity loss in coral reef builders. Proceedings of the National Academy of Sciences 105, 17442-17446.
- Antolini, L. (2012) Percepción del riesgo y dinámica de uso de plaguicidas agrícolas en el Valle Inferior del Río Chubut. Ministerio de Salud, Argentina 1, 1-183.
- Arrigo, K.R., Brown, C.W. (1996) Impact of chromophoric dissolved organic matter on UV inhibition of primary productivity in the sea. Marine Ecology Progress Series 140, 207-216.
- Arrigo, K.R., Weiss, A.M., Smith Jr., W.O. (1998) Physical forcing of phytoplankton dynamics in the southwestern Ross Sea. Journal of Geophysical Research 103, 1007-1021.
- Arvanitoyannis, I.S., Kassaveti, A. (2008) Fish industry waste: treatments, environmental impacts, current and potential uses. International Journal of Food Science and Technology 43, 726-745.
- Atkinson, R.J., Matthews, W.A., Newman, P.A., Plumb, R.A. (1989) Evidence of the mid-latitude impact of Antarctic ozone depletion. Nature 340, 290-294.
- Balch, W.M., Drapeau, D.T., Bowler, B.C., Lyczkowski, E.R., Lubelczyk, L.C., Painter, S.C., Poulto, A.J. (2014) Surface biological, chemical, and optical properties of the Patagonian Shelf coccolithophore bloom, the brightest waters of the Great Calcite Belt. Limnology and Oceanography 59, 1715-1732.
- Ballaré, C.L., Caldwell, M.M., Flint, S.D., Robinson, S.A., Bornman, J.F. (2011) Effects of solar ultraviolet radiation on terrestrial ecosystems. Patterns, mechanisms, and interactions with climate change. Photochemical & Photobiological Sciences 10, 226-241.
- Banaszak, A.T., (2003) Photoprotective physiological and biochemical responses of aquatic organisms, in: Helbling, E.W., Zagarese, H.E. (Eds.), UV effects in aquatic organisms and ecosystems. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, 329-356.
- Barbieri, E.S., Villafañe, V.E., Helbling, E.W. (2002) Experimental assessment of UV effects upon temperate marine phytoplankton when exposed to variable radiation regimes. Limnology and Oceanography 47, 1648-1655.
- Barbieri, E.S., Villafañe, V.E., Helbling, E.W. (2006) Dynamics of oxygen production / consumption in *Dunaliella salina*, *Thalassiosira weissflogii* and *Heterocapsa triquetra* circulating within a simulated upper mixed layer. Investigaciones Marinas 24, 97-108.

- Bauer, J.E., Cai, W.-J., Raymond, P.A., Bianchi, T.S., Hopkinson, C.S., Regnier, P.A.G. (2013) The changing carbon cycle of the coastal ocean. *Nature* 5, 61-70.
- Beardall, J., Giordano, M. (2002) Ecological implications of microalgal and cyanobacterial CO<sub>2</sub> concentrating mechanisms, and their regulation. *Functional Plant Biology* 29, 335-347.
- Beardall, J., Raven, J.A. (2004) The potential effects of global climate change on microalgal photosynthesis, growth and ecology. *Phycologia* 43, 26-40.
- Beardall, J., Stojkovic, S., Gao, K. (2014) Interactive effects of nutrient supply and other environmental factors on the sensitivity of marine primary producers to ultraviolet radiation: Implications for the impacts of global change. *Aquatic Biology* 22, 5-23.
- Behrenfeld, M.J., Boss, E.S. (2014) Resurrecting the ecological underpinnings of ocean plankton blooms. *Annual Review of Marine Science* 6, 167-194.
- Behrenfeld, M.J., O'Malley, R.T., Siegel, D.A., McClain, C.R., Sarmiento, J.L., Feldman, G.C., Milligan, A.J., Falkowski, P.G., Letelier, R.M., Boss, E.S. (2006) Climate-driven trends in contemporary ocean productivity. *Nature* 444, 752-755.
- Bermejo, P., Helbling, E.W., Durán-Romero, C., Cabrerizo, M.J., Villafañe, V.E. (2018) Abiotic control of phytoplankton blooms in temperate coastal marine ecosystems: A case study in the South Atlantic Ocean. *Science of the Total Environment* 612, 894–902.
- Bertoni, R., Jeffrey, W.H., Pujo-Pay, M., Oriol, L., Joux, F. (2011) Influence of water mixing on the inhibitory effect of UV radiation on primary and bacterial production in Mediterranean coastal water. *Aquatic Science* DOI 10.1007/s00027-011-0185-8.
- Björn, L.O., Murphy, T.M. (1985) Computer calculation of solar ultraviolet radiation at ground level. *Physiologie Vegetale* 23, 555-561.
- Boschi, E.E. (1997) Las pesquerías de crustáceos decápodos en el litoral de la República Argentina. *Investigaciones Marinas* 25, 19-40.
- Boss, E.S., Collier, R., Larson, G., Fennel, K., Pegau, W.S. (2007) Measurements of spectral optical properties and their relation to biogeochemical variables and processes in Crater Lake, Crater Lake National Park, OR. *Hydrobiologia* 574, 149-159.
- Bouchard, J.N., Longhi, M.L., Roy, S., Campbell, D.A., Ferreyra, G. (2008) Interaction of nitrogen status and UVB sensitivity in a temperate phytoplankton assemblage. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 359, 67-76.
- Bouchard, J.N., Roy, S., Campbell, D.A. (2006) UVB effects on the photosystem II-D1 protein of phytoplankton and natural phytoplankton communities. *Photochemistry and Photobiology* 82, 936-951.
- Bouchard, J.N., Roy, S., Ferreyra, G., Campbell, D.A., Curtosi, A. (2005) Ultraviolet-B effects on photosystem II efficiency of natural phytoplankton communities from Antarctica. *Polar Biology* 28, 618.
- Boyd, P.W., Lennartz, S.T., Glover, D.M., Doney, S.C. (2015) Biological ramifications of climate-change-mediated oceanic multi-stressors. *Nature Climate Change* 5, 71-79.
- Boyd, P.W., Strzepek, R., Fu, F.-X., Hutchins, D.A. (2010) Environmental control of open-ocean phytoplankton groups: Now and in the future. *Limnology and Oceanography* 55, 1353-1376.

- Bricker, S.B., Clement, C.G., Pirhalla, D.E., Orlando, S.P., Farrow, D.R.G., (1999) National estuarine eutrophication assessment: effects of nutrient enrichment in the nation's estuaries. US National Oceanographic and Atmospheric Administration, National Ocean Service, Special Projects Office and the National Center for Coastal Ocean Science, p. 84.
- Buma, A.G.J., Boelen, P., Jeffrey, W.H., (2003) UVR-induced DNA damage in aquatic organisms, in: Helbling, E.W., Zagarese, H.E. (Eds.), UV effects in aquatic organisms and ecosystems. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, pp. 291-327.
- Buma, A.G.J., Engelen, A.H., Gieskes, W.W.C. (1997) Wavelength-dependent induction of thymine dimers and growth rate reduction in the marine diatom *Cyclotella* sp. exposed to ultraviolet radiation. Marine Ecology Progress Series 153, 91-97.
- Cabrerizo, M.J., Carrillo, P., Villafaña, V.E., Medina-Sánchez, J.M., Helbling, E.W. (2017a) Increased nutrients from aeolian-dust and riverine origin decrease the CO<sub>2</sub>-sink capacity of coastal South Atlantic waters under UVR exposure. Limnology and Oceanography.
- Cabrerizo, M.J., Carrillo, P., Villafaña, V.E., Helbling, E.W. (2017b) Differential impacts of global change variables on coastal South Atlantic phytoplankton: Role of seasonal variations. Marine Environmental Research 125, 63-72.
- Cadet, J., Grand, A., Douki, T., (2014) Solar UV radiation-induced DNA bipyrimidine photoproducts: formation and mechanistic insights, Photoinduced phenomena in nucleic acids II. Springer, pp. 249-275.
- Caille, G., González, R., Gostonyi, A., Ciocco, N.F., (1997) Especies capturadas por las flotas de pesca costera en Patagonia, pp. 1-21.
- Calbet, A., Sazhin, A.F., Nejstgaard, J.C., Berger, S.A., Tait, Z.S., Olmos, L., Sousoni, D., Isari, S., Martínez, R.A., Bouquet, J.-M., Thompson, E.M., Bamstedt, T., Jakobsen, H.H. (2014) Future climate scenarios for a coastal productive planktonic food web resulting in microplankton phenology changes and decreased trophic transfer efficiency. PLoS One 94, e94388.
- Canadell, J.G., Le Quere, C., Raupach, M.R., Field, C.B., Buitenhuis, E.T., Ciais, P., Conway, T.J., Gillett, N.P., Houghton, R.A., Marland, G. (2007) Contributions to accelerating atmospheric CO<sub>2</sub> growth from economic activity, carbon intensity, and efficiency of natural sinks. Proceedings of the National Academy of Sciences USA 104, 18866-18870.
- Carrillo, P., Delgado-Molina, J.A., Medina-Sánchez, J.M., Ballejos, F.J., Villar-Argaiz, M. (2008) Phosphorus inputs unmask negative effects of ultraviolet radiation on algae in a high mountain lake. Global Change Biology 14, 423-439.
- Carrillo, P., Medina-Sánchez, J.M., Durán, C., Herrera, G., Villafaña, V.E., Helbling, E.W. (2015) Synergistic effects of UVR and simulated stratification on commensalistic algal-bacterial relationship in two optically contrasting oligotrophic Mediterranean lakes. Biogeosciences 12, 697-712.
- Carstensen, J., Henriksen, P., Heiskanen, A. (2007) Summer algal blooms in shallow estuaries: Definition, mechanisms, and link to eutrophication. Limnology and Oceanography 52, 370-384.
- Carstensen, J., Klais, R., Cloern, J.E. (2015) Phytoplankton blooms in estuarine and coastal waters: Seasonal patterns and key species. Estuarine, Coastal and Shelf Science 162, 98-109.
- Carvalho, A.P., Monteiro, C.M., Malcata, F.X. (2009) Simultaneous effect of irradiance and temperature on biochemical composition of the microalga *Pavlova lutheri*. Journal of Applied Phycology 21, 543-552.

- Chiarandini Fiore, J.P., Scapini, M.C., Olivieri, A.C. (2013) Excitation-emission matrices applied to the study of urban effluent discharges in the Chubut River (Patagonia, Argentina). *Environmental Monitoring and Assessment* 185, 6909–6919.
- Cicerone, R.J., Stolarski, R., Walters, S. (1974) Stratospheric ozone destruction by man-made chlorofluoromethanes. *Science* 185, 1165-1167.
- Cloern, J.E. (1996) Phytoplankton bloom dynamics in coastal ecosystems: A review with some general lessons from sustained investigation of San Francisco Bay, California. *Reviews of Geophysics* 34, 127-168.
- Cloern, J.E., Abreu, P.C., Carstensen, J., Chauvaud, L., Elmgren, R., Grall, J., Greening, H., Johansson, J.O.R., Kahru, M., Sherwood, E.T., Xu, J.I.E., Yin, K. (2016) Human activities and climate variability drive fast-paced change across the world's estuarine-coastal ecosystems. *Global Change Biology* 22, 513-529.
- Cloern, J.E., Foster, S.Q., Fleckner, A.E. (2014) Phytoplankton primary production in the world's estuarine-coastal ecosystems. *Biogeosciences* 11, 2477-2501.
- Collins, A.K., Allen, S.E., Pawlowicz, R. (2009) The role of wind in determining the timing of the spring bloom in the Strait of Georgia. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 66, 1597-1616.
- Conley, D.J., Paerl, H.W., Howarth, R.W., Boesch, D.F., Seitzinger, S.P., Havens, K.E., Lancelot, C., Likens, G.E. (2009) Controlling eutrophication: nitrogen and phosphorus. *Science* 323, 1014-1015.
- Crain, C.M., Kroeker, K., Halpern, B.S. (2008) Interactive and cumulative effects of multiple human stressors in marine systems. *Ecology Letters* 11, 1304-1315.
- Crespo, E.A., García, N.A., Dans, S.L., Pedraza, S.N., (2008) Mamíferos marinos, in: Boltovskoy, D. (Ed.), *Atlas de sensibilidad ambiental de la costa y el Mar Argentino*, Buenos Aires.
- Crutzen, P.J. (1992) Ultraviolet on the increase. *Nature* 356, 104-105.
- Cullen, J.J., Lewis, M.R. (1988) The kinetics of algal photoadaptation in the context of vertical mixing. *Journal of Plankton Research* 10 (5), 1039-1063.
- Derks, A., Schaven, K., Bruce, D. (2015) Diverse mechanisms for photoprotection in photosynthesis. Dynamic regulation of photosystem II excitation in response to rapid environmental change. *Biochimica et Biophysica Acta: Bioenergetics* 1847, 468-485.
- Diaz, R.J., Rosenberg, R. (2008) Spreading dead zones and consequences for marine ecosystems. *Science* 321, 926-929.
- Diehl, S., Berger, S., Ptacnik, R., Wild, A. (2002) Phytoplankton, light, and nutrients in a gradient of mixing depths: Field experiments. *Ecology* 83, 399-411.
- Domingues, C.M., Church, J.A., White, N.J., Gleckler, P.J., Wijffels, S.E., Barker, P.M., Dunn, J.R. (2008) Improved estimates of upper-ocean warming and multi-decadal sea-level rise. *Nature* 453, 1090.
- Doney, S.C. (2006) Plankton in a warmer world. *Nature* 444, 695-696.
- Doney, S.C., Fabry, V.J., Feely, R.A., Kleypas, J.A. (2009) Ocean acidification: the other CO<sub>2</sub> problem. *Annual Review of Marine Science* 1, 169-192.
- Doyle, S.A., Saros, J.E., Williamson, C.E. (2005) Interactive effects of temperature and nutrient limitation on the response of alpine phytoplankton growth to ultraviolet radiation. *Limnology and Oceanography* 50, 1362-1367.

- Duran-Romero, C., Villafañe, V.E., Valiñas, M.S., Gonçalves, R.J., Helbling, E.W. (2017) Solar UVR sensitivity of phyto- and bacterioplankton communities from Patagonian coastal waters under increased nutrients and acidification. *ICES Journal of Marine Science* 74, 1062-1073.
- Falkowski, P.G. (2012) The power of plankton. *Nature* 483, S17-S20.
- Falkowski, P.G., Oliver, M.J. (2007) Mix and match: how climate selects phytoplankton. *Nature* 5, 813-819.
- Falkowski, P.G., Wirick, C.D. (1981) A simulation model of the effects of vertical mixing on primary productivity. *Marine Biology* 65, 69-75.
- FAO, (2012) The State of World Fisheries and Aquaculture.
- Farman, J.C., Gardiner, B.G., Shanklin, J.D. (1985) Large losses of total ozone in Antarctica reveal seasonal ClO<sub>x</sub>/NO<sub>x</sub> interaction. *Nature* 315, 207-210.
- Fauchot, J., Lévassieur, M., Roy, S. (2005) Daytime and nighttime vertical migrations of *Alexandrium tamarense* in the St. Lawrence estuary (Canada). *Marine Ecology Progress Series* 296, 241-250.
- Favre-Bonvin, J., Bernillon, J., Salin, N., Arpin, N. (1987) Biosynthesis of mycosporines: Mycosporine glutaminol in *Trichothecium roseum*. *Phytochemistry* 26, 2509-2514.
- Ferreira, A.S.A., Hátún, H., Counillon, F., Payne, M.R., Visser, A.W. (2015) Synoptic-scale analysis of mechanisms driving surface chlorophyll dynamics in the North Atlantic. *Biogeosciences* 12, 3641-3653.
- Field, C.B., Behrenfeld, M.J., Randerson, J.T., Falkowski, P. (1998) Primary production of the Biosphere: Integrating terrestrial and oceanic components. *Science* 281, 237-240.
- Fitch, D.T., Moore, J.K. (2007) Wind speed influence on phytoplankton bloom dynamics in the Southern Ocean Marginal Ice Zone. *Journal of Geophysical Research* 112, 13 pp.
- Flynn, K.J., Clark, D.R., Mitra, A., Fabian, H., Hansen, P.J., Glibert, P.M., Wheeler, G.L., Stoecker, D.K., Blackford, J.C., Brownlee, C. (2015) Ocean acidification with (de) eutrophication will alter future phytoplankton growth and succession. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* 282, 20142604.
- Foley, J.A., DeFries, R., Asner, G.P., Barford, C., Bonan, G., Carpenter, S.R., Chapin, F.S., Coe, M.T., Daily, G.C., Gibbs, H.K., Helkowski, J.H., Holloway, T., Howard, E.A., Kucharik, C.J., Monfreda, C., Patz, J.A., Prentice, I.C., Ramankutty, N., Snyder, P.K. (2005) Global consequences of land use. *Science* 309, 570-574.
- Fouilland, E., Gosselin, M., Mostajir, B., Lévassieur, M., Chamut, J.-P., Demers, S., de Mora, S. (2003) Effects of ultraviolet-B radiation and vertical mixing on nitrogen uptake by a natural planktonic community shifting from nitrate to silicic acid deficiency. *Limnology and Oceanography* 48, 18-30.
- Gaiero, D.M., Probst, J.L., Depetris, P.J., Bidart, S.M., Leleyter, L. (2003) Iron and other transition metals in Patagonian riverborne and windborne materials: Geochemical control and transport to the southern South Atlantic Ocean. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 67, 3603-3623.
- Galí, M., Simó, R., Pérez, G.L., Ruiz-González, C., Sarmiento, H., Royer, S.-J., Fuentes-Lema, A., Gasol, J.M. (2013) Differential response of planktonic primary, bacterial, and dimethylsulfide production rates to static vs. dynamic light exposure in upper mixed-layer summer sea waters. *Biogeosciences* 10, 7983-7998.

