



FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS, FÍSICAS Y NATURALES  
UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA

**Crustáceos de intermareales patagónicos en un  
contexto de cambio global:  
efectos directos e indirectos en el anfípodo  
*Ampithoe valida***

**Tesis para optar al título de Doctor en Ciencias Biológicas**

**M.Sc. Ricarda Blum**

**Directora: Dra. Macarena S. Valiñas**

**Director: Dr. E. Walter Helbling**

**Año 2026**

# COMISIÓN ASESORA

Dra. María Carla de Aranzamendi, FCEfyN, Universidad Nacional de Córdoba

Dr. Pablo Agustín Collins, INALI-CONICET; FBCB, Universidad Nacional del Litoral

Dra. Macarena Soledad Valiñas, Estación de Fotobiología Playa Unión/ CONICET,  
FCNyS, Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco

## DEFENSA ORAL Y PÚBLICA

Lugar y Fecha:

Calificación:

### TRIBUNAL

Firma: ..... Aclaración: .....

Firma: ..... Aclaración: .....

Firma: ..... Aclaración: .....

*A mi padre Wendelin Blum.*

*Für meinen Vater Wendelin Blum.*

## Agradecimientos

Quiero agradecer a todas las personas que me han apoyado de alguna manera durante este camino, y a todos los que me han acompañado durante todos estos años.

En primer lugar, agradezco a mi familia: a mis hermanas Carina y Johanna así como a mis padres Regina y Wendelin, que siempre me han apoyado en todo sin pedir nada a cambio, a pesar de que para ellos no siempre fue fácil aceptar las decisiones que tomé. No sé cómo podría agradecerles todo lo que me posibilitaron en esta vida. A ellos les dedico esta tesis.

*Euch, Mama und Papa, möchte ich diese Arbeit widmen.*

Muchas gracias a mis directores de tesis, Dra. Macarena Valiñas y Dr. Walter Helbling, por su constante apoyo y la paciencia que tuvieron conmigo durante este largo proceso.

Gracias a los miembros de la Comisión Asesora y el tribunal de tesis, los Dres. Carla de Aranzamendi, Pablo Collins y Claudia Bas, por el tiempo que dedicaron a mi formación profesional.

Gracias a todo el personal de la carrera de Doctorado en Ciencias Biológicas de la FCEFyN de la UNC por el acompañamiento durante mi formación profesional. Parte de este proyecto de Tesis estuvo financiado por la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (PICT 2012-0411), por el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) y por la Fundación Playa Unión.

Gracias a mis compañeros de la Estación de Fotobiología Playa Unión, a Virginia Villafañe, Paula Bermejo, Juan Vizzo, Jenifer Salas y Alejandro Gadda, así como a Florencia Crespo, Carolina Petti y Micaela Müller, por su ayuda en los trabajos de laboratorio y de campo, por las charlas inspiradoras, y por los momentos compartidos. Gracias a Rodrigo Gonçalves y Esteban Antonicelli por su ayuda y consejos durante el proceso de redacción de tesis.

Gracias a Rosalía Kobs, quien me abrió sus puertas en los inicios y al final de mi estadía en Playa Unión, y quien me daba siempre una mano. Sin ella, mi camino no me hubiera traído hasta aquí.

Gracias a Gustavo por su apoyo, comprensión y acompañamiento.

Y por último les agradezco a mis amigos de la vida: a Maricel, Andrea, Hernán, Carolina, Oscar, Ricardo, Almendra, Olga, mis compañeras de Tai Chi y a todos y todas los que cruzaron mi camino, por el tiempo compartido y por haber hecho de mi vida en Argentina lo que era. Los extraño.

# Índice

Agradecimientos.....	iii
Listado de tablas y figuras.....	viii
Listado de abreviaturas.....	xii
Resumen.....	xiv
Summary.....	xvi
1. Introducción General.....	1
1.1. Cambio global: definición y conceptos generales.....	2
1.2. El impacto del cambio global en los ecosistemas marinos.....	7
1.2.1. Océano.....	7
1.2.2. Zonas costeras.....	9
1.3. Procesos asociados al CG y sus efectos en los organismos acuáticos.....	11
1.3.1. Aumento de temperatura.....	11
1.3.2. Acidificación.....	12
1.3.3. Cambios en los niveles de radiación solar.....	15
1.3.4. Incremento de nutrientes.....	17
1.4. Los organismos intermareales como modelo de estudio de los efectos del CG.....	18
1.4.1. Crustáceos.....	19
1.4.2. <i>Ampithoe valida</i> .....	20
1.5. Fundamentación y lineamiento de la tesis.....	22
1.5.1. Importancia del área de estudio.....	22
1.5.2. Objetivo general.....	24
1.5.3. Objetivos específicos.....	25
1.5.4. Hipótesis.....	25
1.5.5. Estructura de la tesis.....	28
2. Variabilidad estacional de la comunidad epibentónica intermareal y de los rasgos de historia de vida de <i>Ampithoe valida</i> .....	29
2.1. Introducción.....	30
2.2. Materiales y métodos.....	32
2.2.1. Condiciones de temperatura, radiación solar y pH.....	32

2.2.2. Estimación de la cobertura de macroalgas y abundancia de macrofauna epibentónica .....	33
2.2.3. Caracterización de los atributos de historia de vida de <i>A. valida</i> .....	35
2.2.4. Contenido de carbono y nitrógeno en tejidos de <i>A. valida</i> y <i>Ulva</i> spp. ....	37
2.2.5. Análisis de datos.....	38
2.3. Resultados .....	40
2.3.1. Condiciones de temperatura, radiación solar y pH .....	40
2.3.2. Variabilidad estacional de la comunidad epibentónica del intermareal alto y bajo .....	44
2.3.3. Variabilidad estacional de rasgos de la historia de vida de <i>A. valida</i> .....	53
2.3.3.1. Distribución de tallas y pesos.....	54
2.3.3.2. Aspectos reproductivos .....	58
2.3.4. Contenido de carbono y nitrógeno en tejidos de <i>Ulva</i> spp. y <i>A. valida</i> .....	60
2.4. Discusión .....	61
2.4.1. Condiciones abióticas.....	61
2.4.2. Variabilidad temporal de la comunidad epibentónica del intermareal alto y bajo .....	62
2.4.3. Variabilidad estacional de atributos de la historia de vida de <i>A. valida</i> .....	65
2.4.4. Contenido de carbono y nitrógeno en tejidos de <i>Ulva</i> spp. y <i>A. valida</i> .....	69
2.5. Conclusiones.....	70
3. Efectos individuales del aumento de la temperatura, la acidificación y los cambios en los niveles de radiación solar sobre las tasas de respiración de <i>Ampithoe valida</i> .....	72
3.1. Introducción .....	73
3.2. Materiales y Métodos.....	75
3.2.1. Procedimiento experimental general.....	75
3.2.2. Experimentos de temperatura.....	78
3.2.3. Experimentos de radiación .....	79
3.2.4. Experimentos de acidificación .....	80
3.2.5. Análisis de datos.....	81
3.3. Resultados .....	82
3.3.1. Experimentos de temperatura.....	82

3.3.2. Experimentos de radiación .....	84
3.3.3. Experimentos de acidificación .....	85
3.4. Discusión .....	86
3.4.1. Efectos de un aumento de temperatura .....	87
3.4.2. Efectos de cambios en los niveles de radiación solar.....	89
3.4.3. Efectos de la acidificación.....	90
3.4.4. Patrones estacionales.....	91
3.5. Conclusiones.....	92
4. Efectos combinados de un aumento de temperatura, de acidificación y de los niveles de radiación solar en el anfípodo <i>Ampithoe valida</i> .....	93
4.1. Introducción .....	94
4.2. Materiales y Métodos.....	95
4.2.1. Procedimiento experimental general.....	95
4.2.2. Determinación de las tasas de respiración.....	98
4.2.3. Determinación de las tasas de ingestión de alimento.....	100
4.2.4. Mediciones de temperatura, pH e irradiancia.....	100
4.2.5. Análisis estadísticos .....	100
4.3. Resultados .....	102
4.3.1. Condiciones de radiación solar, temperatura y pH durante los experimentos .	102
4.3.2. Respiración.....	107
4.3.3. Consumo de alimento.....	109
4.3.4. Mortalidad .....	111
4.4. Discusión .....	113
4.4.1. Efectos del CG en la respiración y el consumo de alimento en machos y hembras de <i>A. valida</i> .....	113
4.4.2. Efectos del CG en la mortalidad de <i>A. valida</i> .....	116
4.4.3. Patrones estacionales en la respiración y el consumo de alimento de <i>A. valida</i> .....	117
4.4.4. Condiciones experimentales.....	118
4.5. Conclusiones.....	119

5. Efectos de un aumento de temperatura, de radiación solar, de nutrientes y de acidificación en <i>Ulva</i> spp. y sus efectos indirectos en <i>Ampithoe valida</i> .....	121
5.1. Introducción .....	122
5.2. Materiales y Métodos.....	124
5.2.1. Cultivo de macroalgas .....	126
5.2.2. Mediciones de temperatura, pH, irradiancia y nutrientes.....	127
5.2.3. Determinaciones en tejidos de macroalgas .....	128
5.2.4. Ensayos de alimentación de <i>A. valida</i> .....	129
5.2.5. Análisis de datos.....	132
5.3. Resultados .....	133
5.3.1. Condiciones de radiación solar, temperatura, pH y nutrientes durante los experimentos de macroalgas .....	133
5.3.2. Efectos directos en <i>Ulva</i> spp. ....	136
5.3.3. Efectos indirectos en anfípodos.....	140
5.3.3.1. Tasas de consumo y preferencia de alimento .....	140
5.3.3.2. Eficiencia de absorción .....	143
5.4. Discusión .....	144
5.4.1. Condiciones experimentales durante las incubaciones de <i>Ulva</i> spp. ....	145
5.4.2. Efectos directos de un escenario de CG en <i>Ulva</i> spp.....	146
5.4.3. Efectos indirectos en <i>A. valida</i> .....	149
5.5. Conclusiones .....	151
6. Conclusiones generales .....	153
6.1. Prueba de hipótesis planteadas .....	154
6.2. Perspectivas futuras de investigación .....	156
Bibliografía.....	157

## Listado de tablas y figuras

<b>Fig. 1.1</b>	Concentraciones atmosféricas históricas de CO <sub>2</sub> , CH <sub>4</sub> y N <sub>2</sub> O .....	3
<b>Fig. 1.2</b>	Variables asociadas al cambio global en áreas costeras. ....	5
<b>Fig. 1.3</b>	Emisiones anuales de CO <sub>2</sub> y calentamiento proyectado hasta fines del siglo ....	7
<b>Fig. 1.4</b>	Cambios recientes y proyecciones a futuro del pH del océano .....	9
<b>Fig. 1.5</b>	Esquema general de la tolerancia térmica .....	12
<b>Fig. 1.6</b>	Esquema general de los mecanismos fisiológicos de mantenimiento de los niveles ácido-base en animales marinos con respiración branquial .....	14
<b>Fig. 1.7</b>	Espectro solar antes de traspasar la atmósfera y en la superficie terrestre. ....	15
<b>Fig. 1.8</b>	Hembra y macho de <i>Ampithoe valida</i> recolectados en el área de estudio. ....	20
<b>Fig. 1.9</b>	Ubicación geográfica del área de estudio en Playa Bonita. ....	24
<b>Fig. 2.1</b>	Sustrato típico en la zona del intermareal alto y bajo en el área de estudio. ....	34
<b>Fig. 2.2</b>	Características morfológicas utilizadas para la determinación de sexos. ....	36
<b>Fig. 2.3</b>	Huevos de <i>A. valida</i> en diferentes estadios de desarrollo. ....	37
<b>Fig. 2.4</b>	Evolución de los niveles de irradiancia y temperatura del agua en pozas de marea del intermareal alto y bajo a lo largo del ciclo diario. ....	42
<b>Fig. 2.5</b>	Condiciones de irradiancia y temperatura en pozas de marea en el área de estudio a lo largo del ciclo anual. ....	43
<b>Fig. 2.6</b>	Valores promedio de pH en pozas de marea durante una fase de marea baja. .	44
<b>Tabla 2.1</b>	Número total de individuos de la macrofauna cuantificados en el intermareal alto y bajo durante los muestreos. ....	46
<b>Fig. 2.7</b>	Variabilidad estacional de la abundancia de los diferentes grupos de la macrofauna en el intermareal alto. ....	47
<b>Fig. 2.8</b>	Correlación entre la abundancia de <i>A. valida</i> y de los diferentes grupos de la macrofauna en el intermareal alto. ....	48
<b>Fig. 2.9</b>	Variabilidad estacional de la cobertura de <i>Ulva</i> spp. en el intermareal alto y correlación con la abundancia de <i>A. valida</i> . ....	49
<b>Fig. 2.10</b>	Variabilidad estacional de la abundancia de diferentes grupos de macrofauna en el intermareal bajo. ....	50
<b>Fig. 2.11</b>	Correlación entre la abundancia de <i>A. valida</i> y de los diferentes grupos de la macrofauna en el intermareal bajo. ....	52

<b>Fig. 2.12</b>	Variabilidad estacional de la cobertura de <i>C. officinalis</i> en el intermareal bajo y correlación con la abundancia de <i>A. valida</i> . .....	53
<b>Fig. 2.13</b>	Estructura poblacional de <i>A. valida</i> en el intermareal alto y bajo en las cuatro estaciones del año. ....	54
<b>Fig. 2.14</b>	Relación entre el largo total del cuerpo y el peso húmedo de <i>A. valida</i> . .....	55
<b>Tabla 2.2</b>	Rango de tallas de <i>A. valida</i> registrado para las distintas estaciones del año... ..	55
<b>Fig. 2.15</b>	Peso húmedo de individuos de <i>A. valida</i> en el intermareal alto y bajo. ....	57
<b>Tabla 2.3</b>	Resultados de los análisis estadísticos del peso húmedo de <i>A. valida</i> en función de la estación y del estrato del intermareal.....	58
<b>Fig. 2.16</b>	Relación entre el número de huevos por hembra y el largo total del cuerpo en el intermareal alto y bajo.....	59
<b>Tabla 2.4</b>	Resultados del GLM del número de huevos por hembra en función de la estación, del estrato del intermareal y del largo total del cuerpo (mm).....	59
<b>Fig. 2.17</b>	Volumen promedio de huevos de <i>A. valida</i> en el intermareal alto y bajo. ....	60
<b>Fig. 2.18</b>	Proporción de nitrógeno total, carbono total, y relación C:N en tejidos de <i>Ulva</i> spp. y de <i>A. valida</i> . ....	61
<b>Tabla 2.5</b>	Tamaños mínimos de madurez, tamaños máximos y número de huevos por hembra observados en estudios previos de <i>A. valida</i> .....	67
<b>Tabla 3.1</b>	Peso húmedo de los anfípodos utilizados en los experimentos de efectos individuales.....	76
<b>Fig. 3.1</b>	Representación esquemática de los experimentos de efectos individuales. ....	77
<b>Fig. 3.2</b>	Condiciones de temperatura durante la incubación de los anfípodos en los experimentos de temperatura. ....	79
<b>Fig. 3.3</b>	Condiciones de radiación solar durante los experimentos de radiación. ....	80
<b>Tabla 3.2</b>	Condiciones de pH en los tratamientos pHcontrol y pH-0,35 durante los experimentos de acidificación. ....	81
<b>Fig. 3.4</b>	Tasas de respiración de <i>A. valida</i> en los experimentos de temperatura.....	83
<b>Tabla 3.3</b>	Resultado de los análisis estadísticos de las tasas de respiración de <i>A. valida</i> en función de la estación y el tratamiento de temperatura.....	83
<b>Fig. 3.5</b>	Tasas de respiración de de <i>A. valida</i> en los experimentos de radiación. ....	84
<b>Tabla 3.4</b>	Resultado de los análisis estadísticos de las tasas de respiración de <i>A. valida</i> en función de la estación y el tratamiento de radiación.....	85
<b>Fig. 3.6</b>	Tasas de respiración de <i>A. valida</i> en los experimentos de acidificación.....	86

<b>Tabla 3.5</b>	Resultado de los análisis estadísticos de las tasas de respiración de <i>A. valida</i> en función de la estación y el tratamiento de acidificación .....	86
<b>Tabla 4.1</b>	Número inicial de individuos por microcosmos y peso promedio por individuo en los experimentos tipo Clúster.....	96
<b>Fig. 4.1</b>	Esquema general del diseño experimental tipo Clúster.....	98
<b>Fig. 4.2</b>	Condiciones de irradiancia durante los experimentos tipo Clúster. ....	103
<b>Fig. 4.3</b>	Condiciones de temperatura durante los experimentos tipo Clúster. ....	104
<b>Fig. 4.4</b>	Condiciones de pH durante los experimentos tipo Clúster.....	105
<b>Tabla 4.2</b>	Condiciones experimentales durante los experimentos tipo Clúster .....	106
<b>Fig. 4.5</b>	Condiciones de pH en los microcosmos a lo largo de un día de exposición en los experimentos tipo Clúster.....	107
<b>Fig. 4.6</b>	Tasas de respiración de <i>A. valida</i> en los escenarios Presente y Futuro en las cuatro estaciones.....	108
<b>Tabla 4.3</b>	Resultados del ANOVA de las tasas de respiración en función de la estación, el escenario y el día de exposición .....	109
<b>Fig. 4.7</b>	Tasas de consumo de alimento de <i>A. valida</i> en los escenarios Presente y Futuro en las cuatro estaciones.....	110
<b>Tabla 4.4</b>	Resultados del GLMM del consumo de alimento en función de la estación, el escenario y el día de exposición. ....	111
<b>Fig. 4.8</b>	Porcentaje de mortalidad de <i>A. valida</i> en los escenarios Presente y Futuro en las cuatro estaciones.....	112
<b>Tabla 4.5</b>	Resultados del GLM del porcentaje de mortalidad en función de la estación. ....	112
<b>Fig. 5.1</b>	Esquema general del diseño experimental de los experimentos de efectos indirectos.....	125
<b>Fig. 5.2</b>	Sistema utilizado para el cultivo de las macroalgas. ....	127
<b>Fig. 5.3</b>	Esquema del penetrómetro utilizado para determinar la dureza de las macroalgas. ....	129
<b>Tabla 5.1</b>	Número de individuos por réplica y peso promedio de los individuos utilizados en los ensayos de alimentación. ....	131
<b>Fig. 5.4</b>	Sistema utilizado para los ensayos de alimentación. ....	131
<b>Fig. 5.5</b>	Condiciones de irradiancia, temperatura y pH en los escenarios Presente y Futuro durante el periodo de incubación de <i>Ulva</i> spp. ....	134

<b>Tabla 5.2</b>	Condiciones experimentales durante la incubación de las macroalgas .....	136
<b>Fig. 5.6</b>	Cambios en los tejidos de <i>Ulva</i> spp. después del periodo de incubación.....	138
<b>Tabla 5.3</b>	Resultados de los ANOVA de cambios en tejidos de <i>Ulva</i> spp. en función del escenario y de la estación.....	139
<b>Fig. 5.7</b>	Tasas de consumo de <i>A. valida</i> para los tres tratamientos de dieta. ....	140
<b>Tabla 5.4</b>	Resultados del GLMM del consumo de alimento en función de la estación, la dieta y el día de exposición.....	141
<b>Fig. 5.8</b>	Porcentaje de macroalgas provenientes de los escenarios Presente y Futuro consumidas por <i>A. valida</i> en la dieta mixta. ....	142
<b>Fig. 5.9</b>	Preferencia de alimento de machos y hembras de <i>A. valida</i> en función de la dureza de las algas en el tratamiento de dieta mixta.....	143
<b>Fig. 5.10</b>	Eficiencia de absorción de la materia orgánica en machos y hembras de <i>A. valida</i> en los tratamientos de dieta Presente y Futuro .....	144
<b>Tabla 5.5</b>	Resultados de los ANOVA de la eficiencia de absorción de la materia orgánica de <i>A. valida</i> en función de la estación y la dieta.....	144

## Listado de abreviaturas

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ATP: Adenosín trifosfato

CENPAT: Centro Nacional Patagónico

CFCs: Compuestos clorofluorocarbonados

DE: Desvío estándar

EFPU: Estación de Fotobiología Playa Unión

ELDONET: Red Europea de Dosímetros de Luz (del inglés: European Light Dosimeter Network)

GLM: Modelo lineal generalizado (del inglés: generalised linear model)

GLMM: Modelo lineal generalizado mixto (del inglés: generalised linear mixed model)

IPCC: Panel Intergubernamental sobre el Cambio Climático (del inglés: Intergovernmental Panel on Climate Change)

IR: Radiación infrarroja (del inglés: infrared radiation)

$k$ : Coeficiente de atenuación de la radiación en la columna de agua

$k_{\text{PAR}}$ : Coeficiente de atenuación de PAR

$k_{\text{UV}}$ : Coeficiente de atenuación de RUV

MO: Materia orgánica

NASA: Administración Nacional de Aeronáutica y del Espacio (del inglés: National Aeronautics and Space Administration)

RUV: Radiación ultravioleta

RUV-A: Radiación ultravioleta A (315 - 400 nm)

RUV-B: Radiación ultravioleta B (280 - 315 nm)

RUV-C: Radiación ultravioleta C (< 280 nm)

PAR: Radiación fotosintéticamente activa (400 - 700 nm, del inglés: photosynthetically active radiation)

SSP: Trayectorias socioeconómicas compartidas (del inglés: Shared Socio-economic Pathways)

$T_c$ : Temperatura crítica

TMB: Tasa metabólica basal

T<sub>Mar</sub>: Temperatura del agua de mar

ROS: Especies reactivas de oxígeno (del inglés: reactive oxygen species)

VIRCh: Valle inferior del río Chubut

## Resumen

El cambio global (CG) constituye una de las principales amenazas para los organismos marinos, en particular para los que habitan las zonas costeras e intermareales. Este fenómeno provoca múltiples alteraciones en las condiciones físico-químicas de estos ambientes, incluyendo incrementos de temperatura, modificaciones en los niveles de radiación solar recibida por los organismos, acidificación y un mayor ingreso de nutrientes a las zonas costeras. En este contexto, el objetivo general de esta tesis fue evaluar, mediante una aproximación experimental, los efectos directos e indirectos de estas variables (i.e., temperatura, radiación solar, acidificación y nutrientes) sobre aspectos fisiológicos y tróficos de crustáceos epibentónicos de zonas intermareales de la región patagónica, tanto en el corto (i.e. horas) como en el mediano plazo (i.e. días), a lo largo del ciclo anual, utilizando como modelo de estudio al anfípodo *Ampithoe valida*. Complementariamente, se realizaron muestreos sistemáticos en el intermareal alto y bajo a lo largo de dos años, con el objetivo de caracterizar la variabilidad estacional de las comunidades epibentónicas y la historia de vida de la especie en el área de estudio.

Los resultados mostraron que un escenario Futuro de incremento de temperatura (i.e., + 3 °C) aumentó las tasas de respiración de machos y hembras de *A. valida* en el corto plazo, con respuestas más marcadas en otoño y primavera. En contraste, un escenario Futuro de mayores niveles de acidificación (i.e., - 0,35 unidades de pH) y de cambios en los niveles de radiación solar (i.e., + 50 %, - 50 %) no tuvieron efectos significativos (Capítulo 3). La acción conjunta de un incremento de temperatura, radiación solar y acidificación provocó un incremento en la mortalidad de los anfípodos, particularmente durante el verano (Capítulo 4). No obstante, las respuestas en términos de respiración y consumo de alimento fueron sexo-dependientes: las hembras mostraron mayores tasas de consumo de alimento bajo condiciones futuras de CG, independientemente de la estación, mientras que los machos exhibieron un incremento transitorio en las tasas de respiración (Capítulo 4). Finalmente, se demostró que un escenario Futuro de aumento de temperatura, radiación solar, acidificación y nutrientes estimuló el crecimiento de las macroalgas del género *Ulva*, una de las principales fuentes de alimento de *A. valida*, sin afectar su calidad nutricional (Capítulo 5). Sin embargo, la dureza de los talos fue más baja cuando estos fueron incubados bajo las condiciones del escenario Futuro comparado con algas incubadas en condiciones del Presente, al menos

durante los experimentos de primavera. Los resultados además mostraron que una menor dureza del alimento podría modular de manera positiva la preferencia de alimento y el consumo de los anfípodos, particularmente de las hembras (Capítulo 5). A pesar de ello, no se observaron diferencias significativas en las tasas de consumo, la preferencia de alimento ni la eficiencia de absorción de la materia orgánica entre individuos alimentados con algas provenientes de los escenarios Presente y Futuro.

En conjunto, los resultados obtenidos indican que *A. valida* podría ser negativamente afectado bajo un escenario futuro de CG, experimentando un mayor gasto energético y un aumento en la mortalidad. Esto podría afectar la dinámica poblacional a largo plazo, causando una potencial reducción en las tasas de crecimiento y de reproducción y por ende una disminución de la producción de biomasa. Dado que esta especie constituye un recurso alimenticio relevante para organismos de niveles tróficos superiores -incluyendo especies de interés comercial-, estos cambios podrían resultar en una disminución del flujo de energía hacia dichos niveles, con posibles implicancias ecológicas y socioeconómicas para los ecosistemas costeros patagónicos.

Ricarda Blum

Doctorado en Ciencias Biológicas

Universidad Nacional de Córdoba, 2025

## Summary

Global change is one of the biggest threats to marine organisms, particularly to those inhabiting coastal areas, including intertidal zones. This phenomenon causes multiple changes in physical and chemical conditions of these ecosystems, such as an increase in temperature, changes in the intensity of solar radiation received by the organisms, acidification and an increased introduction of nutrients into coastal waters. In this context, the general objective of the present thesis was to evaluate, by means of laboratory experiments, the direct and indirect effects of these variables (i.e. temperature, solar radiation, acidification, nutrients) on physiological and trophic aspects of epibenthic crustaceans inhabiting intertidal zones of Patagonia, Argentina, in the short (i.e., hours) and medium (i.e., days) term throughout the year, using the amphipod *Ampithoe valida* as a model organism. Additionally, a systematic sampling was carried out in the upper and lower intertidal zone during two years, with the aim of characterizing the seasonal variability of the epibenthic communities as well as the life history of *A. valida* in the study area.

The results showed that an increase in temperature (i.e., + 3 °C) led to an increase in respiration rates of both males and females of *A. valida* in the short term, with the largest magnitude of response observed in spring and fall. In contrast, acidified conditions (i.e., - 0,35 ph units) as well as changes in the intensity of solar radiation received by the organisms (i.e., + 50 %, - 50 %) had no significant effects (Chapter 3). The combined impact of an increase in temperature, solar radiation and acidification resulted in an increase in amphipod mortality rates, especially during summer (Chapter 4). However, amphipods' response with respect to respiration and food consumption rates was sex-dependent, with females having higher food consumption rates when exposed to simulated future global change conditions, independently of the season, while males showed a transient increase in respiration rates (Chapter 4). Finally, a future global change scenario of an increase in temperature, solar radiation, acidification and nutrient levels stimulated the growth of macroalgae of the genus *Ulva*, an important food source of *A. valida*, while the nutritional quality was not affected (Chapter 5). Nevertheless, macroalgal tissue toughness was lower when algae were incubated in conditions of a future global change scenario compared to present conditions, at least during the experiments carried out in spring. The results showed furthermore that a

lower tissue toughness could positively influence the food preference and consumption of amphipods, particularly of females (Chapter 5). However, no differences in food consumption rates, food preference or assimilation of organic material were observed between amphipods fed with macroalgae grown under present and future conditions, respectively.

Overall, the results obtained indicate that *A. valida* may be negatively affected by a future global change scenario, experiencing an increased energy expenditure and higher mortality rates. This could seriously affect population dynamics in the long term, causing a potential reduction in growth and reproduction rates and thus a decrease in biomass production. Taken into account that *A. valida* represents an important prey for species of higher trophic levels - including commercially important ones – these potential changes may cause reductions in energy fluxes to higher trophic levels, with possible ecological and socioeconomic implications for coastal ecosystems of Patagonia.

Ricarda Blum

Doctorado en Ciencias Biológicas

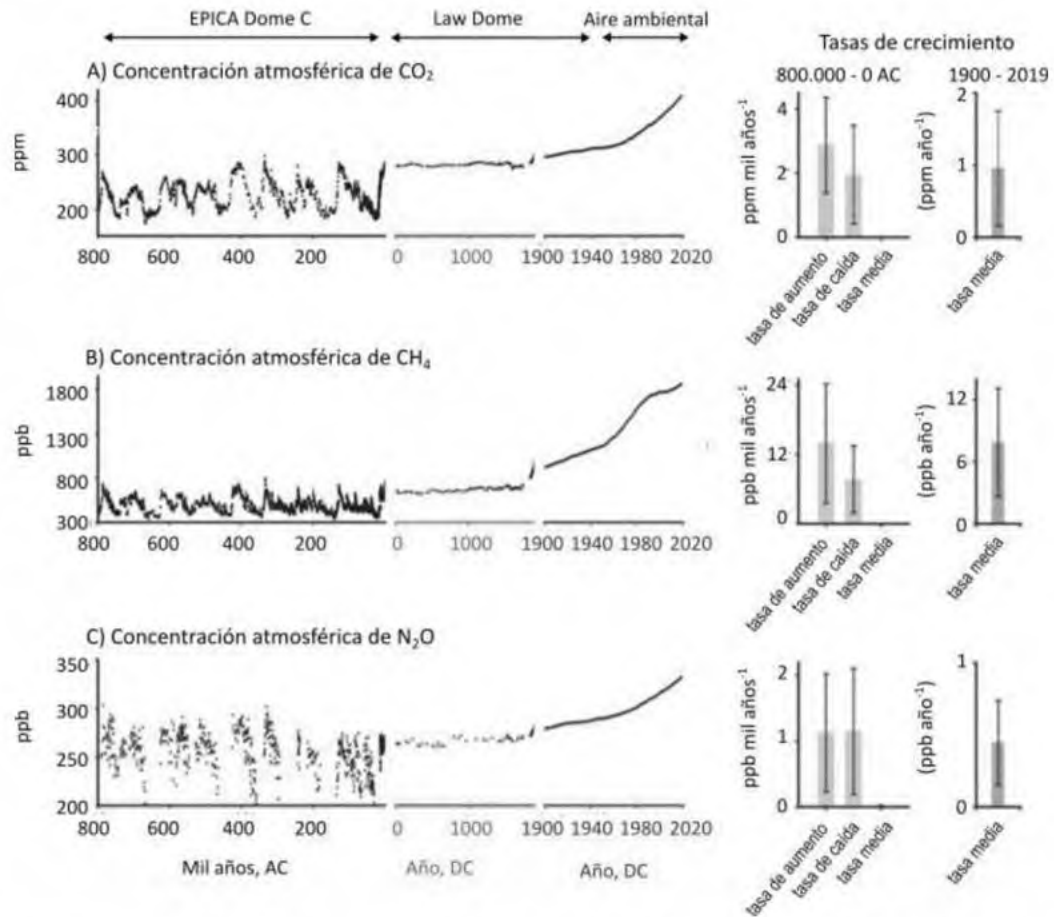
Universidad Nacional de Córdoba, 2025

# **Capítulo 1:**

## **Introducción General**

## **1.1. Cambio global: definición y conceptos generales**

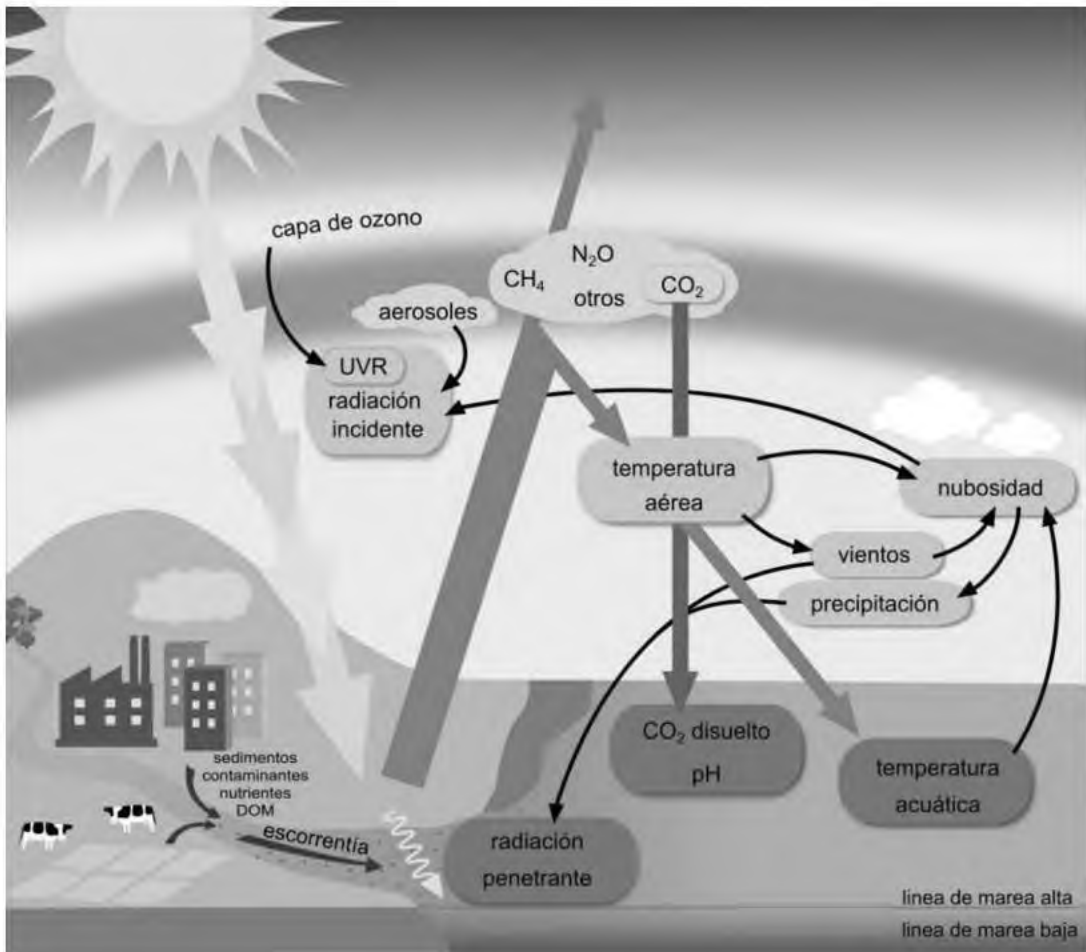
Desde el comienzo de la Revolución Industrial a fines del siglo XVIII, la presión antrópica sobre el planeta se ha incrementado constantemente (Crutzen, 2002; IPCC, 2021). A partir de esa época se ha registrado un rápido y continuo crecimiento de la población y del bienestar humano que condujo a una creciente demanda de recursos naturales, así como al desarrollo de nuevas tecnologías para la facilitación de bienes y servicios (Steffen et al., 2015). Una de las consecuencias de este proceso es el aumento en las emisiones de gases, tales como el dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ), el metano ( $\text{CH}_4$ ), el óxido nitroso ( $\text{N}_2\text{O}$ ) y otros (IPCC, 2021). Si bien estos gases ocurren naturalmente en la atmósfera de la Tierra, sus concentraciones se han incrementado de forma exponencial desde el comienzo de la época industrializada como consecuencia de las actividades antrópicas, principalmente la quema de combustibles fósiles, la expansión e intensificación de la ganadería, la deforestación y los cambios en el uso del suelo (IPCC, 2021). Por ejemplo, la concentración atmosférica promedio de  $\text{CO}_2$  ha aumentado en un 47 % en los últimos 270 años, desde alrededor de 280 ppm en el año 1750 a valores actuales de alrededor de 410 ppm, con un 75% de este aumento ocurriendo durante las últimas 6 décadas (Fig. 1.1 A; Canadell, 2021). Asimismo, las concentraciones de  $\text{CH}_4$  y  $\text{NO}_2$  han aumentado en el mismo periodo en un 156 y 23 %, respectivamente, desde concentraciones de 730 y 270 ppb en el año 1750 a concentraciones actuales de 1866 y 332 ppb, respectivamente (Fig. 1.1 B y C; Canadell, 2021). Si bien las concentraciones de estos gases en la atmósfera fluctúan naturalmente a lo largo del tiempo, su aumento durante el último siglo, así como sus concentraciones actuales son las más altas registradas en al menos 800.000 años (Fig. 1.1; Canadell, 2021).