- Gao, K.S., Helbling, E.W., Häder, D.P., Hutchings, D.A. (2012) Responses of marine primary producers to interactions between ocean acidification, solar radiation, and warming. *Marine Ecology Progress Series* 470, 167-189.
- García-Pichel, F. (1994) A model for internal self-shading in planktonic organisms and its implications for the usefulness of ultraviolet sunscreens. *Limnology and Oceanography* 39, 1704-1717.
- Gassó, S., Stein, A.F. (2007) Does dust from Patagonia reach the sub-Antarctic Atlantic Ocean? *Geophysical Research Letters* 34, 1-5.
- Gattuso, J.-P., Hansson, L. (2011) *Ocean acidification*. Oxford University Press, New York, USA.
- Gattuso, J.P., Gao, K., Lee, K., Rost, B., Schulz, K.G., (2010) Approaches and tools to manipulate the carbonate chemistry, in: Riebesell, U., Fabry, V.J., Hansson, L., Gattuso, J.-P. (Eds.), *Guide to best practices for ocean acidification research and data reporting*. Publications Office of the European Union, Brussels, pp. 41-52.
- Gayoso, A.M. (2001) Observations on *Alexandrium tamarens* (Lebour) Balech and other dinoflagellate populations in Golfo Nuevo, Patagonia (Argentina). *Journal of Plankton Research* 23, 463-468.
- Genty, B.E., Briantais, J.M., Baker, N.R. (1989) The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochimica et Biophysica Acta* 990, 87-92.
- Giraud, X., Le Quéré, C., da Cunha, L.C. (2008) Importance of coastal nutrient supply for global ocean biogeochemistry. *Global Biogeochemical Cycles* 22, 15 pp.
- González-Ortegón, E., Pascual, E., Cuesta, J.A., Drake, P. (2006) Field distribution and osmoregulatory capacity of shrimps in a temperate European estuary (SW Spain). *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 67, 293-302.
- Goss, R., Jakob, T. (2010) Regulation and function of xanthophyll cycle-dependent photoprotection in algae. *Photosynthesis Research* 106, 103-122.
- Guinder, V.A., López-Abbate, M.C., Berasategui, A.A., Negrin, V.L., Zapperi, G., Pratolongo, P.D., Fernández Severini, M.D., Popovich, C.A. (2015) Influence of the winter phytoplankton bloom on the settled material in a temperate shallow estuary. *Oceanologia* 57, 50-60.
- Guinder, V.A., Molinero, J.C., (2013) Climate change effects on marine phytoplankton, in: Arias, A.H., Menendez, M.C. (Eds.), *Marine ecology in a changing World*. CRC Press, pp. 68-90.
- Gupta, R., Bhadauriya, P., Chauhan, V.S., Bisen, P.S. (2008) Impact of UV-B radiation on thylakoid membrane and fatty acid profile of *Spirulina platensis*. *Current Microbiology* 56, 156-161.
- Häder, D.-P., Gao, K. (2015) Interactions of anthropogenic stress factors on marine phytoplankton. *Frontiers in Environmental Science* 3, 10.3389/fenvs.2015.00014.
- Häder, D.-P., Helbling, E.W., Williamson, C.E., Worrest, R.C. (2011) Effects of UV radiation on aquatic ecosystems and interactions with climate change. *Photochemical and Photobiological Sciences* 10, 242-260.
- Häder, D.-P., Williamson, C.E., Wängberg, S.-A., Rautio, M., Rose, K.C., Gao, K., Helbling, E.W., Sinha, R.P., Worrest, R. (2015) Effects of UV radiation on aquatic ecosystems and interactions with other environmental factors. *Photochemical and Photobiological Sciences* 14, 108-126.

- Häder, D.P., Gao, K., (2018) The Impacts of Climate Change on Marine Phytoplankton, in: Phillips, B.F., Pérez Ramírez, M. (Eds.), *Climate Change Impacts on Fisheries and Aquaculture: A Global Analysis*. John Wiley & Sons, pp. 897-924.
- Häder, D.P., Kumar, H.D., Smith, R.C., Worrest, R.C. (2007) Effects of solar UV radiation on aquatic ecosystems and interactions with climate change. *Photochemical and Photobiological Sciences* 6, 267-285.
- Halac, S.R., Villafañe, V.E., Gonçalves, R.J., Helbling, E.W. (2014) Photochemical responses of three marine phytoplankton species exposed to ultraviolet radiation and increased temperature: Role of photoprotective mechanisms. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 141, 217-227.
- Hallegraeff, G.M. (2010) Ocean climate change, phytoplankton community responses, and harmful algal blooms: A formidable predictive challenge. *Journal of Phycology* 46, 220-235.
- Halpern, B.S., Walbridge, S., Selkoe, K.A., Kappel, C.V., Micheli, F., D'Agrosa, C., Bruno, J.F., Casey, K.S., Ebert, C., Fox, H.E., Fujita, R., Heinemann, D., Lenihan, H.S., Madin, E.M.P., Perry, M.T., Selig, E.R., Spalding, M., Steneck, R., Watson, R. (2008) A global map of human impact on marine ecosystems. *Science* 319, 948-952.
- Hanelt, D. (1996) Photoinhibition of photosynthesis in marine macroalgae. *Scientia Marina* 60, 243-248.
- Hansen, D.V., Rattray, M., Jr. (1965) Gravitational circulation in straits and estuaries. *Journal of Marine Research* 23 (2), 104-122.
- Harding, L.W., Adolf, J.E., Mallonee, M.E., Miller, W.D., Gallegos, C.L., Perry, E.S., Johnson, J.M., Sellner, K.G., Paerl, H.W. (2015) Climate effects on phytoplankton floral composition in Chesapeake Bay. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 162, 53-68.
- Harrison, J.W., Smith, R.E.H. (2009) Effects of ultraviolet radiation on the productivity and composition of freshwater phytoplankton communities. *Photochemical and Photobiological Sciences* 8, 1218-1232.
- Harrison, J.W., Smith, R.E.H. (2013) Effects of nutrients and irradiance on PSII variable fluorescence of lake phytoplankton assemblages. *Aquatic Sciences* 75, 399-411.
- Hays, G.C., Richardson, A.J., Robinson, C. (2005) Climate change and marine plankton. *Trends in Ecology and Evolution* 20, 337-344.
- Helbling, E.W., (1989) Estuarine circulation and nutrient variability in the Chubut river estuary (Argentina) during 1986-1987. University of California, San Diego, USA, p. 138.
- Helbling, E.W., Banaszak, A.T., Villafañe, V.E. (2015a) Differential responses of two phytoplankton communities from the Chubut river estuary (Patagonia, Argentina) to the combination of UVR and elevated temperature. *Estuaries and Coasts* 38, 1134-1146.
- Helbling, E.W., Banaszak, A.T., Villafañe, V.E. (2015b) Global change feed-back inhibits cyanobacterial photosynthesis. *Scientific Reports* 5, DOI: 10.1038/srep14514.
- Helbling, E.W., Barbieri, E.S., Marcoval, M.A., Gonçalves, R.J., Villafañe, V.E. (2005) Impact of solar ultraviolet radiation on marine phytoplankton of Patagonia, Argentina. *Photochemistry and Photobiology* 81, 807-818.

- Helbling, E.W., Buma, A.G.J., Boelen, P., van der Strate, H.J., Fiorda Giordanino, M.V., Villafañe, V.E. (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, E.W., Buma, A.G.J., de Boer, M.K., Villafañe, V.E. (2001a) *In situ* impact of solar ultraviolet radiation on photosynthesis and DNA in temperate marine phytoplankton. *Marine Ecology Progress Series* 211, 43-49.
- Helbling, E.W., Carrillo, P., Medina-Sánchez, J.M., Durán, C., Herrera, G., Villar-Argaiz, M., Villafañe, V.E. (2013) Interactive effects of vertical mixing, nutrients and ultraviolet radiation: in situ photosynthetic responses of phytoplankton from high mountain lakes in Southern Europe. *Biogeosciences* 10, 1037-1050.
- Helbling, E.W., Chalker, B.E., Dunlap, W.C., Holm-Hansen, O., Villafañe, V.E. (1996) Photoacclimation of antarctic marine diatoms to solar ultraviolet radiation. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 204, 85-101.
- Helbling, E.W., Gao, K., Gonçalves, R.J., Wu, H., Villafañe, V.E. (2003) Utilization of solar UV radiation by coastal phytoplankton assemblages off SE China when exposed to fast mixing. *Marine Ecology Progress Series* 259, 59-66.
- Helbling, E.W., Pérez, D.E., Medina, C.D., Lagunas, M.G., Villafañe, V.E. (2010) Phytoplankton distribution and photosynthesis dynamics in the Chubut River estuary (Patagonia, Argentina) throughout tidal cycles *Limnology and Oceanography* 55, 55-65.
- Helbling, E.W., Santamarina, J.M., Villafañe, V.E. (1992) Chubut river estuary (Argentina): Estuarine variability under different conditions of river discharge. *Revista de Biología Marina* 27, 73-90.
- Helbling, E.W., Villafañe, V.E., Buma, A.G.J., Andrade, M., Zaratti, F. (2001b) DNA damage and photosynthetic inhibition induced by solar UVR in tropical phytoplankton (Lake Titicaca, Bolivia). *European Journal of Phycology* 36, 157-166.
- Helbling, E.W., Villafañe, V.E., Holm-Hansen, O., (1994) Effects of ultraviolet radiation on Antarctic marine phytoplankton photosynthesis with particular attention to the influence of mixing, in: Weiler, C.S., Penhale, P.A. (Eds.), *Ultraviolet radiation in Antarctica: Measurements and biological effects*. American Geophysical Union, Washington, D.C., pp. 207-227.
- Hessen, D., De Lange, H., Van Donk, E. (1997) UV-induced changes in phytoplankton cells and its effects on grazers. *Freshwater Biology* 38, 513-524.
- Hillebrand, H., Dürselen, C.D., Kirschtel, D., Pollinger, U., Zohary, T. (1999) Biovolume calculation for pelagic and benthic microalgae. *Journal of Phycology* 35, 403-424.
- Holm-Hansen, O., Riemann, B. (1978) Chlorophyll a determination: Improvements in methodology. *Oikos* 30, 438-447.
- Hoppe, C.J.M., Holtz, L.-M., Trimborn, S., Rost, B. (2015) Ocean acidification decrease the light-use efficiency in an Antarctic diatom under dynamic but not constant light. *New Phytologist* 207, 159-171.
- Hudson, N., Baker, A., Reynolds, D. (2007) Fluorescence analysis of dissolved organic matter in natural, waste and polluted waters - a review. *River Research and Applications* 23, 631-649.

- Huisman, J., Sharples, J., Stroom, J., Visser, P., Kardinaal, W., Verspagen, J., Sommeijer, B. (2004) Changes in turbulent mixing shift competition for light between phytoplankton species. *Ecology* 85, 2960-2970.
- Huisman, J., Van Oostveen, P., Weissing, F.J. (1999) Species dynamics in phytoplankton blooms: incomplete mixing and competition for light. *The American Naturalist* 154, 46-68.
- Hüner, N.P.A., Öquist, G., Sarhan, F. (1998) Energy balance and acclimation to light and cold. *Trends in Plant Science* 3, 224-230.
- IPCC (2013) *Climate Change 2013. The Physical Science Basis*. Cambridge University Press, New York, USA.
- IPCC, (2014) *Climate change 2014: impacts, adaptation, and vulnerability*, in: Field, C.B., Barros, V.R., Mach, K., Mastrandrea, M. (Eds.). Cambridge University Press Cambridge and New York, p. 1132.
- IWC, I.W.C.-. (2013) Report of the IWC - Workshop on the Assessment of Southern Right Whales. *Journal of Cetacean Research and Management* 14, 439-462.
- Jeppesen, E., Moss, B., Bennion, H., Carvalho, L., DeMeester, L., Feuchtmayr, H., Friberg, N., Gessner, M.O., Hefting, M., Lauridsen, T.L., (2010) Interaction of climate change and eutrophication, *Climate change impacts on freshwater ecosystems*. Blackwell Publishing Ltd., pp. 119-151.
- Jickells, T.D., Moore, C.M. (2015) The importance of atmospheric deposition for ocean productivity. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics* 46, 481-501.
- Jin, P., Gao, K., Villafane, V.E., Campbell, D.A., Helbling, E.W. (2013) Ocean acidification alters the photosynthetic responses of a coccolithophorid to fluctuating ultraviolet and visible radiation. *Plant Physiology* 162, 2084-2094.
- Johnson, M.S., Meskhidze, N., Kiliyanpilakkil, V.P., Gassó, S. (2011) Understanding the transport of Patagonian dust and its influence on marine biological activity in the South Atlantic Ocean. *Atmospheric Chemistry and Physics* 11, 2487–2502.
- Karentz, D., Cleaver, J.E., Mitchell, D.L. (1991) Cell survival characteristics and molecular responses of Antarctic phytoplankton to ultraviolet-B radiation. *Journal of Phycology* 27, 326-341.
- Kataria, S., Jajoo, A., Guruprasad, K.N. (2014) Impact of increasing ultraviolet-B (UV-B) radiation on photosynthetic processes. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, *in press*. 10.1016/j.jphotobiol.2014.1002.1004.
- Kirk, J.T.O. (2003) The vertical attenuation of irradiance as a function of the optical properties of the water. *Limnology and Oceanography* 48, 9-17.
- Kopczynska, E.E. (1992) Dominance of microflagellates over diatoms in the Antarctic areas of deep vertical mixing and krill concentrations. *Journal of Plankton Research* 14 (8), 1031-1054.
- Kopprio, G.A., Biancalana, F., Fricke, A., Garzón Cardona, J.E., Martínez, A., Lara, R.J. (2015) Global change effects on biogeochemical processes of Argentinian estuaries: An overview of vulnerabilities and ecohydrological adaptive outlooks. *Marine Pollution Bulletin* 91, 554–562.
- Korbee, N., Carrillo, P., Mata, M.T., Rosillo, S., M., M.-S.J., Figueroa, F.L. (2012) Effects of ultraviolet radiation and nutrients on the structure–function of phytoplankton in a high mountain lake. *Photochemical and Photobiological Sciences* DOI: 10.1039/c2pp05336e.
- Lancelot, C., Muylaert, K., (2011) Trends in estuarine phytoplankton ecology, in: Wolanski, E., Mcluskay, D.S., Heip, C.H.R., Middelburg, J.J., Philippart, C.J.M. (Eds.), *Treatise on estuarine and coastal science: 7. Functioning ecosystems at the land-ocean interface*. Elsevier, Amsterdam, pp. 5-15.

- Laufkoetter, C., Vogt, M., Gruber, N., (2013) Trends in marine plankton composition and export production in a CCSM-BEC hindcast (1960-2006), EGU General Assembly Conference Abstracts.
- Laurion, I., Lami, A., Sommaruga, R. (2002) Distribution of mycosporine-like amino acids and photoprotective carotenoids among freshwater phytoplankton assemblages. *Aquatic Microbial Ecology* 26, 283-294.
- Laurion, I., Vincent, W.F. (1998) Cell size versus taxonomic composition as determinants of UV-sensitivity in natural phytoplankton communities. *Limnology and Oceanography* 43, 1774-1779.
- Lavaud, J., Materna, A.C., Sturm, S., Vugrinec, S., Kroth, P.G. (2012) Silencing of the violaxanthin de-epoxidase gene in the diatom *Phaeodactylum tricornutum* reduces diatoxanthin synthesis and non-photochemical quenching. *PLoS One* 7, e36806.
- Levitus, S., Antonov, J.I., Boyer, T.P., Baranova, O.K., Garcia, H.E., Locarnini, R.A., Mishonov, A.V., Reagan, J., Seidov, D., Yarosh, E.S. (2012) World ocean heat content and thermosteric sea level change (0–2000 m), 1955–2010. *Geophysical Research Letters* 39.
- Lewandowska, A., Sommer, U. (2010) Climate change and the spring bloom: a mesocosm study on the influence of light and temperature on phytoplankton and mesozooplankton. *Marine Ecology Progress Series* 405, 101-111.
- Li, F., Ginoux, P., Ramaswamy, V. (2010) Transport of patagonian dust to Antarctica. *Journal of Geophysical Research* 115, 9 pp.
- Li, Y., Gao, K., Villafañe, V.E., Helbling, E.W. (2012) Ocean acidification mediates photosynthetic response to UV radiation and temperature increase in the diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Biogeosciences* 9, 3931-3942.
- Litchman, E., Neale, P.J., Banaszak, A.T. (2002) Increased sensitivity to ultraviolet radiation in nitrogen-limited dinoflagellates: Photoprotection and repair. *Limnology and Oceanography* 47, 86-94.
- Llabrés, M., Agustí, S. (2010) Effects of ultraviolet radiation on growth, cell death and the standing stock of Antarctic phytoplankton. *Aquatic Microbial Ecology* 59, 151-160.
- Longhurst, A.R. (1998) *Ecological geography of the sea*, San Diego, 560 pp.
- Lubin, D., Jensen, E.H. (1995) Effects of clouds and stratospheric ozone depletion on ultraviolet radiation trends. *Nature* 377, 710-713.
- Madronich, S., (1993) The atmosphere and UV-B radiation at ground level, in: Young, A.R., Björn, L.O., Moan, J., Nultsch, W. (Eds.), *Environmental UV photobiology*. Plenum Press, New York, pp. 1-39.
- Marañón, E., Cermeño, P., Latasa, M., Tadonlélé, R.D. (2012) Temperature, resources, and phytoplankton size structure in the ocean. *Limnology and Oceanography*, 1266-1278.
- Marcoval, M.A., Villafañe, V.E., Helbling, E.W. (2007) Interactive effects of ultraviolet radiation and nutrient addition on growth and photosynthesis performance of four species of marine phytoplankton. *Journal of Photochemistry and Photobiology, B: Biology* 89, 78-87.
- Marcoval, M.A., Villafañe, V.E., Helbling, E.W. (2008) Combined effects of solar ultraviolet radiation and nutrients addition on growth, biomass and taxonomic composition of coastal marine phytoplankton communities of Patagonia. *Journal of Photochemistry and Photobiology, B: Biology* 91, 157-166.
- Marra, J., Lance, V.P., Vaillancourt, R.D., Hargreaves, B.R. (2014) Resolving the ocean's euphotic zone. *Deep Sea Research I* 83, 45-50.

- McKenzie, R., Aucamp, P.J., Bais, A., Björn, L.O., Ilyas, M., Madronich, S. (2011) Ozone depletion and climate change: impacts on UV radiation. *Photochemical and Photobiological Sciences* 10, 182-198.
- Mikolajewicz, U., Santer, B.D., Maier-Reimer, E. (1990) Ocean response to greenhouse warming. *Nature* 345, 589-593.
- Mitchell, B.G., Brody, E.A., Holm-Hansen, O., McClain, C.R., Bishop, J. (1991) Light limitation of phytoplankton biomass and macronutrient utilization in the Southern Ocean. *Limnology and Oceanography* 36 (8), 1662-1677.
- Molina, M.J., Rowland, F.S. (1974) Stratospheric sink for chlorofluoromethanes: chlorine atom-catalysed destruction of ozone. *Nature* 249, 810-812.
- Neale, P.J., Davis, R.F., Cullen, J.J. (1998) Interactive effects of ozone depletion and vertical mixing on photosynthesis of Antarctic phytoplankton. *Nature* 392, 585-589.
- Neale, P.J., Helbling, E.W., Zagarese, H.E., (2003) Modulation of UVR exposure and effects by vertical mixing and advection, in: Helbling, E.W., Zagarese, H.E. (Eds.), *UV effects in aquatic organisms and ecosystems*. Royal Society of Chemistry, pp. 108-134.
- Nixon, S.W. (1995) Coastal marine eutrophication: A definition, social causes, and future concerns. *Ophelia* 41, 199-219.
- Nultsch, W., Pfau, J., Ruffer, U. (1981) Do correlations exist between chromatophore arrangement and photosynthetic activity in seaweeds?. *Marine Biology* 62, 111-117.
- Ogbebo, F.E., Ochs, C. (2008) Bacterioplankton and phytoplankton production rates compared at different levels of solar ultraviolet radiation and limiting nutrient ratios. *Journal of Plankton Research* 30, 1271-1284.
- Orce, V.L., Helbling, E.W. (1997) Latitudinal UVR-PAR measurements in Argentina: Extent of the "ozone hole". *Global and Planetary Change* 15, 113-121.
- Oren, A., Gunde-Cimerman, N. (2007) Mycosporines and mycosporine-like amino acids: UV protectants or multipurpose secondary metabolites?. *FEMS Microbiological Letters* 269, 1-10.
- Orr, J.C., Fabry, V.J., Aumont, O., Bopp, L., Doney, S.C., Feely, R.A., Gnanadesikan, A., Gruber, N., Ishida, A., Joos, F., Key, R.M., Lindsay, K., Maier-Reimer, E., Matear, R., Monfray, P., Mouchet, A., Najjar, R.G., Plattner, G.-K., Rodgers, K.B., Sabine, C.L., Sarmiento, J.L., Schlitzer, R., Slater, R.D., Totterdell, I.J., Weirig, M.-F., Yamanaka, Y., Yool, A. (2005) Anthropogenic ocean acidification over the twenty-first century and its impact on calcifying organisms. *Nature* 437, 681-686.
- Paerl, H.W. (1988) Nuisance phytoplankton blooms in coastal, estuarine, and inland waters. *Limnology and Oceanography* 33, 823-847.
- Paerl, H.W., (2007) Nutrient and other environmental controls of harmful cyanobacterial blooms along the freshwater-marine continuum, in: Hudnell, H.K. (Ed.), *Proceedings of the Interagency, International Symposium on cyanobacterial harmful algal blooms - Advances in experimental medicine & biology*, pp. 215-241.
- Paerl, H.W., Fitzpatrick, M., Bebout, B.M. (1996) Seasonal nitrogen fixation dynamics in a marine microbial mat: Potential roles of cyanobacteria and microheterotrophs. *Limnology and Oceanography* 41, 419-427.

- Paerl, H.W., Hall, N.S., Peierls, B.L., Rossignol, K.L. (2014) Evolving paradigms and challenges in estuarine and coastal eutrophication dynamics in a culturally and climatically stressed world. *Estuaries and Coasts* 37, 243-258.
- Paerl, H.W., Huisman, J. (2008) Blooms like it hot. *Science* 320, 57-58.
- Painter, S.C., Poulton, A.J., Allen, J.T., Pidcock, R., Balch, W.M. (2010) The COPAS'08 expedition to the Patagonian Shelf: Physical and environmental conditions during the 2008 coccolithophore bloom. *Continental Shelf Research* 30, 1907–1923.
- Palleiro, L., Rodríguez-Blanco, M.L., Taboada-Castro, M.M., Taboada-Castro, M.T. (2013) The influence of discharge, pH, dissolved organic carbon, and suspended solids on the variability of concentration and partitioning of metals in a rural catchment. *Water, Air, & Soil Pollution* 224, 1651.
- Parson, E.A., Burkett, V., Fisher-Vanden, K., Keith, D., Mearns, L., Pitcher, H., Rosenzweig, C., Webster, M., (2007) Global-change scenarios: their development and use, in: Malone, E.L. (Ed.).
- Passow, U., Carlson, C.A. (2012) The biological pump in a high CO<sub>2</sub> world. *Marine Ecology Progress Series* 470, 249-271.
- Piccolo, M.C., Perillo, G.M.E., (1999) Estuaries of Argentina: A review, in: Perillo, G.M.E., Piccolo, M.C., Pino Quivira, M. (Eds.), *Estuaries of South America: Their geomorphology and dynamics*. Springer-Verlag, Berlin, pp. 101-132.
- Pisoni, J.P., Rivas, A.L., Piola, A.R. (2014) Satellite remote sensing reveals coastal upwelling events in the San Matías Gulf—Northern Patagonia. *Remote Sensing of Environment* 152, 270-278.
- Platt, T., Jassby, A.D. (1976) The relation between photosynthesis and light for natural assemblages of coastal marine phytoplankton. *Journal of Phycology* 12, 421-430.
- Platt, T., Sathyendranath, S. (1988) Oceanic primary production: estimation by remote sensing at local and regional scales. *Science* 241, 1613-1620.
- Pollard, R.T., Rhines, P.B., Thompson, R.O. (1972) The deepening of the wind-mixed layer. *Geophysical & Astrophysical Fluid Dynamics* 4, 381-404.
- Porra, R.J. (2002) The chequered history of the development and use of simultaneous equations for the accurate determination of chlorophylls a and b. *Photosynthesis Research* 73, 149-156.
- Previdi, M., Polvani, L.M. (2014) Climate system response to stratospheric ozone depletion and recovery. *Quarterly Journal of the Royal Meteorological Society* 140, 2401-2419.
- Quintana, F., Frere, E., (2008) Aves marinas, in: Boltovskoy, D. (Ed.), *Atlas de sensibilidad ambiental de la costa y el Mar Argentino*, Buenos Aires.
- Rabalais, N.n., Turner, R.E., Díaz, R.J., Justic, D. (2009) Global change and eutrophication of coastal waters. *ICES Journal of Marine Science* 66, 1528-1537.
- Rastogi, R.P., Singh, S.P., Incharoensakdi, A., Häder, D.P., Sinha, R.P. (2014) Ultraviolet radiation-induced generation of reactive oxygen species, DNA damage and induction of UV-absorbing compounds in the cyanobacterium *Rivularia* sp. HKAR-4. *South African Journal of Botany* 90, 163-169.
- Raven, J., Caldeira, K., Elderfield, H., Hoegh-Guldberg, O., Liss, P., Riebesell, U., Shepherd, J., Turley, C., Watson, A. (2005) Ocean acidification due to increasing atmospheric carbon dioxide. *The Royal Society*.
- Reynolds, C.S., Walsby, A.E. (1975) Water-blooms. *Biological Reviews* 50, 437-481.

- Reynolds, R.A., Stramski, D., Kiefer, D.A. (1997) The effect of nitrogen limitation on the absorption and scattering properties of the marine diatom *Thalassiosira pseudonana*. *Limnology and Oceanography* 42, 881-892.
- Richa, R., Sinha, P., Häder, D.P., (2014) Phytoplankton productivity in a changing global climate, in: Sebastiá, M.T. (Ed.), *Phytoplankton : biology, classification, and environmental impacts*. Nova Science Publishers, Inc, New York, USA.
- Riebesell, U., Gattuso, J.P. (2014) Lessons learned from ocean acidification research. *Nature Climate Change* 5, 12.
- Riebesell, U., Tortell, P.D., (2011) Ocean acidification, in: Gattuso, J.P., Hansson, L. (Eds.), *Effects of ocean acidification on pelagic organisms and ecosystems*. Oxford University Press, Oxford, UK, pp. 99–116.
- Romero, S.I., Piola, A.R., Charo, M., Eiras Garcia, C.A. (2006) Chlorophyll-a variability off Patagonia based on SeaWiFS data. *Journal of Geophysical Research* 111.
- Rousseaux, C.S., Gregg, W.W. (2014) Interannual variation in phytoplankton primary production at a global scale. *Remote Sensing* 6, 1-19.
- Roy, S., (2000) Strategies for the minimization of UV-induced damage, in: De Mora, S.J., Demers, S., Vernet, M. (Eds.), *The effects of UV radiation in the marine environment*. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 177-205.
- Ruggaber, A., Dlugi, R., Nakajima, T. (1994) Modelling of radiation quantities and photolysis frequencies in the troposphere. *Journal of Atmospheric Chemistry* 18, 171-210.
- Saraceno, M., Provost, C., Piola, A.R. (2005) On the relationship between satellite-retrieved surface temperature fronts and chlorophyll a in the western South Atlantic. *Journal of Geophysical Research* 110.
- Sastre, A.V., Santinelli, N.H., Otaño, S.H., Ivanissevich, M.E. (1998) Water quality in the lower section of the Chubut River, Patagonia, Argentina. *Internationale Vereinigung fur Theoretische und Angewandte Limnologie* 26, 951-955.
- Sastre, A.V., Santinelli, N.H., Otaño, S.H., Ivanissevich, M.E., Ayestarán, M.G. (1994) Diatom blooms and their relation to water supply. *Internationale Vereinigung fur Theoretische und Angewandte Limnologie* 25, 1974-1978.
- Sathyendranath, S., Stuart, V., Nair, A., Oka, K., Nakane, T., Bouman, H., Forget, M.H., Maass, H., Platt, T. (2009) Carbon-to-chlorophyll ratio and growth rate of phytoplankton in the sea. *Marine Ecology Progress Series* 383, 73-84.
- Schreiber, U., Bilger, W., Neubauer, C., (1994) Chlorophyll fluorescence as a non-intrusive indicator for rapid assessment of in vivo photosynthesis, in: Schulze, E.-D., Caldwell, M.M. (Eds.), *Ecophysiology of photosynthesis*. Springer-Verlag, Berlin, pp. 49-70.
- Sen Gupta, A., McNeil, B., (2012) Variability and change in the ocean, *The Future of the World's Climate*. Elsevier, Amsterdam, Netherlands, pp. 141-165.
- Siegel, D.A., Doney, S.C., Yoder, J.A. (2002) The North Atlantic spring phytoplankton bloom and Sverdrup's critical depth hypothesis. *Science* 296, 730-733.
- Simpson, J.H., Brown, J., Matthews, J., Allen, G. (1990) Tidal straining, density currents, and stirring in the control of estuarine stratification. *Estuaries* 13, 125-132.