**Fig. 1.1** Concentraciones atmosféricas y tasas de cambio de (A) CO<sub>2</sub> (B) CH<sub>4</sub> y (C) N<sub>2</sub>O durante los últimos 800.000 años. Los datos de concentración se muestran en tres intervalos de tiempo con diferentes escalas en los ejes X: 800.000 – 0 años A.C. (eje negro), 0 – 1900 d.C. (eje rojo) y 1900 – 2020 D.C. (eje azul). Los valores históricos fueron obtenidos a partir de burbujas de aire y cristales de clatrato de núcleos de hielo; los valores recientes fueron obtenidos de mediciones directas en la atmósfera. Las tasas de crecimiento se calcularon para el periodo de 800.000 años – 0 años A.C. y 1900 – 2019 D.C. con diferentes escalas en los ejes Y. Fuente: Canadell (2021)

Estos y otros gases de origen antrópico, junto con el vapor de agua y el ozono troposférico (O<sub>3</sub>), se denominan “gases de efecto invernadero”, debido a su influencia directa en el balance energético del planeta, al retener parte del calor generado por la radiación solar que alcanza la superficie terrestre. Como se mencionó previamente, varios de estos gases también se encuentran de forma natural en la atmósfera, lo que da lugar al denominado “efecto invernadero natural”, responsable de que la temperatura media del planeta sea aproximadamente 30 °C más alta de lo que sería en su ausencia (Steffen et al., 2006). Sin

embargo, el fuerte incremento de gases de origen antrópico en la atmósfera está provocando un rápido aumento de la temperatura global, a un ritmo sin precedentes en la historia reciente de la Tierra (IPCC, 2021). Este “efecto invernadero intensificado de origen antrópico”, comúnmente denominado “calentamiento global”, desencadena una cascada de procesos y cambios en el sistema climático, incluyendo alteraciones en los patrones de vientos y precipitaciones, aumento en la frecuencia e intensidad de tormentas y la ocurrencia de eventos de temperaturas cada vez más extremos, entre otros (Fig. 1.2; IPCC, 2021). Si bien en los medios de comunicación los términos “cambio climático” y “cambio global” (de aquí en adelante: CG) suelen usarse como sinónimos para referirse a estos fenómenos, el CG es mucho más amplio, ya que abarca procesos que trascienden las variables del clima (Steffen et al., 2006). Por ejemplo, durante la segunda mitad del siglo XX, la acumulación de gases en la atmósfera -en particular los clorofluorocarbonados (CFCs), provocó una disminución de la capa de ozono estratosférico, resultando en un aumento de la radiación ultravioleta que alcanza la superficie terrestre (RUV, 280 - 400 nm; Barnes et al., 2019). Aunque este proceso ha sido parcialmente revertido gracias a la implementación del Protocolo de Montreal (Barnes et al., 2019; Barnes et al., 2021), el descubrimiento del “agujero de ozono” en la década de 1980 (Farman et al., 1985) impulsó nuevas líneas de investigación sobre los efectos de la RUV en los sistemas biológicos y contribuyó a la emergente preocupación científica y social acerca de las consecuencias de las actividades humanas sobre el sistema terrestre (Steffen et al., 2006). Asimismo, grandes cantidades de CO<sub>2</sub> atmosférico son absorbidas por los océanos, alterando el balance químico del agua, y dando lugar al proceso conocido como acidificación oceánica (Fig. 1.2; Doney et al., 2009). Además, el incremento en la frecuencia e intensidad de tormentas y precipitaciones asociado al CG, junto con otros factores antrópicos tales como la creciente urbanización y el aumento de las actividades agrícolas e industriales en cercanía a ríos y zonas costeras, puede intensificar el aporte de materia orgánica y nutrientes de origen terrestre a través de un incremento en la escorrentía (Fig. 1.2, Depetris et al., 2005, Vizzo et al., 2021b). Por lo tanto, la definición de CG comprende múltiples procesos y transformaciones del sistema terrestre, que involucran tanto los ciclos biogeoquímicos, como los flujos de energía interconectados a escala planetaria, tales como el ciclo de carbono, el ciclo de nitrógeno y el ciclo de agua (Steffen et al., 2006).

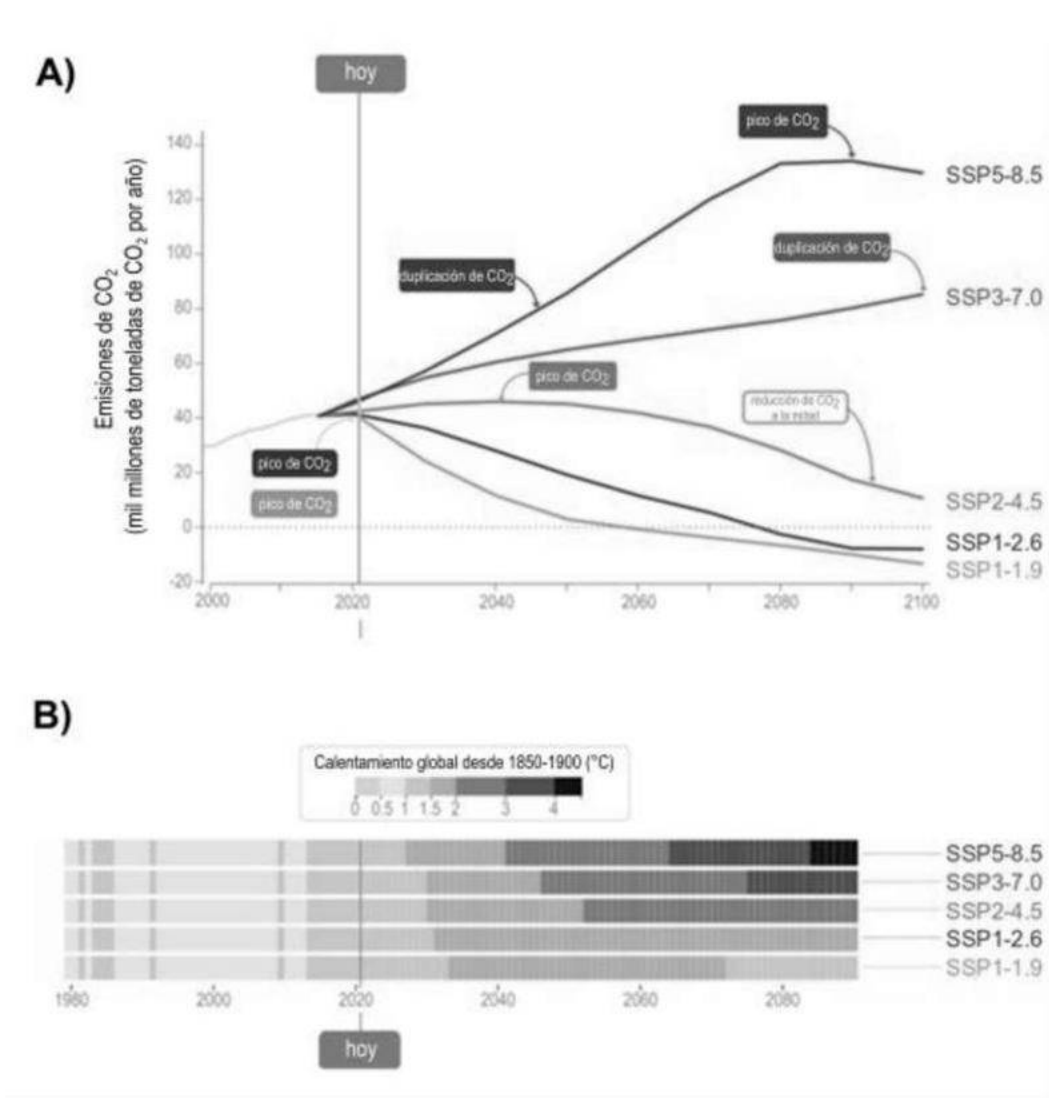


**Fig. 1.2** Variables asociadas al cambio global en áreas costeras. La radiación solar incidente (flechas amarillas) es parcialmente absorbida por la atmósfera y, en parte, reflejada al espacio en forma de calor (flechas rojas). Parte de este calor es retenido por los gases de efecto invernadero presentes en la atmósfera, como el CO<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub>, N<sub>2</sub>O y otros. Cuando la concentración de estos gases aumenta debido a actividades antrópicas, este proceso se intensifica y la temperatura en la Tierra se eleva. Este calentamiento global, a su vez, desencadena una serie de modificaciones en el sistema climático, tales como variaciones en la nubesidad y alteraciones en los patrones de vientos y precipitaciones. La intensidad y el tipo de radiación solar incidente también se ven afectados por cambios en la nubesidad, la emisión de aerosoles, y alteraciones en la capa de ozono. En cuanto a los ambientes marino-costeros, el incremento de CO<sub>2</sub> en la atmósfera conduce a una mayor cantidad de CO<sub>2</sub> absorbido por el océano, lo cual produce cambios en la química del agua. Asimismo, una mayor introducción de material de origen terrestre en aguas costeras por escorrentía - producto de las actividades antrópicas tales como la agricultura y urbanización en zonas costeras - incrementa los niveles de nutrientes y altera la transparencia del agua, reduciendo la cantidad de radiación que penetra en la columna de agua.

Dado que los gases de efecto invernadero pueden permanecer en la atmósfera durante décadas, siglos, e incluso miles de años (Solomon et al., 2010), y teniendo en cuenta que sus emisiones continúan en aumento en la actualidad (NOAA,

<https://gml.noaa.gov/ccgg/trends/>), se prevé que el calentamiento global y los distintos procesos del CG relacionados persistan a lo largo del próximo siglo y más allá (IPCC, 2021). No obstante, la magnitud de estos cambios futuros dependerá, en gran medida, de las decisiones que adopte la humanidad respecto a la emisión de estos gases y a la presión que ejerce sobre el sistema terrestre (IPCC, 2021). En este contexto, el Panel Intergubernamental sobre el Cambio Climático (IPCC) en su sexto informe ha identificado cinco trayectorias de desarrollo socioeconómico, SSPs (Shared Socio-economic Pathways; IPCC, 2021). Se trata de escenarios construidos sobre distintos supuestos de políticas climáticas que proyectan la evolución de las emisiones de gases de efecto invernadero -principalmente de CO<sub>2</sub>- hasta finales del presente siglo, junto con el consecuente aumento de la temperatura global. Por un lado, los escenarios SSP1-1.9 y SSP1-2.6 suponen una reducción drástica de las emisiones en las próximas décadas, lo cual limitaría el incremento de la temperatura a un máximo de 2 °C hacia fines de siglo (Fig. 1.3 A y B). En el otro extremo, el escenario SSP5-8.5 refleja la ausencia de medidas de mitigación y proyecta un incremento superior a 4 °C para fines del siglo XXI (Fig. 1.3 A y B). Entre estos extremos, se ubican los escenarios SSP2-4.5 y SSP3-7.0, que representan trayectorias intermedias en términos de severidad (IPCC, 2021; Fig. 1.3 A y B).

Los experimentos que se presentan en esta tesis se basan en simulaciones bajo el escenario SSP5-8.5, dado que este proyecta los cambios más severos en las condiciones ambientales y, por lo tanto, se considera el de mayor riesgo para los ecosistemas del planeta (Trisos et al., 2020). En las secciones siguientes se describen los principales procesos y transformaciones en las condiciones físicoquímicas del océano -y en particular en los ambientes marino-costeros- observados desde la época preindustrial hasta la actualidad, así como sus proyecciones bajo distintos escenarios futuros.



**Fig. 1.3** (A) Evolución de las emisiones anuales de CO<sub>2</sub> a nivel global proyectadas hasta fines del presente siglo en los cinco escenarios propuestos por el Panel Intergubernamental sobre el Cambio Climático (IPCC). (B) Calentamiento proyectado en cada uno de esos escenarios hasta fines del presente siglo respecto al periodo 1850-1900. Fuente: Arias et al. (2021)

## 1.2. El impacto del cambio global en los ecosistemas marinos

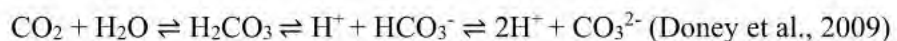
### 1.2.1. Océano

El océano absorbe aproximadamente el 30 % de las emisiones de CO<sub>2</sub> (Sabine et al., 2004), y alrededor del 90 % del exceso de calor que se produce a partir del efecto invernadero de

origen antrópico, transfiriéndolo gradualmente hacia sus capas más profundas (Cheng et al., 2020). Este proceso provoca cambios significativos en las condiciones físico-químicas de las aguas superficiales. Desde el inicio de la era industrial, la temperatura promedio de la capa superficial de los océanos a escala global ha aumentado aproximadamente 0,88 °C (i.e., incremento promedio de temperatura entre 2011-2020 en comparación con el periodo de referencia de 1850-1900), de los cuales 0,60 °C corresponden al calentamiento registrado en las últimas cuatro décadas (Fox-Kemper et al., 2021). Para finales de este siglo, se proyecta un incremento adicional de 3 °C en promedio (2,01 °C - 4,07 °C) bajo el escenario SSP5-8.5 (Fox-Kemper et al., 2021).

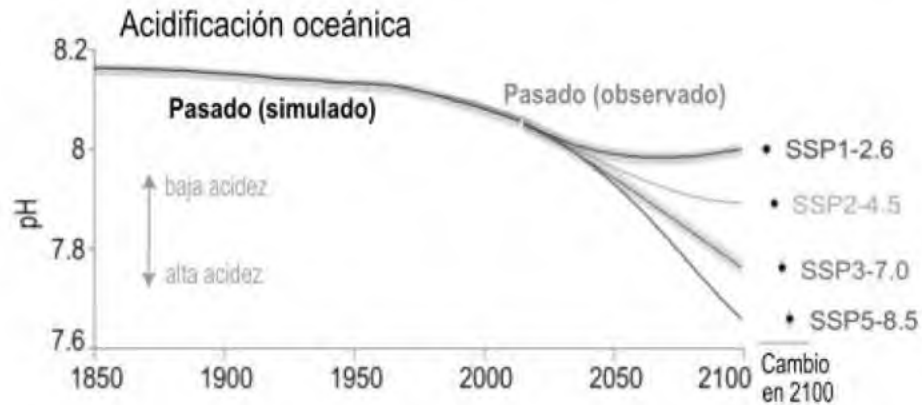
Junto con el aumento de la temperatura media oceánica, se ha registrado un incremento en la frecuencia, duración y severidad de los eventos de temperatura extrema (i.e., olas de calor) en las aguas superficiales (Fox-Kemper et al., 2021; Lopez et al., 2025). Por ejemplo, en 2023 -el segundo año más cálido desde que comenzaron los registros- la temperatura superficial del océano Atlántico durante el verano boreal alcanzó valores sin precedentes (Lopez et al., 2025). Este calentamiento desencadena una serie de impactos, entre ellos, la pérdida de hielo marino, el aumento del nivel del mar, alteraciones en las corrientes oceánicas, desoxigenación, y una mayor estratificación vertical de la columna de agua (Bindoff et al., 2019).

Por otro lado, el incremento de CO<sub>2</sub> en el agua altera el equilibrio químico del carbono inorgánico disuelto, descrito por la siguiente ecuación:



El CO<sub>2</sub> reacciona con el agua formando ácido carbónico (H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>), el cual se disocia liberando iones hidrógeno (H<sup>+</sup>) y generando bicarbonato (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>) y carbonato (CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>). En condiciones naturales, estas tres formas de carbono inorgánico disuelto (i.e., CO<sub>2</sub>, HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> y CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>) se encuentran en equilibrio. Sin embargo, el aumento de CO<sub>2</sub> disuelto incrementa la concentración de bicarbonato e iones de hidrógeno, lo que provoca una disminución tanto del pH como del estado de saturación del carbonato de calcio (Doney et al., 2009, Canadell, 2021). Este fenómeno, conocido como acidificación, ha provocado una reducción de aproximadamente 0,1 unidades en el pH promedio de las aguas superficiales de los océanos

desde la era preindustrial. Se estima que, si las emisiones de CO<sub>2</sub> continúan en aumento (escenario SSP5-8.5; Fig. 1.4), el pH podría disminuir aproximadamente 0,3 unidades adicionales para finales del siglo XXI (Doney et al., 2009; Bindoff et al., 2019).



**Fig. 1.4** Cambios recientes y proyecciones a futuro del pH del océano a nivel mundial (medias, rango de 5 % - 95 %). La curva del cambio observado se extiende de 1985 a 2019 y coincide con los cambios simulados para la misma época a través de modelos. Fuente: Arias et al. (2021) (modificado)

### 1.2.2. Zonas costeras

Las zonas marino-costeras se encuentran entre las más productivas del planeta y revisten una gran importancia tanto ecológica como económica (Harley et al., 2006; Mehvar et al., 2018). Estas áreas proveen hábitat y alimento a una amplia diversidad de especies (Ramírez et al., 2017) y ofrecen valiosos servicios ecosistémicos para los seres humanos, tales como la protección costera frente a tormentas e inundaciones, el ciclado de nutrientes, la provisión de materias primas, así como oportunidades para la recreación y el turismo (Mehvar et al., 2018). Al ser zonas de interfase entre los ambientes terrestre y marino, están expuestas a múltiples estresores derivados de actividades humanas que se desarrollan tanto en la tierra como en el océano (Harley et al., 2006; Halpern et al., 2008). Por ejemplo, la creciente urbanización y el aumento de las actividades agrícolas e industriales en áreas cercanas a ríos y zonas costeras, junto con una mayor escorrentía provocada por el incremento en la frecuencia e intensidad de tormentas y lluvias asociadas al CG, intensifican el aporte de materia orgánica y nutrientes de origen terrestre (Fig. 1.2, Depetris et al., 2005, Vizzo et al.,

2021b). Este aporte excesivo de nutrientes puede desencadenar procesos de eutrofización, deteriorando la calidad del agua y de los sedimentos (Valiela et al., 1997; Cloern et al., 2016). Asimismo, la mayor introducción de agua dulce, materia orgánica y otros contaminantes de origen terrestre en las aguas costeras -como consecuencia de procesos asociados al CG- afectan la química del agua, incrementando la concentración de sustancias tóxicas y alterando su pH (Islam & Tanaka, 2004; Doney et al., 2009; Waldbusser & Salisbury, 2014; Vargas et al., 2017). Estos procesos, junto con factores naturales como la surgencia de aguas profundas, no solo contribuyen a una acidificación más intensa en las aguas costeras en comparación con las del océano abierto, sino que también generan fluctuaciones del pH más pronunciadas en diferentes escalas temporales (Doney et al., 2009, Waldbusser & Salisbury, 2014; Vargas et al., 2017). Simultáneamente, el aporte de material de origen terrestre derivado de las actividades humanas puede reducir la transparencia del agua, disminuyendo los niveles de radiación solar que penetran en la columna de agua (i.e., aumentando el coeficiente de atenuación  $k$ , Vizzo et al., 2021a). Por ejemplo, en aguas costeras de la Patagonia con poca influencia antrópica, las longitudes de onda correspondientes a la radiación fotosintéticamente activa (PAR - Photosynthetically Active Radiation, 400 - 700 nm) pueden penetrar hasta profundidades superiores a los 20 m (i.e., 1 % de la irradiancia medida en la superficie, coeficiente de atenuación  $k_{PAR} = 0,2 \text{ m}^{-1}$ ), mientras que en zonas cercanas a estuarios con alto impacto antrópico, la penetración máxima de la radiación PAR puede reducirse a menos de 2,5 m ( $k_{PAR} > 2 \text{ m}^{-1}$ , Helbling et al., 2005). No obstante, este proceso actúa a escala local y es altamente variable, dependiendo de la estación y del tipo y cantidad de material introducido, entre otros factores.

Por otra parte, las zonas costeras también se encuentran entre las más afectadas por las fluctuaciones en los niveles de radiación solar incidente. Estos cambios, estrechamente vinculados al CG y las actividades antrópicas, son impulsados por la variación en la nubosidad, la emisión de aerosoles a la atmósfera y las alteraciones de la capa de ozono (Häder et al., 2011; Bais et al., 2019). Por ejemplo, un incremento en la concentración de gases de efecto invernadero puede provocar un enfriamiento en las capas superiores de la estratósfera. Este enfriamiento puede influir en las reacciones químicas que afectan la capa de ozono, reduciendo su destrucción en algunas regiones, lo que podría disminuir la cantidad de radiación ultravioleta B (RUV-B) que alcanza la superficie terrestre (Bais et al., 2019).

Por otro lado, los cambios en las circulaciones planetarias producto del cambio climático, podrían alterar los patrones de nubosidad, lo que, a su vez, podría aumentar la irradiancia solar global que llega a la superficie terrestre (Bais et al., 2019; Luo et al., 2024; Tselioudis et al., 2025). Dada la complejidad de los procesos que determinan los niveles de irradiancia que alcanzan la superficie terrestre, persiste una gran incertidumbre respecto a la dirección e intensidad de los cambios esperados a futuro (Bais et al., 2019).

### **1.3. Procesos asociados al CG y sus efectos en los organismos acuáticos**

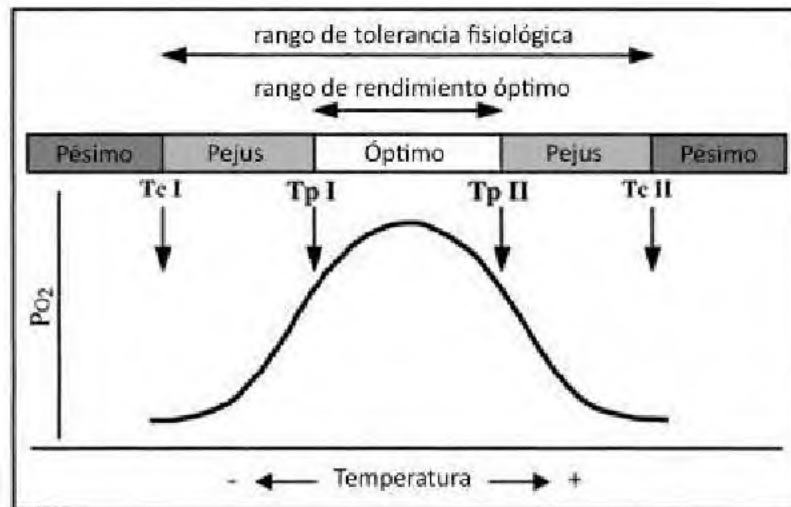
#### **1.3.1. Aumento de temperatura**

La temperatura es una variable ambiental clave que regula una amplia variedad de procesos fisiológicos en especies ectotermas, afectando directamente sus tasas metabólicas, su desarrollo, su crecimiento y su distribución geográfica (Pörtner, 2001). En términos generales, un aumento de temperatura dentro de un cierto rango acelera las reacciones bioquímicas, lo que conlleva un incremento en las tasas metabólicas, la demanda energética y, en consecuencia, el consumo de oxígeno (Pörtner, 2001; Brown et al., 2004). Este oxígeno es esencial para la producción de energía en forma de adenosín trifosfato (ATP) en las mitocondrias, donde se lleva a cabo la respiración celular.

Para satisfacer la creciente demanda de oxígeno en condiciones de temperatura elevada, los organismos ectotermos ajustan sus fisiologías aumentando la frecuencia cardíaca y las tasas de ventilación (Frederich & Pörtner, 2000). De esta manera, dentro de un rango térmico óptimo, pueden mantener concentraciones adecuadas de oxígeno en sus fluidos corporales, permitiendo un rendimiento energético eficiente (Fig. 1.5; Frederich & Pörtner, 2000). Sin embargo, cuando la temperatura supera un umbral crítico -conocido como punto de Pejus (Fig. 1.5)- se produce un desajuste entre la demanda de oxígeno y su suministro. Esto provoca una disminución del oxígeno disponible en los fluidos corporales, deteriorando la condición fisiológica del organismo y potencialmente conduciendo a una transición hacia un metabolismo anaeróbico (Pésimo, Fig. 1.5).

La temperatura crítica ( $T_c$ ), que marca la transición del metabolismo aeróbico al anaeróbico, define el rango de termotolerancia de una especie. Fuera de este rango térmico, los organismos sólo pueden sobrevivir durante períodos limitados (Frederich & Pörtner, 2000).

Es importante destacar que tanto el rango de termotolerancia, como las temperaturas óptimas y críticas, pueden variar significativamente entre especies (Stillman, 2002), entre distintas poblaciones de una misma especie e incluso entre estaciones del año dentro de una misma población (Crickenberger et al., 2015). Estos factores determinan el rendimiento metabólico y la vulnerabilidad de los organismos frente a las variaciones ambientales asociadas al CG (Stillman, 2003). En este contexto, el aumento continuo de la temperatura oceánica desde la Revolución Industrial, junto con el incremento en la frecuencia y severidad de olas de calor marinas, ha provocado severas alteraciones en la biota marina. Entre los efectos observados se encuentran desplazamientos en los rangos de distribución de las especies (Pörtner, 2001), incrementos en las tasas de mortalidad (Hughes et al., 2017), modificaciones en la composición de las comunidades (Nagai et al., 2011), alteraciones en las relaciones tróficas (O'Connor, 2009) y reducciones en las tasas de reproducción (Philippart et al., 2003) y crecimiento (Audzijonyte et al., 2019), entre otros.



**Fig. 1.5** Esquema general de una curva de tolerancia térmica de las especies ectotermas acuáticas definido según la concentración de oxígeno en los fluidos corporales. Fuente: Frederich & Pörtner, 2000

### 1.3.2. Acidificación

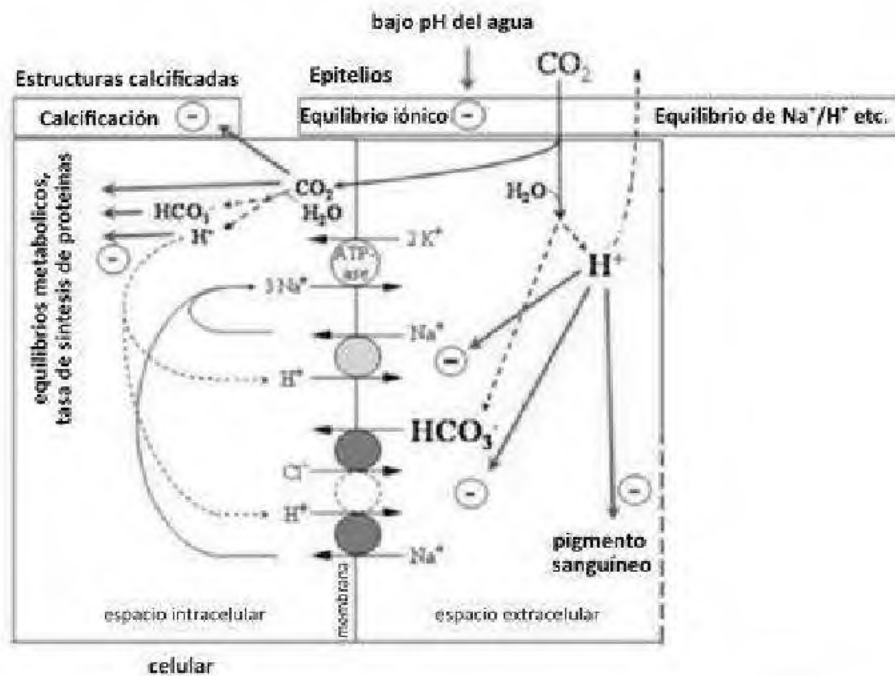
Como se describió en la sección 1.2.1, la acidificación oceánica es un proceso que altera significativamente el equilibrio químico del agua, incrementando la concentración de  $\text{CO}_2$

disuelto. Este fenómeno conduce a una disminución del pH y a una reducción en la saturación de carbonato de calcio, un compuesto esencial para la formación de estructuras calcáreas en numerosos organismos marinos (Doney et al., 2009; Bindoff et al., 2019). Los efectos de la acidificación varían considerablemente entre organismos, dependiendo de sus características fisiológicas y ecológicas. Mientras algunas especies resultan perjudicadas, otras pueden ser beneficiadas por las nuevas condiciones (Kroeker et al., 2013). Por ejemplo, ciertos productores primarios no calcificados pueden experimentar un incremento en la actividad fotosintética y en sus tasas de crecimiento, como consecuencia de la mayor disponibilidad de carbono inorgánico disuelto (Ji & Gao, 2020). En particular, se ha sugerido que concentraciones elevadas de CO<sub>2</sub> podrían mejorar la eficiencia del complejo enzimático Rubisco, responsable de la fijación del carbono durante la fotosíntesis (Raven et al., 2005). Sin embargo, este potencial beneficio se encuentra condicionado por factores como la disponibilidad de luz y nutrientes, lo cual sugiere que los efectos de la acidificación sobre los productores primarios son altamente dependientes del contexto ambiental (Celis-Pla et al., 2015).

Por otro lado, los organismos calcificados, tales como moluscos, corales y equinodermos, se encuentran entre los más vulnerables a la acidificación oceánica, ya que dependen de la disponibilidad de iones carbonato para la formación de sus esqueletos y conchas. La disminución en el estado de saturación de carbonato de calcio compromete su capacidad de biomineralización (Kroeker et al., 2010), lo que puede derivar en procesos de descalcificación, con la consecuente disolución parcial o total de sus estructuras calcáreas. Esta alteración conlleva un incremento en los costos energéticos asociados a la calcificación, afectando negativamente las tasas de crecimiento, la reproducción y la supervivencia de los organismos (Pörtner et al., 2004; Doney et al., 2009; Kroeker et al., 2010).

Algunos taxones, tales como peces y crustáceos, suelen mostrar una mayor tolerancia a la acidificación, al menos en el corto plazo (Kroeker et al., 2013). En particular, especies que habitan ambientes naturalmente sujetos a fluctuaciones del pH, como las zonas costeras, han desarrollado mecanismos fisiológicos que les permiten hacer frente al aumento de CO<sub>2</sub> en sus fluidos corporales, un estado conocido como hipercapnia (Pörtner et al., 2004). Este estado implica un aumento en la presión parcial de CO<sub>2</sub> en los fluidos extracelulares, lo que puede afectar el equilibrio ácido-base interno. Para contrarrestarlo, muchos organismos

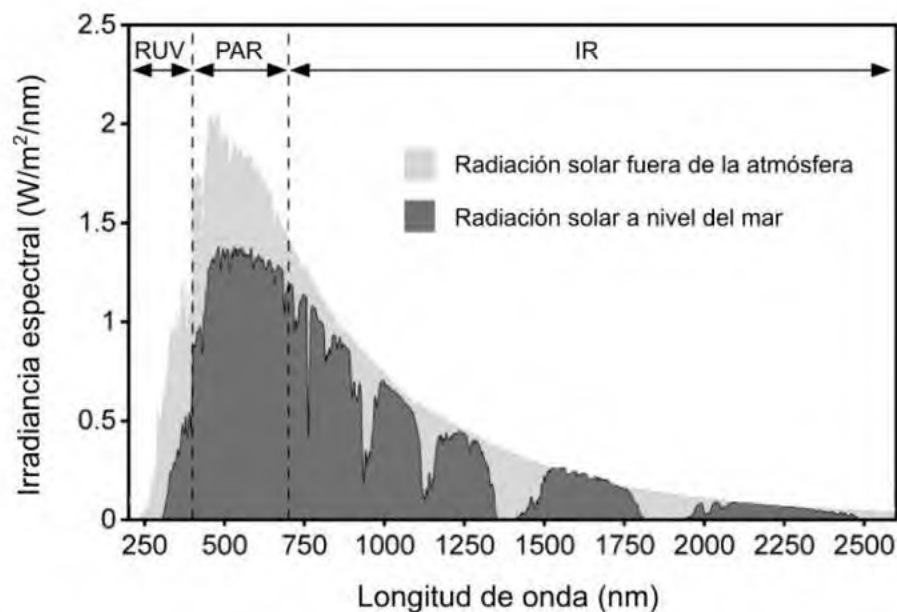
utilizan mecanismos de regulación del pH que incluyen el intercambio activo de iones a través de los epitelios branquiales (principalmente  $\text{Na}^+$ ,  $\text{H}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  y  $\text{HCO}_3^-$ ), así como el uso de buffers como el bicarbonato y proteínas en los fluidos intra- y extracelulares (Fig. 1.6; Pörtner et al., 2004; Whiteley, 2011). Estos mecanismos de regulación ácido-base son fundamentales para la supervivencia en ambientes con condiciones extremas de pH, al menos durante cortos periodos de tiempo (Pörtner et al., 2004; Whiteley, 2011). No obstante, la ionoregulación es un proceso altamente demandante en términos energéticos, ya que depende del consumo de ATP. Este aumento en la demanda energética puede desviar recursos que normalmente estarían destinados a funciones esenciales como el crecimiento o la reproducción de los organismos (Pörtner et al., 2004; Whiteley, 2011). A largo plazo, esta redistribución de energía podría repercutir en la dinámica poblacional de algunas especies (Pörtner et al., 2004), especialmente en escenarios donde la acidificación oceánica persista o se intensifique.



**Fig. 1.6** Esquema general de los mecanismos fisiológicos de mantenimiento de los niveles ácido-base a nivel celular bajo condiciones de hipercapnia (i.e., incremento de  $\text{CO}_2$ ) en animales marinos con respiración branquial. Fuente: Pörtner et al. (2004)

### 1.3.3. Cambios en los niveles de radiación solar

La radiación solar constituye la principal fuente de energía para la vida en la Tierra. Se trata de radiación electromagnética que abarca un amplio rango espectral, el cual se clasifica según las longitudes de onda ( $\lambda$ ). La porción de radiación solar que alcanza la superficie terrestre representa sólo una fracción del espectro electromagnético emitido por el Sol, ya que una parte significativa es absorbida por la atmósfera (Fig. 1.7). El espectro de la radiación solar se divide en tres grandes bandas según su longitud de onda (Fig. 1.7): radiación ultravioleta (RUV,  $\lambda < 400$  nm), radiación visible o fotosintéticamente activa (PAR,  $\lambda = 400 - 700$  nm) y radiación infrarroja (IR,  $\lambda > 700$  nm). La RUV, a su vez, se subdivide en tres franjas: RUV-A (315 - 400 nm), RUV-B (280 - 315 nm) y RUV-C ( $< 280$  nm); sin embargo, la RUV-C no alcanza la superficie terrestre, ya que completamente absorbida por la atmósfera (Fig. 1.7).



**Fig. 1.7** Espectro solar antes de traspasar la atmósfera (amarillo) y en la superficie terrestre (rojo). Se indican las franjas de radiación ultravioleta (RUV), radiación fotosintéticamente activa (PAR) y radiación infrarroja (IR). Modificado de Tanaka et al., 2010 (datos originales provenientes de American Society for Testing and Materials (ASTM) Terrestrial Reference Spectra).

Las longitudes de onda no solo determinan las propiedades físicas de la radiación, sino también sus efectos biológicos sobre los organismos. Por ejemplo, la radiación PAR

comprende la franja del espectro utilizada por los organismos fotoautótrofos para llevar a cabo la fotosíntesis, un proceso fundamental para la producción de biomasa y el sostenimiento de las cadenas tróficas en los ecosistemas. Además, cambios en la intensidad de luz y en el fotoperiodo pueden influir en el comportamiento y, en particular, en los niveles de actividad en ciertos invertebrados, afectando indirectamente su balance energético (Fanjul-Moles et al., 1998, Teschke et al., 2007).

Por otro lado, la RUV, especialmente la RUV-B, puede generar efectos adversos en los organismos, incluyendo daños en el ADN y en las proteínas (Häder et al., 2011), así como la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS, Obermüller et al., 2005). Estos daños pueden activar respuestas celulares complejas, comprometiendo la supervivencia y la reproducción de las especies expuestas. En este contexto, los organismos naturalmente expuestos a la RUV han desarrollado diversos mecanismos de protección frente a este estresor ambiental. Entre ellos se incluyen respuestas comportamentales, como el desplazamiento hacia aguas más profundas o la búsqueda de refugios (Hansson et al., 2016; Blum & Valiñas, 2022); la acumulación de compuestos fotoprotectores y/o pigmentación que actúan como filtros naturales (Hansson et al., 2007; Hernández Moresino et al., 2014; Valiñas & Helbling, 2015); así como mecanismos celulares capaces de reparar los daños inducidos por la radiación (Moresino & Helbling, 2010). Estos mecanismos son específicos de cada especie y pueden provocar modificaciones en las tasas metabólicas, en el comportamiento y, por ende, en las interacciones con otras especies (Hansson et al., 2007; Valiñas & Helbling, 2016).

Además de la composición espectral, el impacto de la radiación solar sobre los organismos depende de su intensidad (i.e., irradiancia), de su dosis (i.e., acumulación a lo largo del tiempo) y del fotoperiodo. Estas variables presentan una alta variabilidad espacial y temporal, influenciadas por factores como la latitud, la altitud y la estación del año (Hernández et al., 2012; Pfeifroth et al., 2018). Además, la actividad humana añade complejidad a estos factores naturales. Por ejemplo, las emisiones de aerosoles y los cambios en la nubosidad asociados al CG pueden modificar tanto la cantidad de radiación incidente como su composición espectral (Bais et al., 2019; Schwarz et al., 2020).

En los ecosistemas acuáticos, la irradiancia que reciben los organismos está condicionada por las propiedades ópticas de la columna de agua, la cual actúa como una barrera natural

que atenúa la radiación solar. El grado de atenuación depende de la transparencia del agua y de las longitudes de onda que logran atravesarla (Helbling et al., 2005). Diversos tipos de material particulado y sustancias orgánicas disueltas pueden reducir la transparencia, alterando así la composición espectral y disminuyendo los niveles de irradiancia a los que están expuestos los organismos. Esto no solo repercute en la fotosíntesis, sino también en el comportamiento y la distribución de las especies en el medio acuático (Hansson et al., 2007, Vizzo et al., 2021b).

### **1.3.4. Incremento de nutrientes**

Las aguas costeras reciben naturalmente un aporte de nutrientes de origen terrestre a través de diversos mecanismos, como el transporte por viento (i.e., polvo eólico) y la escorrentía. Este ingreso de nutrientes, especialmente de nitrógeno y fósforo, es esencial para el crecimiento de los productores primarios, ya que estos elementos se consideran limitantes en los ecosistemas acuáticos. El aporte de nutrientes hacia los cuerpos de agua ha aumentado significativamente en las últimas décadas como consecuencia de la creciente urbanización en zonas costeras, un fenómeno que ha intensificado las actividades agrícolas e industriales y que, en muchos casos, ha derivado en la eutrofización de estos ecosistemas (Carpenter et al., 1998, Conley et al., 2009). A esto se suman los cambios en los patrones de vientos y precipitaciones, como consecuencia del cambio climático, que pueden favorecer la introducción de material de origen terrestre, exacerbando aún más este problema (Depetris et al., 2005, Vizzo et al., 2021b). Un incremento moderado de nutrientes en aguas costeras puede aumentar la biomasa y mejorar la calidad nutricional de los productores primarios, lo que puede beneficiar a los consumidores que dependen de ellos (Hemmi & Jormalainen, 2002). Sin embargo, un aporte excesivo y sostenido de nutrientes puede desencadenar un proceso de eutrofización, caracterizado por un aumento desmedido en la producción primaria, la acumulación de materia orgánica y el deterioro de la calidad del agua (Valiela et al., 1997). Diversos estudios han demostrado que los eventos de eutrofización favorecen la proliferación de macroalgas verdes, lo que puede provocar cambios en la composición de especies y una pérdida de biodiversidad en los ecosistemas afectados (Valiela et al., 1997; Pardal, 2000; Díaz et al., 2002; Gao et al., 2017). Este proceso se ve acelerado por la interacción con otras variables asociadas al CG, como el aumento de la temperatura y la

acidificación del océano. Como consecuencia, la estructura de las comunidades biológicas y los servicios ecosistémicos pueden ser alterados, afectando la resiliencia y el funcionamiento a largo plazo de estos entornos acuáticos (Valiela et al., 1997, Gao et al., 2017).

#### **1.4. Los organismos intermareales como modelo de estudio de los efectos del CG**

Dentro de los ecosistemas marino-costeros, las zonas intermareales representan uno de los entornos más desafiantes para la vida marina debido al intenso estrés físico-químico al que están expuestos los organismos que en ellas habitan. Este estrés resulta principalmente de las fuertes fluctuaciones de las condiciones ambientales, que cambian drásticamente a lo largo del ciclo de mareas (Thompson et al., 2002; Helmuth et al., 2006). A medida que la marea baja y sube, las especies intermareales deben adaptarse a variaciones extremas de temperatura, pH y niveles de radiación, entre otras variables. Por ejemplo, en zonas intermareales de latitudes medias, la temperatura puede variar más de 20 °C a lo largo del ciclo de mareas (Helmuth & Hofmann, 2001, Stillman, 2002; Scrosati et al., 2020). En consecuencia, los organismos deben soportar tanto bajas de temperatura durante la marea alta, como el calor extremo al quedar expuestos al sol durante la marea baja.

Adicionalmente, los organismos intermareales están expuestos a fluctuaciones de los niveles de radiación solar, con máximos durante la marea baja coincidente con las horas del mediodía y bajo condiciones de cielos despejados (Zou et al., 2007). En estas circunstancias, los organismos se ven expuestos periódicamente a altos niveles de RUV (Häder et al., 2011). Asimismo, las zonas intermareales se caracterizan por marcadas variaciones en los niveles de pH que ocurren en distintas escalas temporales, observándose diferencias de más de una unidad de pH entre la marea alta y la baja (Vargas et al., 2017; Carstensen & Duarte, 2019). La intensidad de ese estrés abiótico aumenta a lo largo de un gradiente perpendicular que se extiende desde la zona baja, más próxima a la línea de costa durante la marea baja, hasta la zona intermareal alta, más alejada y expuesta durante períodos más prolongados a las condiciones atmosféricas.

Aunque los organismos intermareales muestran una amplia tolerancia a las fluctuaciones de las condiciones fisicoquímicas que caracterizan estos ambientes, muchos de ellos ya operan cerca de sus límites fisiológicos de tolerancia, lo que los hace particularmente vulnerables frente al impacto del CG (Stillman, 2003). Sin embargo, esta misma exposición a condiciones variables les ha conferido una notable capacidad de adaptación, lo que los convierte en modelos valiosos para estudiar los mecanismos fisiológicos y comportamentales afectados por el CG (Pörtner et al., 2004).

### **1.4.1. Crustáceos**

El subfilo Crustácea es un grupo altamente diverso, con alrededor de 52.000 especies descritas (Martin & Davis, 2001), que habitan ambientes marinos (i.e., mar profundo, zonas intermareales, estuarios y zonas pelágicas), de agua dulce y terrestres. En los ecosistemas intermareales, los crustáceos representan uno de los grupos de macrofauna móvil más diversos y abundantes y cumplen un rol clave como consumidores primarios y secundarios, además de constituir presas para organismos de niveles tróficos superiores (Duffy & Hay, 2000; Sueiro et al., 2011; Rechimont et al., 2013). Por ejemplo, en intermareales rocosos de la Patagonia argentina, los peracáridos tales como isópodos, anfípodos y tanaidáceos pueden alcanzar densidades totales de hasta 45.000 individuos por m<sup>2</sup> (Rumbold et al., 2017).

Debido a su diversidad taxonómica y a la amplia variedad de hábitats que ocupan, los crustáceos muestran una gran diversidad de respuestas frente a cambios en las condiciones fisicoquímicas de los ecosistemas acuáticos. Por ejemplo, especies estrechamente emparentadas, aun cuando coexisten en un mismo ambiente, pueden mostrar diferentes niveles de tolerancia a temperaturas extremas. Estas diferencias se atribuyen a la diversidad de mecanismos fisiológicos y comportamentales que utilizan para hacer frente al estrés térmico (Stillman, 2002, Axenov-Gribanov et al., 2016). La variabilidad en las respuestas a distintos factores ambientales convierte a los crustáceos en modelos ideales para investigar los mecanismos subyacentes que determinan su tolerancia al estrés ambiental. Además, su abundancia, relevancia ecológica, y la facilidad con la que pueden ser mantenidos en condiciones de laboratorio, refuerzan su valor como organismos modelo. Estas características los convierten en herramientas clave para comprender y prever las respuestas biológicas frente a las alteraciones ambientales asociadas al CG.

### 1.4.2. *Ampithoe valida*

Los anfípodos son crustáceos que habitan ambientes terrestres, dulceacuícolas y marinos y ocupan una multitud de nichos ecológicos. Las especies herbívoras que viven asociadas a macrófitas en las zonas costeras e intermareales desempeñan un papel ecológico relevante como nexo entre los productores primarios y los organismos de niveles tróficos superiores, entre los cuales se incluyen especies de interés comercial (Hidalgo et al., 2007; Roux et al., 2009).

*Ampithoe valida* pertenece a la familia Ampithoidae, incluida dentro del suborden Senticaudata (Harper et al., 2022; Horton et al., 2023). Se trata de anfípodos de cuerpo convexo y ligeramente comprimido lateralmente. Los adultos alcanzan típicamente un tamaño máximo de entre 12,5 mm (Chapman, 2007) y 14,7 mm (Alonso et al., 1995), aunque algunos estudios han reportado ejemplares de hasta 20,4 mm (Zheng et al., 2013). Su coloración varía de verde claro a parduzco (Fig. 1.8), ocasionalmente con manchas negras (Faasse, 2015). La especie presenta dimorfismo sexual, que se evidencia en el segundo par de gnatópodos, que son considerablemente más grandes en los machos (Fig. 1.8). La morfología típica de estos apéndices en los machos constituye una de las principales características diagnósticas de la especie (Faasse, 2015).



**Fig. 1.8** Hembra y macho de *Ampithoe valida* recolectados en el área de estudio. Las flechas muestran el segundo par de gnatópodos.

*Ampithoe valida* es una especie cosmopolita con un amplio rango de distribución geográfica. Su área de distribución nativa abarca tanto las costas atlánticas como pacíficas de América del Norte, así como del Pacífico occidental (i.e., costas de Japón y Corea del Sur), donde se han identificado tres linajes genéticos diferenciados (Pilgrim & Darling, 2010, Harper et al., 2022). No obstante, ha sido introducida en diversas regiones, como la costa atlántica de Europa -desde el Mar del Norte hasta Portugal- (Pardal, 2000; Faasse, 2015), el mar Mediterráneo (Faasse, 2015) y Argentina (Rumbold, 2019; Schwindt et al., 2020). Esta especie habita zonas marino-costeras, incluyendo intermareales rocosos (Valiñas et al., 2014; Rumbold, 2019) y estuarios (Pardal, 2000) hasta profundidades de 30 m (Chapman, 2007). Comúnmente, *A. valida* se asocia a macroalgas blandas, que le proveen tanto refugio como alimento (Nicotri, 1980; Pardal, 2000; Valiñas & Helbling, 2015). También se ha registrado su presencia en praderas del pasto marino *Zostera marina* (Reynolds et al., 2012). Los individuos de esta especie construyen tubos entre las láminas de las macroalgas (Borowsky, 1983), utilizando una mezcla de materia fecal, fragmentos de algas y secreciones glandulares producidas en los pereiópodos (Kronenberger et al., 2012). Los machos presentan mayor movilidad que las hembras, desplazándose entre los tubos que estas construyen para aparearse (Borowsky, 1983).

*Ampithoe valida* se reproduce durante todo el año (Alonso et al., 1995; Pardal, 2000; Zheng et al., 2013). El ciclo reproductivo de las hembras está relacionado con su ciclo de mudas, dado que cada muda por lo general está acompañada por una ovulación en presencia de un macho (Borowsky, 1983). El tiempo de intermuda de las hembras corresponde al tiempo necesario para el desarrollo desde la ovulación hasta que los juveniles salen del marsupio, y se estimó entre 9 a 17 días para individuos mantenidos en laboratorio entre 30 a 15 °C, respectivamente (Zheng et al., 2013) y de ~12 días para individuos mantenidos a 21 °C (Borowsky, 1983). La esperanza de vida de individuos observados en la naturaleza se estimó entre 191 - 242 días según la época del año (Pardal, 2000), aunque otros autores reportaron esperanzas de vida de solo 77 - 150 días para individuos mantenidos en laboratorio a temperaturas de 30 a 15 °C, respectivamente (Zheng et al., 2013). La especie presenta un crecimiento continuo durante toda su vida (Pardal, 2000). Las hembras alcanzan la madurez sexual después de aproximadamente 28 - 61 días dependiendo de la estación del año, mientras que los machos la alcanzan más temprano, aproximadamente después de 24 - 44

días (Pardal, 2000). De esa manera, se estima que una hembra puede tener entre 4 - 9 ciclos reproductivos a lo largo de su vida dependiendo de la temperatura considerada (Barrett, 1966).

Debido a su amplia distribución geográfica, gran abundancia y rol ecológico, *A. valida* ha sido objeto de numerosas investigaciones. Sin embargo, se conoce poco sobre cómo el CG podría afectar a esta especie y sus dinámicas poblacionales. Considerando el creciente impacto del CG sobre los sistemas costeros e intermareales, resulta fundamental profundizar los estudios que evalúen la resiliencia y capacidad de adaptación de esta especie frente a dichos cambios.

## **1.5. Fundamentación y lineamiento de la tesis**

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

La costa atlántica de la Patagonia argentina, en particular la de la provincia del Chubut, se encuentra entre los ecosistemas marinos más productivos del mundo. Esta alta productividad ha dado lugar tanto a una gran biodiversidad marina, como al desarrollo de una industria pesquera de gran relevancia (Skewgar et al., 2007; Ramírez et al., 2017; Gil et al., 2019). En efecto, la región alberga una de las industrias pesqueras más importantes del país, con una notable incidencia económica tanto a nivel regional como nacional (Gil et al., 2019), y contribuye de manera significativa al volumen total de exportaciones de Argentina. En 2024, Chubut se posicionó como la principal provincia exportadora de productos pesqueros, con un valor de US\$ ~677 millones (Instituto Nacional de Estadística y Censos (INDEC), <https://www.indec.gob.ar/>). Entre las especies más importantes capturadas al sur de 41°S se destacan el langostino (*Pleoticus muelleri*), la merluza (*Merluccius hubbsi*) y el calamar (*Illex argentinus*). Además, la diversidad de megafauna costera de Chubut, que incluye pingüinos de magallanes (*Spheniscus magellanicus*), ballenas francas australes (*Eubalaena australis*), orcas (*Orcinus orca*), delfines (*Lagenorhynchus obscurus*; *Cephalorhynchus commersonii*), elefantes marinos (*Mirounga leonina*) y lobos marinos (*Otaria flavescens*), constituye un pilar fundamental para el desarrollo del ecoturismo, una fuente significativa de ingresos anuales para la región (Skewgar et al., 2007).

La alta productividad biológica de la costa patagónica está impulsada en gran medida por una elevada producción primaria, favorecida por la acción de fuertes vientos de baja

humedad, predominantemente del oeste, que soplan durante la mayor parte del año (Bermejo et al., 2018). Estos vientos transportan grandes cantidades de sedimentos, materia orgánica y otras sustancias de origen terrestre hacia las áreas costeras, aportando oligoelementos como el hierro (Fe) y otros metales que estimulan el crecimiento de los productores primarios (Gaiero et al., 2003, Vizzo et al., 2021b). Asimismo, contribuyen a la mezcla de las aguas superficiales, reduciendo la transparencia del agua mediante la introducción de polvo eólico, lo que disminuye la penetración de la radiación solar en la columna de agua (Gaiero et al., 2003; Bermejo et al., 2018). En las zonas intermareales, estos mismos vientos incrementan el estrés por desecación durante los períodos de marea baja (Silliman et al., 2011).

El área de estudio de esta tesis fue el intermareal de Playa Bonita (43°22'S - 65°03'W), ubicado dentro del Complejo Magagna, en la Bahía Engaño (Chubut, Patagonia, Argentina; Fig. 1.9). Este intermareal está expuesto a mareas semidiurnas que alcanzan alturas máximas de hasta 5 m (Servicio de Hidrografía Naval Argentina, <http://www.hidro.gov.ar/>). La zona intermareal abarca aproximadamente 300 m entre las líneas de marea alta y baja, y se caracteriza por suelos consolidados, bordeados por canto rodado en su parte superior. Playa Bonita se encuentra a unos 2 km de la desembocadura del río Chubut, el cual atraviesa la provincia homónima desde la cordillera de los Andes hasta el océano Atlántico, aportando agua dulce, nutrientes y materia orgánica a la Bahía Engaño (Depetris et al., 2005, Bermejo et al., 2018). A pesar de su bajo caudal promedio (i.e.,  $42 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$ ) y escorrentía (i.e.,  $32 \text{ mm año}^{-1}$ ), el río drena una cuenca extensa (i.e.,  $31.680 \text{ km}^2$ ) que atraviesa zonas con una densidad poblacional relativamente alta para la región ( $\sim 3,5$  habitantes  $\text{km}^{-2}$ , Gaiero et al., 2003). Su caudal está regulado por el Dique Florentino Ameghino, situado aproximadamente 150 km aguas arriba de su desembocadura. En el valle inferior del río Chubut (VIRCh) que comprende los últimos 100 km antes de la desembocadura, se encuentran las ciudades de Gaiman, Dolavon, Trelew, Rawson y Playa Unión, y se caracteriza por una intensa actividad agropecuaria. Esta actividad, junto con los asentamientos urbanos, contribuye al aporte significativo de nutrientes, material particulado y disuelto y otros contaminantes de origen antropogénico en la región (Depetris et al., 2005, Bermejo et al., 2018).

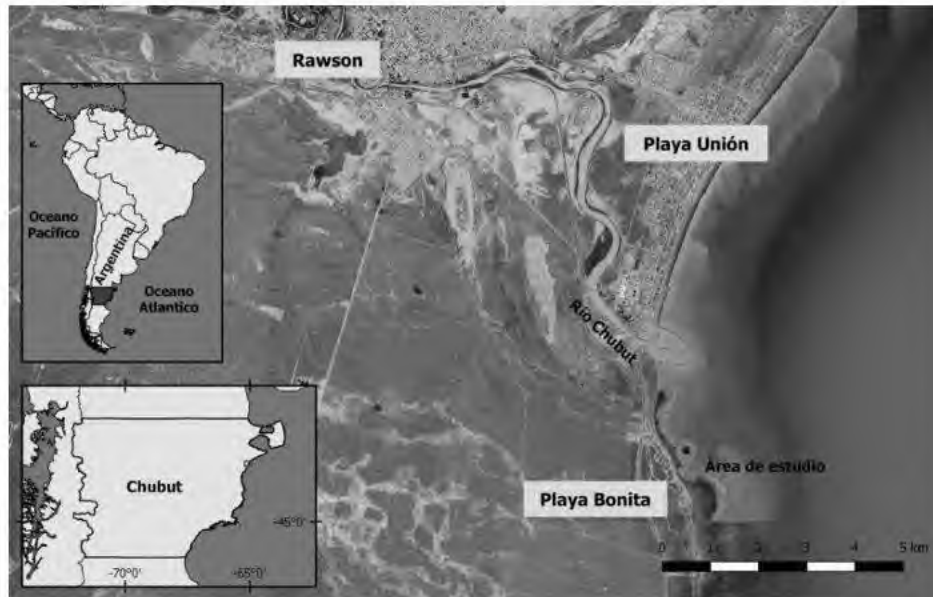


Fig. 1.9 Ubicación geográfica del área de estudio en Playa Bonita, provincia del Chubut, Argentina.

### 1.5.2. Objetivo general

El CG se considera una de las principales amenazas para los ecosistemas marino-costeros (Harley et al., 2006). En consecuencia, durante las últimas décadas ha habido un creciente interés en estudiar los efectos de los diversos procesos asociados con este fenómeno sobre los organismos que habitan estos ambientes (Harley et al., 2006, Bass et al., 2021). A pesar de los avances alcanzados, el estado actual de conocimiento aún resulta insuficiente para evaluar con precisión su impacto. Entre los principales vacíos de información se destacan: (1) la comprensión del efecto simultáneo de múltiples variables de CG sobre los organismos, tal como ocurre en la naturaleza; (2) los efectos indirectos del CG sobre una especie, mediado por interacciones con otras especies afectadas; y (3) la variabilidad en las respuestas de las especies a lo largo del ciclo anual (Bass et al., 2021). Además, la mayoría de los estudios disponibles se concentran en regiones del hemisferio norte y Australasia (Wernberg et al., 2012), siendo limitado el conocimiento sobre las zonas costeras de Sudamérica. El objetivo general de esta tesis es evaluar los efectos directos e indirectos de un escenario de CG - caracterizado por un aumento de la temperatura, la acidificación del agua, el incremento de nutrientes y cambios en los niveles de radiación solar- sobre aspectos fisiológicos y tróficos

de crustáceos epibentónicos en zonas intermareales de la región patagónica, a lo largo del ciclo anual, utilizando como modelo al anfípodo *Ampithoe valida*.

### **1.5.3. Objetivos específicos**

A partir del objetivo general propuesto, se plantean los siguientes objetivos específicos:

- Caracterizar la variabilidad estacional de la comunidad epibentónica del intermareal alto y bajo en el área de estudio, con especial énfasis en la dinámica poblacional de *A. valida* (Capítulo 2).
- Evaluar el efecto directo individual de un aumento de temperatura, de acidificación y de cambios en los niveles de radiación solar sobre las tasas de respiración de *Ampithoe valida* a corto plazo (i.e. horas, Capítulo 3).
- Evaluar el efecto directo de un aumento simultáneo de temperatura, de acidificación y un incremento en los niveles de radiación solar sobre las tasas de respiración, de ingestión de alimento y de mortalidad de machos y hembras de *A. valida* a mediano plazo (i.e. días, Capítulo 4).
- Evaluar el efecto indirecto de un escenario de CG de aumento de temperatura, de radiación solar, de nutrientes y de acidificación en las tasas de consumo, la preferencia de alimento y la eficiencia de absorción de los anfípodos a través de efectos directos sobre el crecimiento, la calidad nutricional y la palatabilidad de macroalgas del género *Ulva* (Chlorophyta), una de las principales fuentes de alimento de *A. valida*, a mediano plazo (i.e. días, Capítulo 5).