- Skewgar, E., Boersma, P.D., Harris, G., Caille, G. (2007) Sustainability: Anchovy fishery threat to Patagonian Ecosystem. *Science* 315, 45.
- Smayda, T.J. (1997a) Harmful algal blooms: their ecophysiology and general relevance to phytoplankton blooms in the sea. *Limnology and Oceanography* 42, 1137-1153.
- Smayda, T.J. (1997b) What is a bloom? A commentary. *Limnology and Oceanography* 42, 1132-1136.
- Smayda, T.J., Reynolds, C.S. (2003) Strategies of marine dinoflagellate survival and some rules of assembly. *Journal of Sea Research* 49, 95-106.
- Smith, V.H., Tilman, G.D., Nekola, J.C. (1999) Eutrophication: impacts of excess nutrient inputs on freshwater, marine, and terrestrial ecosystems. *Environmental Pollution* 100, 179-196.
- Sobrinho, C., Neale, P.J. (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.
- Sobrinho, C., Ward, M.L., Neale, P.J. (2008) Acclimation to elevated carbon dioxide and ultraviolet radiation in the diatom *Thalassiosira pseudonana*: Effects on growth, photosynthesis, and spectral sensitivity of photoinhibition. *Limnology and Oceanography* 53, 494-505.
- Solomon, S. (1999) Stratospheric ozone depletion: A review of concepts and history. *Reviews of Geophysics* 37, 275-316.
- Sommaruga, R., (2003) UVR and its effects on species interactions, in: Helbling, E.W., Zagarese, H. (Eds.), UV effects in aquatic organisms and ecosystems. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, pp. 485-508.
- Sommaruga, R., Garcia-Pichel, F. (1999) UV-absorbing mycosporine-like compounds in planktonic and benthic organisms from a high-mountain lake. *Archiv für Hydrobiologie* 144, 255-269.
- Sommer, U., Lengfellner, K. (2008) Climate change and the timing, magnitude, and composition of the phytoplankton spring bloom. *Global Change Biology* 14, 1199-1208.
- Song, H., Marshall, J., Follows, M.J., Dutkiewicz, S., Forget, G. (2016) Source waters for the highly productive Patagonian shelf in the southwestern Atlantic. *Journal of Marine Systems* 158, 120-128.
- Spilling, K., Markager, S. (2008) Ecophysiological growth characteristics and modeling of the onset of the spring bloom in the Baltic Sea. *Journal of Marine Systems* 73, 323-337.
- Spinelli, M.L., Gonçalves, R.J., Villafañe, V.E., Capitano, F.L. (2016) Diversity of copepods in Atlantic Patagonian coastal waters throughout an annual cycle. *Ciencias Marinas* 42, 31-47.
- Srivastava, P.K., Singh, V.P., Prasad, S.M. (2014) Low and high doses of UV-B differentially modulate chlorpyrifos-induced alterations in nitrogen metabolism of cyanobacteria. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 107, 291-299.
- Staeher, P.A., Henriksen, P., Markager, S. (2002) Photoacclimation of four marine phytoplankton species to irradiance and nutrient availability. *Marine Ecology Progress Series* 238, 47-59.
- Strathmann, R.R. (1967) Estimating the organic carbon content of phytoplankton from cell volume or plasma volume. *Limnology and Oceanography* 12, 411-418.
- Strickland, J.D.H., Parsons, T.R. (1972) A practical handbook of seawater analysis. Fisheries Research Board of Canada Bull. 167, 1-310.
- Sverdrup, H.U. (1953) On conditions for the vernal blooming of phytoplankton. *Journal du Conseil permanent International pour l' Exploration de la Mer* 18, 287-295.

- Sverdrup, H.U., Johnson, M.W., Fleming, R.H. (1942) The oceans. Their physics, chemistry, and general biology. Prentice-Hall, Inc., New York (USA).
- Takahashi, S., Murata, N. (2008) How do environmental stresses accelerate photoinhibition? Trends in Plant Science 13, 178-182.
- Taylor, A.H., Allen, J.I., Clark, P.A. (2002) Extraction of a weak climatic signal by an ecosystem. Nature 416, 629.
- Thomas, C.D., Cameron, A., Green, R.E., Bakkenes, M., Beaumont, L.J., Collingham, Y.C., Erasmus, B.F.N., Ferreira de Siqueira, M., Grainger, A., Hannah, L., Hughes, L., Huntley, B., van Jaarsveld, A.S., Midgley, G.F., Miles, L., Ortega-Huerta, M.A., Townsend Peterson, A., Phillips, O.L., Williams, S.E. (2004) Extinction risk from climate change. Nature 427, 145-148.
- Thompson, P. (1999) The response of growth and biochemical composition to variations in daylength, temperature, and irradiance in the marine diatom *Thalassiosira pseudonana* (Bacillariophyceae). Journal of Phycology 35, 1215-1223.
- Toseland, A., Daines, S.J., Clark, J.R., Kirkham, A., Strauss, J., Uhlig, C., Lenton, T.M., Valentin, K., Pearson, G.A., Moulton, V., Mock, T. (2013) The impact of temperature on marine phytoplankton resource allocation and metabolism. Nature Climate Change 3, 979-984.
- Uitz, J., Claustre, H., Gentili, B., Stramski, D. (2010) Phytoplankton class- specific primary production in the world's oceans: Seasonal and interannual variability from satellite observations. Global Biogeochemical Cycles 24, GB3016-3035.
- UNEP, (2006) Marine and coastal ecosystems and human well-being: A synthesis report based on the findings of the Millennium Ecosystem Assessment., in: UNEP (Ed.), p. 76.
- Van de Poll, W.H., Buma, A.G.J. (2009) Does ultraviolet radiation affect the xanthophyll cycle in marine phytoplankton? Photochemical and Photobiological Sciences 8, 1295-1301.
- Villafañe, V.E., Banaszak, A.T., Guendulain-García, S.D., Strauch, S.M., Halac, S.R., Helbling, E.W. (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, V.E., Barbieri, E.S., Helbling, E.W. (2004) Annual patterns of ultraviolet radiation effects on temperate marine phytoplankton off Patagonia, Argentina. Journal of Plankton Research 26, 167-174.
- Villafañe, V.E., Cabrerizo, M.J., Erzinger, G.S., Bermejo, P., Strauch, S.M., Valiñas, M.S., Helbling, E.W. (2017) Photosynthesis and growth of temperate and sub-tropical estuarine phytoplankton in a scenario of nutrient enrichment under solar ultraviolet radiation exposure. Estuaries and Coasts 40, 842-855.
- Villafañe, V.E., Erzinger, G.S., Strauch, S.M., Helbling, E.W. (2014) Photochemical activity of PSII of tropical phytoplankton communities of Southern Brazil exposed to solar radiation and nutrient addition. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 459, 199-207.
- Villafañe, V.E., Gao, K., Li, P., Helbling, E.W. (2007) Vertical mixing within the epilimnion modulates UVR-induced photoinhibition in tropical freshwater phytoplankton from southern China. Freshwater Biology 52, 1260-1270.
- Villafañe, V.E., Helbling, E.W., Holm-Hansen, O. (1993) Phytoplankton around Elephant Island, Antarctica. Distribution, biomass and composition. Polar Biology, 13, 183-191.

- Villafañe, V.E., Helbling, E.W., Holm-Hansen, O. (1995a) Spatial and temporal variability of phytoplankton biomass and taxonomic composition around Elephant Island, Antarctica, during the summers of 1990-1993. *Marine Biology* 123, 677-686.
- Villafañe, V.E., Helbling, E.W., Holm-Hansen, O., Chalker, B.E. (1995b) Acclimatization of Antarctic natural phytoplankton assemblages when exposed to solar ultraviolet radiation. *Journal of Plankton Research* 17, 2295-2306.
- Villafañe, V.E., Helbling, E.W., Holm-Hansen, O., Díaz, H.G. (1995c) Long-term responses by antarctic phytoplankton to solar ultraviolet radiation. *Antarctic Journal of the United States* 30, 320-323.
- Villafañe, V.E., Janknegt, P.J., de Graaff, M., Visser, R.J.W., van de Poll, W.H., Buma, A.G.J., Helbling, E.W. (2008) UVR-induced photoinhibition of summer marine phytoplankton communities from Patagonia. *Marine Biology* 154, 1021-1029.
- Villafañe, V.E., Reid, F.M.H., (1995) Métodos de microscopía para la cuantificación del fitoplancton, in: Alveal, K., Ferrario, M.E., Oliveira, E.C., Sar, E. (Eds.), *Manual de Métodos Ficológicos*. Universidad de Concepción, Concepción, Chile, pp. 169-185.
- Villafañe, V.E., Valiñas, M.S., Cabrerizo, M.J., Helbling, E.W. (2015) Physio-ecological responses of Patagonian coastal marine phytoplankton in a scenario of global change: Role of acidification, nutrients and solar UVR. *Marine Chemistry* 177, 411-420.
- Volk, T., Hoffert, M.I., (1985) Ocean carbon pumps: Analysis of relative strengths and efficiencies in ocean-driven atmospheric CO<sub>2</sub> changes, in: Sundquist, E.T., Broecker, W.S. (Eds.), *The Carbon Cycle and Atmospheric CO<sub>2</sub>: Natural Variations Archean to Present*. American Geophysical Union, pp. 99-110.
- Walther, G.-R. (2010) Community and ecosystem responses to recent climate change. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 365, 2019-2024.
- 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.
- Weise, A.M., Levasseur, M., Saucier, F.J., Senneville, S., Bonneau, E., Roy, S., Sauvé, G., Michaud, S., Fauchot, J. (2002) The link between precipitation, river runoff, and blooms of the toxic dinoflagellate *Alexandrium tamarense* in the St. Lawrence. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 59, 464-473.
- Williamson, C.E., Zepp, R.G., Lucas, R.M., Madronich, S., Austin, A.T., Ballaré, C.L., Norval, M., Sulzberger, B., Bais, A.F., McKenzie, R.L., Robinson, S.A., Häder, D.P., Paul, N.D., Bornman, J.F. (2014) Solar ultraviolet radiation in a changing climate. *Nature Climate Change* 4, 434-441.
- Winder, M., Hunter, D.A. (2008) Temporal organization of phytoplankton communities linked to physical forcing. *Oecologia* 156, 179-192.
- Wong, C.Y., Chu, W.L., Marchant, H., Phang, S.M. (2007) Comparing the response of Antarctic, tropical and temperate microalgae to ultraviolet radiation (UVR) stress. *Journal of Applied Phycology* 19, 689-699.
- Wu, D., Hu, Q., Yan, Z., Chen, W., Yan, C., Huang, X., Zhang, J., Yang, P., Deng, H., Wang, J. (2012) Structural basis of ultraviolet-B perception by UVR8. *Nature* 484, 214.
- Wu, H.Y., Zou, D.H., Gao, K.S. (2008) Impacts of increased atmospheric CO<sub>2</sub> concentration on photosynthesis and growth of micro- and macro-algae. *Science in China Series C: Life Sciences* 51, 1144-1150.

- Xenopoulos, M.A., Frost, P.C. (2003) UV radiation, phosphorous, and their combined effects on the taxonomic composition of phytoplankton in a boreal lake. *Journal of Phycology* 39, 291-302.
- Xu, X., Liu, J., Shi, Q., Mei, H., Zhao, Y., Wu, H. (2016) Ocean warming alters photosynthetic responses of diatom *Phaeodactylum tricornutum* to fluctuating irradiance. *Phycologia* 55, 126-133.
- Yin, K., Zhang, J., Qian, P.Y., Jian, W., Huang, L., Chen, J., Wu, M.C.S. (2004) Effect of wind events on phytoplankton blooms in the Pearl River estuary during summer. *Continental Shelf Research* 24, 1909-1923.
- Yvon-Durocher, G., Allen, A.P., Cellamare, M., Dossena, M., Dossena, M., Gaston, K.J., Leitao, M., Montoya, J.M., Reuman, D.C., Woodward, G., Trimmer, M. (2015) Five years of experimental warming increases the biodiversity and productivity of phytoplankton. *PLoS Biology* 13, e1002324.
- Zar, J.H. (1999) *Biostatistical analysis*, 4th ed. Prentice Hall, Englewood Cliffs, NJ.
- Zepp, R.G., Erickson III, D.J., Paul, N.D., Sulzberger, B. (2007) Interactive effects of solar UV radiation and climate change on biogeochemical cycling. *Photochemical and Photobiological Sciences* 6, 286-300.
- Zhang, Y., Jiang, H.B., Qiu, B.S. (2013) Effects of UVB Radiation on competition between the bloom-forming cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* and the Chlorophyceae *Chlamydomonas microspheara*1. *Journal of Phycology* 49, 318-328.
- Zhu, W., Wan, L., Zhao, L. (2010) Effect of nutrient level on phytoplankton community structure in different water bodies. *Journal of Environmental Sciences* 22, 32-39.

**Anexo I:**  
***Trabajo de Respaldo***



## Abiotic control of phytoplankton blooms in temperate coastal marine ecosystems: A case study in the South Atlantic Ocean



Paula Bermejo<sup>a,b</sup>, E. Walter Helbling<sup>a,b</sup>, Cristina Durán-Romero<sup>a</sup>, Marco J. Cabrerizo<sup>a,c</sup>, Virginia E. Villafañe<sup>a,b,\*</sup>

<sup>a</sup> Estación de Fotobiología Playa Unión, Casilla de Correos 15, 9103 Rawson, Chubut, Argentina

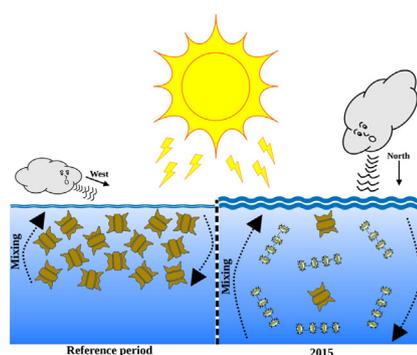
<sup>b</sup> Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Argentina

<sup>c</sup> Departamento de Ecología, Facultad de Ciencias, Universidad de Granada, 18071 Granada, Spain

### HIGHLIGHTS

- The high productivity of coastal SAO is maintained by winter phytoplankton blooms.
- These blooms peaked during June and were dominated by microplanktonic diatoms.
- In 2015 the bloom occurred in August and had a higher proportion of nanoplankton.
- Changes in wind patterns caused the shifts in the 2015 phytoplankton bloom.

### GRAPHICAL ABSTRACT



### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 23 June 2017

Received in revised form 16 August 2017

Accepted 16 August 2017

Available online xxx

Editor: Jay Gan

#### Keywords:

Anthropogenic influence

Diatoms

Patagonia

Solar radiation

Upper mixed layer

Wind stress

### ABSTRACT

Coastal waters of the South Atlantic Ocean (SAO) sustain one of the highest levels of production of the World's ocean, maintained by dense phytoplankton winter blooms that are dominated by large diatoms. These blooms have been associated to calm weather conditions that allow the formation of a shallow and well illuminated upper mixed layer. In Bahía Engaño, a coastal site in Patagonia, Argentina (chosen as a model coastal ecosystem) winter blooms recurrently peaked on June and they were dominated almost entirely by the microplanktonic diatom *Odontella aurita*. However, during the year 2015, a new wind pattern was observed - with many days of northerly high-speed winds, deviating from the calm winter days observed during a reference period (2001–2014) used for comparison. We determined that this new wind pattern was the most important factor that affected the phytoplankton dynamics, precluding the initiation of a June bloom during 2015 that instead occurred during late winter (August). Furthermore, the 2015 bloom had a higher proportion of nanoplanktonic cells (as compared to the reference period) and it was co-dominated by *O. aurita* and *Thalassiosira* spp. Other variables such as nutrient supply and incident solar radiation did not have an important role in limiting and/or initiating the June 2015 bloom, but temperature might have benefited the growth of small cells during August 2015. If these changes in the timing and/or the taxonomic composition of the bloom persist, they may have important consequences for the secondary production and economic services of the coastal SAO.

© 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

\* Corresponding author at: Estación de Fotobiología Playa Unión, Casilla de Correos 15, 9103 Rawson, Chubut, Argentina.

E-mail addresses: [bermejopaula@efpu.org.ar](mailto:bermejopaula@efpu.org.ar) (P. Bermejo), [whelbling@efpu.org.ar](mailto:whelbling@efpu.org.ar) (E.W. Helbling), [mjc@ugr.es](mailto:mjc@ugr.es) (M.J. Cabrerizo), [virginia@efpu.org.ar](mailto:virginia@efpu.org.ar) (V.E. Villafañe).