### **1.5.4. Hipótesis**

Numerosos estudios han demostrado que el aumento de la temperatura, la acidificación y cambios en los niveles de radiación solar -particularmente la RUV- pueden afectar diversos procesos fisiológicos y bioquímicos de los crustáceos, impactando en su actividad metabólica. Estas alteraciones en la actividad metabólica pueden reflejarse en cambios en la demanda de oxígeno (Fischer et al., 2006; Li & Gao, 2012; Semsar-kazerouni & Verberk, 2018). Por lo tanto, la primera hipótesis de esta tesis plantea que:

*H1: A corto plazo, el aumento de la temperatura, la acidificación y el incremento en los niveles de radiación solar, aumentan las tasas de respiración en A. valida (i.e., efectos directos individuales).*

El impacto de las distintas variables de CG fluctúa a lo largo del año, dependiendo del estado de aclimatación de los organismos y de fluctuaciones naturales de las condiciones ambientales (Hopkin et al., 2006; Vargas et al., 2017). La capacidad de los organismos para hacer frente a cambios en las condiciones abióticas puede disminuir en épocas de mayor estrés natural. Por ejemplo, se ha demostrado que, en la época estival, las altas temperaturas ambientales reducen la capacidad de los crustáceos de hacer frente a un incremento adicional en la temperatura relacionado con el CG (Hopkin et al., 2006; Semsar-kazerouni & Verberk, 2018). Por lo tanto, se plantea la segunda hipótesis:

*H2: La magnitud del incremento en las tasas de respiración de A. valida frente a un aumento de temperatura, de acidificación o de cambios en los niveles de radiación solar es menor durante verano que en el resto del año (i.e., efectos directos individuales).*

La respuesta de los organismos frente a un incremento de temperatura, de acidificación y de los niveles de radiación solar, puede ser alterada cuando estos estresores actúan de manera simultánea. Por ejemplo, se ha demostrado que un aumento de temperatura puede contrarrestar los efectos nocivos de la RUV al acelerar los mecanismos enzimáticos de reparación del ADN (Moresino & Helbling, 2010); sin embargo, este proceso es energéticamente costoso y suele implicar un aumento en las tasas de respiración (Fischer et al., 2006). De manera similar, se ha observado que la acidificación combinada con un incremento de temperatura, aumentan las tasas de respiración en numerosas especies (Lefevre, 2016). Este aumento en la demanda energética puede, a su vez, derivar en un incremento de las tasas de consumo de alimento (Li & Gao, 2012). No obstante, la exposición simultánea a múltiples estresores puede superar los límites de tolerancia de los organismos, generando disfunciones en procesos claves como la respiración y derivando en un aumento en las tasas de mortalidad (Metzger et al., 2007; Walther et al., 2009). Por lo tanto, la tercera hipótesis de trabajo plantea que:

*H3: La acción conjunta de un aumento de temperatura, la acidificación y un incremento en los niveles de radiación solar aumentan las tasas de respiración y de consumo de alimento de A. valida en otoño, invierno y primavera (H3a) y las tasas de mortalidad en verano (H3b) (i.e., efectos directos combinados).*

Además de los efectos directos, los organismos pueden ser afectados indirectamente por el CG a través de cambios en la calidad y disponibilidad del alimento que consumen (Valiñas et al., 2022). Por ejemplo, se ha observado que un aumento en los niveles de nutrientes - especialmente de nitrógeno- y en la disponibilidad de carbono, este último producto de la acidificación, puede favorecer el crecimiento de algunas especies de productores primarios, aumentando la cantidad de alimento disponible para los herbívoros (Ji & Gao, 2020). Este proceso puede acelerarse con el incremento de la temperatura (Gao et al., 2017). No obstante, las alteraciones fisiológicas inducidas por el CG pueden también reducir la calidad nutricional del alimento. En este sentido, se ha demostrado que un incremento en las tasas de fotosíntesis bajo condiciones de alta radiación y/o acidificación pueden incrementar la relación C:N, disminuyendo así la calidad nutricional de los productores primarios (Lapointe & Tenore, 1981). En este contexto se plantea la cuarta hipótesis:

*H4: Un escenario futuro de CG de aumento de temperatura, acidificación, incremento en los niveles de radiación solar e incremento en los niveles de nutrientes aumenta la tasa de crecimiento de las macroalgas (H4a), pero disminuye su calidad nutricional (H4b) (i.e., efecto directo sobre las macroalgas).*

Dado que los consumidores deben satisfacer sus requerimientos energéticos a través del alimento, una disminución en la calidad nutricional (H4b) puede afectar su balance energético. Por ello se propone la quinta hipótesis:

*H5: Para compensar la menor calidad del alimento, resultado de los efectos de las variables de CG estudiadas sobre las macroalgas (H4b), A. valida aumenta sus tasas de consumo y eficiencia de absorción (i.e., efecto indirecto sobre los anfípodos).*

### 1.5.5. Estructura de la tesis

Para cumplir con los objetivos propuestos, esta tesis se estructura de la siguiente manera: El **Capítulo 1** ofrece una introducción al concepto de CG, presentando un marco teórico sobre los cambios esperados en las condiciones físico-químicas de los ecosistemas marino-costeros, con especial énfasis en las variables de interés de esta tesis: el aumento de la temperatura, la acidificación, el incremento en los niveles de nutrientes y las variaciones en los niveles de irradiancia. Asimismo, se brinda una descripción de las principales características del área de estudio y del organismo modelo de estudio, el anfípodo *Ampithoe valida*. Para poder obtener una base de conocimiento acerca de la estructura de la comunidad intermareal en el área de estudio, así como de distintos aspectos biológicos y ecológicos de la población de *A. valida* a lo largo del ciclo anual, en el **Capítulo 2**, se describe la variabilidad temporal de la comunidad epibentónica, haciendo foco en la dinámica poblacional de *A. valida*. En el **Capítulo 3** se evalúan, mediante experimentos de laboratorio, los efectos individuales de un aumento de temperatura, acidificación y distintos niveles de irradiancia sobre las tasas de respiración de *A. valida* en el corto plazo a lo largo de las 4 estaciones del año. Con esa información de base, en el **Capítulo 4** se evalúan los efectos combinados de las variables de interés en las tasas de respiración, el consumo de alimento y la mortalidad de los anfípodos. Para ello se utiliza un diseño experimental de clústeres ambientales, exponiendo a los organismos a dos escenarios: Presente (control) y Futuro (con mayores niveles de temperatura, irradiancia y acidificación, respecto al escenario Presente), manipulando las variables en simultáneo. Por su parte, en el **Capítulo 5** se evalúa el efecto de un escenario de CG de incremento en los niveles de temperatura, de acidificación, de irradiancia y de nutrientes, sobre las tasas de crecimiento y la calidad nutricional de la macroalga *Ulva* spp., una fuente clave de alimento para *A. valida*. A través de los cambios observados en el alimento, se analizan los efectos indirectos sobre *A. valida*, específicamente en sus tasas de consumo, preferencias alimentarias y eficiencia de absorción. Finalmente, en el **Capítulo 6** se presentan las conclusiones generales de esta tesis, integrando y evaluando críticamente cada una de las hipótesis formuladas a lo largo del trabajo, en función de los resultados obtenidos en los distintos capítulos. Asimismo, se proponen líneas concretas para futuras investigaciones, con el objetivo de profundizar y ampliar el conocimiento generado en esta tesis.

## **Capítulo 2:**

### **Variabilidad estacional de la comunidad epibentónica intermareal y de los rasgos de historia de vida de *Ampithoe valida***

## 2.1. Introducción

Los intermareales rocosos se encuentran en la interfaz entre los ambientes marinos y terrestres, en las márgenes de los océanos alrededor del mundo, y representan uno de los entornos más desafiantes para los organismos que los habitan (Harley et al., 2006; Wolfe et al., 2020; Mieszkowska, 2025). La distribución, diversidad y densidad de especies que habitan estos ambientes generalmente varía a lo largo de un gradiente vertical, desde la línea de costa en marea baja (i.e., intermareal bajo) hacia la línea de costa en marea alta (i.e., intermareal alto, Stephenson & Stephenson, 1949). Este patrón está determinado por un conjunto de factores físicoquímicos y bióticos, los cuales cambian progresivamente hacia las márgenes superiores de la costa. El nivel de estrés abiótico, generado por grandes fluctuaciones de temperatura, salinidad, pH y radiación solar, así como por el riesgo de desecación, aumenta hacia el intermareal alto. Las zonas más altas del intermareal, que permanecen expuestas al aire durante períodos prolongados en marea baja, están dominadas por especies con alta tolerancia al estrés abiótico, como cirripedios, moluscos bivalvos y algunas especies de macroalgas (Stephenson & Stephenson, 1949; Connell, 1961; Somero, 2002, Bertness et al., 2006). También se encuentran especies móviles asociadas a los sustratos creados por estas especies sésiles (Silliman et al., 2011). En el intermareal bajo, en cambio, aumenta la riqueza, diversidad y abundancia de macroalgas y de las especies que viven asociadas a ellas. En esta zona, el límite inferior de distribución de las especies está regulado principalmente por factores bióticos, como la competencia y la depredación (Connell, 1961; Somero, 2002, Bertness et al., 2006).

Las condiciones ambientales que afectan la abundancia y distribución de especies varían estacionalmente, por lo que las comunidades intermareales son dinámicas en el tiempo (Rumbold et al., 2017, Bueno et al., 2019). Por ejemplo, estudios previos realizados en Brasil demostraron que las comunidades de anfípodos asociados a algas coralinas estuvieron dominadas por la especie generalista y omnívora *Apothyale media* durante la primavera y el verano, cuando las condiciones del oleaje fueron más calmas y el contenido de materia orgánica en los sedimentos retenidos fue mayor (Bueno et al., 2019). En cambio, durante el otoño y el invierno, la disminución en la abundancia de *A. media* permitió un incremento en la abundancia de otras especies de anfípodos, dando lugar a comunidades con mayor diversidad. En el caso de *Ampithoe valida*, especie modelo de estudio en el marco de esta

tesis, se ha demostrado en diferentes lugares del mundo que las fluctuaciones temporales en su abundancia estarían relacionadas con variaciones en la abundancia de macroalgas verdes (Pardal, 2000, Zheng et al., 2013). Por otro lado, se observó una correlación entre la abundancia de *A. valida* en intermareales de la provincia de Buenos Aires y la temperatura aérea, registrando un incremento en el número de individuos hacia finales del verano y comienzo del otoño, aproximadamente dos meses después de que se registraran las temperaturas más altas del año (Alonso et al., 1995). Este aumento se atribuyó principalmente a un incremento abrupto de juveniles en la población. Estudiar la dinámica estacional de las comunidades epibentónicas en zonas intermareales puede proporcionar una visión más clara de los factores que influyen en la abundancia de las distintas especies que las integran. Comprender estas dinámicas resulta clave para predecir cómo responderán estas comunidades frente a cambios en las condiciones ambientales, especialmente aquellos asociados al CG.

En comparación con otros intermareales del mundo, los intermareales de la Patagonia argentina se caracterizan por condiciones de estrés abiótico extremas, asociadas principalmente a altos niveles de desecación provocados por la acción de fuertes vientos predominantes del sector oeste, de baja humedad (< 60 %) y velocidades promedio de 25 km h<sup>-1</sup> (Bertness et al., 2006; Silliman et al., 2011), pudiendo alcanzar máximas de 110 km h<sup>-1</sup> (Bermejo et al., 2018). Además, la región está expuesta a niveles elevados de RUV, con eventos periódicos de disminución de ozono (Bermejo et al., 2018). Las costas están sometidas a la acción del oleaje, con alturas de hasta 5 m (Rechimont et al., 2013). En los intermareales de la región, es común encontrar extensos bancos de mejillines, principalmente *Perumytilus purpuratus* y *Brachidontes rodriguezii*, especies que actúan como ingenieros ecosistémicos al generar hábitats tridimensionales que ofrecen refugio frente a la depredación y atenúan el estrés físico asociado a las condiciones ambientales extremas, facilitando así el establecimiento y desarrollo de las comunidades epibentónicas (Bertness et al., 2006; Silliman et al., 2011, Rechimont et al., 2013). Entre las macroalgas más representativas se encuentran las rojas como *Corallina officinalis*, *Pyropia columbina*, *Ceramium virgatum* y *Polysiphonia sp.*, y macroalgas verdes del género *Ulva* (Rechimont et al., 2013). Estas últimas tienden a proliferar en áreas con alta carga de nutrientes, como

estuarios y zonas cercanas a centros urbanos, por lo que son consideradas bioindicadoras de procesos de eutrofización (Díaz et al., 2002).

El objetivo del presente capítulo es caracterizar la variabilidad estacional de la comunidad epibentónica del intermareal alto y bajo de Playa Bonita, una playa ubicada en el Complejo Magagna, provincia del Chubut, con especial énfasis en la dinámica poblacional de *A. valida*. Esta playa, situada a 2 km de la desembocadura del río Chubut, se caracteriza por un intermareal extenso -de aproximadamente 300 m- y de pendiente suave. La zona alta y media del intermareal está dominada por un lecho de *Ulva* spp. mientras que en el intermareal bajo predomina una comunidad compuesta por un mosaico de *C. officinalis* y extensos bancos de mejillines. Con el fin de obtener una base de conocimiento para el desarrollo de los experimentos propuestos en el marco de esta tesis, en este capítulo también se realiza una descripción del ambiente en relación con las fluctuaciones estacionales de la radiación solar, las variaciones térmicas en pozas de marea del intermareal alto y bajo tanto a corto (i.e., ciclo de mareas) como a largo plazo (i.e., variabilidad estacional), las fluctuaciones del pH en pozas de marea durante la marea baja, y la variabilidad estacional en la relación C:N en tejidos de macroalgas y anfípodos.

## **2.2. Materiales y métodos**

### **2.2.1. Condiciones de temperatura, radiación solar y pH**

Entre marzo de 2018 y noviembre de 2019, se realizaron mediciones mensuales de temperatura en el área de estudio. Para ello, se utilizaron data loggers (modelos: ELV WTDL1, Alemania, y LTBL2, servicio centralizado de electrónica, CENPAT - CONICET) que se colocaron en una poza en el intermareal alto y una en el intermareal bajo de Playa Bonita. Las mediciones se realizaron dentro de las zonas donde se llevaron a cabo los muestreos de macrofauna y macroalgas (ver sección 2.2.2) a una distancia aproximada de 25 m desde la línea de costa durante las mareas alta y baja, respectivamente. Los loggers se colocaron en pozas de marea poco profundas (i.e.,  $\leq 20$  cm) de forma tal que permanecieran permanentemente sumergidos. Los equipos se instalaron durante la marea baja utilizando estacas para su correcta fijación al sustrato y se dejaron entre 4 y 9 días al mes. El intervalo de medición fue de tres minutos. Para cada mes se calculó la temperatura promedio del agua de mar durante la marea alta ( $T_{Mar}$ ), así como las temperaturas promedio máximas ( $T_{max}$ ) y

mínimas ( $T_{\min}$ ) alcanzadas en el intermareal alto y bajo durante las mareas bajas diurnas y nocturnas, respectivamente. En algunos meses, por razones técnicas, solo se obtuvieron datos de una de las pozas.

Durante el mismo periodo, se obtuvieron registros continuos de radiación solar (i.e., PAR, RUV-A, RUV-B, con un intervalo de medición de un minuto) mediante un radiómetro de banda ancha (European Light dosimeter Network; ELDONET; Real Time Computers Inc., Möhrendorf Alemania; Häder et al., 2007), instalado de forma permanente en el techo de la Estación de Fotobiología Playa Unión (EFPU). Este equipo es calibrado una vez al año, mediante la comparación de los datos de irradiancia obtenidos en condiciones de cielo despejado con los resultados de modelos de radiación solar como STAR (Ruggaber et al., 1994) y DAYLIGHT (Björn & Murphy, 1985).

Dado que la marea baja diurna representa la fase de mayor estrés abiótico y el momento en que se esperan las mayores fluctuaciones de pH, se realizaron, adicionalmente, mediciones puntuales de pH durante marea baja en dos días en los meses de enero y abril de 2019. Para ello, se seleccionaron al azar 4 pozas de marea poco profundas (i.e., 5-20 cm) tanto en el intermareal alto como en el bajo. En cada poza se tomaron muestras para la determinación del pH a intervalos de 30 minutos, desde el momento en que el agua se retiró de la zona adyacente a las pozas -dejando únicamente a estas cubiertas- hasta que el área fue nuevamente inundada con el regreso de la marea. Las mediciones se realizaron utilizando un pHmetro portátil (Ohaus Starter 300).

### **2.2.2. Estimación de la cobertura de macroalgas y abundancia de macrofauna epibentónica**

Para caracterizar a la comunidad de invertebrados y relevar las macroalgas dominantes en el área de estudio, se realizaron muestreos mensuales en el intermareal alto y bajo de Playa Bonita, entre septiembre de 2017 y septiembre de 2019. Si bien en esta playa – a diferencia de otros intermareales – no se distingue claramente el límite entre las zonas alta y media, en este capítulo, se hará referencia al intermareal alto como el área dominada por *Ulva* spp. (Fig. 2.1 A), y al intermareal bajo como la zona caracterizada por un mosaico de *Corallina officinalis* y densos bancos de mejillines (*Perumytilus purpuratus*, *Brachidontes rodriguezii*) (Fig. 2.1 B). Si bien en el intermareal bajo es posible encontrar pozas de marea de hasta 1 m

de profundidad, estas fueron excluidas de los muestreos, ya que representan sistemas de transición entre los ambientes intermareales y submareales, donde las comunidades epibentónicas asociadas pueden diferir significativamente respecto a las que se desarrollan sobre los sustratos emergentes (Metaxas & Scheibling, 1993).



**Fig. 2.1** Sustrato típico en la zona del intermareal alto (A) y bajo (B) en el área de estudio en Playa Bonita.

Los muestreos se realizaron durante las horas de la mañana y en condiciones de marea baja, utilizando un cuadrante de 25 cm x 25 cm (i.e., 0,0625 m<sup>2</sup>), el cual fue arrojado al azar 20 veces en cada estrato del intermareal. De cada cuadrante se tomaron fotografías utilizando una cámara CANON EOS 1100, posicionada de manera perpendicular al sustrato, con el objetivo de estimar la cobertura de macroalgas. En 8 de los 20 cuadrantes, se raspó el sustrato con espátula y el material recolectado se almacenó en bolsas plásticas para su posterior análisis. En el laboratorio, las muestras fueron cuidadosamente enjuagadas con agua sobre un tamiz de 500 µm para remover el sedimento. El material biológico se preservó en frascos plásticos con formol al 20 %.

Por razones logísticas, el análisis de la comunidad macrofaunal se realizó sobre 15 de los 25 meses muestreados, los que fueron seleccionados de modo tal de tener representadas las cuatro estaciones del año. Asimismo, el número de réplicas analizadas por mes se redujo de 8 a 6 por estrato del intermareal. Para la identificación de los organismos, el material fue enjuagado reiteradas veces para eliminar los restos de formol y examinado bajo lupa binocular (Novex Holland P-20). En el caso de los crustáceos, la identificación y cuantificación de los organismos se realizó al menor nivel taxonómico posible, lográndose en la mayoría de los casos la determinación a nivel de especie. Para los demás organismos,

la determinación se efectuó a nivel de clase. Adicionalmente, de los muestreos realizados en octubre de 2017, enero de 2018, marzo de 2018 y julio de 2018, se separaron y conservaron en alcohol al 80 % todos los individuos de *A. valida* recolectados en 4 de las 6 muestras procesadas para cada estrato del intermareal. Estos ejemplares fueron utilizados para analizar distintos rasgos de la historia de vida de la especie, tales como talla corporal, proporción de sexos, y tamaño y número de huevos (ver sección 2.2.3).

En cuanto a las macroalgas, se estimó únicamente la cobertura de *Ulva* spp. (Chlorophyta), y de *Corallina officinalis* (Rhodophyta), especies dominantes del intermareal alto y bajo, respectivamente. Si bien *Ulva rigida* es la especie más abundante en el área de estudio, también se han registrado otras especies del género, como *U. lactuca* y *U. fasciata* (Siniscalchi et al., 2012). Dado que no se realizó la identificación a nivel de especie para esta macroalga, de aquí en adelante se hará referencia a *Ulva* spp. La cobertura se estimó a partir del análisis de las fotografías tomadas en el campo, sobre las cuales se superpuso una grilla de 100 cuadrículas (i.e., 10 x 10) utilizando el software Inkscape. Cada cuadrícula representó el 1 % del área del cuadrante y la cobertura fue estimada contando las cuadrículas ocupadas por cada especie de macroalga.

### **2.2.3. Caracterización de los atributos de historia de vida de *A. valida***

Con el objetivo de caracterizar la población de *A. valida* en el área de estudio y evaluar sus variaciones estacionales, se estimaron distintos atributos de historia de vida, a partir de individuos recolectados en octubre de 2017, enero de 2018, marzo de 2018 y julio de 2018. A continuación, se describe la metodología utilizada para la estimación de la proporción de sexos, la talla, el peso húmedo y seco, así como el número y el tamaño de los huevos en hembras ovígeras.

La determinación de sexos se realizó siguiendo los criterios descritos por Alonso et al. (1995). *Ampithoe valida* presenta un marcado dimorfismo sexual, el cual se evidencia por el agrandamiento del segundo par de gnatópodos en los machos. Sin embargo, esta característica se manifiesta de manera progresiva con el aumento del tamaño corporal de los individuos, por lo que puede no ser fácilmente identificable en individuos pequeños. Por ello, los individuos fueron clasificados en cuatro categorías, según los siguientes criterios:

- I. Machos: presencia de un par de papilas genitales ubicadas ventralmente entre el séptimo par de pereiópodos (Fig. 2.2 A).
- II. Hembras no ovígeras: presencia de oostegitos en diferentes estadios de desarrollo (Fig. 2.2 B).
- III. Hembras ovígeras: presencia de huevos o juveniles en el marsupio (Fig. 2.2 C).
- IV. Juveniles: individuos de menor tamaño sin las características descritas anteriormente.



**Fig. 2.2** Características morfológicas utilizadas para diferenciar machos (A), hembras no ovígeras (B) y hembras ovígeras (C) de anfípodos. Las imágenes corresponden a individuos de *Gammarus roeselii* (Fuente: Jourdan et al., 2019). gp: papilas genitales (según las siglas en inglés, genital papillae), oo: oostegitos.

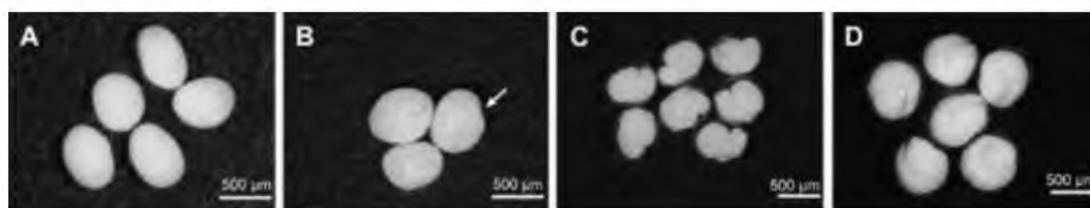
De cada muestra ( $n = 4$ ), se seleccionaron aleatoriamente 20 individuos por categoría para determinar la talla, el peso húmedo y seco, y, en el caso de las hembras ovígeras, el número y tamaño de los huevos. Cuando el número de individuos disponibles en alguna categoría fue menor a 20, se utilizaron el total de los ejemplares presentes en la muestra. Para estimar las tallas, se realizaron mediciones del largo total del cuerpo (i.e., desde el borde anterior del rostro hasta el extremo del telson), utilizando una lupa binocular equipada con ocular con escala de medición integrada (Marca: Leica, modelo: MZ6). Dado que los anfípodos presentan naturalmente forma curvada, los individuos se extendieron sobre placas de telgopor con ayuda de agujas de disección para facilitar la medición del eje dorsal bajo la lupa. Para determinar el peso húmedo, los organismos fueron cuidadosamente secados con papel de filtro y pesados utilizando una balanza digital (Ohaus Pioneer PA214, precisión: 0,1 mg). En el caso de los juveniles, cuyo peso era inferior al límite de detección de la balanza, se pesaron grupos de 10 individuos y se calculó el peso promedio por ejemplar. En el caso de las hembras ovígeras, los huevos y/o los juveniles fueron removidos del marsupio y cuantificados luego de su pesaje. Los huevos se clasificaron según su estado de desarrollo en cuatro categorías (Alonso et al., 1995):

- A. Huevos ovalados, de color verdoso y parejo (Fig. 2.3 A)
- B. Huevos ovalados, de color verdoso con un notable espacio transparente entre el corion y la periferia (Fig. 2.3 B)
- C. Huevos blancuzcos, amorfos (Fig. 2.3 C)
- D. Huevos en cuyo interior se visibilizan contornos de segmentos corporales y apéndices del juvenil (Fig. 2.3 D)

Posteriormente, los huevos fueron colocados en placas de Petri y fotografiados utilizando una cámara digital acoplada a un adaptador para ocular. De cada imagen se seleccionaron aleatoriamente 5 huevos, a los que se les midió el largo y el ancho utilizando el software ImageJ. El volumen de cada huevo se estimó utilizando la siguiente fórmula (Yu et al., 2008):

$$V = 4/3 * \pi * r_1 * r_2^2$$

donde V = volumen del huevo (en mm<sup>3</sup>), r<sub>1</sub> = mitad del largo del huevo, r<sub>2</sub> = mitad del ancho del huevo.



**Fig. 2.3** Estadios de desarrollo de huevos de anfípodos en las cuatro categorías (A-D). La flecha en B muestra el espacio entre el corion y la periferia. Las imágenes corresponden a la especie *Gammarus roeselii* (Fuente: Jourdan et al., 2019, modificado).

#### **2.2.4. Contenido de carbono y nitrógeno en tejidos de *A. valida* y *Ulva* spp.**

Con el objetivo de determinar el contenido de carbono (C), nitrógeno (N) y la relación C:N en *A. valida* y su principal fuente de alimento, *Ulva* spp., se realizaron muestreos dirigidos en enero, abril, julio y octubre de 2019. Dado que los individuos de *A. valida* habitan en tubos que construyen entre los talos laminares de macroalgas – especialmente entre talos de *Ulva* spp. - se recolectaron talos de esta macroalga en el intermareal alto, asegurando que

contuvieran anfípodos asociados. Las muestras se almacenaron en conservadoras plásticas y fueron transportadas a la EFPU. En el laboratorio, las macroalgas fueron inspeccionadas cuidadosamente para separar los anfípodos, que luego se mantuvieron en ayuno durante 24 h con el fin de vaciar sus tractos digestivos. Durante ese periodo, los individuos se colocaron en recipientes plásticos dentro de una cámara de cultivo (Sanyo, modelo: MLR-350) programada para replicar la temperatura del agua de mar y el fotoperiodo según la estación considerada (i.e. enero: 18 °C, 14 h luz : 10 h oscuridad; abril: 14 °C, 12 h luz : 12 h oscuridad; julio: 7 °C, 10 h luz : 14 h oscuridad; octubre: 11 °C, 12 h luz : 12 h oscuridad). Finalizado el ayuno, los individuos se guardaron en un freezer a -20 °C para su posterior análisis. Sólo se utilizaron anfípodos adultos, sin discriminar por sexo.

En el caso de las macroalgas, se seleccionaron al azar talos de *Ulva* spp. los cuales se limpiaron para remover detritos o cualquier tipo de material adherido a la lámina, se enjuagaron con agua destilada y se almacenaron en freezer. Para la preparación del material que se envió al Laboratorio de Química del Centro Nacional Patagónico (CENPAT, Puerto Madryn, Chubut), las muestras se descongelaron y secaron en estufa a 40 °C durante 24 h en el caso de las macroalgas y durante 48 h en el caso de los anfípodos. Una vez secos, los tejidos se molieron en un mortero de porcelana hasta obtener un polvo fino, que fue almacenado en tubos Falcon de 15 ml (macroalgas) o en tubos Eppendorf (anfípodos). En el caso de las macroalgas, se realizaron 3 réplicas para cada mes de muestreo, constituidas cada una por varios talos de *Ulva* spp. En el caso de los anfípodos, sólo se obtuvo una réplica por mes de muestreo, dado que no fue posible reunir una cantidad suficiente de individuos para realizar duplicados o triplicados. La determinación del contenido de carbono y nitrógeno se realizó mediante un autoanalizador de combustión seca (Equipo LECO modelo CN628).

### **2.2.5. Análisis de datos**

Para el análisis de la comunidad macrofaunal, en una primera instancia se calculó el número promedio total de individuos por m<sup>2</sup> para cada mes de muestreo y para cada estrato del intermareal. Posteriormente, también para cada mes de muestreo y estrato del intermareal se analizaron las abundancias de los distintos grupos taxonómicos encontrados. Finalmente, en el caso de los crustáceos se realizó un análisis más detallado, discriminando por especie.

Con el objetivo de evaluar si la abundancia de *A. valida* estuvo relacionada con la cobertura promedio de macroalgas y/o con la abundancia de los distintos grupos de la macrofauna, se realizaron análisis de regresión lineal. Este análisis entre las abundancias de dos especies permite identificar patrones de variación temporal similares. Una correlación positiva puede indicar que las fluctuaciones en las abundancias de ambas especies son similares, lo cual puede reflejar una respuesta común a factores ambientales o una relación causal directa. Por el contrario, una correlación negativa puede sugerir interacciones negativas, tales como depredación o competencia interespecífica. Para los análisis solo se consideraron los grupos taxonómicos cuya abundancia superó los 10 individuos por muestreo y cuya presencia fue registrada en al menos 3 meses durante del periodo considerado.

En el caso de *A. valida*, se calcularon: (i) la proporción de juveniles, (ii) la relación machos : hembras, y (iii) la proporción de hembras ovígeras (calculada en relación al número total de hembras) para cada estación y nivel del intermareal. En el caso de la proporción de sexos, se comparó la relación machos : hembras dentro de la población adulta contra un valor esperado de 1, utilizando una prueba t para una muestra. Los supuestos de homocedasticidad y normalidad fueron evaluados utilizando las pruebas de Shapiro-Wilk y Levene, respectivamente, y en caso de ser necesario se aplicaron transformaciones para cumplir dichos supuestos (Zar, 1999).

En el caso de los porcentajes de individuos juveniles y de hembras ovígeras, se utilizó la prueba de Wald para evaluar diferencias entre estaciones y estratos del intermareal, dado que los datos no cumplieron con el supuesto de homocedasticidad, incluso luego de aplicar transformaciones. Esta prueba es robusta frente a la falta de normalidad y homogeneidad de varianzas (Friedrich et al., 2017) y se implementó a través del paquete GFD (Friedrich et al., 2017) del programa estadístico R (R Core Team, 2020).

Para determinar la relación entre el peso húmedo y el largo del cuerpo de *A. valida* se realizaron análisis de regresión utilizando la totalidad de los individuos analizados. Observaciones gráficas previas no evidenciaron diferencias en estas relaciones entre las distintas categorías de anfípodos, así como entre individuos del intermareal alto y bajo.

Las diferencias en el peso húmedo de las distintas categorías de anfípodos se compararon entre estaciones y estratos del intermareal (i.e. alto y bajo) utilizando ANOVAs de dos vías (Zar 1999). Para cumplir con los supuestos de normalidad y homocedasticidad, los datos

fueron transformados aplicando logaritmo. En los casos en que las transformaciones no permitieron satisfacer dichos supuestos, se utilizó la prueba no-paramétrica de Wald (WTPS), tal y cómo fue descrito anteriormente. En caso de detectarse diferencias significativas, se realizaron análisis *post hoc* mediante pruebas de Tukey en el caso del ANOVA o comparaciones múltiples no paramétricas utilizando el paquete nparcomp (Konietschke et al., 2015).

El número de huevos por hembra se comparó entre estaciones y estratos del intermareal utilizando un modelo lineal generalizado (GLM) para datos de conteo. Dado que en muchas especies de crustáceos el número de huevos incrementa con el tamaño de la hembra (Rumbold, 2019), se incluyó el largo total del cuerpo como variable en los análisis. Los supuestos del modelo se evaluaron siguiendo las recomendaciones de Crawley (2013). Dado que no se cumplió el supuesto de sobredispersión, se utilizó una distribución quasipoisson (Crawley, 2013).

No se realizaron análisis sobre los juveniles contenidos en el marsupio, dado que algunos podrían haberse liberado durante la manipulación realizada en el proceso de procesamiento y preservación de las muestras. Para evaluar diferencias en el número y volumen de los huevos entre estratos del intermareal y estaciones del año, se utilizaron ANOVAs de dos vías. El análisis del volumen de los huevos se limitó a los correspondientes al primer estadio de desarrollo (estadio A, ver Fig. 2.3 A), debido al bajo número de huevos encontrados en los estadios más avanzados. En este caso, los datos fueron transformados mediante raíz cuadrada para cumplir el supuesto de normalidad.

Finalmente, la composición estequiométrica de los tejidos de *Ulva* spp. expresada en términos de contenido de carbono y nitrógeno, así como la relación C:N, se comparó entre estaciones mediante ANOVA. Los supuestos de normalidad y homocedasticidad fueron evaluados mediante las pruebas de Shapiro-Wilk y Levene, respectivamente (Zar, 1999). En caso de detectarse diferencias significativas, se aplicaron análisis *post hoc* de Tukey.

## **2.3. Resultados**

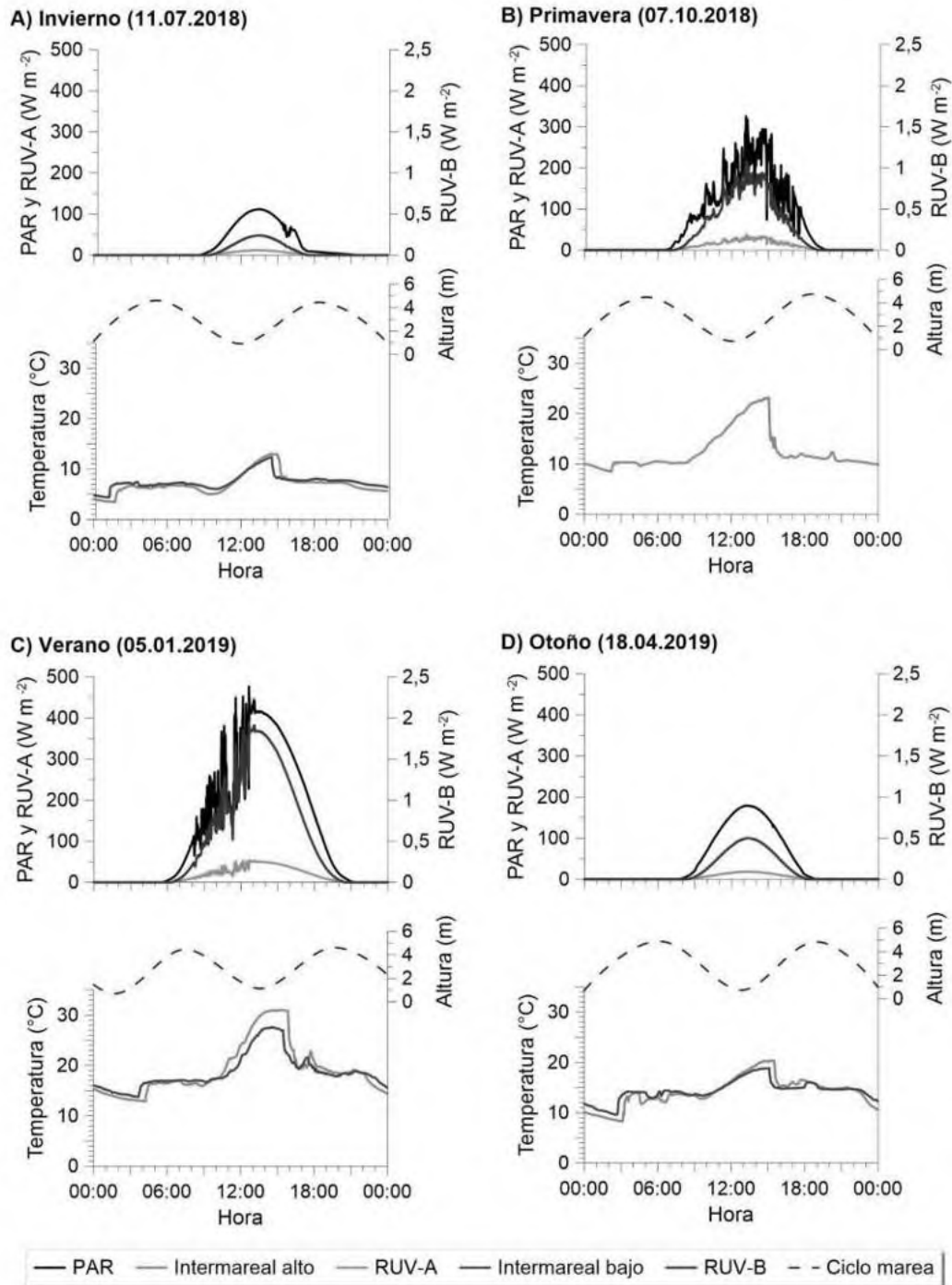
### **2.3.1. Condiciones de temperatura, radiación solar y pH**

La Fig. 2.4 muestra, a modo ilustrativo, la evolución de los niveles de radiación solar incidente (PAR, RUV-A y RUV-B), así como la variación de la temperatura del agua en

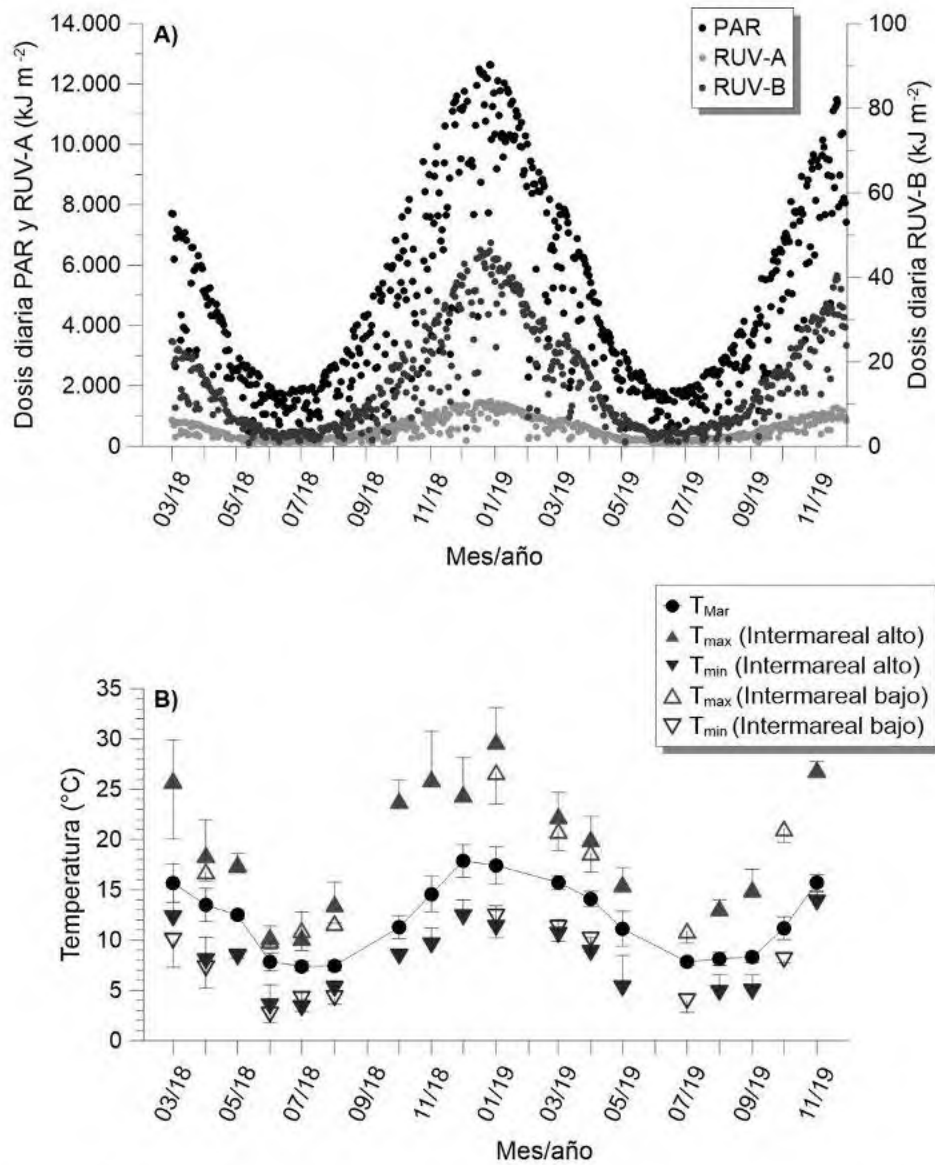
pozas de marea del intermareal alto y bajo del área de estudio, correspondientes a un día seleccionado aleatoriamente de cada estación del año. La cantidad de horas de luz osciló entre ~10 h en invierno (Fig. 2.4 A) y ~15 h en verano (Fig. 2.4 C), con niveles máximos de radiación durante las horas del mediodía. En cuanto a la temperatura del agua en las pozas de marea, se observó en todas las estaciones y en ambos niveles del intermareal, un aumento durante la bajamar diurna y un descenso durante la bajamar nocturna, coincidiendo con el retroceso de la marea (Fig. 2.4 A-D). Los cambios de temperatura más abruptos ocurrieron durante el reingreso de la marea, momento en el cual la temperatura del agua en las pozas se igualó a la del mar abierto en un lapso aproximado de 45 minutos, registrándose fluctuaciones de hasta 11 °C en primavera y verano (Fig. 2.4 B y C).

Tal como se observa en la Fig. 2.5 A, las dosis diarias de radiación solar variaron a lo largo del año, alcanzando sus valores más altos en enero de 2019 ( $10.370 \pm 1.166$ ,  $1.184 \pm 132$  y  $37 \pm 4$  kJ m<sup>2</sup> para PAR, RUV-A y RUV-B, respectivamente; Fig. 2.5 A) y los más bajos en junio de 2019 ( $1.423 \pm 474$ ,  $146 \pm 51$  y  $2,6 \pm 0,9$  kJ m<sup>2</sup> para PAR, RUV-A y RUV-B, respectivamente; Fig. 2.5 A).

La temperatura del agua de mar durante la marea alta ( $T_{\text{Mar}}$ ) osciló entre  $7,4 \pm 0,5$  °C en julio de 2018 y  $17,8 \pm 1,6$  °C en diciembre de ese mismo año (Fig. 2.5 B). En 2019, los valores mensuales promedio de  $T_{\text{Mar}}$  fueron  $0,2 \pm 0,7$  °C superiores a los registrados en 2018. La amplitud de las fluctuaciones diarias de temperatura fue mayor en el intermareal alto, particularmente durante el verano y el otoño (Fig. 2.5 B). Por ejemplo, en enero de 2019, la diferencia promedio entre la temperatura máxima ( $T_{\text{max}}$ ) y mínima ( $T_{\text{min}}$ ) registrada durante las bajamars diurna y nocturna, respectivamente, fue de  $18,5 \pm 2,7$  °C en el intermareal alto y de  $14,5 \pm 2,9$  °C en el intermareal bajo (Fig. 2.5 B). En contraste, en junio de 2018, esas diferencias fueron de  $7,2 \pm 3,1$  °C y  $2,5 \pm 3,2$  °C, respectivamente (Fig. 2.5 B).



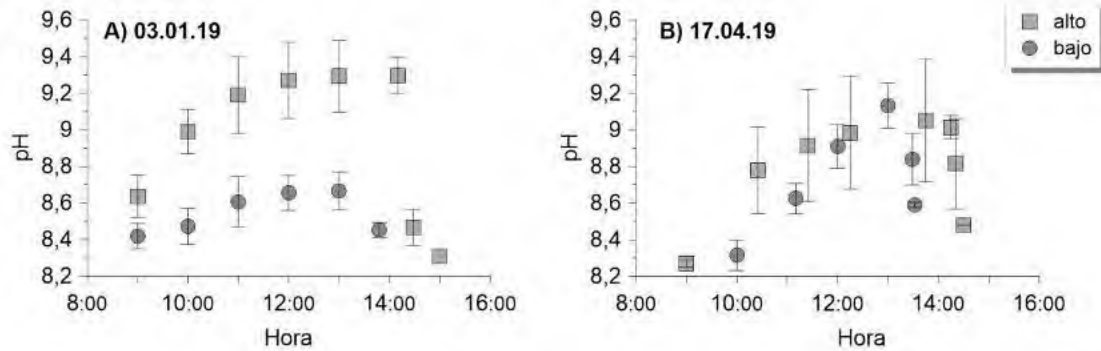
**Fig. 2.4** Evolución de los niveles de irradiancia PAR, RUV-A y RUV-B y temperatura del agua en pozas de marea del intermareal alto y bajo a lo largo del ciclo diario, con marea baja centrada en el mediodía, para las distintas estaciones del año. La selección de cada día se realizó de manera aleatoria. Las líneas punteadas en la parte superior de los gráficos de temperatura indican el curso de la marea, basados en datos de la altura de la columna de agua sobre el plano de reducción en pleamar y bajamar (fuente: Servicio de Hidrografía Naval, [https://www.hidro.gov.ar/oceanografia/Tmareas/Form\\_Tmareas.asp](https://www.hidro.gov.ar/oceanografia/Tmareas/Form_Tmareas.asp)).



**Fig. 2.5** Dosis diarias de PAR, RUV-A y RUV-B (A) y temperatura promedio ( $\pm$  DE) del agua de mar durante la marea alta ( $T_{Mar}$ ) y temperaturas promedio máximas ( $T_{max}$ ) y mínimas ( $T_{min}$ ) ( $\pm$  DE) medidas en una poza de marea en el intermareal alto y bajo durante la marea baja diurna y nocturna, respectivamente (B) para el período comprendido entre marzo de 2018 y noviembre de 2019 en el sitio de muestreo.

La Fig. 2.6 presenta las variaciones del pH del agua en pozas de marea ubicadas en el intermareal alto y bajo durante una marea baja diurna representativa de los meses de enero y abril de 2019. En ambos casos, se registró un aumento progresivo del pH a lo largo del período de emersión, alcanzándose los valores máximos inmediatamente antes del reingreso

del agua al intermareal. En enero, el pH alcanzó valores máximos de  $9,3 \pm 0,1$  unidades en pozas del intermareal alto y de  $8,7 \pm 0,1$  unidades en pozas del intermareal bajo (Fig. 2.6 A), mientras que, en abril, se registraron máximos de  $9,0 \pm 0,1$  y  $9,1 \pm 0,1$  unidades, respectivamente (Fig. 2.6 B).



**Fig. 2.6** Valores promedio ( $\pm$  DE) de pH registrados en enero (A) y abril (B) de 2019 en pozas de marea del intermareal alto y bajo, durante una fase de marea baja diurna en el sitio de muestreo.

### 2.3.2. Variabilidad estacional de la comunidad epibentónica del intermareal alto y bajo

Se cuantificaron un total de 142.507 individuos macrofaunales, pertenecientes a 5 filos y clasificados en 8 grupos taxonómicos con distintos niveles de resolución. En el caso de los crustáceos, se identificaron 12 especies a lo largo de todo el periodo del muestreo. Los grupos taxonómicos y las especies determinadas se listan en la Tabla 2.1, junto con el número de individuos registrados en cada categoría durante dicho periodo.

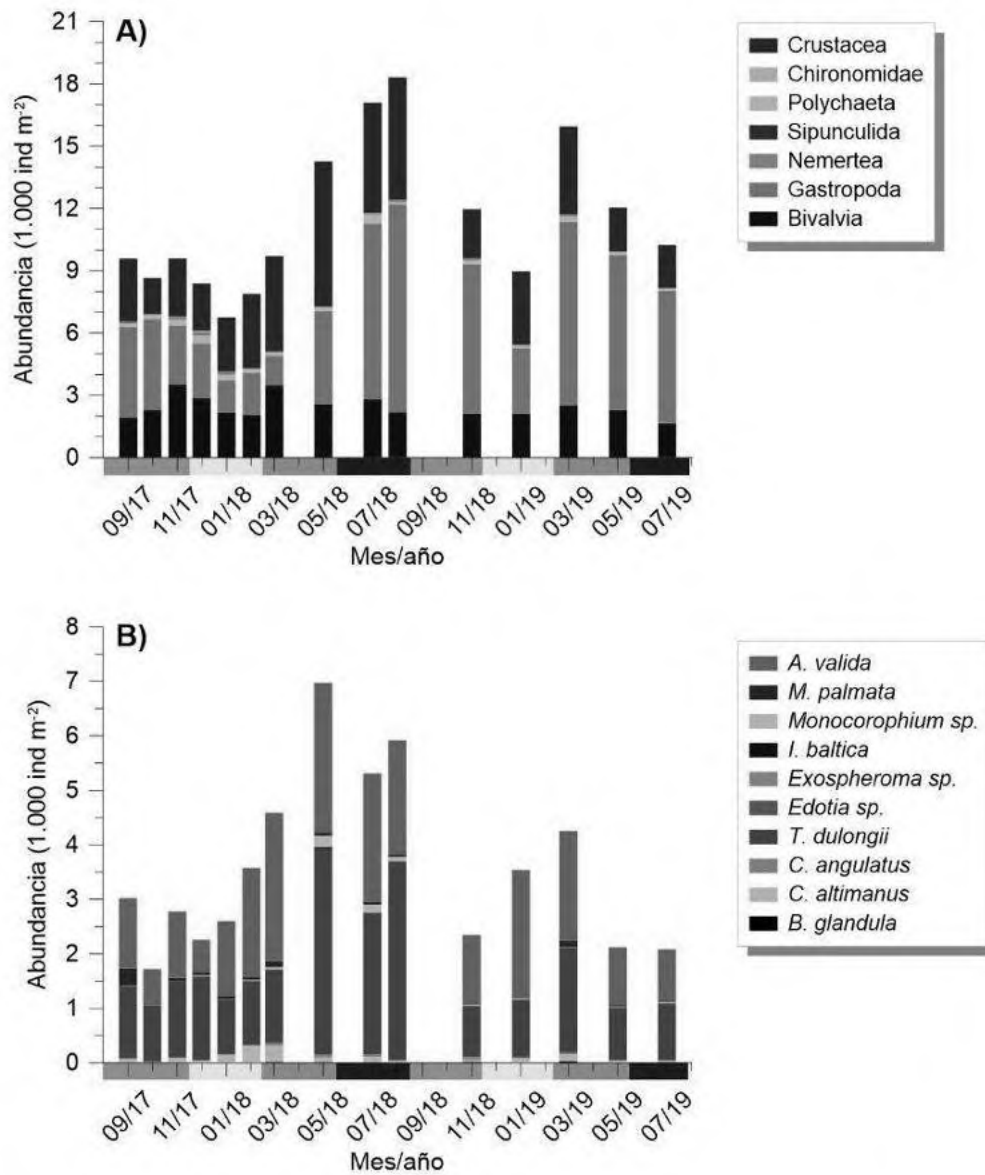
La Fig. 2.7 muestra la variabilidad estacional en la abundancia de los distintos grupos de macrofauna encontrados en el intermareal alto. Los grupos más abundantes en este estrato fueron los gasterópodos, seguidos por los crustáceos y los bivalvos (Fig. 2.7 A), los cuales, en conjunto, representaron más del 92 % de los individuos cuantificados en cada mes de muestreo. En el caso de los gasterópodos, las densidades en invierno y, en parte también en otoño y primavera superaron los  $6.000 \text{ ind m}^{-2}$ , mientras que en verano alcanzaron densidades máximas de  $3.200 \text{ ind m}^{-2}$  (Fig. 2.7 A). Dentro de este grupo, predominaron los microgasterópodos, los cuales comprenden especies de tamaños menores a 2 mm. La

densidad de bivalvos osciló entre 1.656 y 3.475 ind m<sup>-2</sup>, sin evidenciar un patrón estacional marcado (Fig. 2.7 A). Los poliquetos y nemertinos estuvieron presentes durante todo el período de muestreo, aunque en bajas densidades, con valores entre 104 y 440 ind m<sup>-2</sup> y entre 3 y 189 ind m<sup>-2</sup>, respectivamente (Fig. 2.7 A). Por su parte, los quironómidos y sipuncúlidos fueron los grupos menos representados; en este último caso solo se registró un individuo en mayo de 2018. Los quironómidos, estuvieron ausentes en septiembre de 2017, febrero, marzo y noviembre de 2018, y en enero de 2019. En los meses restantes, sus densidades fluctuaron entre 3 y 19 ind m<sup>-2</sup>, con un pico de 61 ind m<sup>-2</sup> en diciembre de 2017.

En cuanto a los crustáceos, de las 10 especies registradas en el intermareal alto, 5 estuvieron presentes durante todos los meses considerados: el tanaidáceo *Tanais dulongii*, los anfípodos *A. valida* y *Melita palmata*, y los cangrejos *Cyrtograpsus angulatus* y *Cyrtograpsus altimanus*. La presencia del anfípodo *Monocorophium* sp. se registró en todos los meses, excepto en octubre de 2017. Las especies más abundantes fueron *T. dulongii* y *A. valida*, representando cada uno entre el 30 % y el 70 % de los crustáceos cuantificados, dependiendo del mes considerado (Fig. 2.7 B). En el caso de *A. valida*, se observó un patrón general de menor abundancia en primavera, con un aumento progresivo hacia el verano y el otoño en ambos años de muestreo. En 2018 se registraron elevadas densidades de esta especie, incluso durante los meses de invierno (Fig. 2.7 B). Las densidades más bajas se registraron en diciembre de 2017 con 595 ind m<sup>-2</sup>, y las más altas en mayo de 2018 con 2.744 ind m<sup>-2</sup> (Fig. 2.7 B). En ese mismo mes también se registraron los valores máximos de densidad para *T. dulongii* (3.757 ind m<sup>-2</sup>), *Monocorophium* sp. (205 ind m<sup>-2</sup>), y *C. angulatus* (51 ind m<sup>-2</sup>, Fig. 2.7 B). Para esta última especie también se registró un segundo pico de abundancia durante la primavera del mismo año. El mes de mayo de 2018 fue también el único mes en el que se registró la presencia de *Idotea baltica* en el intermareal alto. En febrero y marzo de 2018, *C. altimanus* alcanzó un pico de ~300 ind m<sup>-2</sup>, mientras que en el resto del periodo de muestreo su densidad varió entre 11 y 141 ind m<sup>-2</sup>. Para *M. palmata* la densidad varió entre 13 y 117 ind m<sup>-2</sup>, con un pico aislado de 317 ind m<sup>-2</sup> en septiembre de 2017. *Balanus glandula* se registró en aproximadamente el 50 % de los meses analizados, con una densidad máxima de 27 ind m<sup>-2</sup>. Los isópodos *Exosphaeroma* sp. y *Edotia* sp. fueron las especies menos representadas: *Edotia* sp. solo estuvo presente en febrero de 2018, mientras que *Exosphaeroma* sp. fue registrado en aproximadamente la mitad de los meses analizados.

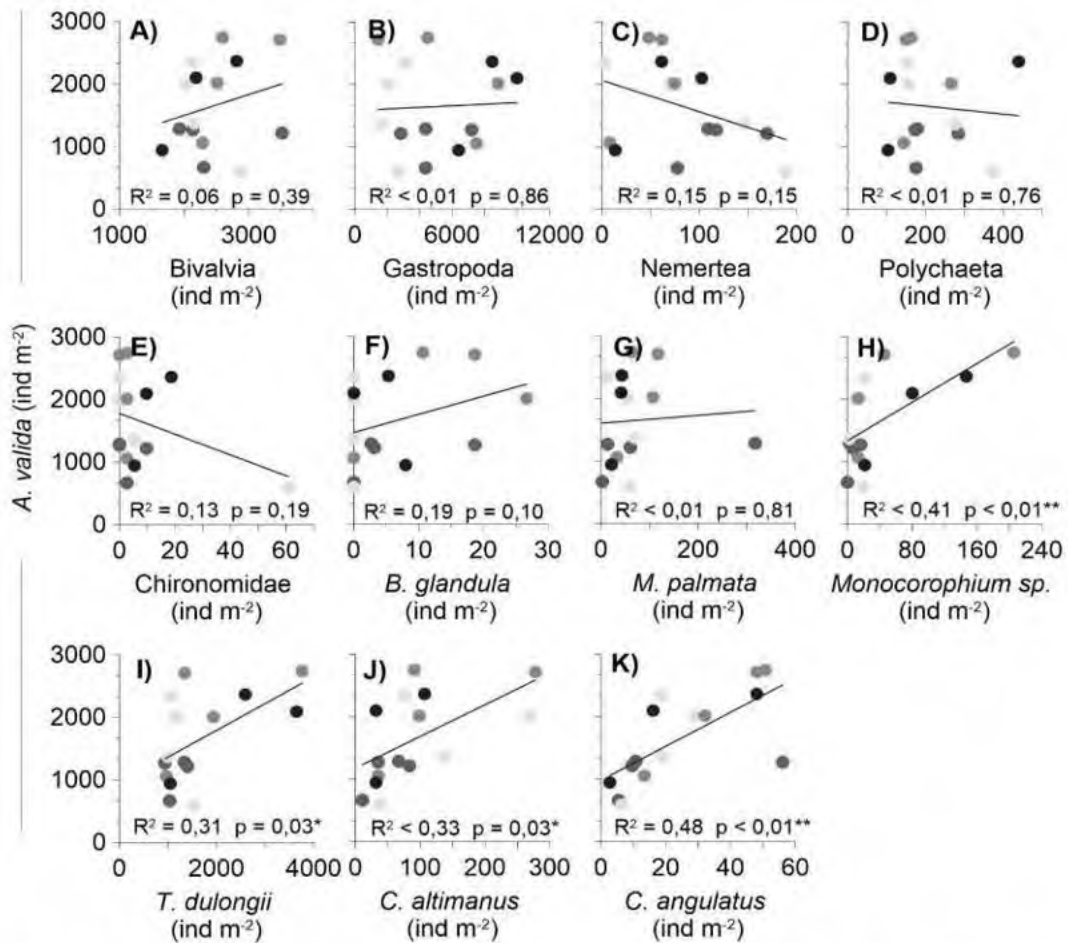
**Tabla 2.1** Número total de individuos de la macrofauna cuantificados en el intermareal alto y bajo durante los muestreos.

<b>Taxón</b>	<b>Intermareal alto</b>	<b>Intermareal bajo</b>
<b>Arthropoda</b>		
Crustacea		
<i>Balanus glandula</i>	35	109
<i>Ampithoe valida</i>	8.884	6.205
<i>Melita palmata</i>	367	5.752
<i>Monocorophium sp.</i>	219	7.651
Phoxocephalidae	0	3
<i>Exosphaeroma sp.</i>	11	379
<i>Edotia sp.</i>	1	483
<i>Idotea baltica</i>	16	29
<i>Tanais dulongii</i>	8.805	18.081
<i>Cyrtograpsus altimanus</i>	529	2.004
<i>Cyrtograpsus angulatus</i>	133	12
<i>Leucippa pentagona</i>	0	19
Insecta		
Chironomidae	40	885
<b>Annelida</b>		
Polychaeta	1.124	1.604
Sipunculida	1	6
<b>Nemertea</b>	436	97
<b>Echinodermata</b>		
Ophiuroidea	0	6
<b>Mollusca</b>		
Bivalvia	13.056	38.383
Gastropoda	27.100	42



**Fig. 2.7** Variabilidad estacional de la abundancia de los diferentes grupos de la macrofauna (A) y de crustáceos (B) durante el periodo de muestreo en el intermareal alto. Los colores en el eje X indican las estaciones del año: amarillo: verano, naranja: otoño, azul: invierno y verde: primavera.

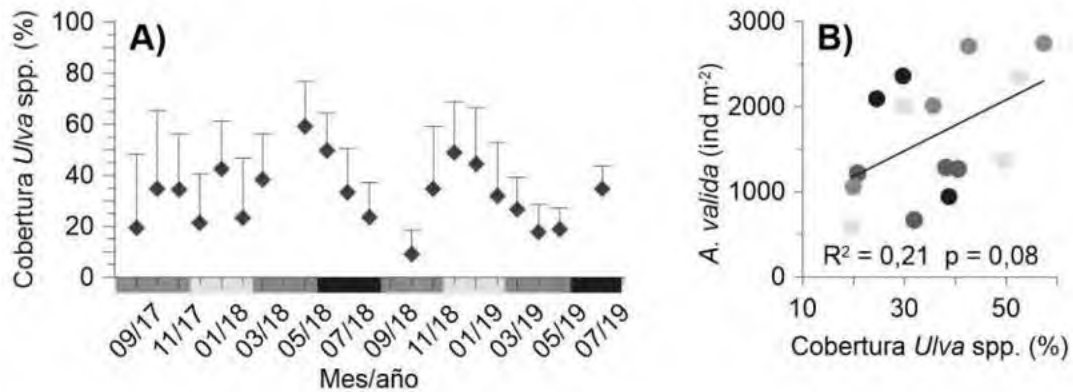
La abundancia de *A. valida* se correlacionó positivamente con la de otras cuatro especies de crustáceos: *Monocorophium sp.*, *T. dulongii*, y los cangrejos *C. altimanus* y *C. angulatus* (Fig. 2.8 H-K). En contraste, no se observó una correlación significativa con *B. glandula* (Fig. 2.8 F), *M. palmata* (Fig. 2.8 G), ni con los demás grupos de la macrofauna (Fig. 2.8 A-E).



**Fig. 2.8** Correlación entre la abundancia promedio de *A. valida* y de los diferentes grupos de la macrofauna en el intermareal alto. Los colores de los puntos indican las estaciones del año: amarillo: verano, naranja: otoño, azul: invierno y verde: primavera. Se muestran las líneas de regresión lineal incluyendo todas las estaciones, así como los resultados del estadístico (i.e., valores de R<sup>2</sup> y p). Los asteriscos indican el nivel de significancia: \*: p < 0,05; \*\*: p < 0,01; \*\*\*: p < 0,001.

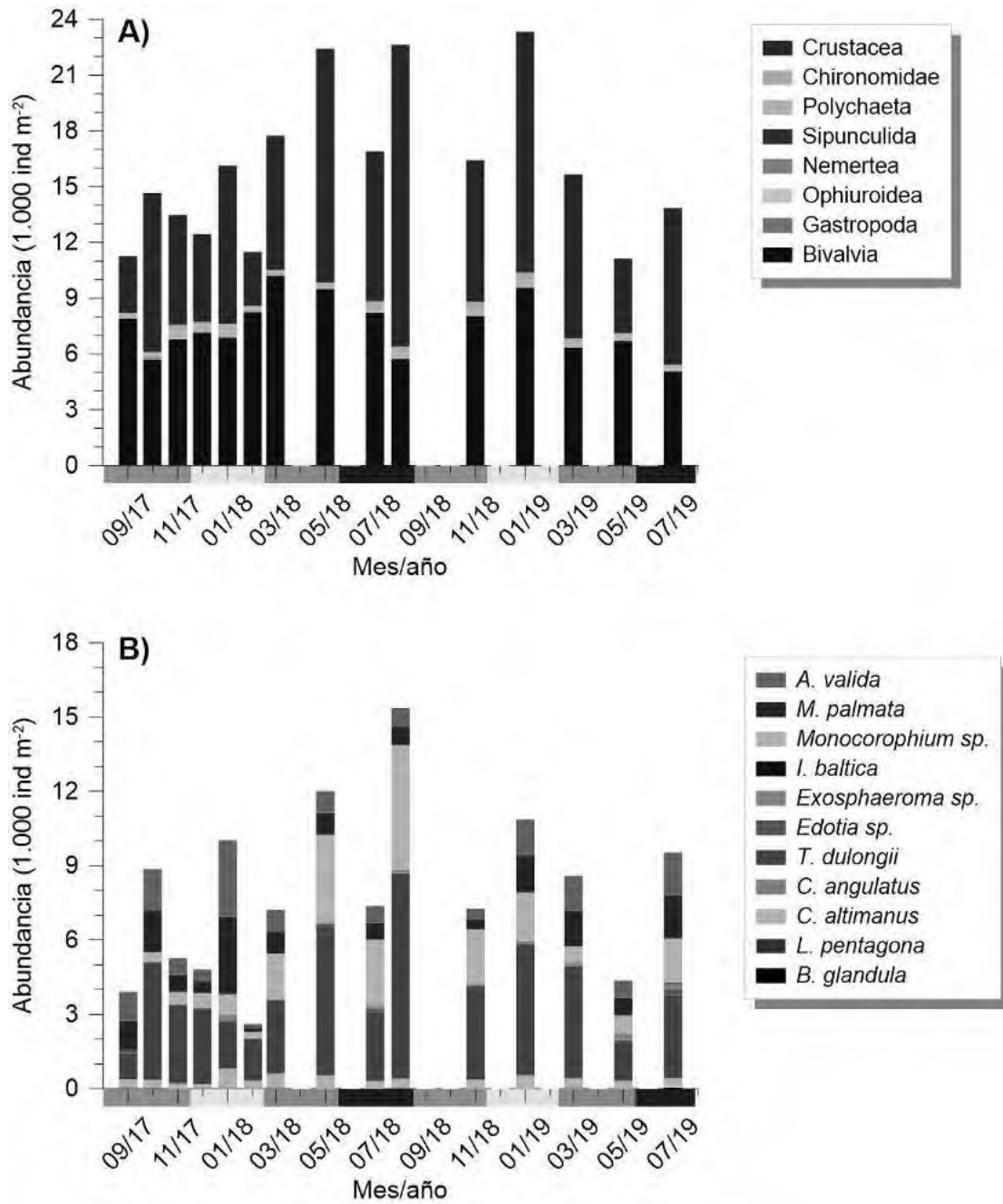
La cobertura de *Ulva* spp. varió a lo largo del tiempo, aunque sin un patrón estacional claro (Fig. 2.9 A). En el primer año de muestreo se registró un valor máximo de cobertura de  $59,3 \pm 17,6$  % en mayo de 2018, seguido de una disminución durante el invierno y la primavera, hasta alcanzar un valor mínimo de  $9,1 \pm 9,4$  % de cobertura en octubre (Fig. 2.9 A). Posteriormente, se registró un incremento en la cobertura en diciembre de 2018, con valores de  $48,8 \pm 20,1$  %, y una disminución durante los meses siguientes, hasta alcanzar un mínimo de  $17,8 \pm 10,7$  % en abril de 2019. En términos generales, la abundancia de *A. valida* tendió a aumentar con la cobertura de *Ulva* spp. en verano/otoño, pero no en invierno/primavera,

por lo cual esta relación no resultó estadísticamente significativa teniendo en cuenta los datos obtenidos a lo largo de todo el ciclo anual (Fig. 2.9 B).



**Fig. 2.9** Variabilidad estacional de la cobertura de *Ulva* spp. ( $\pm$ DE) durante el periodo de muestreo en el intermareal alto (A) y correlación entre la abundancia de *A. valida* y la cobertura promedio de *Ulva* spp. en cada mes de muestreo (B). Se muestran las líneas de regresión lineal incluyendo todas las estaciones, así como los resultados del estadístico (i.e., valores de  $R^2$  y  $p$ ).

La variabilidad estacional de los diferentes grupos de la macrofauna en el intermareal bajo se presenta en la Fig. 2.10. En este estrato, los crustáceos fueron el grupo dominante, representando entre el 25 y el 71 % de los individuos, dependiendo del mes considerado (Fig. 2.10 A). Los bivalvos constituyeron el segundo grupo más representativo, con densidades que oscilaron entre 5.086 y 10.214 ind m<sup>-2</sup>. En este grupo, las densidades más bajas se registraron durante el invierno, mientras que los máximos se observaron en otoño de 2018 y verano de 2019 (Fig. 2.10 B). A diferencia de lo observado en el intermareal alto, los gasterópodos estuvieron escasamente representados con densidades que fluctuaron entre 3 y 29 ind m<sup>-2</sup>. Las densidades de quironómidos oscilaron entre 52 y 445 ind m<sup>-2</sup>, con valores mínimos en otoño y máximos en primavera y verano. Los poliquetos y nemertinos se registraron en la mayoría de los meses analizados, con densidades entre 155 y 560 ind m<sup>-2</sup> y 3 y 77 ind m<sup>-2</sup>, respectivamente, sin un patrón estacional definido. Asimismo, se registraron algunos individuos de la Clase Ophiuroidea, aunque en muy bajas densidades y solo en algunos meses del periodo de muestreo.