## 1. Introduction

Coastal ecosystems worldwide are characterized by their high biodiversity and strong gradients in solar radiation, temperature and nutrients (among others) making them sites of special ecological interest (Cloern et al., 2014). Coastal areas represent a small fraction of the total oceanic area i.e., ~5%, however, they are one of the most productive ecosystems on the Earth (Uitz et al., 2010; Rousseaux and Gregg, 2014), providing also highly valuable services (UNEP, 2006). Among these services, food (in the form of fisheries catch) is one of the most important, accounting for ~80 million tons  $\text{yr}^{-1}$  over the globe, with a big share of captures in temperate coastal areas (FAO, 2012). In particular, the coastal waters of the South Atlantic Ocean (SAO) sustain one of the highest production levels of the World's ocean (Longhurst, 1998; Skewgar et al., 2007). They are also important for nursery and recruitment of several species of commercial interest (e.g., hake, Argentine red and Patagonian shrimp; Boschi, 1997), and breeding of several flagship species (e.g., the austral right whale, orca and the Magellan penguin; IWC, 2013).

The high production, richness and biodiversity of species in the SAO is maintained by dense phytoplankton blooms occurring all over the continental shelf (Villafañe et al., 2004; Romero et al., 2006; Guinder et al., 2015) or at the shelf break (Saraceno et al., 2005; Painter et al., 2010; Balch et al., 2014). These blooms may be directly or indirectly affected by diverse drivers (e.g., vertical mixing, solar radiation, temperature and nutrients; Behrenfeld and Boss, 2014), including those of anthropogenic origin. In particular, there is much concern about the impact of excessive inputs of organic and inorganic nutrients via rivers (which in turn is associated to human activities; Cloern et al., 2014) or in the form of atmospheric dust (Jickells and Moore, 2015). These inputs may result in an increase in the biomass and shifts in the phytoplankton structure towards taxa that may be of low nutritional quality, inedible or even toxic for consumers (Smith et al., 1999; Fauchot et al., 2005; Carstensen et al., 2007). All these drivers can affect, in different degree, the dynamics of coastal ecosystems, as well as the functioning and timing of the annual phytoplankton succession, and particularly of the blooms. Since the early work of Sverdrup (1953) on the potential causes that trigger blooms, great efforts have been put to develop a general theory; however, as today, there are many uncertainties respect to: 1) the specific requirements that trigger these massive growth events, 2) when and how are they triggered and, 3) what factors (biotic or abiotic) influence their duration and intensity.

It is already known that blooms usually respond to changes in physical forcing originating in the coastal ocean (e.g., tides), the atmosphere (wind), or on the land surface (precipitation and river runoff) (Paerl et al., 1996; Carstensen et al., 2015). Some abiotic factors are known to directly affect the initiation and the development of phytoplankton blooms, such as light, nutrients (as essential requirements for photosynthesis) and temperature (as catalyst of several enzymatic reactions involved in the  $\text{CO}_2$  uptake reactions; Toseland et al., 2013). Wind (speed and direction) may also influence the strength and duration of phytoplankton blooms, as it conditions the stratification and the depth of the upper mixed layer (UML) that in turn, will control the light availability for photosynthesis (Yin et al., 2004; Fitch and Moore, 2007). For the particular case of coastal areas of the SAO it was proposed (Villafañe et al., 2004) that the phytoplankton blooms are triggered by the calm weather conditions characteristic of the winter time. On the other hand, during spring and summer, strong winds predominate, keeping the cells circulating within a relatively deep and poor-illuminated layer and thus the growth of phytoplankton is low (i.e., pre- and post-bloom conditions; Villafañe et al., 2004; Helbling et al., 2005).

During the year 2015 we determined a change in the wind pattern (as compared to previous years) for the area of Bahía Engaño – a coastal site in the Chubut Province (Patagonia, Argentina). This change gave us the opportunity to study the influence of this new wind pattern on the onset and development of the phytoplankton bloom, using Bahía

Engaño as a model coastal ecosystem for coastal SAO. To this purpose, we compared not only the patterns of wind but also of other abiotic variables (solar radiation, temperature, nutrients, etc.) for the year 2015 against a reference period (2001–2014) to evaluate their impact on the local phytoplankton dynamics. Our work has an evident usefulness, as the understanding of the link between changes in abiotic factors and the dynamics of phytoplankton blooms will allow for a prediction of future impacts on the secondary production and, ultimately, on the regional economy.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Study area

Bahía Engaño is located at the mouth of the Chubut River (Patagonia, Argentina) (Fig. 1). The flow of the Chubut River is regulated by the Florentino Ameghino Dam, 150 km upstream of the river's mouth (Fig. 1). The largest cities of the area (Trelew, Rawson, Gaiman, Dolavon, ~150,000 inhabitants in total, [www.indec.gov.ar](http://www.indec.gov.ar)) are located in the fertile Chubut River valley - between the dam and the river's mouth. In this valley the river is diverted into several irrigation channels that supply water for agricultural and animal breeding activities. About 80% of the horticultural production of the Chubut Province is found along the margin of the Chubut River, in the last 100 km before it reaches the sea. In the past decade, the land use for agricultural activities has doubled and therefore, the use of fertilizers (mainly organochlorine and organophosphate compounds) - without adequate control - had increased (Antolini, 2012; Kopprio et al., 2015). Fishing industries also release their wastes near the mouth of the river reaching, ultimately, Bahía Engaño (Chiarandini Fiore et al., 2013). Thus the study area, as a whole, can be considered as highly impacted by anthropogenic activities.

### 2.2. Data

#### 2.2.1. Meteorological data

Data for the reference period (2001–2014) and for the year 2015 for the different meteorological variables (Table 1) were obtained as follows: Temperature, humidity, wind speed, and direction were continuously obtained (one datum per minute) with a meteorological station (Tecmes, model TS, Argentina) permanently installed (since 2001) on the roof of the Estación de Fotobiología Playa Unión (EFPU; Fig. 1). Precipitation data were obtained from the database SIPAS (Sistema de Información Patagonia Sur, [www.sipas.inta.gob.ar](http://www.sipas.inta.gob.ar)) of the Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA, Trelew; ~15 km upstream from the Rawson Bridge, Fig. 1).

Incident solar radiation is continuously measured (since 1999) using an European Light Dosimeter Network (ELDONET, Real Time Computers, Germany) broadband filter radiometer that measures photosynthetically active radiation (PAR, 400–700 nm), ultraviolet A radiation (UV-A, 315–400 nm) and ultraviolet B radiation (UV-B, 280–315 nm) every second, with the data being averaged and stored every minute. The instrument is permanently located on the roof of the EFPU and is routinely calibrated (once a year) using a solar calibration procedure (Ruggaber et al., 1994; Björn and Murphy, 1985). In this work we only used data corresponding to the reference period (2001–2014) and for the year 2015.

Area-averaged daily aerosol indexes (AI) for the Bahía Engaño area were downloaded from the Earth's database of the National Aeronautics and Space Administration (NASA) (Acker and Leptoukh, 2007). The data were obtained by the Total Ozone Mapping Spectrometer – Earth Probe (TOMS-EP; 2001–2004) with a global grid resolution of  $1 \times 1.25$  degrees, and by the Ozone Monitoring Instrument (OMI; 2005–2015) with a global grid resolution of  $1 \times 1$  degrees. We only considered the positive values of AI as they represent absorbing aerosols (i.e., atmospheric dust).

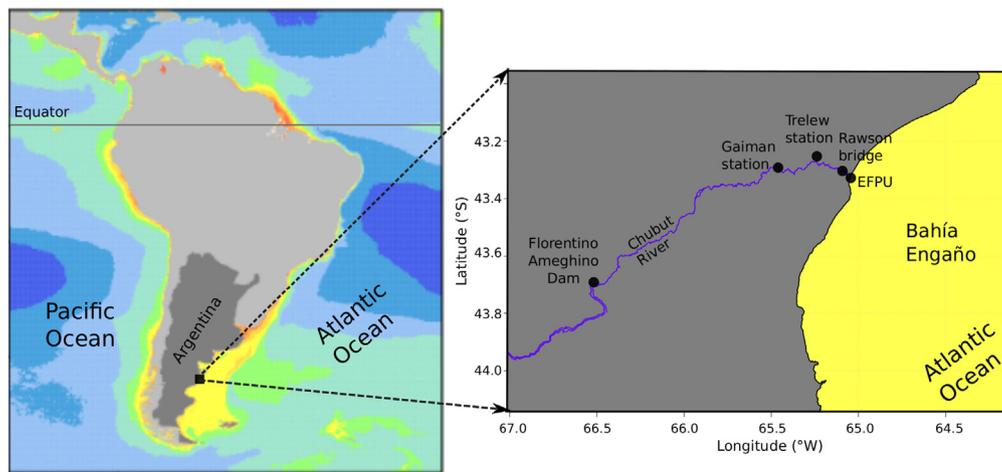


Fig. 1. Map of the study area showing the different sites in which data were obtained.

### 2.2.2. Hydrology and water chemistry data

River flow data (for the reference period and for the year 2015, Table 1) were obtained from the Base de Datos Hidrológica Integrada ([www.bdhi.hidricosargentina.gov.ar](http://www.bdhi.hidricosargentina.gov.ar)) of the Secretaría de Recursos Hídricos (Argentina) at the Gaiman station (~40 km upstream from the Rawson Bridge, Fig. 1). Physical (i.e., water temperature) and chemical data (i.e., nutrients) from the reference period were obtained from different published sources as well as from unpublished data collected by our research group (Table 1). During 2015, surface water samples (~0.5 m depth) were collected every 10–15 days at two sites: 1) the outer regime (Bahía Engaño, at the mouth of the Chubut River and during high tide, salinities > 33), and 2) the inner regime of the estuary (Rawson Bridge, salinities < 1; Fig. 1) to determine physical (temperature and conductivity) and chemical characteristics (nutrients) of both water bodies. Temperature and conductivity were measured in situ using a multiparameter probe (Yellow Spring Instruments, model XLM 600, USA). The samples for chemical characterization of macronutrients ( $\text{NO}_3^- + \text{NO}_2^-$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$ ,  $\text{SiO}_3^{2-}$ ; in triplicates) were immediately taken to the EFPU (10 min away from both sampling sites), put in 100-mL High-Density Polyethylene (HDPE) bottles and frozen ( $-20^\circ\text{C}$ ) until analyses. These samples were analyzed using spectrophotometric techniques (Strickland and Parsons, 1972).

### 2.2.3. Phytoplankton data

Due to the scarcity of biological data for the area, we used and extended the reference period (from 1986 to 2014), including all available data for chlorophyll-*a* (Chl-*a*) concentration, taxonomic composition and abundance of phytoplankton cells. These data were obtained from

different published sources as well as from unpublished data collected by our research group (Table 1). During 2015, Chl-*a* concentration and phytoplankton taxonomic composition and abundance data were obtained as follows: Surface water samples (triplicates) were collected at the aforementioned sites (i.e., inner and outer regime of the estuary) with an acid-cleaned bucket (1 N HCl), pre-screened (200  $\mu\text{m}$ -mesh) to eliminate large zooplankton and put in acid-cleaned (1 N HCl) polycarbonate bottles (5 L) for further analyses/determinations. To determine the concentration of Chl-*a*, aliquots of 100–250 mL were filtered onto Munktell GF/F filters (25 mm diameter) that were placed in 15 mL centrifuge tubes. Five mL of absolute methanol (Holm-Hansen and Riemann, 1978) were added to the tubes that were then placed in a sonicator for 20 min at  $20^\circ\text{C}$ , and the extraction was completed after 40 min more in darkness. After the extraction period, the samples were centrifuged at 2000 rpm for 20 min and the supernatant scanned from 250 to 750 nm, using a spectrophotometer (Hewlett Packard model HP 8453E, USA). The Chl-*a* concentration was calculated using the equation of Porra (2002).

Samples for identification and enumeration of phytoplankton were put in 250-mL brown glass bottles, and fixed with buffered formaldehyde (final concentration 0.4% in the sample) or acid Lugol solution (1% vol vol $^{-1}$ ) for sea and river samples, respectively. Sub-samples of 10–25 mL were allowed to settle for 24 h in Utermöhl chambers and, in the case of marine samples, a drop of Rose Bengal was added to better distinguish organic material from detritus. Species were identified and enumerated using an inverted microscope (Leica, model DM IL, Germany) following the technique described in Villafañe and Reid (1995). The biovolumes of the phytoplankton cells were calculated according to Hillebrand et al. (1999). Biovolumes were then converted

**Table 1**  
Sources of data used in this study for the reference (2001–2014) and for 2015 periods, of solar radiation doses (ultraviolet A and B [UV-A and UV-B] and photosynthetically active radiation [PAR]), temperature (air, seawater and river), wind (speed and direction), precipitation, river flow, Chl-*a* and phytoplankton abundance and composition, and nutrients.

Variable/period	Frequency of data/number of observations	Sources
Solar radiation (UV-A, UV-B, PAR) (2001–2015)	Every minute	EFPU database ( <a href="http://www.efpu.org.ar">www.efpu.org.ar</a> )
Air temperature (2001–2015)	Every minute	EFPU database ( <a href="http://www.efpu.org.ar">www.efpu.org.ar</a> )
Wind speed/direction (2001–2015)	Every minute	EFPU database ( <a href="http://www.efpu.org.ar">www.efpu.org.ar</a> )
Precipitation (2001–2015)	Monthly	SIPAS database ( <a href="http://www.sipas.inta.gob.ar">www.sipas.inta.gob.ar</a> )
River flow (2001–2015)	Daily	BDHI database ( <a href="http://www.bdhi.hidricosargentina.gov.ar">www.bdhi.hidricosargentina.gov.ar</a> )
Water temperature (1986–2015) (sea/river)	Sea: $n = 162$ River: $n = 105$	Helbling (1989); Villafañe et al. (2004); Helbling et al. (2005, 2010); Spinelli et al. (2016); Cabrerizo et al. (2017); EFPU (unpubl.)
Nutrients (1986–2015) (sea/river)	Sea: $n = 94$ River: $n = 76$	Helbling (1989); Helbling et al. (2005); EFPU (unpubl.)
Chl- <i>a</i> (1986–2015)	$n = 194$	Helbling (1989); Barbieri et al. (2002); Helbling et al. (2005, 2010); Villafañe et al. (2004, 2008); Spinelli et al. (2016); Cabrerizo et al. (2017); EFPU (unpubl.)
Phytoplankton abundance/composition/C biomass	$n = 90$	Sastre et al. (1994); Villafañe et al. (2004, 2008); Spinelli et al. (2016); EFPU (unpubl.)

into carbon content (i.e., biomass) using the equations of Strathmann (1967), considering the abundance of cells in the samples. The percentage microplankton was obtained as the number of microplankton cells relative to the total of cells (\*100), or by the biomass (as carbon) in the microplanktonic fraction as compared to the total carbon biomass. There was a good agreement between both methods of calculation and thus the data presented is based on cell counts.

2.3. Data treatment

The biological data (i.e., Chl-*a*, carbon biomass, cell abundances and percentage of microplankton and diatoms) are presented as box-plots therefore medians, first and third quartiles, together with 1.5 of the interquartile range (IQR) and outliers are shown. In the case of air, river and seawater temperature data, the mean monthly values, and standard deviations (SD) were calculated for the reference period as well as for the year 2015. Mean monthly values and SD were also calculated for the river flow, precipitation data, and aerosol index. In the case of wind data, the mean numbers of days per year (i.e., frequency) having the same maximum wind speed, with a resolution of 1 km h<sup>-1</sup> interval, were calculated for the bloom period (i.e., winter) for both, the reference period and for the year 2015.

Normality and homoscedasticity of the data sets were tested using the Shapiro-Wilks and Barlett tests, respectively (Zar, 1999). As the data did not follow a normal distribution, statistical differences between the year 2015 and the reference period data sets were established using the non-parametric Mann Whitney *U* test.

3. Results and discussion

One of the most important characteristics of the South Atlantic Ocean (SAO) is that it is exposed to intense winds almost all year around (Gaiero et al., 2003; Gassó and Stein, 2007) and thus the upper water

column over the continental shelf is in general well mixed and with a deep upper mixed layer, UML (Neale et al., 2003). Nevertheless, there is a temporal heterogeneity in the wind patterns, being more intense during spring and summer, and less so and variable during winter (Villafañe et al., 2004; Helbling et al., 2005). We used the wind data over our reference period to calculate the numbers of days per year (i.e., frequency) with a certain wind speed, and a clear bi-modal curve was observed during winter (Fig. 2a). The first peak of the curve involves calm days, with low wind speeds (<15 km h<sup>-1</sup>) occurring during winter and with a predominant west direction (Fig. 2a,c); during this period there were up to 11 days with a maximum speed ca. 10 km h<sup>-1</sup>. The second peak of the curve corresponds to high wind speeds (up to 5 days with wind speeds ca. 40–45 km h<sup>-1</sup>) occurring mostly during spring and summer, as previously determined by Villafañe et al. (2004) and Helbling et al. (2005). During 2015, however, a uni-modal curve was determined (Fig. 2b) with up to 10 days with wind speeds ca. 30–35 km h<sup>-1</sup>. Thus the characteristic calm days observed during winter, for the reference period (Fig. 2a) completely disappeared and instead, during winter 2015 the maximum wind speed was always >15 km h<sup>-1</sup> and predominantly from the north (Fig. 2d).