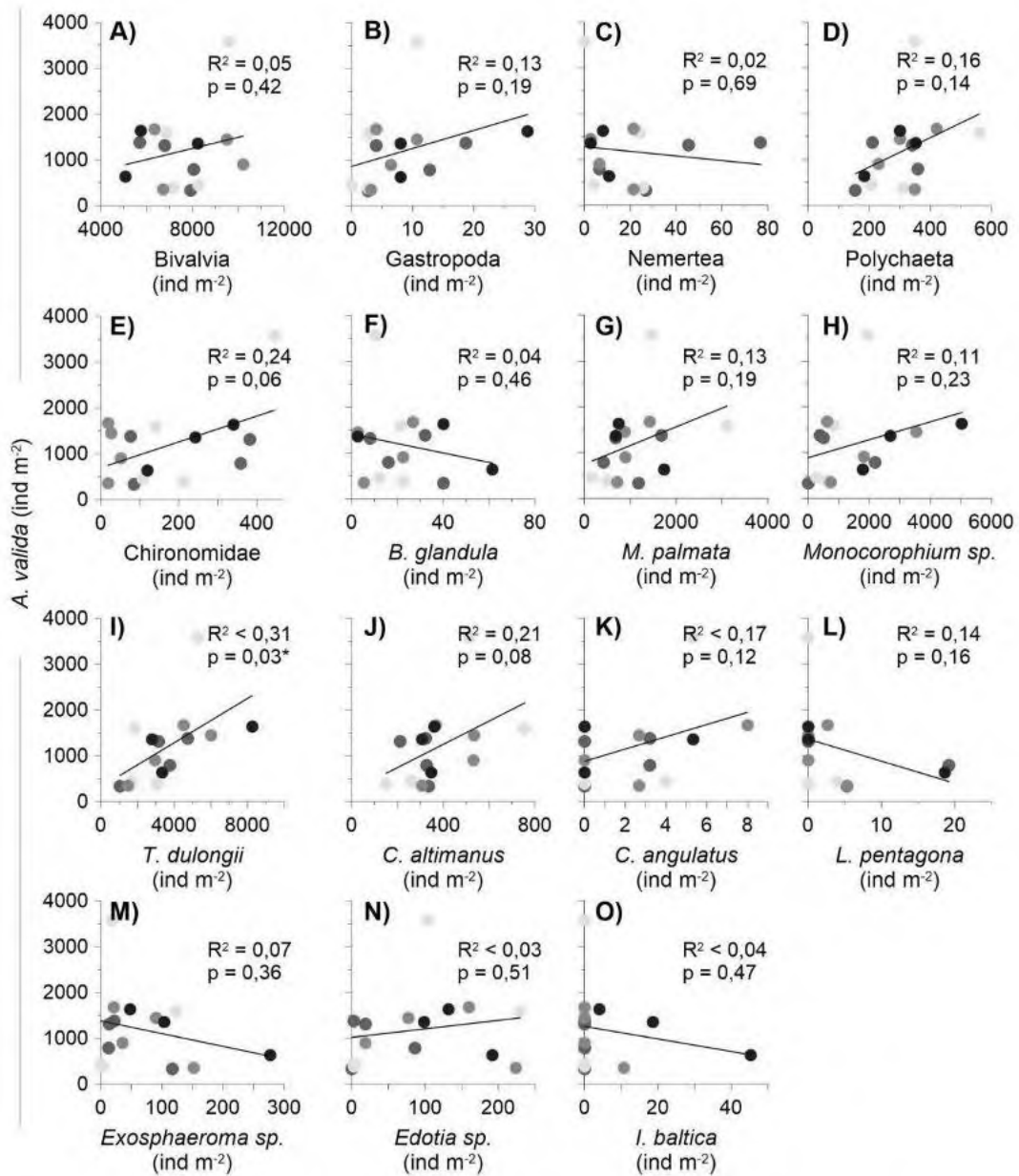
**Fig. 2.10** Variabilidad estacional de la abundancia de diferentes grupos de macrofauna (A) y de crustáceos (B) durante el periodo de muestreo en el intermareal bajo. Los colores en el eje X indican las estaciones del año: amarillo: verano, naranja: otoño, azul: invierno, verde: primavera

Dentro de los crustáceos, se identificaron 12 especies en el intermareal bajo (Tabla 2.1, Fig. 2.10 B). *T. dulongii* fue la especie dominante en la mayoría de los meses, con densidades que oscilaron entre 1.053 y 8.256 ind m<sup>-2</sup> en septiembre de 2017 y agosto de 2018, respectivamente. A continuación, se ubicaron *Monocorophium* sp., *A. valida*, *M. palmata* y *C. altimanus*, todas presentes durante todos los meses analizados.

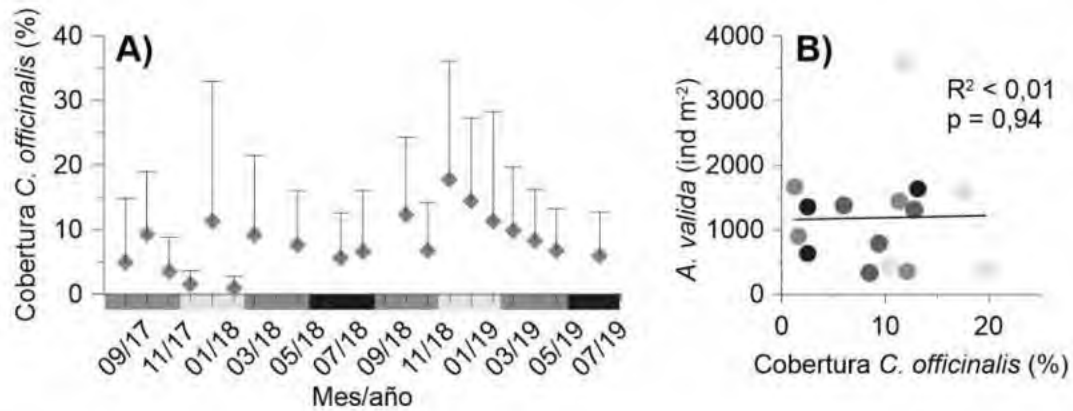
La densidad de *A. valida* osciló entre 333 y 1.672 ind m<sup>-2</sup> en septiembre de 2018 y marzo de 2019, respectivamente, con un pico excepcional de 3.576 ind m<sup>-2</sup> en enero de 2019 (Fig. 2.10 B). A diferencia del intermareal alto, *B. glandula*, *Edotia* sp. y *Exosphaeroma* sp. estuvieron presentes en la mayoría de los meses analizados y en mayores densidades. En cambio, *C. angulatus* se registró sólo en aproximadamente la mitad de los meses analizados, con una densidad máxima de 8 ind m<sup>2</sup>. También se detectó la presencia, aunque en muy bajas densidades, de anfípodos de la Familia Phoxocephalidae y del cangrejo *Leucippa pentagona*, ambos ausentes en el intermareal alto.

En el intermareal bajo, la abundancia de *A. valida* mostró una correlación positiva y significativa únicamente con la de *T. dulongii* (Fig. 2.11 I). No se detectaron correlaciones significativas con ninguno de los otros grupos de la macrofauna analizados.

Si bien en este estrato se observaron especímenes de *Ulva* spp., su cobertura fue inferior al 3 % en todos los meses considerados. Por su parte, la cobertura promedio de *C. officinalis* varió entre 1,0 ± 1,7 % en febrero de 2018 y 17,8 ± 18,3 % en enero de 2019, sin evidenciar un patrón estacional definido (Fig. 2.12 A). Tampoco se detectó una correlación significativa entre la abundancia de *A. valida* y la cobertura de *C. officinalis* (Fig. 2.12 B).



**Fig. 2.11** Correlación entre la abundancia promedio de *A. valida* y de los diferentes grupos de la macrofauna en el intermareal bajo. Los colores en el eje X indican las estaciones del año: amarillo: verano, naranja: otoño, azul: invierno, verde: primavera. Se muestran las líneas de regresión lineal incluyendo todas las estaciones, así como sus resultados estadísticos (i.e., valores de  $R^2$  y  $p$ ). Asteriscos indican el nivel de significancia: \*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01$ ; \*\*\*:  $p < 0,001$ .

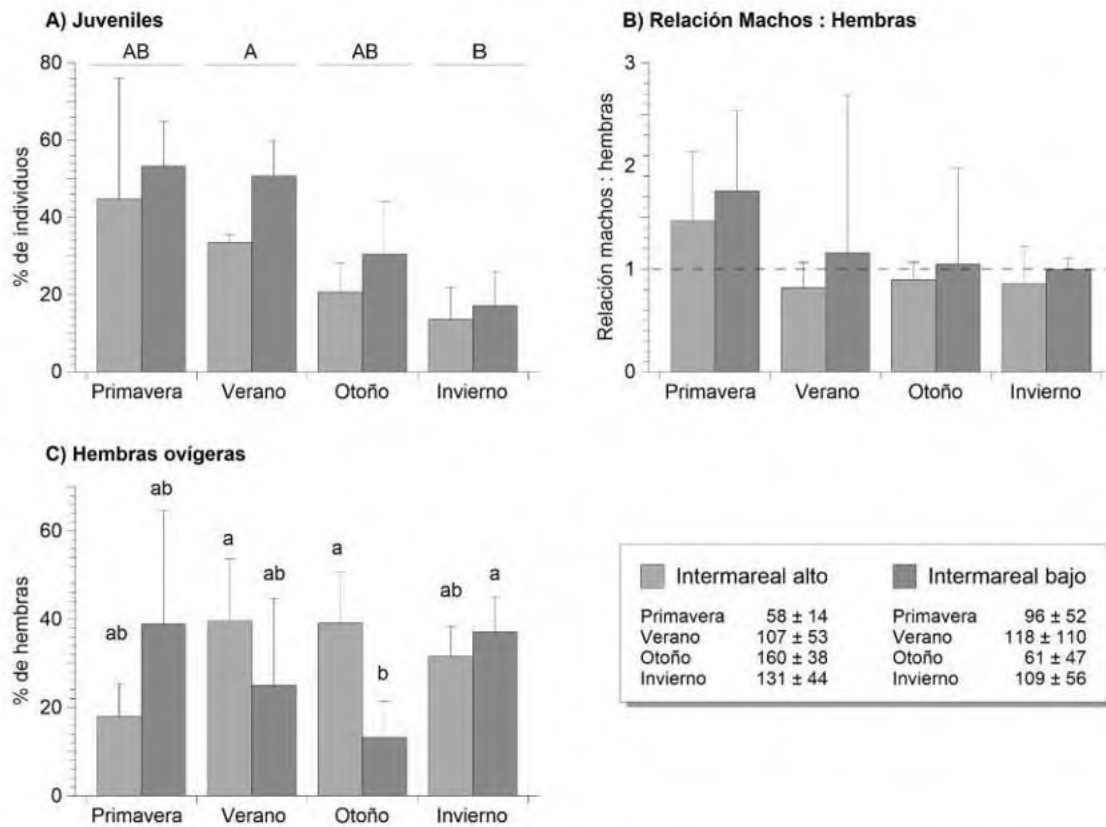


**Fig. 2.12** Variabilidad estacional de la cobertura de *C. officinalis* ( $\pm$ DE) durante el periodo de muestreo en el intermareal bajo y correlación entre la abundancia de *A. valida* y la cobertura promedio de *C. officinalis*. en cada mes de muestreo (B). Se muestran las líneas de regresión lineal incluyendo todas las estaciones, así como los resultados del estadístico (i.e., valores de  $R^2$  y  $p$ ).

### 2.3.3. Variabilidad estacional de rasgos de la historia de vida de *A. valida*

La estructura poblacional de *A. valida*, en términos de la proporción de juveniles, la relación de sexos de individuos adultos y el porcentaje de hembras ovígeras respecto del total de las hembras se presenta en la Fig. 2.13. La presencia de juveniles fue constante a lo largo del año, aunque su proporción mostró variaciones significativas entre estaciones (WTPS,  $p < 0,001$ ), disminuyendo progresivamente desde la primavera hacia el invierno (Fig. 2.13 A). En primavera y verano, los juveniles representaron entre un tercio y la mitad de los individuos registrados, mientras que en invierno su proporción no superó el 20 % en ninguno de los estratos del intermareal (Fig. 2.13 A). En cuanto a la proporción machos : hembras, se mantuvo el valor esperado de 1:1 en todas las estaciones sin detectarse desviaciones significativas del mismo (prueba de t de una muestra,  $p > 0,05$ ), aunque en primavera se observó, como patrón general, una mayor proporción promedio de machos (Fig. 2.13 B). En el caso de las hembras, las no ovígeras fueron numéricamente dominantes y las ovígeras representaron, como máximo y en promedio, el 40 % del total de las hembras (Fig. 2.13 C). Ese porcentaje varió significativamente tanto a lo largo del año como entre estratos del intermareal (interacción estación x estrato; WTPS,  $p < 0,001$ ). En otoño, el porcentaje de hembras ovígeras fue significativamente mayor en el intermareal alto que en el bajo,

mientras que para las demás estaciones no se observaron diferencias significativas entre estratos (Fig. 2.13 C).

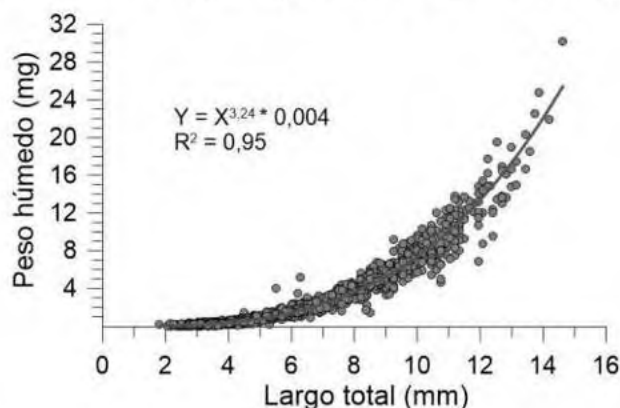


**Fig. 2.13** Porcentaje de juveniles (A), proporción de sexos (B) y porcentaje de hembras ovígeras en el total de hembras (C) en el intermareal alto y bajo en las cuatro estaciones del año. Las barras muestran las medias ± DE. Letras mayúsculas indican diferencias significativas entre estaciones, letras minúsculas diferencias significativas para la interacción entre estación y estrato del intermareal ( $p < 0,05$ ). En la leyenda se indica el número promedio de individuos ± DE por cada muestra ( $n = 4$ ).

### 2.3.3.1. Distribución de tallas y pesos

La relación entre el peso húmedo y el largo total del cuerpo de los individuos de *A. valida* se muestra en la Fig. 2.14, y el rango de tallas correspondiente a cada estación y estrato del intermareal en la Tabla 2.2. El peso húmedo se ajustó al largo total del cuerpo a través de una curva de ajuste potencial (Fig. 2.14). En juveniles, las tallas oscilaron entre 2,1 mm y 4,8 mm en el intermareal alto y entre 1,8 y 5,3 mm en el bajo (Tabla 2.2), con el 86 % de los

individuos midiendo menos de 4 mm. En el caso de los individuos adultos, el tamaño mínimo registrado fue de 2,8 mm en machos y de 2,4 mm en hembras, alcanzando máximos de 14,6 y 14,2 mm, respectivamente. En estos últimos casos, se hallaron los individuos de mayor tamaño en el intermareal alto en primavera (Tabla 2.2), aunque su abundancia fue baja. Se observaron hembras ovígeras a partir de los 5,3 mm de longitud (Tabla 2.2).



**Fig. 2.14** Relación entre el largo total del cuerpo y el peso húmedo de *A. valida*.

**Tabla 2.2** Rango de tallas (i.e., largo total del cuerpo en mm) de juveniles, machos, hembras no ovígeras y hembras ovígeras de *A. valida* registrado para las distintas estaciones del año.

	Estrato	Primavera	Verano	Otoño	Invierno
Juveniles	alto	2,1 – 4,5	2,2 – 4,7	2,1 – 4,4	2,5 – 4,8
	bajo	2,1 – 4,0	1,8 – 4,8	2,2 – 3,8	2,2 – 5,3
Machos	alto	2,9 – 14,6	3,4 – 11,3	3,6 – 11,0	2,9 – 12,7
	bajo	2,8 – 12,2	3,2 – 9,6	3,1 – 8,4	4,0 – 11,0
Hembras no ovígeras	alto	3,8 – 13,6	3,6 – 11,2	4,1 – 13,0	3,8 – 13,1
	bajo	2,4 – 11,8	3,7 – 13,0	3,1 – 7,5	4,1 – 12,1
Hembras ovígeras	alto	10,1 – 14,2	6,4 – 11,2	7,1 – 13,1	7,2 – 13,7
	bajo	8,2 – 12,4	6,0 – 11,0	5,3 – 9,1	7,6 – 12,5

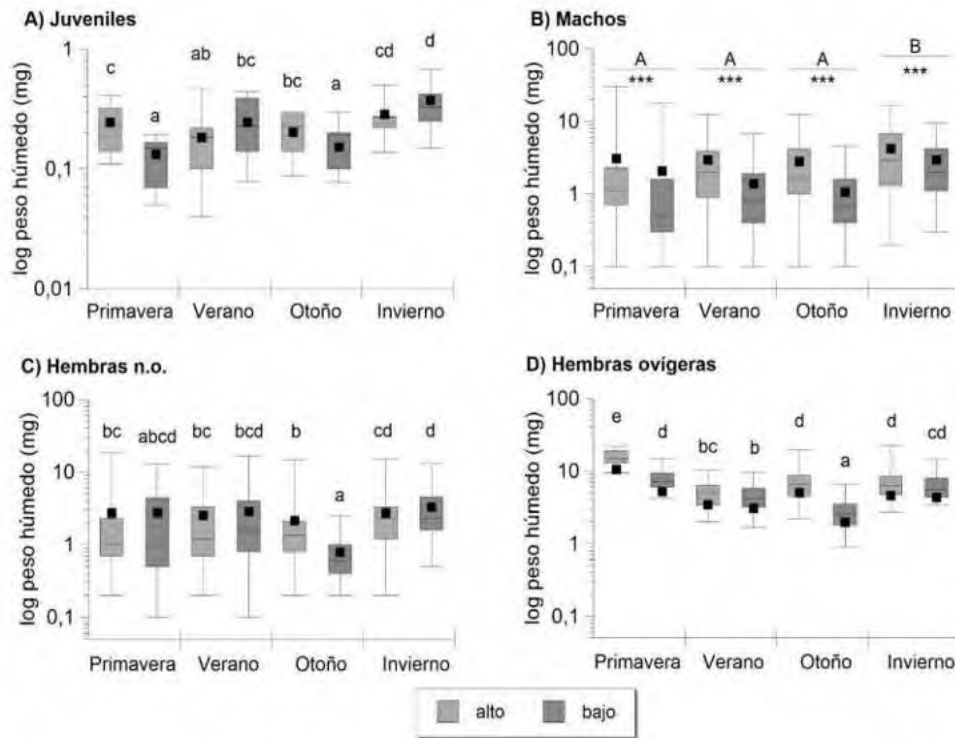
El peso húmedo de los individuos de *A. valida* mostró una gran variabilidad a lo largo del año y entre estratos del intermareal (Fig. 2.15). En el caso de los juveniles, se detectó una

interacción significativa entre estaciones y estratos (Fig. 2.15 A, Tabla 2.3). En el intermareal alto, los valores promedio fluctuaron entre  $0,18 \pm 0,13$  mg en verano y  $0,29 \pm 0,12$  mg en invierno, siendo significativamente mayores en invierno y primavera que en verano (Fig. 2.15 A). En el intermareal bajo, los promedios oscilaron entre  $0,13 \pm 0,05$  mg y  $0,37 \pm 0,18$  mg, registrándose los valores más altos también en invierno (Fig. 2.15 A). Durante primavera y otoño, los juveniles del intermareal alto presentaron un peso significativamente mayor que los colectados en el intermareal bajo, mientras que en verano e invierno los pesos fueron similares en ambos estratos (Fig. 2.15 A).

El peso húmedo de los machos varió significativamente entre estratos (Tabla 2.2), siendo los individuos del intermareal alto entre 1,4 y 2,7 veces más pesados que los del intermareal bajo, dependiendo la estación (Fig. 2.15 B). Asimismo, se registraron variaciones estacionales significativas en ambos estratos (Tabla 2.3), con los mayores pesos promedio en invierno:  $4,2 \pm 3,7$  mg en el intermareal alto y  $3,0 \pm 2,4$  mg en el intermareal bajo (Fig. 2.15 B). Durante el resto del año, el peso promedio de los machos fue de  $3,0 \pm 3,9$  mg y de  $1,5 \pm 2,4$  mg en el intermareal alto y bajo, respectivamente. En todas las estaciones y estratos del intermareal, los valores promedio de peso húmedo superaron las medianas (Fig. 2.15 B), indicando una distribución sesgada hacia tallas pequeñas e intermedias, con la presencia de algunos individuos de tamaños excepcionalmente grandes. El individuo de mayor peso fue registrado en primavera, alcanzando los 30,2 mg. Aproximadamente el 90% de los machos analizados presentaron pesos promedio menores a 8 mg.

En el caso de las hembras no ovígeras, el peso húmedo varió significativamente entre estaciones y estratos del intermareal, detectándose una interacción significativa entre ambos factores (Tabla 2.3). En otoño, el peso promedio de los individuos en el intermareal bajo fue de  $0,8 \pm 0,5$  mg, con un valor máximo de 2,5 mg (Fig. 2.15 C). En contraste, en las demás estaciones los pesos oscilaron en promedio entre  $2,2 \pm 2,7$  y  $3,3 \pm 2,6$  mg en ambos estratos, observándose también la presencia de algunos individuos de gran tamaño, que alcanzaron hasta 18,5 mg (Fig. 2.15 C). El peso de las hembras no ovígeras del intermareal bajo fue significativamente menor que las del intermareal alto en otoño, mientras que para las demás estaciones los pesos fueron similares en ambos estratos (Fig. 2.15 C). Al igual que en juveniles y machos, los mayores pesos promedio se registraron en invierno en ambos estratos, siendo estos significativamente superiores a los de otoño.

El peso húmedo de las hembras ovígeras también varió entre estaciones y estratos, detectándose una interacción significativa entre ambos factores (Tabla 2.3, Fig. 2.15 D). En concordancia con el patrón observado en las hembras no ovígeras, los individuos más pequeños se registraron en otoño en el intermareal bajo, con un peso promedio de  $2,9 \pm 1,6$  mg, mientras que, en las demás estaciones, los valores oscilaron entre  $4,6 \pm 2,1$  mg y  $7,8 \pm 2,4$  mg, siguiendo el orden: otoño < verano < invierno/primavera (Fig. 2.15 D). En el intermareal alto, los pesos promedios de las hembras ovígeras oscilaron entre  $5,1 \pm 2,1$  mg y  $15,7 \pm 3,9$  mg, siguiendo el patrón: verano < otoño / invierno < primavera (Fig. 2.15 D). En otoño y primavera, las hembras del intermareal alto presentaron pesos significativamente mayores que las del bajo, mientras que, en verano e invierno, los pesos fueron similares en ambos estratos.



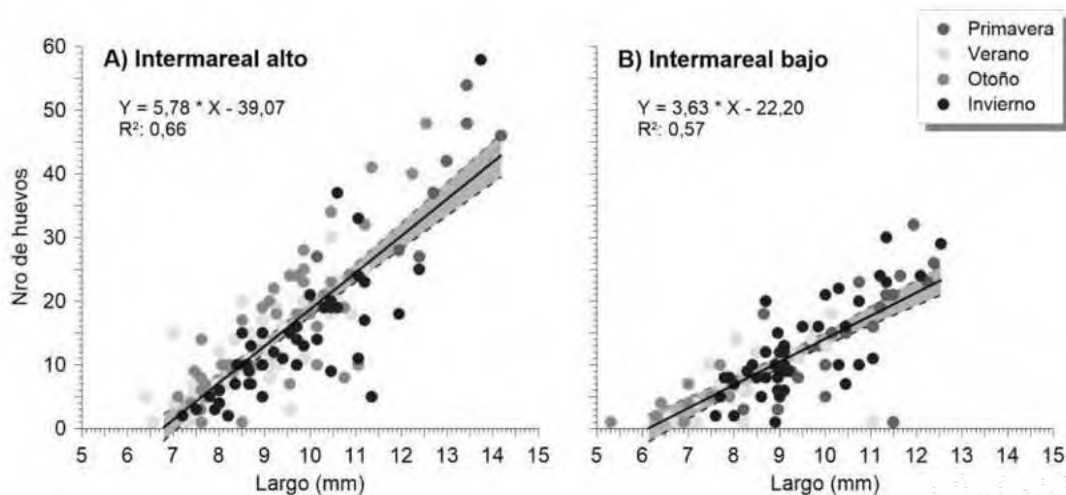
**Fig. 2.15** Peso húmedo de (A) juveniles, (B) machos, (C) hembras no ovígeras y (D) hembras ovígeras de *A. valida* en el intermareal alto y bajo en las cuatro estaciones de muestreo. Para una mejor visualización se muestra el eje Y en escala logarítmica. Las cajas muestran el 1<sup>er</sup> y 3<sup>er</sup> cuartil, las líneas horizontales las medianas, las líneas verticales los extremos superiores e inferiores, y los cuadrados negros los promedios. Las letras mayúsculas indican diferencias significativas entre estaciones, los asteriscos indican diferencias significativas entre estratos del intermareal y las letras minúsculas indican diferencias significativas en la interacción estación y estrato del intermareal.

**Tabla 2.3** Resultados de los análisis estadísticos del peso húmedo de juveniles, machos, hembras ovígeras y no ovígeras de *A. valida* en función de la estación y del estrato del intermareal. En el caso de los juveniles y las hembras no ovígeras, se utilizó la versión permutada de la estadística tipo Wald (WTPS, Friedrich et al., 2017) y en el caso de los machos y de las hembras ovígeras se realizó un ANOVA. Los asteriscos muestran el nivel de significancia: \*:  $p < 0,5$ ; \*\*:  $p < 0,1$ ; \*\*\*:  $p < 0,001$ .

		W / F	df	p
Juveniles	Estación	79,31	3	< 0,001***
	Estrato	0,10	1	0,76
	Estación x estrato	55,71	3	< 0,001***
Machos	Estación	19,78	3	< 0,001***
	Estrato	44,33	1	< 0,001***
	Estación x estrato	2,62	3	0,05
Hembras no ovígeras	Estación	45,56	3	< 0,001***
	Estrato	0,12	1	0,72
	Estación x estrato	17,77	3	< 0,001***
Hembras ovígeras	Estación	29,73	3	< 0,001***
	Estrato	33,01	1	< 0,001***
	Estación x estrato	14,92	3	< 0,001***

### 2.3.3.2. Aspectos reproductivos

Como se observó en las figuras previas, la presencia de hembras ovígeras fue registrada durante todas las estaciones del año. El número de huevos varió significativamente en función del largo total del cuerpo de las hembras, así como entre estratos del intermareal (Fig. 2.16; Tabla 2.4). En ambos estratos, el número de huevos por hembra aumentó con el tamaño corporal (Fig. 2.16 A y B). Las hembras del intermareal alto portaron, en promedio, un mayor número de huevos que las del intermareal bajo (Fig. 2.16 A y B). Si bien se observó como patrón general una mayor fecundidad en primavera en el intermareal alto (Fig. 2.16 A), el efecto de la estación no resultó estadísticamente significativo (Tabla 2.4).



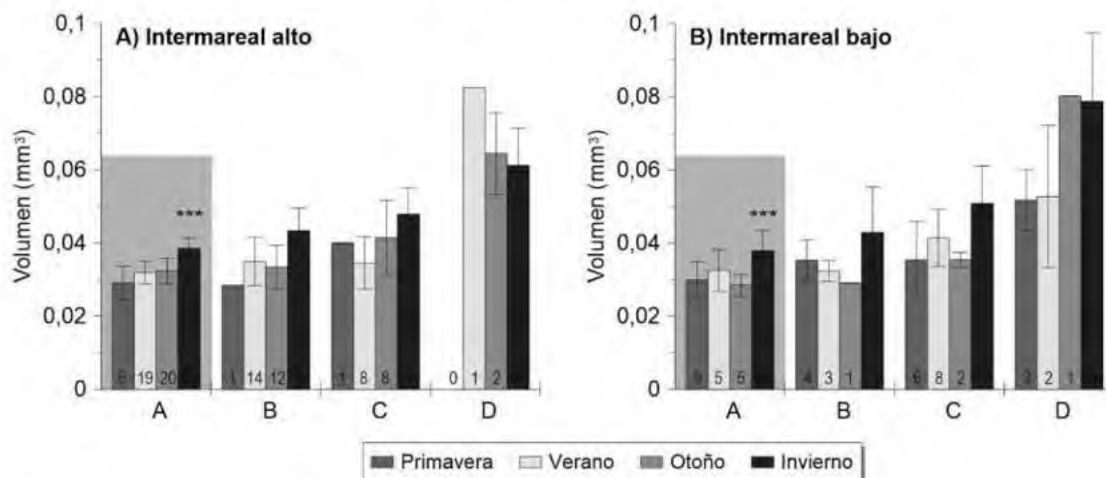
**Fig. 2.16** Relación entre el número de huevos por hembra y el largo total del cuerpo en el intermareal alto (A) y bajo (B), para las distintas estaciones del año (indicadas con diferentes colores). La línea de regresión y el área de confianza se calcularon sobre la totalidad de los datos. En la parte superior izquierda de cada figura se muestra la ecuación de regresión y el valor de  $R^2$ .

**Tabla 2.4** Resultados del modelo lineal generalizado (GLM) del número de huevos por hembra en función de la estación, del estrato del intermareal y del largo total del cuerpo (mm). Los asteriscos muestran el nivel de significancia: \*:  $p < 0,5$ ; \*\*:  $p < 0,1$ ; \*\*\*:  $p < 0,001$ .

	Chi <sup>2</sup>	df	p
Estación	7,37	3	0,06
Estrato	7,85	1	< 0,01**
Largo total	295,75	1	< 0,001***
Estación x estrato	4,04	3	0,26
Estación x largo total	1,81	3	0,61
Estrato x largo total	0,00	1	0,99
Estación x estrato x largo total	3,81	3	0,28

En cuanto al tamaño de los huevos, y tal como se indicó en la metodología, las comparaciones estadísticas se realizaron únicamente para los huevos de la primera categoría de desarrollo (categoría A) debido al bajo número de hembras portadoras de huevos en etapas más avanzadas. Se observaron diferencias significativas entre estaciones, con huevos de un volumen promedio un 25 % mayor en invierno respecto de las demás estaciones (Fig. 2.17). En todas las estaciones, se observó un patrón general de aumento progresivo del volumen desde la categoría A hasta la D (Fig. 2.17). El incremento porcentual promedio entre la

categoría A y D varió entre 59 % (intermareal alto, invierno) y un 182 % (intermareal bajo, otoño), observándose la transición más marcada entre las categorías C y D.

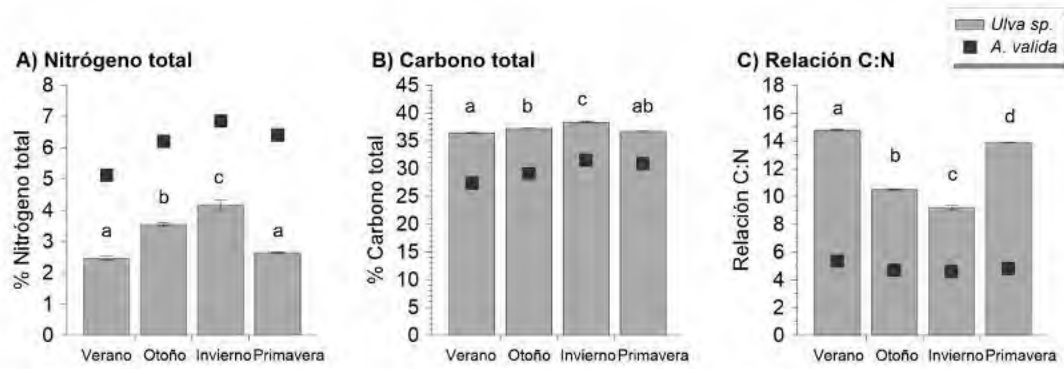


**Fig. 2.17** Volumen promedio ( $\pm$  DE) de huevos de *A. valida* de las cuatro categorías de desarrollo para las cuatro estaciones de muestreo en el intermareal alto (A) y bajo (B). Los asteriscos indican diferencias significativas entre las estaciones para los huevos del primer estadio de desarrollo (categoría A). Los números dentro de las barras indican el número de hembras portadoras de huevos analizadas para cada categoría.