Wind is an essential factor controlling phytoplankton dynamics, as determined not only in the early work of Sverdrup (1953) but also in other studies that proposed that strong winds could delay the initiation of blooms, while calmer winds could promote their formation (e.g., Arrigo et al., 1998; Collins et al., 2009; Ferreira et al., 2015). Previous reports (Fitch and Moore, 2007) indicate that phytoplankton biomass and blooms in the Southern Ocean peaked at low wind speeds (<18 km h<sup>-1</sup>) whereas over this threshold their initiation was precluded (Weise et al., 2002). Thus, the changes in the wind pattern observed during 2015 (Fig. 2) gave us a unique opportunity to analyze the impact that it might have on the winter phytoplankton bloom in our study area.

The Chl-*a* concentration (Fig. 3a), phytoplankton carbon biomass (Fig. 3b) and abundance of cells (Fig. 3c) show a clear pattern, with a

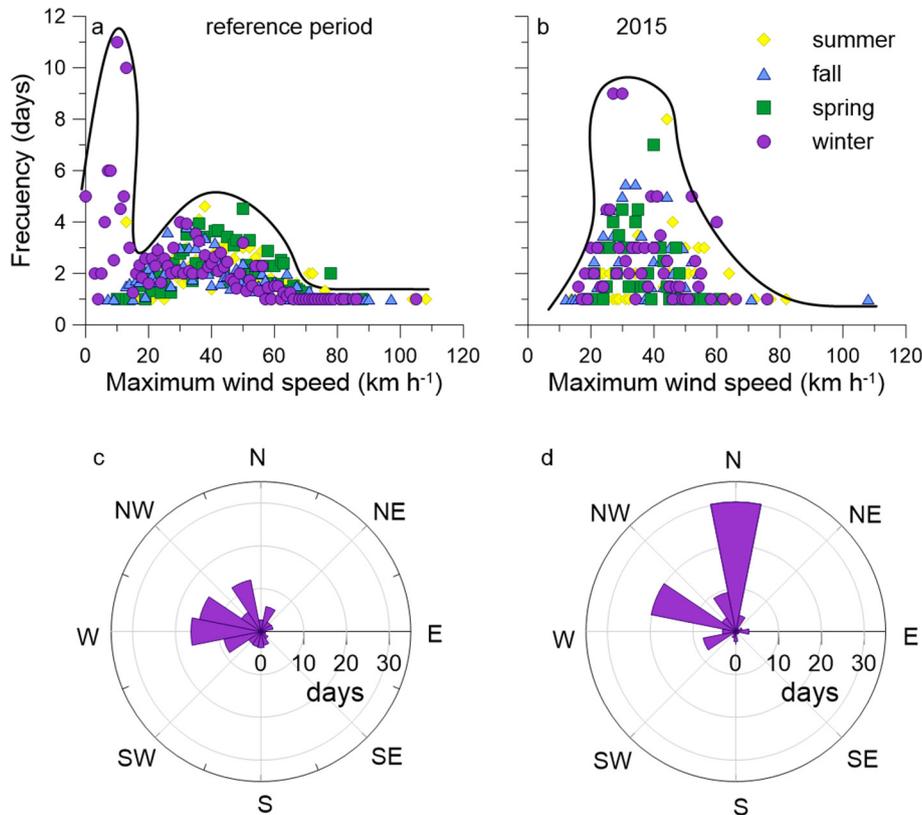
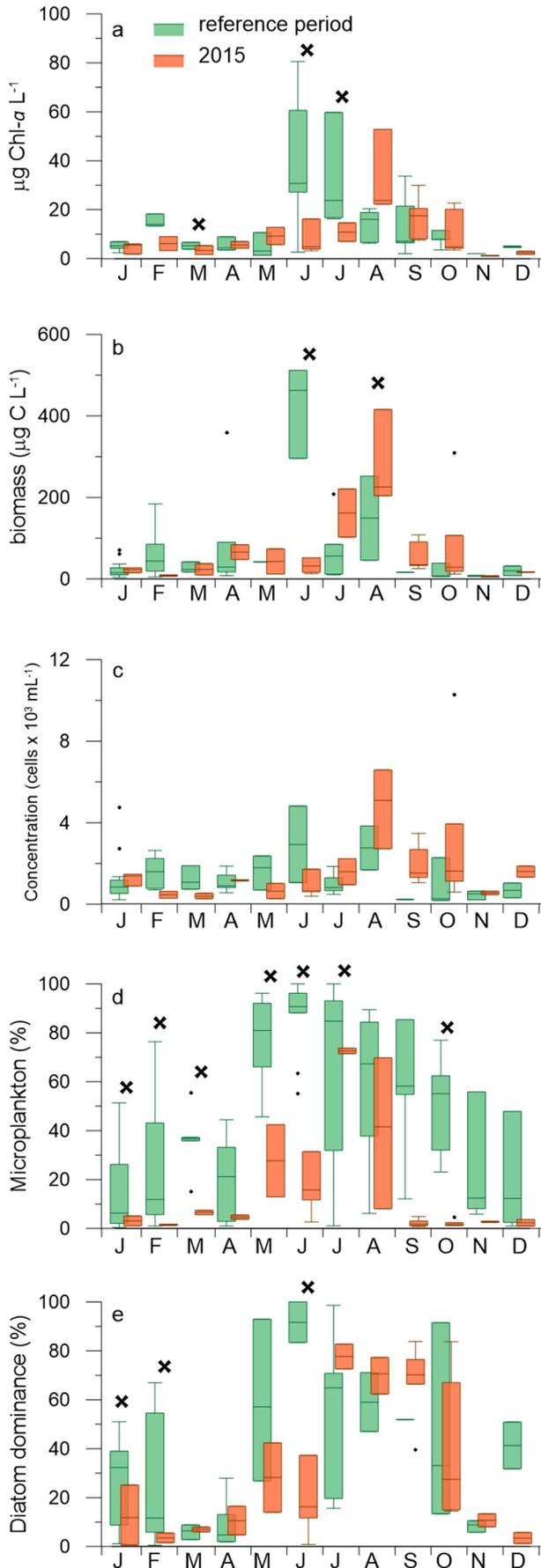


Fig. 2. Wind speed and direction for the reference period (2001–2014) and for the year 2015. a, b) Mean frequency (number of days) of maximum wind speed (km h<sup>-1</sup>) for summer, fall, spring and winter. c, d) Mean frequency (number of days) for each wind direction during the winter of the reference and 2015 periods, respectively.



winter phytoplankton bloom during the reference period peaking at the month of June, and with pre- and post-bloom periods during fall, and spring–summer, respectively. The median Chl-*a*, phytoplankton carbon biomass, and cell abundances during the peak of the bloom were ca.  $\sim 30 \mu\text{g Chl-}a \text{ L}^{-1}$ ,  $\sim 450 \mu\text{g C L}^{-1}$  and  $3 \times 10^3 \text{ cells mL}^{-1}$ , respectively, but values  $> 100 \mu\text{g Chl-}a \text{ L}^{-1}$  and  $> 5 \times 10^3 \text{ cells mL}^{-1}$  were previously reported for two particular years (2000–2001; Helbling et al., 2005). Outside of the winter bloom period, the Chl-*a* concentration, biomass, and phytoplankton abundance remained relatively low i.e.,  $< 10 \mu\text{g Chl-}a \text{ L}^{-1}$ ,  $< 50 \mu\text{g C L}^{-1}$  and  $2 \times 10^3 \text{ cells mL}^{-1}$  (Fig. 3a–c) although some months had slightly higher values (e.g., early spring). These patterns in phytoplankton abundance were in turn associated with the cell size structure, with microplanktonic cells ( $> 20 \mu\text{m}$ ) dominating the winter bloom during the reference period (Fig. 3d), being the diatom *Odontella aurita* the dominant species ( $> 80\%$  of the diatom contribution, Fig. 3e). The microplankton diatom dominance reported during the winter bloom period is consistent with other studies (Marañón et al., 2012; Harding et al., 2015) that showed a higher proportion of diatoms in communities that had high availability of resources and phytoplankton biomass. Moreover, the fact that these blooms in the SAO are almost completely dominated by large diatoms (i.e., *Odontella aurita*) agrees with the idea that estuarine-coastal waters act as diatom-producing factories that provide huge amounts of high-value food to consumers and regulate the global silica cycling (Agustí et al., 2015). During the pre- and post-bloom periods, however, nanoplanktonic cells ( $2\text{--}20 \mu\text{m}$ ; i.e., mostly unidentified flagellates) were the most conspicuous (Fig. 3d). Even more, a survey carried out during the summer of 2006 in the study area (Villafañe et al., 2008) determined high biodiversity of picoplankton ( $< 2 \mu\text{m}$ ) using HPLC techniques, with chlorophytes, cyanobacteria and cryptophytes being the most representative groups and accounting up to 30% of the total phytoplankton biomass; thus picoplankton, although not evaluated in this study, might be numerically important in the area when diatoms are not dominant. Dinoflagellates never contributed for an important share ( $< 2\%$  of total abundance, with a maximum concentration of  $\sim 60 \text{ cells mL}^{-1}$ ), but it is worth to mention that *Alexandrium tamarense*, found in the samples mostly during the post-bloom is responsible for red tide events (Gayoso, 2001). The low contribution of dinoflagellates found in our study and also in a recent meta-analysis (Carstensen et al., 2015) can be attributed to the fact that they are poor competitors, as compared with fast-growing diatoms such as *O. aurita*. Moreover, a previous work (Smayda and Reynolds, 2003) reported that dinoflagellates are not able to compete with diatoms because of their low nutrient uptake capacities and their low growth rates under the replete-nutrient conditions as found in coastal waters. Also, a study carried out in the Baltic Sea proposed that dinoflagellates are only relevant contributors to the community when they develop alternative biotic strategies other than photosynthesis to obtain carbon and/or nutrients, i.e. mixotrophy or allelopathic interference (Spilling and Markager, 2008). In contrast to the above described phytoplankton dynamics, during 2015 there were two significant deviations (as compared to the reference period): The first one was related to the significantly lower values of Chl-*a*, carbon biomass and cells abundance during June of 2015 as compared to June bloom characteristic of the reference period (Fig. 3a–c). Furthermore, the 2015 bloom occurred later in the season i.e., on August (Fig. 3a–c). The second deviation was related to the size structure and composition of the phytoplankton community, with microplankton and diatoms accounting for  $< 40\%$  dominance during June 2015 as compared to the  $> 80\%$  during the reference period (Fig. 3d, e). In addition, the late bloom observed during August 2015 (Fig. 3a–c) was co-dominated by

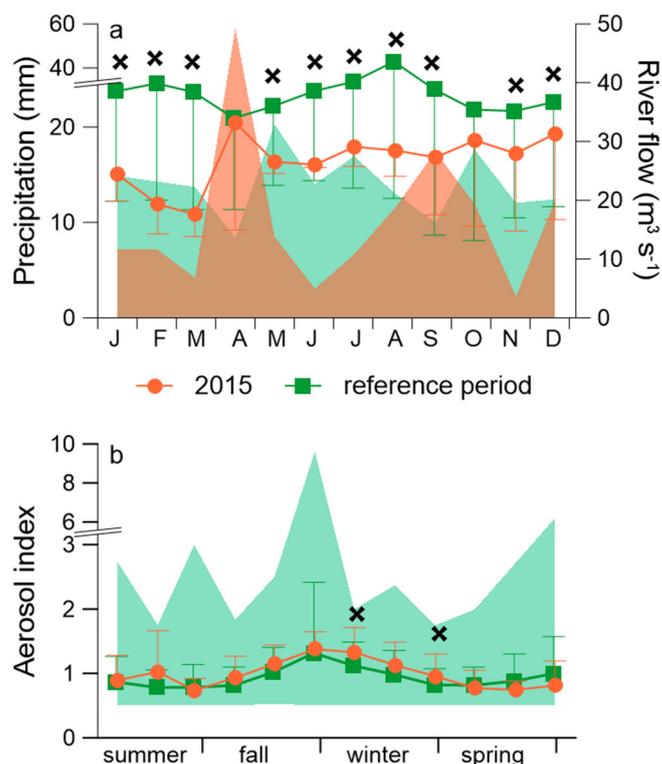
**Fig. 3.** Box plots showing the monthly median, first and third quartiles, together with 1.5 of the interquartile range (IQR) and outliers, for both the reference period and the year 2015 for: a) Chl-*a* concentration (in  $\mu\text{g Chl-}a \text{ L}^{-1}$ ), b) Phytoplankton biomass (in  $\mu\text{g C L}^{-1}$ ); c) Total phytoplankton abundance (in cells  $\times 10^3 \text{ mL}^{-1}$ ), d) Percentage of microplankton ( $> 20 \mu\text{m}$ ) and, e) Percentage of diatom contribution. The X indicates significant differences between the reference period and the year 2015.

nanoplanktonic diatoms such as *Thalassiosira* species (10–20  $\mu\text{m}$  in diameter) together with *O. aurita*.

It was proposed for the study area (Villafañe et al., 2004; Helbling et al., 2005) that the stratification of the water column (i.e., shallow upper mixed layer, UML) during the winter was the key factor for the development of the intense phytoplankton blooms observed during the reference period. The underlying mechanism that allowed the growth of phytoplankton was such that stratification resulted in higher solar radiation availability during this low-light period, allowing the cells to take full advantage of nutrients. On the other hand, the intense vertical mixing due to the strong winds - characteristic of mid-latitudes of the SAO - precluded the development and/or the maintenance of the bloom during the rest of the year (e.g., spring and summer). This is in agreement with a recent survey of 86 estuarine-coastal sites that showed that the occurrence of blooms did not follow a response pattern across gradients of temperature, salinity or nutrient concentrations; rather, the wind direction and/or speed was the main variable directly related to the bloom occurrence and its timing (Carstensen et al., 2015). The differences in the stratification (due to differences in wind conditions) throughout the annual succession during the reference period are also seen in the C/Chl-*a* ratio, that had significantly higher values during the June bloom (value of 18) in spite of the relatively low irradiance during winter, as compared to the rest of the year (values <8). These values, although somehow lower than in other parts of the World's ocean (i.e., 15–176; Sathyendranath et al., 2009) reflect the relatively deep mixing for most of the year, and the low-light history of these cells. In June of 2015 however, the C/Chl-*a* ratio was <5, supporting the view that the strong northerly winds mixed the water column, thus exposing the phytoplankton to relatively low solar radiation levels. During August 2015 (bloom period) the irradiance was higher and thus the C/Chl-*a* ratio during this month also increased (value of ca. 15).

The phytoplankton dynamics also depends on other variables such as solar radiation (Platt and Jassby, 1976; Mitchell et al., 1991; Cloern, 1996), temperature (Sobrino and Neale, 2007; Yvon-Durocher et al., 2015) and nutrients (Paerl, 2007; Lancelot and Muylaert, 2011). Thus we analyzed and compared the patterns of these variables during 2015 and the reference period to evaluate if there were changes that may also accounted for the lack of a bloom during June 2015. The mean daily doses for surface solar radiation i.e., PAR (400–700 nm) and for ultraviolet radiation (UVR, 280–400 nm) during 2015 were comparable to the reference period with the exception of a few months (June to August) when they were slightly, but significantly lower in the former (data not shown). These differences in solar radiation doses were so small that we consider that they were not enough to solely explain the lack of a phytoplankton bloom during June 2015, but they contributed to decrease the irradiance received by the cells in the water column. Nevertheless, previous experimental and modeling results indicate that a critical light intensity is needed to trigger a phytoplankton bloom (Siegel et al., 2002; Sommer and Lengfellner, 2008).

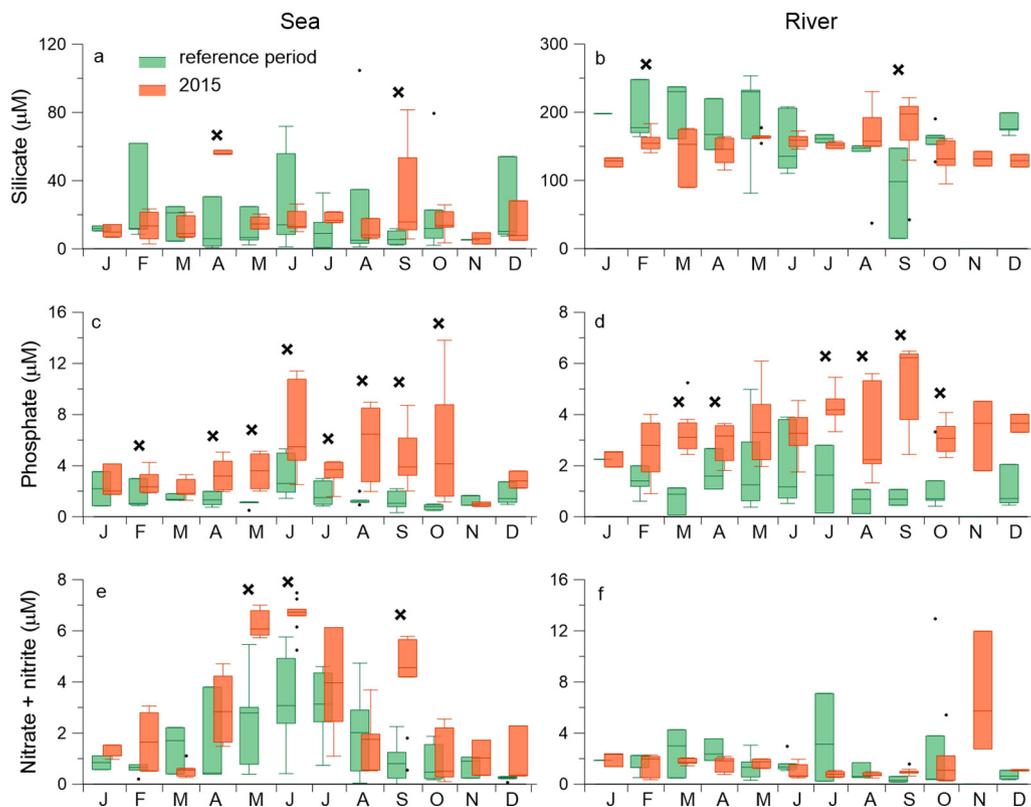
In the water column however, solar radiation is further reduced by the presence of dissolved and suspended organic material from riverine and eolic origin, and it is expected that their amounts will increase in the future due to the growth of cities and their associated economic activities (Rabalais et al., 2009; Cloern et al., 2016). In the study area, the monthly precipitation values (Fig. 4a) during 2015 were in general lower than during the reference period, and this might be associated with the 2015 El Niño event that caused less precipitation than the average in the Patagonian area (<https://www.ncdc.noaa.gov/sotc/global/201513>). This pattern was also observed (Fig. 4a) in the river flow (with the exception of April and September 2015) that had a yearly mean of  $26.8 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$  (SD = 4.5) and  $37.9 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$  (SD = 2.6) during the year 2015 and the reference period, respectively. The river flow is controlled by the Florentino Ameghino Dam and this is why there is little or no correlation in the monthly means between precipitation and river flow. It could be argued that as the river flow and precipitation



**Fig. 4.** a) Monthly precipitation (in mm, symbols and deviations) and river flow (in  $\text{m}^3 \text{ s}^{-1}$ , shaded areas) for the reference (green) and 2015 periods (orange); b) Daily aerosol index (AI) for the reference period (green squares) and year 2015 (orange circles); the shaded green area covers the maximum and minimum values for the reference period. The X represents significant differences between the reference period and the year 2015. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

were lower in 2015 than in the reference period, lower amounts of dissolved and particulate materials would be dumped into the coastal areas, thus counteracting somehow the lower solar radiation levels determined during winter in 2015. However, if there was a decrease in the amount of materials carried by the river, this was not reflected in the C/Chl-*a* ratio (as mentioned above) that during June 2015 was low (<5), highlighting for the low-light history of the cells. The other source of particulates (eolic aerosols i.e., dust and smoke Acker and Leptoukh, 2007), estimated through the monthly mean aerosol index (AI), varied between 0.7 and 1.4 (Fig. 4b) for both, 2015 and the reference period; the only exceptions were July and September of 2015, when the AI values were significantly higher than during the reference period. However, a particular event gave rise to a maximum reference AI of ca. 10 during June 2011, when the Puyehue volcano erupted in the Andes (~700 km west from Bahía Engaño) but ashes reached soon the study area, as aerosols in general (and the Patagonian dust in particular) can travel long distances over the continents and seas such as the SAO region (Johnson et al., 2011; Li et al., 2010). This event resulted in a decrease in the underwater radiation levels in the study area; however, it did not affect photosynthesis and growth during the bloom period (Villafañe et al., 2013).

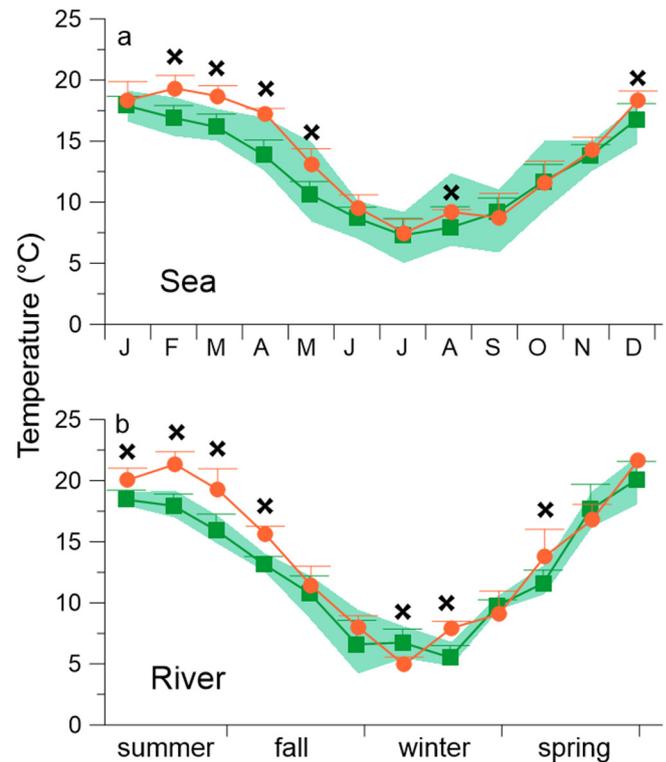
Nutrients are also essential for photosynthesis and growth, and in the coastal SAO they originate from local upwellings (Pisoni et al., 2014), river inputs (mainly associated to anthropogenic activities i.e., agricultural and land use; Giraud et al., 2008) and dust deposition from eolic origin (Jickells and Moore, 2015; Song et al., 2016). Thus it can be argued that the reduced precipitation and river flow during 2015 would decrease the amount of nutrients brought into the coastal areas, potentially modifying the dynamics of the bloom. However, and although there were differences in the nutrient concentrations between



**Fig. 5.** Box plots showing the monthly median, first and third quartiles, together with 1.5 of the interquartile range (IQR) and outliers, for both the reference period and the year 2015 for: a, b) Silicate concentration (in  $\mu\text{M}$ ), at sea and river, respectively. c, d) Phosphate concentration (in  $\mu\text{M}$ ), at sea and river, respectively. e, f) Nitrite + nitrate concentration (in  $\mu\text{M}$ ), at sea and river, respectively. The X represents significant differences between the reference period and the year 2015.

2015 and the reference period (Fig. 5) they were probably not the main drivers behind the changes in the phytoplankton dynamics. Silicate concentrations were always higher in the river than in the sea (Fig. 5a, b) but high values were observed at the sea during April and September 2015, coinciding with the two peaks of river flow (Fig. 4a) during this year. This increase in silicate, however, was not reflected in the dominance of diatoms or in the relative proportion of microplankton (Fig. 2d, e). In the case of nitrogen and phosphorus (Fig. 5c–f), and despite their high variability throughout the year, their patterns during the reference years and during 2015 in both the river and the sea were rather similar, for most of the time. This suggests little use of nutrients within the estuary, and that much of them, transported by the river, reached the ocean. However, significantly higher values in 2015 (as compared with the reference period) were determined for phosphate, both in the river and the sea (Fig. 5c, d), and nitrite + nitrate at the seawater end of the estuary (Fig. 5e), with values that sometimes surpassed the maximum registered during the reference period reported here. The high amounts of phosphate are probably related to the more intense use of land (i.e., agricultural activities and excessive use of fertilizers; Kopprio et al., 2015), mainly in the form of organophosphates (Antolini, 2012). On the other hand, the high amounts of nitrogen observed at the sea end of the estuary, that far exceeded those registered in the river, may originate from the fish processing factories (Arvanitoyannis and Kassaveti, 2008) located at the mouth of the river (Chiarandini Fiore et al., 2013). Overall, we conclude that nutrients were not limiting throughout the year; even more, during 2015 their concentrations were in general higher than during the reference period therefore, the lack of a bloom during June 2015 was not directly related to nutrients availability.

Finally, we evaluated the water temperature patterns during 2015 and the reference period. At the sea end of the estuary, higher temperatures were determined during 2015, as compared with the reference period, mainly in summer and fall (Fig. 6). Thus seawater was warmer



**Fig. 6.** Monthly temperature ( $^{\circ}\text{C}$ ) average ( $\pm\text{SD}$ , vertical lines) for seawater and river during the reference (green squares) and 2015 periods (orange circles). The green shaded areas cover the maximum and minimum values for the reference period. The X represents significant differences between the reference period and the year 2015. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

during August 2015 than in the past (Fig. 4b) and this temporally coincided with the maximum Chl-*a* and cell abundances observed (Fig. 3b, c). This slight, but significant increase in temperature during August 2015 might partially explain the changes in the phytoplankton size structure towards a higher proportion of small nanoplankton species (Fig. 3d). This is in agreement with other studies (Winder and Hunter, 2008; Lewandowska and Sommer, 2010) that determined the key role of temperature in shaping the size structure of the community. In particular, other studies conducted in the SAO (north of Bahía Engaño) reported changes in the phytoplankton community towards the dominance of small diatoms such as *Cyclotella* and *Thalassiosira* that were associated to the combined effects of increased water temperature and changes in precipitation patterns (Guinder and Molinero, 2013).

#### 4. Conclusions

SAO coastal areas deserve much attention due to their high productivity and their key role as breeding and nursery areas for species of ecological and economical interest. This is an under-sampled area as compared to other parts of the World's ocean, so our work presented here add relevant information about recent changes in wind patterns and how this affected the phytoplankton dynamics in this coastal system. The delay of the annual phytoplankton bloom in Bahía Engaño during 2015, as well as the reduction in its intensity clearly highlight for an important influence of physical mechanisms as disturbance agents that can disrupt the balance between phytoplankton division and grazer consumption (Behrenfeld and Boss, 2014). In the coastal SAO, wind provides by itself the necessary mechanism to trigger or to delay blooms. These changes in the timing and intensity of the bloom, tied to shifts in the size structure of the bloom community towards smaller cells, can alter the subsequent ecosystem feedbacks due to the coupling predator (zooplankton) - prey (phytoplankton), negatively impacting the food quality and quantity for the zooplankton community and thus, the energy transference to higher trophic levels.

This work allowed us to establish a starting point for temporal patterns and variability of different biotic and abiotic factors for the last decades, and it constitutes the first step to understand potential changes that are expected for the future. It is obvious, from the type of data obtained so far (with important gaps in time and effort to collect the data), the necessity of implementing more rigorous and new monitoring and control programs over long-term. Such programs should consider other variables related with climate (e.g. winds) and/or human-being activities (e.g. amount of nutrients of anthropogenic origin, effluents from fisheries, agricultural fertilizers) to obtain more precise predictions that would allow policymakers and environmental managers to take decisions based on solid empirical evidences.

#### Acknowledgment

We thank M. Valiñas for helpful discussions about this manuscript. L. Bandieri helped with computer drawings and R. Gonçalves during sampling. We thank the comments and suggestions of two anonymous reviewers that helped us to improve this manuscript. This work was supported by Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica - ANPCyT (PICT 2013-0208 and PICT 2015-0462), Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas - CONICET (PIP No. 112-201001-00228) and Fundación Playa Unión. MJC was supported by a "Formación de Profesorado Universitario" PhD grant of the Ministerio de Educación, Cultura y Deporte (FPU12/01243), two short-term placement grants at EPPU - Ministerio de Educación, Cultura y Deporte (EST13/0666) and Campus de Excelencia Internacional - Universidad de Granada (Ceibiotic - UGR, call 2015), and by a postdoctoral fellow from University of Granada, Spain. We acknowledge the Goddard Earth Sciences and Information Services Center (GES DISC) from NASA and associated personnel for the production of the data used in this research effort. We thank the Cooperativa Eléctrica y de Servicios de Rawson for

providing building's infrastructure to carry out this work. This work is in partial fulfillment of the Ph. D thesis of PB. This is Contribution No. 168 of Estación de Fotobiología Playa Unión.