### 2.3.4. Contenido de carbono y nitrógeno en tejidos de *Ulva* spp. y *A. valida*

Tal como se observa en la Fig. 2.18, la composición estequiométrica de *Ulva* spp. varió significativamente entre estaciones (ANOVA,  $p < 0,001$ , Fig. 2.18 A-C). El contenido de nitrógeno total, expresado como porcentaje de materia seca, alcanzó en invierno un valor promedio de  $4,2 \pm 0,2$  %, siendo aproximadamente 1,6 veces superior al registrado en primavera y verano, y 1,2 veces más alto que en otoño (Fig. 2.18 A). De manera similar, el contenido de carbono varió según el orden: invierno > otoño > primavera / verano, con valores promedio entre  $36,4 \pm 0,1$  % y  $38,4 \pm 0,3$  % (Fig. 2.18 B). La relación C:N varió entre  $9,2 \pm 0,3$  en invierno y  $14,8 \pm 0,3$  en verano, con valores intermedios en otoño ( $10,5 \pm 0,1$ ) y primavera ( $13,9 \pm 0,0$ ; Fig. 2.18 C).

En el caso de *A. valida*, se registraron valores de N total entre 5,1 y 6,9 % y de C total entre 27,4 y 31,5 %, siendo los valores de ambos mayores en invierno y menores en verano (Fig. 2.18 A-B). La relación C:N en *A. valida* osciló entre 4,6 en invierno y 5,3 en verano (Fig. 2.18 C).



**Fig. 2.18** Proporción de nitrógeno total (A), carbono total (B), y relación C:N (C) en tejidos de *Ulva* spp. y de *A. valida*. En el caso de *Ulva* spp. se muestran los datos promedio  $\pm$  DE. Las letras minúsculas sobre las barras indican diferencias significativas entre estaciones en la proporción de C, N y en la relación C:N de *Ulva* spp.

## 2.4. Discusión

### 2.4.1. Condiciones abióticas

En este capítulo se demostró que, en aquellas áreas donde el agua queda retenida durante la marea baja (i.e., pozas de marea, canales), la temperatura del agua presenta fluctuaciones marcadas a lo largo del ciclo de mareas, con incrementos durante el día y descensos durante la noche. Si bien este patrón se observó en ambos estratos del intermareal y en todas las estaciones del año, el rango de fluctuación resultó más pronunciado en el intermareal alto durante el verano, alcanzando variaciones diarias de hasta  $\sim 19$  °C. Este valor se encuentra dentro del rango reportado para otros sistemas intermareales de zonas templadas (Wolfe et al., 2020). Por ejemplo, en pozas de marea en California, (EE.UU) se documentaron fluctuaciones máximas de  $\sim 25$  °C a lo largo de un ciclo de mareas, y temperaturas extremas de hasta  $\sim 43$  °C durante el verano (Kelly et al., 2012). Los máximos térmicos registrados durante la marea baja diurna pueden exponer a los individuos a episodios de estrés térmico agudo, en algunos casos superando los límites fisiológicos de tolerancia térmica (Helmuth & Hofmann, 2001). A este estrés se suma la exposición simultánea a altos niveles de radiación solar, que se intensifica cuando la marea baja coincide con las horas cercanas al mediodía (Häder et al., 2011). Esta combinación de factores resulta especialmente crítica en el intermareal alto, donde los organismos permanecen expuestos a condiciones extremas durante períodos de tiempo más prolongados en la fase de marea baja (Legrand et al., 2018).

En cuanto al pH, el incremento observado durante la marea baja diurna es principalmente el resultado neto del consumo de CO<sub>2</sub> por la actividad fotosintética de los organismos autótrofos durante las horas de luz, el cual supera la cantidad de CO<sub>2</sub> liberado por la respiración de los organismos. Los rangos de fluctuación registrados se encuentran dentro de los reportados en estudios previos, que documentaron incrementos de hasta 2 unidades de pH, alcanzando valores cercanos a 10 durante esta fase del ciclo mareal (Legrand et al., 2018; Wolfe et al., 2020). En contraste, durante la marea baja nocturna, el incremento del CO<sub>2</sub> como consecuencia de la respiración de los organismos se traduciría en una disminución del pH de hasta 0,5 unidades por debajo del valor del agua de mar (Legrand et al., 2018).

#### **2.4.2. Variabilidad temporal de la comunidad epibentónica del intermareal alto y bajo**

Las comunidades epibentónicas de las zonas intermareales se estructuran, en parte, en torno a especies sésiles, como bivalvos, macroalgas y cirripedios, que actúan como ingenieros ecosistémicos al generar sustratos secundarios que brindan refugio a otros invertebrados (Bertness et al., 2006; Silliman et al., 2011; Mendez et al., 2015; Bueno et al., 2019). Por ejemplo, estudios previos realizados en sistemas intermareales de la costa patagónica argentina reportaron que 43 de 46 especies de invertebrados se encontraban exclusivamente asociadas a bancos de mejillines, mientras que solo 3 especies también estaban presentes en suelos desnudos (Silliman et al., 2011). En Playa Bonita, los bancos de mejillines estuvieron presentes en todo el gradiente intermareal, aunque su densidad aumentó desde el intermareal alto hacia el bajo. No obstante, dicha densidad fue menor que la reportada para otras localidades de la costa patagónica (Bertness et al., 2006; Cuevas et al., 2006, Rechimont et al., 2013). A pesar de las variaciones estacionales observadas en la densidad de los mejillines a lo largo del año, los bancos se mantuvieron durante todo el periodo de estudio, lo que sugiere que su función como sustrato secundario y refugio para especies colonizadoras se sostuvo de manera continua. Por lo tanto, la variación estacional en la abundancia de especies asociadas al mejillinar, en particular de la macrofauna móvil, no estaría relacionada -al menos en primera instancia- con las fluctuaciones en la densidad de estos bivalvos.

La cobertura de *Ulva* spp. alcanzó su máximo en mayo de 2018, disminuyó durante el invierno y la primavera, aumentó nuevamente en diciembre de ese mismo año, y descendió

hacia el otoño siguiente. Estos patrones difieren parcialmente de lo reportado en otras localidades de la costa patagónica argentina, donde las mayores abundancias de *Ulva* spp. se registran durante la primavera y el verano (Díaz et al., 2002; Rico et al., 2005; Gauna et al., 2017). Este comportamiento ha sido atribuido al incremento en la disponibilidad de nutrientes -especialmente nitratos y nitritos-, durante esa estación (Díaz et al., 2002). Playa Bonita recibe aportes de nutrientes provenientes de diversas fuentes, entre ellas, el polvo atmosférico, la descarga del río Chubut, y efluentes urbanos y pesqueros del puerto Rawson, cercano al área de estudio (Helbling, 1989; Bermejo et al., 2018; Vizzo et al., 2021b). En la Bahía Engaño, se han reportado niveles elevados de nitratos entre abril y agosto (Bermejo et al., 2018), lo que podría explicar el máximo de cobertura de *Ulva* spp. observado en otoño de 2018. Sin embargo, no puede descartarse que la influencia de otros factores, como la temperatura, los niveles de radiación solar, el viento o la herbivoría, también hayan influido en los patrones observados (Duffy & Hay, 2000; Rico et al., 2005).

Las macroalgas del género *Ulva* proporcionan alimento y refugio a numerosas especies de invertebrados (Martinetto et al., 2010), incluyendo a *A. valida*. Un aumento en su cobertura puede favorecer la abundancia de esta especie (Pardal, 2000; Zheng et al., 2013), aunque otros autores no han encontrado una relación directa entre la cobertura de *Ulva* spp. y la abundancia de *A. valida* (Alonso et al., 1995). En este capítulo, no se observó una correlación significativa entre la cobertura de *Ulva* spp. y la abundancia de *A. valida* a lo largo del ciclo anual, aunque la abundancia de *A. valida* tendió a aumentar con la cobertura de *Ulva* spp. durante otoño y verano. El máximo de cobertura de *Ulva* spp. registrado en mayo de 2018 coincidió con picos de abundancia no solo de *A. valida*, sino también de *C. angulatus*, *T. dulongii*, *Monocorophium* sp. e *I. báltica*. De forma similar, se han reportado máximos de abundancia para varias especies de crustáceos peracáridos -entre ellos *T. dulongii*, *Monocorophium acherusicum*, *Hyale grandicornis*, *Leptochelia* sp. y *A. valida*- durante el otoño de 2011 en La Estafeta (provincia de Buenos Aires), lo cual ha sido asociado con la temperatura ambiental (Rumbold et al., 2017). Este factor influye en el crecimiento, el desarrollo embrionario y la madurez sexual de los juveniles, afectando así la actividad reproductiva (Barrett, 1966; Pardal, 2000). En el caso de *A. valida*, se hallaron los mayores valores de abundancia en intermareales de Quequén (provincia de Buenos Aires), durante febrero y marzo de dos años consecutivos, aproximadamente dos meses después de haberse

registrado las temperaturas máximas anuales (Alonso et al., 1995). En Playa Bonita, la correlación positiva entre las abundancias de crustáceos sugiere que sus dinámicas poblacionales estarían moduladas por factores ambientales comunes, entre los cuales la cobertura de *Ulva* spp. y la temperatura podrían desempeñar un rol clave, en interacción con otras variables físicas del ambiente como las condiciones hidrodinámicas (Rumbold et al., 2017).

Respecto al cangrejo *C. altimanus*, su mayor abundancia se registró en marzo de 2018, en concordancia con los resultados de trabajos previos realizados en la Bahía de San Antonio (provincia de Río Negro), que reportaron los máximos de abundancia durante marzo y abril (Vázquez et al., 2012). Dado que el período reproductivo de esta especie ocurre en verano, el aumento en el número de individuos en otoño estaría asociado al reclutamiento de juveniles (Vázquez et al., 2012). En mayo se registró una disminución en la abundancia de la especie, coincidiendo con un incremento en la abundancia de *C. angulatus*, el cangrejo intermareal nativo de mayor tamaño en el área de estudio, considerado un importante depredador (Luppi et al., 2002; Hidalgo et al., 2007). Por lo tanto, los patrones observados podrían estar vinculados con eventos de reclutamiento seguidos de depredación.

Una característica distintiva de la comunidad del intermareal alto en Playa Bonita fue la elevada densidad de microgasterópodos, que representaron aproximadamente el 45% del total de los individuos de la macrofauna recolectada en ese estrato durante todo el periodo de estudio. Este grupo fue el único que mostró un patrón estacional consistente durante los dos años de muestreo, con máximos de abundancia en verano y mínimos en invierno, comportamiento probablemente asociado a su período de reclutamiento, tal como ha sido documentado por otros autores (Carcedo & Fiori, 2012).

En el intermareal bajo, los valores de cobertura de *C. officinalis* fueron similares a los reportados en estudios previos (~10 – 15 %) para áreas expuestas al oleaje en Cabo Dos Bahías (Chubut) (Bertness et al., 2006). En contraste, en zonas protegidas, estos autores registraron coberturas de hasta ~90 %. En ambientes expuestos, como Playa Bonita, el crecimiento de esta macroalga en el intermareal bajo estaría limitado por la energía del oleaje (Bertness et al., 2006). El mayor desarrollo de *C. officinalis* se registró en verano durante ambos años de muestreo, en concordancia con lo reportado por otros autores, quienes además documentaron una disminución en la abundancia de varias especies de anfípodos asociadas

a algas coralinas con una reducción en su cobertura, atribuyéndolo a la pérdida de hábitat (Bueno et al., 2019). En este capítulo, no se detectó una relación entre la cobertura de *C. officinalis* y la abundancia de *A. valida*. Cabe señalar que *C. officinalis* forma parches de distinto grosor en el intermareal, por lo que la cobertura superficial podría subestimar su biomasa real, dificultando la detección de cambios estacionales. Además, en el intermareal bajo de Playa Bonita, la presencia de bancos de mejillines también ofrece refugio y hábitat, por lo que la abundancia de *A. valida* no dependería exclusivamente de la disponibilidad de *C. officinalis*.

### **2.4.3. Variabilidad estacional de atributos de la historia de vida de *A. valida***

En la literatura científica, *A. valida* ha sido principalmente asociado a *Ulva* spp. y otras macroalgas blandas (Barrett, 1966; Nicotri, 1980; Alonso et al., 1995; Zheng et al., 2013; Faasse, 2015; Valiñas & Helbling, 2015; Machado et al., 2018), así como a pastos marinos del género *Zostera* (Pardal, 2000; Reynolds et al., 2012). Sin embargo, en Playa Bonita, se registró una alta abundancia de esta especie en el intermareal bajo, donde la presencia de *Ulva* spp. fue escasa. En este ambiente, los individuos se encontraron principalmente asociados a *C. officinalis* y a bancos de mejillines. Dado que las algas coralinas no constituyen una fuente de alimento preferida por los mesoherbivoros debido a su dureza, producto de su estructura calcárea (Bueno et al., 2017), es probable que en el intermareal bajo los anfípodos se alimenten principalmente de algas epífitas y detritos (Cruz-Rivera & Hay, 2000b). El menor tamaño corporal y la menor fecundidad observada en las hembras en este estrato, sugieren que la calidad nutricional del alimento disponible podría ser inferior a la del intermareal alto (Cruz-Rivera & Hay, 2000b). No obstante, la colonización del intermareal bajo podría ofrecer beneficios compensatorios, como: (1) un menor tiempo de exposición a condiciones abióticas extremas, y (2) una mayor protección frente a depredadores y desecación, favorecida por la complejidad estructural de *C. officinalis* y los bancos de mejillines (Boström & Mattila, 1999; Sotka, 2007; Bueno et al., 2017). Por ejemplo, estudios previos demostraron que el anfípodo *Perampithoe tea* selecciona preferentemente macroalgas con estructuras más complejas, ya que éstas proporcionan mayor protección frente al desprendimiento por acción del oleaje (Sotka, 2007). En este

sentido, la estructura rígida y ramificada de *C. officinalis* no solo ofrece sustrato para la colonización, sino que también contribuye a la retención de agua y sedimentos, reduciendo el riesgo de desecación (Bueno et al., 2019). En conjunto, los resultados sugieren que los individuos de *A. valida* del intermareal bajo adoptan una estrategia compensatoria, sacrificando calidad de alimento por protección. En especies generalistas, como *A. valida*, el uso de diferentes tipos de hábitats dentro de un mismo ecosistema puede constituir una estrategia efectiva para asegurar la persistencia poblacional en entornos con alta variabilidad ambiental (Pardal, 2000).

Los rangos de tamaño y los tamaños de madurez sexual registrados para *A. valida*, coinciden con los reportados previamente en la literatura (Tabla 2.5). Asimismo, los patrones estacionales observados en el tamaño corporal concuerdan con estudios que documentan individuos de mayor tamaño durante el invierno (Pardal, 2000; Zheng et al., 2013). A temperaturas más bajas, las tasas de crecimiento disminuyen, pero aumentan tanto la longevidad como el tamaño máximo alcanzado (Pardal, 2000; Zheng et al., 2013; Maszczyk & Brzezinski, 2018). Además, la madurez sexual suele alcanzarse a tallas mayores en épocas más frías (Pardal, 2000; Maszczyk & Brzezinski, 2018). Esto último se reflejó en la presencia de hembras ovígeras de mayor tamaño durante el invierno y la primavera. En Playa Bonita, el mayor tamaño de los individuos en invierno – particularmente en el intermareal alto - podría estar asociado, además, a una mayor calidad nutricional de *Ulva* spp., en términos de una menor relación C:N. Cabe destacar que en esta tesis, no se evaluó la calidad nutricional de otras macroalgas, como las epífitas, que probablemente constituyan la principal fuente de alimento de los anfípodos en el intermareal bajo.

**Tabla 2.5** Tamaños mínimos de madurez, tamaños máximos y número de huevos por hembra observados en estudios previos de *A. valida*. im: intermareal, sm: submareal, lab: laboratorio,  $\bar{x}$ : promedio; n.d.: no determinado

Autor	Lugar	Origen de muestra	Periodo de muestreo	Tamaño mín. de madurez	Tamaño máx. alcanzado	Nº de huevos por hembra
Barrett, 1966	Costa atlántica de EEUU	im y sm	primavera – invierno	hembra: 6,3 mm	hembra: 18,5 mm	3 - 60 ( $\bar{x}$ 22)
Alonso et al., 1995	Quequén, Argentina	im	mensual, dos años	hembra: 6 mm	hembra: 14,7 mm macho: 14,4 mm	10 - 38
Cruz-Rivera & Hay, 2000b	Carolina del Norte, EEUU	lab	-	n.d.	n.d.	5 – 25, según la dieta
Zheng et al., 2013	China	sm	mensual, un año	n.d.	20,4 mm	24 - 192
Rumbold, 2019	Chubut, Argentina	im	1x por estación, un año	n.d.	n.d.	1 - 21 ( $\bar{x}$ ~7)

La diferenciación de sexos se realizó siguiendo los criterios de Alonso et al. (1995), basados en la observación bajo lupa de estructuras sexuales: papilas copuladoras en machos y oostegitos en hembras. Esta diferenciación fue posible a partir de individuos de aproximadamente 3 – 4 mm, por lo que este rango se consideró como el umbral mínimo para clasificar a un individuo como adulto. No obstante, en algunos casos, la ausencia de caracteres sexuales visibles podría deberse al pequeño tamaño de los ejemplares, generando una superposición entre el tamaño máximo de los juveniles y el mínimo de los adultos, reflejando así una transición gradual entre ambas categorías. En los adultos, no se distinguió entre individuos sexualmente maduros e inmaduros, excepto en el caso de las hembras ovígeras, cuyo tamaño mínimo se utilizó como indicador de madurez sexual. Cabe señalar que otros estudios han empleado el grado de desarrollo de los oostegitos como criterio alternativo de madurez (Barrett, 1966; Alonso et al., 1995).

Aunque los patrones estacionales de tamaño fueron similares entre ambos estratos del intermareal, en el intermareal bajo fue llamativa la ausencia de individuos de gran tamaño durante el otoño, especialmente entre las hembras. Este patrón podría estar asociado a una depredación selectiva sobre los individuos de mayor tamaño (Mascaro et al., 2003; Maszczyk & Brzezinski, 2018). En el intermareal bajo, el riesgo de depredación podría ser mayor que en el alto, por ejemplo, debido a la presencia del pez *Patagonotothen cornucola*, considerado un depredador relevante en los intermareales patagónicos (Marcinkevicius et al., 2021). La dieta de esta especie varía entre sitios y estaciones según la disponibilidad y el tamaño de las presas (Marcinkevicius et al., 2021). Estudios recientes documentaron un incremento abrupto en el desarrollo gonadal de *P. cornucola* a partir del otoño, asociado a su actividad reproductiva (Marcinkevicius et al., 2024), lo que podría implicar un aumento en la demanda energética y, en consecuencia, en la selectividad hacia presas más grandes. Según la teoría del forrajeo óptimo, la depredación selectiva sobre individuos de mayor tamaño, en este caso de *A. valida*, resultaría ventajosa, al maximizar la energía obtenida por cada presa capturada (Mascaro et al., 2003). Sin embargo, existe la posibilidad de que otros factores, tales como las condiciones climáticas, también podrían haber influido en el patrón estacional observado en los tamaños de los anfípodos (Maszczyk & Brzezinski, 2018), aunque en este caso se hubiera esperado observar el mismo patrón en el intermareal alto.

El tamaño corporal de las hembras resultó ser un factor determinante en la reproducción. Las hembras más grandes portaron un mayor número de huevos, patrón ampliamente documentado en crustáceos peracáridos (Yu et al., 2008; Rumbold, 2019), incluyendo *A. valida* (Alonso et al., 1995; Zheng et al., 2013). Además, estudios previos señalaron que la mortalidad embrionaria en algunas especies de crustáceos disminuye con el aumento del tamaño corporal de la hembra (Kuris, 1991). En *A. valida*, se ha observado que la pérdida promedio de huevos durante el desarrollo embrionario (desde la categoría A a la C) varió entre ~18 % en hembras de mayor tamaño y ~43 % en hembras de tallas pequeñas (Alonso et al., 1995). Por lo tanto, las hembras de mayor tamaño no solo producen más huevos, sino que también presentan una mayor eficacia reproductiva, lo que las convierte en las principales contribuyentes al reclutamiento poblacional. Las hembras de mayor tamaño fueron registradas en primavera, aunque en baja abundancia. Dado que en esa estación

también se observó el mayor porcentaje de juveniles, la primavera podría considerarse el período de mayor rendimiento reproductivo de la especie.

Mientras que el número de huevos varió con el tamaño de las hembras y en función del estrato del intermareal, el tamaño de los huevos varió significativamente entre estaciones. En invierno, los huevos fueron significativamente más grandes que durante el resto del año, un patrón ampliamente reportado en anfípodos de zonas templadas (Dunn & McCabe, 1995; Shearer, 1996; Yu et al., 2008), incluyendo *A. valida* (Pardal, 2000). Este fenómeno se interpreta como una estrategia adaptativa, ya que los huevos de mayor tamaño contienen mayores reservas energéticas que incrementan la supervivencia embrionaria a bajas temperaturas (Dunn & McCabe, 1995; Pardal, 2000). Dado que el tamaño del huevo determina el tamaño del juvenil al momento de la eclosión, el mayor tamaño de los juveniles observado en invierno en esta tesis es coherente con esta hipótesis.

#### **2.4.4. Contenido de carbono y nitrógeno en tejidos de *Ulva* spp. y *A. valida***

La composición estequiométrica de carbono, nitrógeno y fósforo en los tejidos de macroalgas presenta una marcada variación estacional, influenciada por múltiples factores, entre ellos la disponibilidad de nutrientes en el ambiente y las tasas de crecimiento y eficiencia de asimilación de estos elementos (Villares & Carballeira, 2003). Si bien en este capítulo no se evaluó el contenido de fósforo, estudios previos indican que este elemento suele mostrar una variabilidad estacional menor en comparación con el nitrógeno, considerado el principal determinante de los cambios en la calidad nutricional de las macroalgas a lo largo del año (Villares & Carballeira, 2003). El nitrógeno constituye uno de los factores limitantes más relevantes para el crecimiento de las macroalgas, y su concentración en los tejidos puede variar sustancialmente entre estaciones (Villares & Carballeira, 2003). En general, en zonas templadas, el contenido de nitrógeno en los tejidos algales tiende a ser menor en verano y más elevado en invierno (Villares & Carballeira, 2003), patrón que también se observó en los tejidos de *Ulva* spp. recolectados en Playa Bonita. Esta tendencia podría estar asociada al aumento de la productividad primaria posterior al invierno, acompañado por una aceleración de la tasa de crecimiento, lo que generaría una dilución del contenido de nitrógeno en los tejidos cuando la demanda de este

nutriente supera su tasa de asimilación (Villares & Carballeira, 2003). A esto se suma que el área de estudio se encuentra bajo la influencia del río Chubut, que aporta cantidades significativas de nutrientes a la Bahía Engaño (Helbling, 1989; Bermejo et al., 2018). Según los resultados de estudios previos, la concentración de compuestos nitrogenados (i.e., nitratos + nitritos) en el agua aumenta desde mediados de otoño hasta fines de invierno, indicando un mayor aporte de este nutriente durante la época invernal (Bermejo et al., 2018). La relación C:N en los tejidos de los productores primarios constituye un indicador clave de su calidad nutricional para los herbívoros que se alimentan de ellos. Una mayor calidad nutricional, asociada a un mayor contenido de nitrógeno y/o una menor relación C:N, ha sido vinculada con modificaciones en las tasas de consumo y en las preferencias alimenticias (Cruz-Rivera & Hay, 2000a, Alberti et al., 2011, Valiñas et al., 2014) así como con mayores tasas de crecimiento y reproducción en los consumidores (Cruz-Rivera & Hay, 2000a), y con una mayor resistencia frente a estresores ambientales (Valiñas et al., 2014). Los resultados de este capítulo además indican que el contenido de carbono, nitrógeno y la relación C:N en los tejidos de *A. valida* varía a lo largo del año, siguiendo un patrón estacional similar al observado en *Ulva* spp. Si bien los datos obtenidos no permitieron realizar un análisis estadístico para determinar si el patrón estacional observado es significativo, estudios previos demostraron que la composición estequiométrica de carbono y nitrógeno, junto con el fósforo, en los tejidos de los consumidores puede variar entre estaciones del año, así como entre poblaciones de una especie (Liess & Hillebrand, 2005, Mäkelin & Villnäs, 2022). Esa variabilidad se vinculó a múltiples factores, tales como el tamaño y el estado ontogénico de los individuos, así como la disponibilidad de alimento (Liess & Hillebrand, 2005, Mäkelin & Villnäs, 2022). En este sentido, *A. valida* presentaría un mejor estado nutricional durante el invierno, lo que podría favorecer su crecimiento, reproducción y fitness, además de repercutir positivamente en la calidad trófica de los organismos de niveles superiores.

## **2.5. Conclusiones**

Los resultados del presente capítulo mostraron que los crustáceos, y en particular *A. valida*, constituyen uno de los grupos de la macrofauna más abundantes tanto en el intermareal alto como en el bajo del área de estudio. Debido a su alta abundancia a lo largo de todo el año,

*A. valida* representa una de las especies de macrofauna móvil más representativas de los intermareales de esta zona, y constituye una presa relevante para organismos de niveles tróficos superiores. Si bien la especie estuvo presente en todo el gradiente intermareal, se registraron -en términos generales- mayores abundancias, mayores tamaños individuales y un mayor número de huevos por hembra ovígera en el intermareal alto respecto del bajo. Estos resultados sugieren que la zona del intermareal alto ofrecería condiciones más favorables para el desarrollo de los individuos. Sin embargo, en un contexto de CG, la población que habita el intermareal alto podría ser más vulnerable a los cambios ambientales esperados, que aquella que ocupa el intermareal bajo, debido al mayor nivel de estrés abiótico que experimenta esta zona durante la fase de marea baja. Este estrés se asocia principalmente con períodos más prolongados de exposición a elevados niveles de radiación solar -en particular RUV nociva- y con picos de temperatura más altos alcanzados durante la fase de mareas bajas diurnas. Bajo escenarios de CG, estos factores se intensificarían, afectando potencialmente las tasas de crecimiento, las tasas reproductivas y la supervivencia de los anfípodos. A esto se suma que el CG también afectaría la abundancia y la calidad nutricional de las macroalgas, un factor que, en el caso de *Ulva* spp., podría estar vinculado -al menos en parte- con la dinámica estacional de la abundancia y el crecimiento de *A. valida*. Por otra parte, la correlación observada entre la abundancia de *A. valida* y la de otras especies de crustáceos en el intermareal alto sugiere que las dinámicas poblacionales de estas especies están determinadas por factores ambientales similares, principalmente las condiciones abióticas dominantes. En consecuencia, los efectos potenciales del CG sobre *A. valida* podrían también reflejarse en otras especies de crustáceos que habitan los intermareales de la costa patagónica.

## **Capítulo 3:**

**Efectos individuales del aumento de la temperatura, la acidificación y los cambios en los niveles de radiación solar sobre las tasas de respiración de *Ampithoe valida***

### 3.1. Introducción

Las áreas intermareales de las zonas templadas se caracterizan por drásticas fluctuaciones en las condiciones físico-químicas, como la temperatura, el pH y la radiación solar, tanto a lo largo del ciclo de mareas como entre estaciones (Thompson et al., 2002; Helmuth et al., 2006; Pulgar et al., 2017). Los organismos que habitan estos ambientes presentan una alta capacidad de adaptación a dichas fluctuaciones y una amplia tolerancia al estrés abiótico, por lo que constituyen modelos biológicos adecuados para estudiar los efectos de distintos procesos asociados al CG (Helmuth et al., 2006, Mieszkowska, 2025). Como se describió en el Capítulo I de esta tesis, el CG está provocando múltiples alteraciones en las condiciones físico-químicas de los ambientes marinos, entre los que se destacan incrementos en las temperaturas superficiales oceánicas -con predicciones de aumento de entre 2 °C y 4 °C para finales del presente siglo bajo el escenario SSP5-8.5 (Fox-Kemper et al., 2021), una disminución del pH oceánico de entre 0,3 y 0,4 para el mismo período (Bindoff et al., 2019), y cambios en la cantidad de la radiación solar que penetra en la columna de agua (Bais et al., 2019; Tang et al., 2019; Williamson et al., 2019). En consecuencia, se prevé que el CG intensifique el estrés ambiental característico de los intermareales, afectando significativamente a las especies que los habitan (Thompson et al., 2002; Harley et al., 2006; Mieszkowska, 2025).

Numerosos estudios han evaluado experimentalmente los impactos de las variables asociadas al CG sobre los organismos intermareales -en particular sobre crustáceos-, reportando efectos directos a corto plazo en la fisiología, los procesos metabólicos, el balance energético y el comportamiento (e.g.; Alenius, 2012; Valiñas & Helbling, 2015; Scheffler et al., 2019). Se ha observado que la magnitud de estas respuestas varía estacionalmente, dependiendo tanto de la intensidad de las variables de estrés como de la capacidad de aclimatación de cada especie (Hopkin et al., 2006; Crickenberger et al., 2015; Vargas et al., 2017; Semsar-kazerouni & Verberk, 2018). Por ejemplo, algunas especies de crustáceos exhiben una mayor tolerancia térmica en verano que en invierno; sin embargo, bajo un escenario de CG, su capacidad de aclimatación frente a un incremento de temperatura podría ser más limitada en la época estival en comparación con la invernal (Hopkin et al., 2006; Semsar-kazerouni & Verberk, 2018). Sumado a esto, el estrés térmico experimentado durante la marea baja diurna alcanza sus valores máximos en primavera y

verano (Helmuth & Hofmann, 2001), lo que refuerza la necesidad de incorporar estas fluctuaciones en los enfoques experimentales. Considerar la variabilidad natural de la temperatura puede modificar sustancialmente la interpretación de las respuestas de los organismos ante escenarios de CG (Helmuth & Hofmann, 2001; Semsar-kazerouni & Verberk, 2018).

En cuanto al efecto de la acidificación, se sabe que los mecanismos fisiológicos relacionados que mantienen la homeostasis ácido-base en los crustáceos -como la concentración de bicarbonato y el pH de la hemolinfa - dependen de la temperatura ambiental (Henry & Wheatly, 1992; Qadri et al., 2007). Por ello, la magnitud del impacto de la acidificación sobre los procesos fisiológicos puede variar a lo largo del año (Augusto et al., 2018). Por otro lado, diversos estudios demostraron que niveles elevados de radiación solar, tanto RUV como PAR, pueden constituir un factor de estrés para muchas especies de crustáceos, generando incrementos en las tasas de respiración, depresión metabólica y aumentos en la concentración de lactato en la hemolinfa (Fanjul-Moles et al., 1998; Fischer et al., 2006; Obermüller, 2007). No obstante, la mayoría de estos estudios se realizaron bajo condiciones de radiación artificial, utilizando niveles equivalentes o incluso superiores a los registrados naturalmente durante el verano, sin considerar las fluctuaciones naturales ni la variabilidad estacional en la intensidad y la composición espectral de la radiación. Para evaluar de manera realista el impacto de las variables asociadas al CG, resulta fundamental comparar la respuesta de los organismos entre estaciones, incorporando las fluctuaciones naturales de las variables de interés. Sin embargo, la información disponible sobre los efectos estacionales de estas variables sigue siendo escasa, lo que limita la comprensión de los mecanismos de respuesta fisiológica de los organismos intermareales frente a escenarios de CG.