#### References

- Acker, J.G., Leptoukh, G., 2007. Online analysis enhance NASA Earth science data. *EOS Trans. Am. Geophys. Union* 88, 14–17.
- Agustí, S., González-Gordillo, J.L., Vaqué, D., Estrada, M., Cerezo, M.I., Salazar, G., Duarte, C.M., 2015. Ubiquitous healthy diatoms in the deep sea confirm deep carbon injection by the biological pump. *Nat. Commun.* 6, 8.
- Antolini, L., 2012. Percepción del riesgo y dinámica de uso de plaguicidas agrícolas en el Valle Inferior del Río Chubut. 1. Ministerio de Salud, Argentina, pp. 1–183.
- Arrigo, K.R., Weiss, A.M., Smith Jr., W.O., 1998. Physical forcing of phytoplankton dynamics in the southwestern Ross Sea. *J. Geophys. Res.* 103 (C1), 1007–1021.
- Arvanitoyannis, I.S., Kassaveti, A., 2008. Fish industry waste: treatments, environmental impacts, current and potential uses. *Int. J. Food Sci. Technol.* 43, 726–745.
- Balch, W.M., Drapeau, D.T., Bowler, B.C., Lyczkowski, E.R., Lubelczyk, L.C., Painter, S.C., Poulto, A.J., 2014. Surface biological, chemical, and optical properties of the Patagonian Shelf coccolithophore bloom, the brightest waters of the Great Calcite Belt. *Limnol. Oceanogr.* 59, 1715–1732.
- Barbieri, E.S., Villafañe, V.E., Helbling, E.W., 2002. Experimental assessment of UV effects upon temperate marine phytoplankton when exposed to variable radiation regimes. *Limnol. Oceanogr.* 47, 1648–1655.
- Behrenfeld, M.J., Boss, E.S., 2014. Resurrecting the ecological underpinnings of ocean plankton blooms. *Annu. Rev. Mar. Sci.* 6, 167–194.
- Björn, L.O., Murphy, T.M., 1985. Computer calculation of solar ultraviolet radiation at ground level. *Physiol. Veg.* 23, 555–561.
- Boschi, E.E., 1997. Las pesquerías de crustáceos decápodos en el litoral de la República Argentina. *Inverrig. Mar.* 25, 19–40.
- Cabrera, M.J., Carrillo, P., Villafañe, V.E., Helbling, E.W., 2017. Differential impacts of global change variables on coastal South Atlantic phytoplankton: role of seasonal variations. *Mar. Environ. Res.* 125, 63–72.
- Carstensen, J., Henriksen, P., Heiskanen, A., 2007. Summer algal blooms in shallow estuaries: definition, mechanisms, and link to eutrophication. *Limnol. Oceanogr.* 52, 370–384.
- Carstensen, J., Klais, R., Cloern, J.E., 2015. Phytoplankton blooms in estuarine and coastal waters: seasonal patterns and key species. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 162, 98–109.
- Chiarandini Fiore, J.P., Scapini, M.C., Olivieri, A.C., 2013. Excitation-emission matrices applied to the study of urban effluent discharges in the Chubut River (Patagonia, Argentina). *Environ. Monit. Assess.* 185, 6909–6919.
- Cloern, J.E., 1996. Phytoplankton bloom dynamics in coastal ecosystems: a review with some general lessons from sustained investigation of San Francisco Bay, California. *Rev. Geophys.* 34, 127–168.
- Cloern, J.E., Foster, S.Q., Fleckner, A.E., 2014. Phytoplankton primary production in the world's estuarine-coastal ecosystems. *Biogeosciences* 11, 2477–2501.
- Cloern, J.E., Abreu, P.C., Carstensen, J., Chauvaud, L., Elmgren, R., Grall, J., Greening, H., Johansson, J.O.R., Kahru, M., Sherwood, E.T., Xu, J.L.E., Yin, K., 2016. Human activities and climate variability drive fast-paced change across the world's estuarine-coastal ecosystems. *Glob. Chang. Biol.* 22, 513–529.
- Collins, A.K., Allen, S.E., Pawlowicz, R., 2009. The role of wind in determining the timing of the spring bloom in the Strait of Georgia. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 66, 1597–1616.
- FAO, 2012. The State of World Fisheries and Aquaculture. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome (230 pp).
- Fauchot, J., Levasseur, M., Roy, S., 2005. Daytime and nighttime vertical migrations of *Alexandrium tamarense* in the St. Lawrence estuary (Canada). *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 296, 241–250.
- Ferreira, A.S.A., Hátún, H., Counillon, F., Payne, M.R., Visser, A.W., 2015. Synoptic-scale analysis of mechanisms driving surface chlorophyll dynamics in the North Atlantic. *Biogeosciences* 12, 3641–3653.
- Fitch, D.T., Moore, J.K., 2007. Wind speed influence on phytoplankton bloom dynamics in the Southern Ocean Marginal Ice Zone. *J. Geophys. Res.* 112 (C08006) (13 pp).
- Gaiero, D.M., Probst, J.L., Depetris, P.J., Bidart, S.M., Leleyter, L., 2003. Iron and other transition metals in Patagonian riverborne and windborne materials: geochemical control and transport to the southern South Atlantic Ocean. *Geochim. Cosmochim. Acta* 67, 3603–3623.
- Gassó, S., Stein, A.F., 2007. Does dust from Patagonia reach the sub-Antarctic Atlantic Ocean? *Geophys. Res. Lett.* 34, 1–5.
- Gayoso, A.M., 2001. Observations on *Alexandrium tamarense* (Lebour) Balech and other dinoflagellate populations in Golfo Nuevo, Patagonia (Argentina). *J. Plankton Res.* 23, 463–468.
- Giraud, X., Le Quérec, C., da Cunha, L.C., 2008. Importance of coastal nutrient supply for global ocean biogeochemistry. *Glob. Biogeochem. Cycles* 22 (GB2025) (15 pp).
- Guinder, V.A., Molinero, J.C., 2013. Climate change effects on marine phytoplankton. In: Arias, A.H., Menendez, M.C. (Eds.), *CRC Press, Marine Ecology in a Changing World*, pp. 68–90.
- Guinder, V.A., López-Abbate, M.C., Berasategui, A.A., Negrin, V.L., Zapperi, G., Pratalongo, P.D., Fernández Severini, M.D., Popovich, C.A., 2015. Influence of the winter phytoplankton bloom on the settled material in a temperate shallow estuary. *Oceanologia* 57, 50–60.
- Harding, L.W., Adolf, J.E., Mallonee, M.E., Miller, W.D., Gallegos, C.L., Perry, E.S., Johnson, J.M., Sellner, K.G., Paerl, H.W., 2015. Climate effects on phytoplankton floral composition in Chesapeake Bay. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 162, 53–68.
- Helbling, E.W., 1989. Estuarine Circulation and Nutrient Variability in the Chubut River Estuary (Argentina) During 1986–1987. University of California, San Diego, USA, p. 138.

- Helbling, E.W., Barbieri, E.S., Marcoval, M.A., Gonçalves, R.J., Villafañe, V.E., 2005. Impact of solar ultraviolet radiation on marine phytoplankton of Patagonia, Argentina. *Photochem. Photobiol.* 81, 807–818.
- Helbling, E.W., Pérez, D.E., Medina, C.D., Lagunas, M.G., Villafañe, V.E., 2010. Phytoplankton distribution and photosynthesis dynamics in the Chubut River estuary (Patagonia, Argentina) throughout tidal cycles. *Limnol. Oceanogr.* 55, 55–65.
- Hillebrand, H., Dürselen, C.D., Kirschtel, D., Pollingher, U., Zohary, T., 1999. Biovolume calculation for pelagic and benthic microalgae. *J. Phycol.* 35, 403–424.
- Holm-Hansen, O., Riemann, B., 1978. Chlorophyll a determination: improvements in methodology. *Oikos* 30, 438–447.
- IWC, 2013. Report of the IWC - workshop on the assessment of southern right whales. *J. Cetacean Res. Manag.* 14, 439–462.
- Jickells, T.D., Moore, C.M., 2015. The importance of atmospheric deposition for ocean productivity. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 46, 481–501.
- Johnson, M.S., Meskhidze, N., Kiliyanpilakkil, V.P., Gassó, S., 2011. Understanding the transport of Patagonian dust and its influence on marine biological activity in the South Atlantic Ocean. *Atmos. Chem. Phys.* 11, 2487–2502.
- Kopprio, G.A., Biancalana, F., Fricke, A., Garzón Cardona, J.E., Martínez, A., Lara, R.J., 2015. Global change effects on biogeochemical processes of Argentinian estuaries: an overview of vulnerabilities and ecohydrological adaptive outlooks. *Mar. Pollut. Bull.* 91, 554–562.
- Lancelot, C., Muylaert, K., 2011. Trends in estuarine phytoplankton ecology. In: Wolanski, E., Mcluskay, D.S., Heip, C.H.R., Middelburg, J.J., Philippart, C.J.M. (Eds.), *Treatise on Estuarine and Coastal Science: 7. Functioning Ecosystems at the Land-Ocean Interface*. Elsevier, Amsterdam, pp. 5–15.
- Lewandowska, A., Sommer, U., 2010. Climate change and the spring bloom: a mesocosm study on the influence of light and temperature on phytoplankton and mesozooplankton. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 405, 101–111.
- Li, F., Ginoux, P., Ramaswamy, V., 2010. Transport of Patagonian dust to Antarctica. *J. Geophys. Res.* 115 (D18217) (9 pp).
- Longhurst, A.R., 1998. *Ecological Geography of the Sea*, San Diego (398 pp).
- Marañón, E., Cermeño, P., Latasa, M., Tardonléké, R.D., 2012. Temperature, resources, and phytoplankton size structure in the ocean. *Limnol. Oceanogr.* 57 (5), 1266–1278.
- Mitchell, B.G., Brody, E.A., Holm-Hansen, O., McClain, C.R., Bishop, J., 1991. Light limitation of phytoplankton biomass and macronutrient utilization in the Southern Ocean. *Limnol. Oceanogr.* 36, 1662–1677.
- Neale, P.J., Helbling, E.W., Zagarese, H.E., 2003. Modulation of UVR exposure and effects by vertical mixing and advection. In: Helbling, E.W., Zagarese, H.E. (Eds.), *Royal Society of Chemistry, UV effects in aquatic organisms and ecosystems*, pp. 108–134.
- Paerl, H.W., 2007. Nutrient and other environmental controls of harmful cyanobacterial blooms along the freshwater–marine continuum. In: Hudnell, H.K. (Ed.), *Proceedings of the Interagency, International Symposium on Cyanobacterial Harmful Algal Blooms - Advances in Experimental Medicine & Biology*, pp. 215–241.
- Paerl, H.W., Fitzpatrick, M., Bebout, B.M., 1996. Seasonal nitrogen fixation dynamics in a marine microbial mat: potential roles of cyanobacteria and microheterotrophs. *Limnol. Oceanogr.* 41, 419–427.
- Painter, S.C., Poulton, A.J., Allen, J.T., Pidcock, R., Balch, W.M., 2010. The COPAS'08 expedition to the Patagonian shelf: physical and environmental conditions during the 2008 coccolithophore bloom. *Cont. Shelf Res.* 30, 1907–1923.
- Pisoni, J.P., Rivas, A.L., Piola, A.R., 2014. Satellite remote sensing reveals coastal upwelling events in the San Matías Gulf—Northern Patagonia. *Remote Sens. Environ.* 152, 270–278.
- Platt, T., Jassby, A.D., 1976. The relation between photosynthesis and light for natural assemblages of coastal marine phytoplankton. *J. Phycol.* 12, 421–430.
- Porra, R.J., 2002. The chequered history of the development and use of simultaneous equations for the accurate determination of chlorophylls a and b. *Photosynth. Res.* 73, 149–156.
- Rabalais, N.N., Turner, R.E., Díaz, R.J., Justic, D., 2009. Global change and eutrophication of coastal waters. *ICES J. Mar. Sci.* 66, 1528–1537.
- Romero, S.I., Piola, A.R., Charo, M., Eiras García, C.A., 2006. Chlorophyll-a variability off Patagonia based on SeaWiFS data. *J. Geophys. Res.* 111 (C05021) (11 pp).
- Rousseaux, C.S., Gregg, W.W., 2014. Interannual variation in phytoplankton primary production at a global scale. *Remote Sens.* 6, 1–19.
- Ruggaber, A., Dlugi, R., Nakajima, T., 1994. Modelling of radiation quantities and photolysis frequencies in the troposphere. *J. Atmos. Chem.* 18, 171–210.
- Saraceno, M., Provost, C., Piola, A.R., 2005. On the relationship between satellite-retrieved surface temperature fronts and chlorophyll a in the western South Atlantic. *J. Geophys. Res.* 110 (C11016) (16 pp).
- Sastre, A.V., Santinelli, N.H., Otaño, S.H., Ivanissevich, M.E., Ayestarán, M.G., 1994. Diatom blooms and their relation to water supply. *Internationale Vereinigung für Theoretische und Angewandte Limnologie* 25, 1974–1978.
- Sathyendranath, S., Stuart, V., Nair, A., Oka, K., Nakane, T., Bouman, H., Forget, M.H., Maass, H., Platt, T., 2009. Carbon-to-chlorophyll ratio and growth rate of phytoplankton in the sea. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 383, 73–84.
- Siegel, D.A., Doney, S.C., Yoder, J.A., 2002. The North Atlantic spring phytoplankton bloom and Sverdrup's critical depth hypothesis. *Science* 296, 730–733.
- Skewgar, E., Boersma, P.D., Harris, G., Caille, G., 2007. Sustainability: anchovy fishery threat to Patagonian ecosystem. *Science* 315, 45.
- Smayda, T.J., Reynolds, C.S., 2003. Strategies of marine dinoflagellate survival and some rules of assembly. *J. Sea Res.* 49, 95–106.
- Smith, V.H., Tilman, G.D., Nekola, J.C., 1999. Eutrophication: impacts of excess nutrient inputs on freshwater, marine, and terrestrial ecosystems. *Environ. Pollut.* 100, 179–196.
- Sobrinho, C., Neale, P.J., 2007. Short-term and long-term effects of temperature on photosynthesis in the diatom *Thalassiosira pseudonana* under UVR exposures. *J. Phycol.* 43, 426–436.
- Sommer, U., Lengfellner, K., 2008. Climate change and the timing, magnitude, and composition of the phytoplankton spring bloom. *Glob. Chang. Biol.* 14, 1199–1208.
- Song, H., Marshall, J., Follows, M.J., Dutkiewicz, S., Forget, G., 2016. Source waters for the highly productive Patagonian shelf in the southwestern Atlantic. *J. Mar. Syst.* 158, 120–128.
- Spilling, K., Markager, S., 2008. Ecophysiological growth characteristics and modeling of the onset of the spring bloom in the Baltic Sea. *J. Mar. Syst.* 73, 323–337.
- Spinelli, M.L., Gonçalves, R.J., Villafañe, V.E., Capitanio, F.L., 2016. Diversity of copepods in Atlantic Patagonian coastal waters throughout an annual cycle. *Cienc. Mar.* 42, 31–47.
- Strathmann, R.R., 1967. Estimating the organic carbon content of phytoplankton from cell volume or plasma volume. *Limnol. Oceanogr.* 12, 411–418.
- Strickland, J.D.H., Parsons, T.R., 1972. *A practical handbook of seawater analysis*. Fish. Res. Board Can. Bull. 167, 1–310.
- Sverdrup, H.U., 1953. On conditions for the vernal blooming of phytoplankton. *J. Cons. Perm. Int. Explor. Mer.* 18, 287–295.
- Toseland, A., Daines, S.J., Clark, J.R., Kirkham, A., Strauss, J., Uhlir, C., Lenton, T.M., Valentin, K., Pearson, G.A., Moulton, V., Mock, T., 2013. The impact of temperature on marine phytoplankton resource allocation and metabolism. *Nat. Clim. Chang.* 3, 979–984.
- Uitz, J., Claustre, H., Gentili, B., Stramski, D., 2010. Phytoplankton class-specific primary production in the world's oceans: seasonal and interannual variability from satellite observations. *Glob. Biogeochem. Cycles* 24, GB3016–3035.
- UNEP, 2006. In: UNEP (Ed.), *Marine and Coastal Ecosystems and Human Well-being: A Synthesis Report Based on the Findings of the Millennium Ecosystem Assessment*, p. 76.
- Villafañe, V.E., Reid, F.M.H., 1995. Métodos de microscopía para la cuantificación del fitoplancton. In: Alveal, K., Ferrario, M.E., Oliveira, E.C., Sar, E. (Eds.), *Manual de Métodos Ficológicos*. Universidad de Concepción, Concepción, Chile, pp. 169–185.
- Villafañe, V.E., Barbieri, E.S., Helbling, E.W., 2004. Annual patterns of ultraviolet radiation effects on temperate marine phytoplankton off Patagonia, Argentina. *J. Plankton Res.* 26, 167–174.
- Villafañe, V.E., Janknegt, P.J., de Graaff, M., Visser, R.J.W., van de Poll, W.H., Buma, A.G.J., Helbling, E.W., 2008. UVR-induced photoinhibition of summer marine phytoplankton communities from Patagonia. *Mar. Biol.* 154, 1021–1029.
- Villafañe, V.E., Banaszak, A.T., Guendulain-García, S.D., Strauch, S.M., Halac, S.R., Helbling, E.W., 2013. Influence of seasonal variables associated with climate change on photochemical diurnal cycles of marine phytoplankton from Patagonia (Argentina). *Limnol. Oceanogr.* 58, 203–214.
- Weise, A.M., Levasseur, M., Saucier, F.J., Senneville, S., Bonneau, E., Roy, S., Sauvé, G., Michaud, S., Fauchot, J., 2002. The link between precipitation, river runoff, and blooms of the toxic dinoflagellate *Alexandrium tamarense* in the St. Lawrence. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 59, 464–473.
- Winder, M., Hunter, D.A., 2008. Temporal organization of phytoplankton communities linked to physical forcing. *Oecologia* 156, 179–192.
- Yin, K., Zhang, J., Qian, P.Y., Jian, W., Huang, L., Chen, J., Wu, M.C.S., 2004. Effect of wind events on phytoplankton blooms in the Pearl River estuary during summer. *Cont. Shelf Res.* 24, 1909–1923.
- Yvon-Durocher, G., Allen, A.P., Cellamare, M., Dossena, M., Dossena, M., Gaston, K.J., Leita, M., Montoya, J.M., Reuman, D.C., Woodward, G., Trimmer, M., 2015. Five years of experimental warming increases the biodiversity and productivity of phytoplankton. *PLoS Biol.* 13, e1002324.
- Zar, J.H., 1999. *Biostatistical Analysis*. 4th ed. Prentice Hall, Englewood Cliffs, NJ.