Un indicador sensible del impacto de las variables asociadas al CG sobre los organismos, es la alteración de sus tasas metabólicas. Estas alteraciones pueden evaluarse de manera indirecta a través de la tasa de respiración, la cual refleja el consumo de oxígeno requerido para sostener los procesos metabólicos celulares, y por ende, la demanda energética total del organismo (e.g. Fischer et al., 2006; Valiñas & Helbling, 2016; Semsar-kazerouni & Verberk, 2018; Scheffler et al., 2019). La síntesis de ATP, que ocurre principalmente en las mitocondrias, depende de un suministro adecuado de oxígeno. Dado que funciones vitales tales como la locomoción, la digestión o la respuesta al estrés agudo aumentan la demanda

energética, los estudios ecofisiológicos suelen recurrir a la medición de la tasa metabólica basal (TMB). Esta se determina bajo condiciones controladas de inactividad y ayuno, y representa el gasto energético mínimo necesario para mantener las funciones fisiológicas básicas (Lemoine & Burkepile, 2012). Un aumento sostenido en la TMB puede ser indicativo de un mayor nivel de estrés fisiológico y una demanda energética incrementada, que, si se prolonga en el tiempo, puede conducir a un desequilibrio energético, comprometiendo procesos esenciales como el crecimiento, la reproducción y la supervivencia (Pörtner et al., 2004; Fischer et al., 2006; Hofmann & Todgham, 2010).

El presente capítulo tiene como objetivo evaluar, a lo largo de las cuatro estaciones del año, los efectos individuales a corto plazo de un aumento de temperatura (i.e., +3 °C), de acidificación (i.e. valor del pH -0,35) y cambios en los niveles de radiación solar (i.e., +50 %; -50 %) -variables afectadas por el CG- sobre las tasas de respiración de *Ampithoe valida*.

## **3.2. Materiales y Métodos**

### **3.2.1. Procedimiento experimental general**

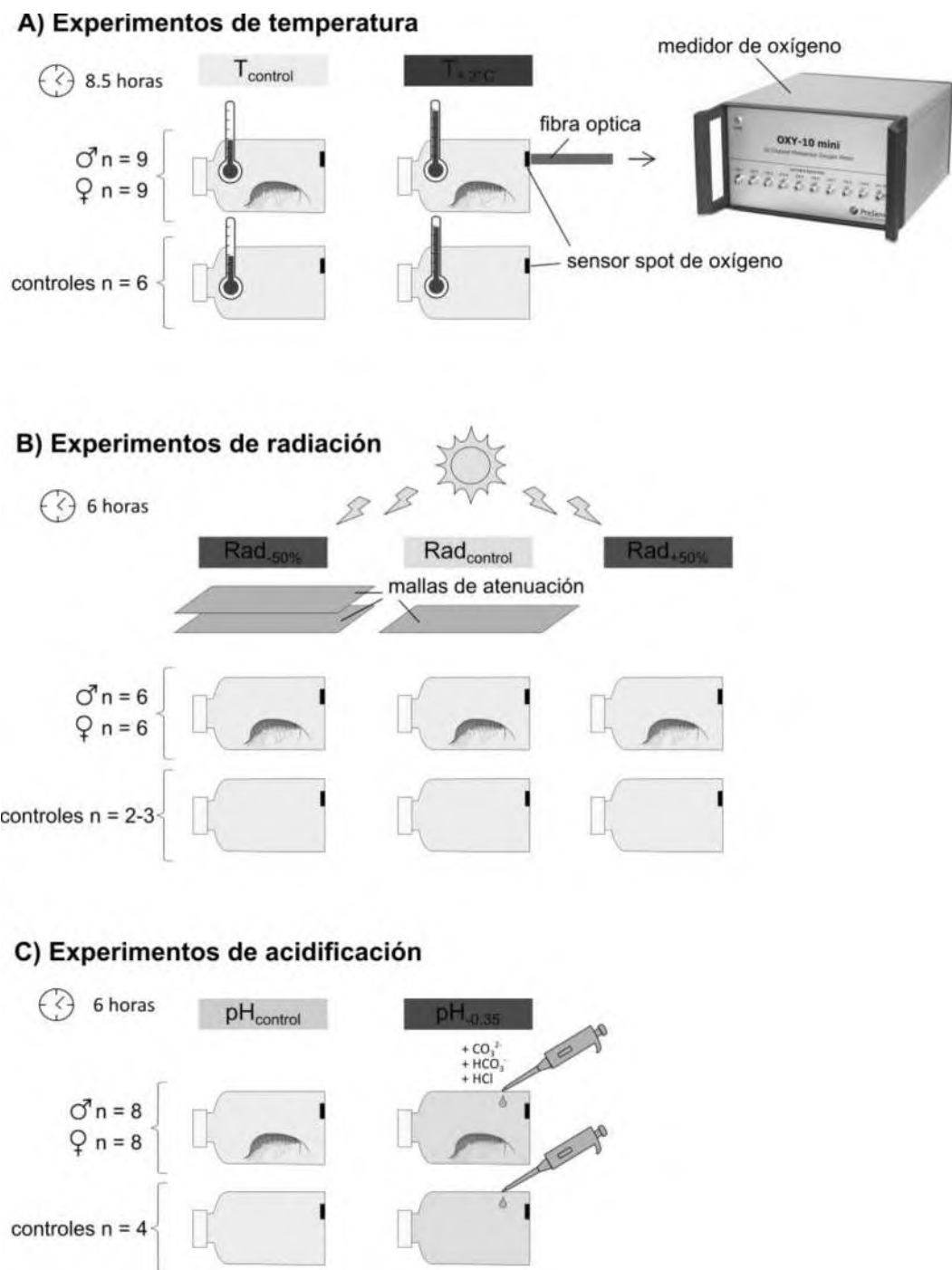
Se realizaron un total de 24 experimentos con el objetivo de evaluar el impacto de (I) un incremento de temperatura (de aquí en adelante: experimentos de temperatura), (II) cambios en los niveles de radiación solar (de aquí en adelante: experimentos de radiación) y (III) la acidificación (de aquí en adelante: experimentos de acidificación) en las tasas de respiración de (A) machos y (B) hembras de *A. valida* a lo largo de las cuatro estaciones del año: (a) invierno (agosto de 2018); (b) primavera (octubre de 2018); (c) verano (enero de 2019) y otoño (abril 2019). Los ejemplares utilizados en los experimentos fueron colectados en el intermareal alto de Playa Bonita (43°22'S – 65°03'W) dentro del complejo Magagna (ver Capítulo 1, sección 1.5.1) y trasladados a la Estación de Fotobiología Playa Unión (EFPU, 15 min del sitio de muestreo). En el laboratorio, los anfípodos se mantuvieron en recipientes plásticos llenos con agua de mar, con aireación constante, y fueron alimentados con *Ulva* spp. (Chlorophyceae) hasta el comienzo de cada experimento (máximo 7 días de mantenimiento en laboratorio). Durante la noche, los anfípodos se mantuvieron en oscuridad en una cámara de cultivo (Sanyo modelo MLR-350), a la temperatura del agua de mar registrada para cada estación (i.e.,  $T_{Mar}$ , invierno: 7 °C, primavera: 11 °C, verano: 18 °C, otoño: 14 °C). Durante el día, los recipientes conteniendo los anfípodos se mantuvieron al

aire libre, en las instalaciones externas de la EFPU, lo que permitió su exposición a las condiciones naturales de radiación y temperatura. Los fotoperiodos se ajustaron de acuerdo a la estación del año: 12 h luz: 12 h oscuridad en primavera y otoño, 14 h luz: 10 h oscuridad en verano y 10 h luz: 14 h oscuridad en invierno.

El día previo al inicio de cada experimento, los anfípodos adultos se separaron por sexo y se mantuvieron en ayuno durante la noche (i.e., entre 14 - 18 h) para asegurar el vaciado de sus tractos digestivos. En cada estación se seleccionaron los individuos de mayor tamaño (ver Tabla 3.1). En el caso de las hembras, no se diferenciaron entre ovígeras y no ovígeras. Cada anfípodo se colocó individualmente en botellas de teflón de 42 mL (transparentes a la RUV), equipadas con un sensor spot de oxígeno (SP-PSt3-NAU-D5-YOP). Las botellas se llenaron con agua de mar autoclavada y se cerraron herméticamente, evitando la formación de burbujas. La concentración de oxígeno se midió de manera no invasiva utilizando un sistema de optodes con fibras ópticas (Minioxy-10 Presens GmbH, Alemania, Fig. 3.1A). Los datos fueron registrados utilizando el software Oxyview 6.02. Previo a cada experimento, el sistema fue calibrado, utilizando una calibración de dos puntos para una saturación de oxígeno de 100 % y 0 %, a la temperatura y presión atmosférica deseadas. Simultáneamente, se incubaron botellas control con agua autoclavada sin anfípodos, para monitorear cambios en la concentración de oxígeno debidas a posibles variaciones en la temperatura durante la exposición (Fig. 3.1 A-C). La duración de las mediciones osciló entre 6 y 8,5 horas, con registros cada 1 - 2 horas, según la variable considerada (ver detalles en las secciones subsiguientes). Al finalizar cada experimento, se determinó el peso húmedo de cada individuo. En el caso de las hembras, este valor se obtuvo luego de remover los huevos y/o juveniles del marsupio.

**Tabla 3.1** Peso húmedo ( $\pm$  DE) de los anfípodos utilizados en los experimentos realizados en las cuatro estaciones.

		<b>Invierno</b>	<b>Primavera</b>	<b>Verano</b>	<b>Otoño</b>
Peso húmedo por individuo (mg)	Machos	21,6 $\pm$ 7,2	19,7 $\pm$ 3,6	15,4 $\pm$ 2,7	12,0 $\pm$ 2,6
	Hembras	17,4 $\pm$ 5,6	21,7 $\pm$ 4,0	15,8 $\pm$ 4,0	14,8 $\pm$ 3,5



**Fig. 3.1** Representación esquemática de los experimentos de efectos individuales (no a escala). (A) Experimentos de temperatura, (B) Experimentos de radiación, (C) Experimentos de acidificación. En (A) se muestra el esquema general de medición de oxígeno no invasivo utilizando un medidor de oxígeno equipado con un sistema de optodes.

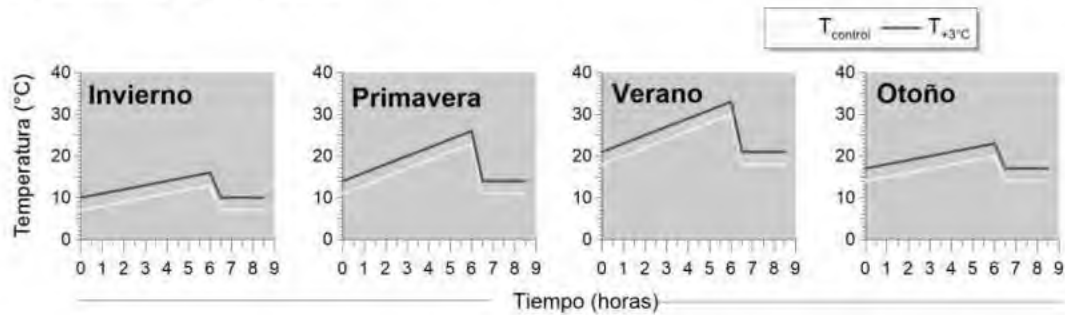
### 3.2.2. Experimentos de temperatura

Para evaluar los efectos de un aumento de temperatura sobre las tasas de respiración de *A. valida*, los anfípodos fueron incubados bajo dos tratamientos (Fig. 3.1 A): (a)  $T_{\text{control}}$ : que reprodujo las condiciones de temperatura registradas en el ambiente, y (b)  $T_{+3^{\circ}\text{C}}$ : en el cual la temperatura fue incrementada en  $3^{\circ}\text{C}$  respecto al tratamiento  $T_{\text{control}}$ . En ambos tratamientos, se simularon las fluctuaciones de temperatura características de una marea baja centrada en el mediodía local, con una duración promedio de 6 horas, seguida de una disminución abrupta de la temperatura a los valores iniciales al regresar la marea, alcanzando un tiempo total de exposición de 8,5 horas (Fig. 3.2).

Para determinar el rango de temperatura del tratamiento  $T_{\text{control}}$ , se colocaron data loggers (ELV WTDL1, Alemania) en pozas de marea seleccionadas al azar durante 5 días consecutivos previos al inicio de cada experimento. A partir de los datos obtenidos se estimó la temperatura promedio del agua de mar durante la marea alta ( $T_{\text{Mar}}$ ) y la temperatura máxima alcanzada durante la marea baja ( $T_{\text{max}}$ ). En función de estos valores la temperatura del tratamiento  $T_{+3^{\circ}\text{C}}$  se incrementó en  $3^{\circ}\text{C}$ , respecto a la  $T_{\text{control}}$ . De este modo, se utilizaron los siguientes rangos de temperatura durante la simulación de la marea baja (Fig. 3.2): (a) invierno:  $7 - 13^{\circ}\text{C}$  ( $T_{\text{control}}$ ) y  $10 - 16^{\circ}\text{C}$  ( $T_{+3^{\circ}\text{C}}$ ); (b) primavera:  $11 - 23^{\circ}\text{C}$  ( $T_{\text{control}}$ ) y  $14 - 26^{\circ}\text{C}$  ( $T_{+3^{\circ}\text{C}}$ ); (c) verano:  $18 - 30^{\circ}\text{C}$  ( $T_{\text{control}}$ ) y  $21 - 33^{\circ}\text{C}$  ( $T_{+3^{\circ}\text{C}}$ ); (d) otoño:  $14 - 20^{\circ}\text{C}$  ( $T_{\text{control}}$ ) y  $17 - 23^{\circ}\text{C}$  ( $T_{+3^{\circ}\text{C}}$ ).

Durante los experimentos, las botellas conteniendo los anfípodos y las botellas control, se mantuvieron en condiciones de oscuridad dentro de una cámara de cultivo con control de temperatura (Sanyo modelo MLR-350). Durante la simulación de la marea baja, la temperatura se ajustó manualmente cada hora, (i.e., incremento de  $1^{\circ}\text{C}$  por hora en invierno y otoño, y de  $2^{\circ}\text{C}$  por hora en primavera y verano; Fig. 3.2), reproduciendo la tasa de aumento de temperatura observada en el ambiente a partir de los registros obtenidos con los data loggers. Para lograr una caída rápida de la temperatura tras la fase de marea baja, las botellas se transfirieron inmediatamente a un baño de agua a  $T_{\text{Mar}}$  o  $T_{\text{Mar}} + 3^{\circ}\text{C}$ , según el tratamiento que correspondiera. El experimento contó con un total de 9 réplicas por tratamiento y sexo. En el caso de las botellas control (agua de mar autoclavada sin anfípodos), se realizaron 6 réplicas por cada tratamiento de temperatura (Fig. 3.1 A). La concentración de oxígeno se midió al inicio de la incubación y a las 2, 4, 6, 6,5 y 8,5 horas.

Por cuestiones logísticas, los experimentos se llevaron a cabo en distintos días para cada tratamiento de temperatura.

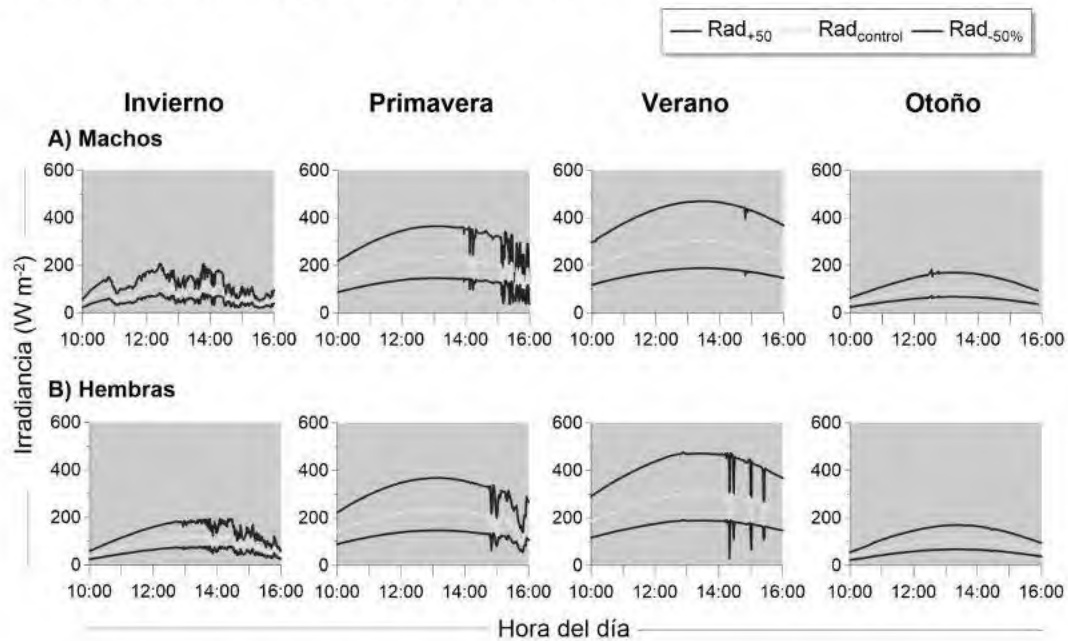


**Fig. 3.2** Condiciones de temperatura durante la incubación de los anfípodos en los tratamientos  $T_{control}$  (amarillo) y  $T_{+3°C}$  (rojo) en los experimentos realizados a lo largo de las cuatro estaciones.

### 3.2.3. Experimentos de radiación

Con el objetivo de evaluar la respuesta de los anfípodos frente a distintos niveles de radiación solar, los individuos fueron incubados bajo tres condiciones de irradiancia (Fig. 3.1 B, Fig. 3.3): (a)  $Rad_{control}$ : recipientes cubiertos con una malla de atenuación, en los cuales los anfípodos recibieron ~64 % de la radiación solar incidente, (b)  $Rad_{+50\%}$ : recipientes descubiertos, donde los organismos recibieron un 50 % más de irradiancia respecto al tratamiento  $Rad_{control}$ , y (c)  $Rad_{-50\%}$ : recipientes cubiertos con dos mallas de atenuación, en los cuales los individuos recibieron ~50 % menos irradiancia respecto del tratamiento  $Rad_{control}$ . La irradiancia recibida en el tratamiento  $Rad_{control}$  representó los niveles promedio estimados para una columna de agua de ~1 m de profundidad, calculados a partir de coeficientes de atenuación representativos de zonas costeras patagónicas durante el verano ( $K_{RUV-B}$ :  $1,27\ m^{-1}$ ,  $K_{RUV-A}$ :  $0,66\ m^{-1}$ ;  $K_{PAR}$ :  $0,31\ m^{-1}$ ; Helbling et al., 2005). Los individuos fueron expuestos a las condiciones mencionadas anteriormente durante 6 horas, desde las 10:00 am hasta las 4:00 pm. El experimento contó con un total de 6 réplicas por tratamiento de luz y sexo. Adicionalmente, se incorporaron botellas control sin anfípodos para los tratamientos  $Rad_{+50\%}$  y  $Rad_{-50\%}$  ( $n = 3$  por tratamiento), que se utilizaron para monitorear posibles cambios en la concentración de oxígeno derivados de variaciones en la temperatura durante la incubación (Fig. 3.1 B). Para el tratamiento  $Rad_{control}$ , se utilizaron solo dos réplicas debido a la limitación en la cantidad de botellas disponibles.

Las botellas se mantuvieron en un baño de agua a la temperatura  $T_{Mar}$  correspondiente a los meses en los que se llevaron a cabo los experimentos (i.e., invierno: 7 °C, primavera: 11 °C, verano: 18 °C, otoño: 14 °C). La concentración de oxígeno se midió al inicio de la exposición y luego de 1, 3, 5 y 6 horas. Durante todo el período experimental, la radiación solar (PAR, RUV-A y RUV-B) fue monitoreada de manera continua (a intervalos de un minuto) mediante un radiómetro de banda ancha (European Light dosimeter Network; ELDONET; Real Time Computers Inc., Möhrendorf Alemania), instalado de forma permanente en el techo de la EFPU (Häder et al., 2007). Por cuestiones logísticas, los experimentos se llevaron a cabo en días distintos para machos y hembras.



**Fig. 3.3** Condiciones de radiación en los tratamientos  $Rad_{+50\%}$  (violeta),  $Rad_{control}$  (celeste) y  $Rad_{-50\%}$  (azul) durante los experimentos realizados con machos (A) y hembras (B) de *A. valida* a lo largo de las cuatro estaciones.

### 3.2.4. Experimentos de acidificación

Para evaluar el efecto de la acidificación sobre las tasas de respiración de *A. valida*, los anfípodos fueron expuestos a los siguientes tratamientos (Fig. 3.1 C, Tabla 3.2): (a)  $pH_{control}$ : anfípodos incubados en agua de mar en las condiciones tal y como se encontraba en el ambiente natural (i.e., condiciones *in situ*); (b)  $pH_{-0.35}$ : anfípodos incubados en agua de mar cuyo pH fue reducido  $\sim 0,35$  unidades respecto al tratamiento  $pH_{control}$ . Para lograr las

condiciones de pH del tratamiento pH<sub>-0,35</sub>, se agregaron al agua de mar, CO<sub>3</sub><sup>2-</sup> (en forma de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>), HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> (en forma de NaHCO<sub>3</sub>) y HCl (0,1 N), siguiendo la metodología descrita en Gattuso et al., 2010. El experimento contó con un total de 8 réplicas por tratamiento y sexo, a las que se sumaron 4 botellas control sin anfípodos por cada tratamiento de pH, utilizadas para monitorear posibles cambios en la concentración de oxígeno derivados de variaciones en la temperatura durante la incubación. El tiempo de exposición fue de 6 horas, durante las cuales las botellas con los anfípodos y las botellas control se mantuvieron en oscuridad, dentro de una cámara de cultivo (Sanyo modelo MLR-350) a la temperatura T<sub>Mar</sub> correspondiente a cada estación. La concentración de oxígeno se midió al inicio del experimento y a intervalos de 1 - 2 horas a lo largo de la exposición.

**Tabla 3.2** Condiciones de pH en los tratamientos pH<sub>control</sub> y pH<sub>-0,35</sub> durante los experimentos de acidificación para machos y hembras en las cuatro estaciones.

		Invierno	Primavera	Verano	Otoño
Machos	pH <sub>control</sub>	8,31	8,14	8,11	8,03
	pH <sub>-0,35</sub>	7,90	7,78	7,76	7,67
Hembras	pH <sub>control</sub>	8,30	8,20	8,01	7,97
	pH <sub>-0,35</sub>	7,90	7,83	7,66	7,62

### 3.2.5. Análisis de datos

Los análisis estadísticos se realizaron por separado para machos y hembras, utilizando el software R (R Core Team, 2020). Las tasas de respiración se estimaron mediante análisis de regresión. Dado que se detectaron diferencias en los tamaños de los individuos entre estaciones (ANOVA,  $p < 0,05$  para ambos sexos), las tasas de respiración fueron estandarizadas por el peso húmedo de los individuos y expresadas en  $\mu\text{g}$  de oxígeno por  $\text{mg}$  de peso húmedo por hora ( $\mu\text{g}$  de O<sub>2</sub>  $\text{mg}^{-1}$   $\text{h}^{-1}$ ). Las réplicas en las que se observó la presencia de mudas o individuos muertos al finalizar las mediciones fueron descartadas de los análisis. En cada experimento, las tasas de respiración se compararon entre tratamientos y estaciones mediante ANOVA de dos vías. En caso de detectarse diferencias significativas, se aplicaron pruebas de comparaciones múltiples *a posteriori* utilizando el test de Tukey. Los supuestos

de normalidad y homocedasticidad se evaluaron mediante los tests de Shapiro-Wilk y Levene, respectivamente (Zar, 1999). En aquellos casos en los que dichos supuestos no se cumplieron, incluso luego de transformar los datos, se aplicó la versión permutada de la estadística tipo Wald (WTPS) implementada en el paquete GFD para diseños factoriales generales (Friedrich et al., 2017) del programa estadístico R (R Core Team, 2020). Este método es robusto frente a la falta de normalidad y homocedasticidad (Friedrich et al., 2017) y resulta apropiado para diseños con bajo número de réplicas (Pauly et al., 2015). En los casos en los que se detectaron diferencias significativas, se llevaron a cabo comparaciones múltiples no paramétricas *post hoc* utilizando el paquete nparcomp (Konietschke et al., 2015).

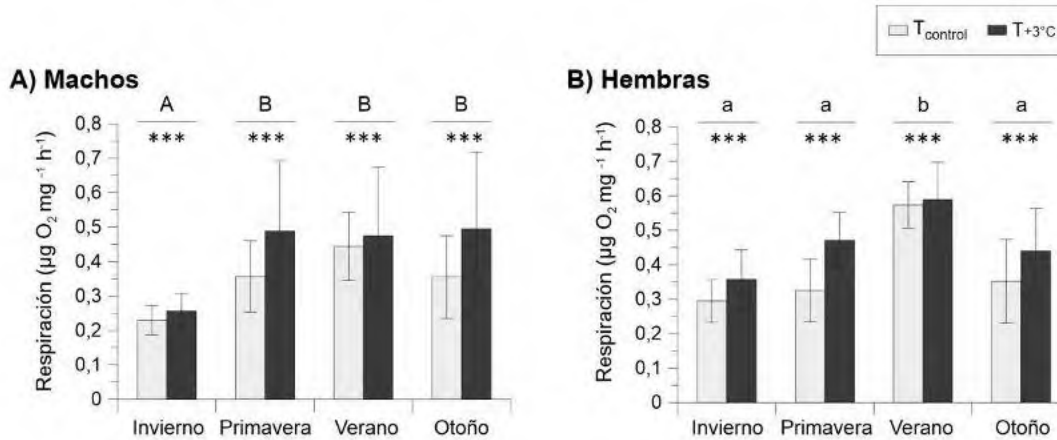
### **3.3. Resultados**

#### **3.3.1. Experimentos de temperatura**

La Figura 3.4 muestra las tasas de respiración de machos y hembras de *A. valida* bajo los dos tratamientos de temperatura en los experimentos realizados a lo largo de las cuatro estaciones. Un incremento de temperatura de 3 °C provocó un aumento significativo en las tasas de respiración en ambos sexos, siendo este efecto más pronunciado en primavera y otoño (Tabla 3.3, Fig. 3.4 A y B). En primavera, las tasas de respiración fueron, en promedio, un 37 % mayores en  $T_{+3^{\circ}\text{C}}$  respecto de  $T_{\text{control}}$  en los machos, y un 44 % mayores en las hembras (Fig. 3.4 A y B). En otoño, las tasas aumentaron, en promedio, un 39 % y un 25 % en machos y hembras, respectivamente. En contraste, durante el verano se registraron incrementos más moderados, con valores promedio del 7 % en machos y del 3 % en hembras. En invierno, las tasas se incrementaron un 12 % y un 21 % en machos y hembras, respectivamente (Fig. 3.4 A y B).

Asimismo, se detectaron diferencias significativas en las tasas de respiración entre estaciones para ambos sexos (Tabla 3.3). En los machos, las tasas fueron significativamente más bajas en invierno, con valores promedio por debajo de  $0,26 \mu\text{g O}_2 \text{ mg}^{-1} \text{ h}^{-1}$  en ambos tratamientos de temperatura (Fig. 3.4 A). En las demás estaciones, las tasas de respiración no mostraron diferencias significativas y sus valores oscilaron entre  $0,36 \pm 0,12$  y  $0,50 \pm 0,22 \mu\text{g O}_2 \text{ mg}^{-1} \text{ h}^{-1}$  (Fig. 3.4 A). En las hembras, se observó un patrón general de aumento en las tasas de respiración desde el invierno hacia el verano (Fig. 3.4 B). Sin embargo, sólo

durante el verano se registraron diferencias significativas con respecto a las demás estaciones, alcanzando las tasas de respiración valores promedio de  $\sim 0,60 \mu\text{g O}_2 \text{ mg}^{-1} \text{ h}^{-1}$  en ambos tratamientos. En el resto de las estaciones, las tasas oscilaron entre  $0,29 \pm 0,06$  y  $0,47 \pm 0,08 \mu\text{g O}_2 \text{ mg}^{-1} \text{ h}^{-1}$  (Fig. 3.4 B).



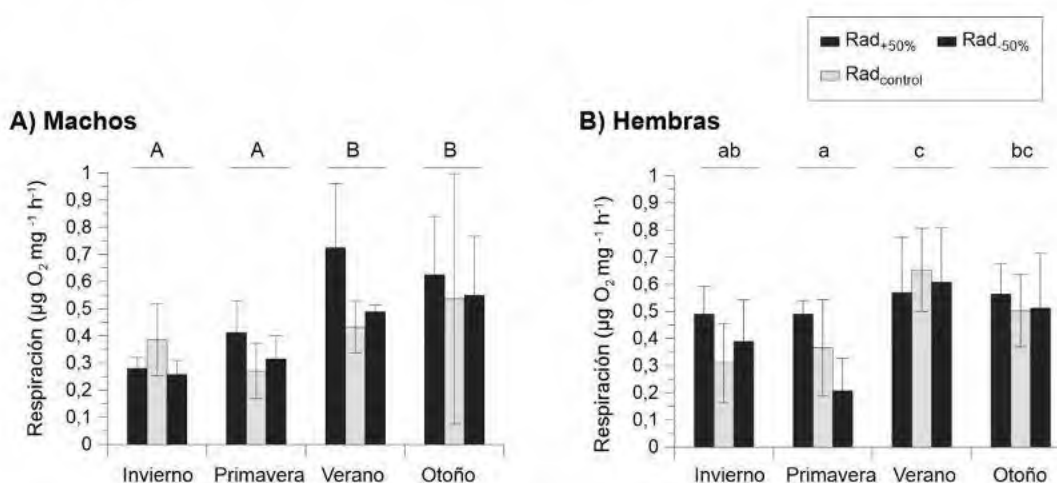
**Fig. 3.4** Tasas de respiración expresadas en  $\mu\text{g}$  de oxígeno consumido por peso húmedo por hora ( $\pm$  DE) de machos (A) y hembras (B) de *A. valida* bajo los dos tratamientos de temperatura a lo largo de las cuatro estaciones. Las letras indican diferencias significativas entre estaciones, mientras que los asteriscos señalan diferencias significativas entre los tratamientos  $T_{\text{control}}$  y  $T_{+3^\circ\text{C}}$ .

**Tabla 3.3** Resultado de los análisis estadísticos de las tasas de respiración de *A. valida* en función de la estación y el tratamiento de temperatura. Para los machos, se aplicó la versión permutada de la estadística tipo Wald (WTPS, Friedrich et al., 2017), mientras que para las hembras se utilizó un ANOVA de dos vías. Los asteriscos indican el nivel de significancia: \*:  $p < 0,5$ ; \*\*:  $p < 0,1$ ; \*\*\*:  $p < 0,001$ .

		W / F	df	p
Machos	Estación	48,37	3	< 0,001***
	Tratamiento	4,53	1	0,036*
	Estación x tratamiento	2,71	3	0,462
Hembras	Estación	17,47	3	< 0,001***
	Tratamiento	10,20	1	0,002**
	Estación x tratamiento	1,17	3	0,329

### 3.3.2. Experimentos de radiación

Tal como se observa en la Fig. 3.5, el aumento o la reducción en los niveles de radiación solar no tuvieron efectos significativos sobre las tasas de respiración de *A. valida* (Tabla 3.4). Sin embargo, se observó como patrón general un incremento en las tasas respiratorias de los anfípodos expuestos a los niveles más altos de irradiancia (Rad<sub>+50%</sub>), con excepción de los machos en invierno y las hembras en verano (Fig. 3.5 A y B). En algunos casos, se registró una alta variabilidad en los valores de las tasas de respiración, particularmente en los machos bajo el tratamiento Rad<sub>+50%</sub> en verano y bajo el tratamiento Rad<sub>control</sub> en otoño (Fig. 3.5 A).



**Fig. 3.5** Tasas de respiración expresadas en µg de oxígeno consumido por peso húmedo por hora (± DE) en machos (A) y hembras (B) de *A. valida* bajo los tres tratamientos de irradiancia en las cuatro estaciones. Las letras indican diferencias significativas entre estaciones.

De manera similar al patrón estacional observado en los experimentos de temperatura, las tasas de respiración de *A. valida* mostraron diferencias significativas entre estaciones, para ambos sexos (Tabla 3.4, Fig. 3.5 A y B). En los machos, durante invierno y primavera los valores promedio de consumo oxígeno en los tres tratamientos de irradiancia oscilaron entre  $0,26 \pm 0,05$  y  $0,41 \pm 0,12$  µg de O<sub>2</sub> mg<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>, siendo significativamente más bajos que en verano y otoño, donde alcanzaron valores entre  $0,43 \pm 0,09$  y  $0,72 \pm 0,24$  µg de O<sub>2</sub> mg<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> (Fig. 3.5A). En las hembras, las tasas de respiración más altas se registraron en verano y otoño, con valores promedio de consumo de oxígeno entre  $0,50 \pm 0,13$  µg de O<sub>2</sub> mg<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> y

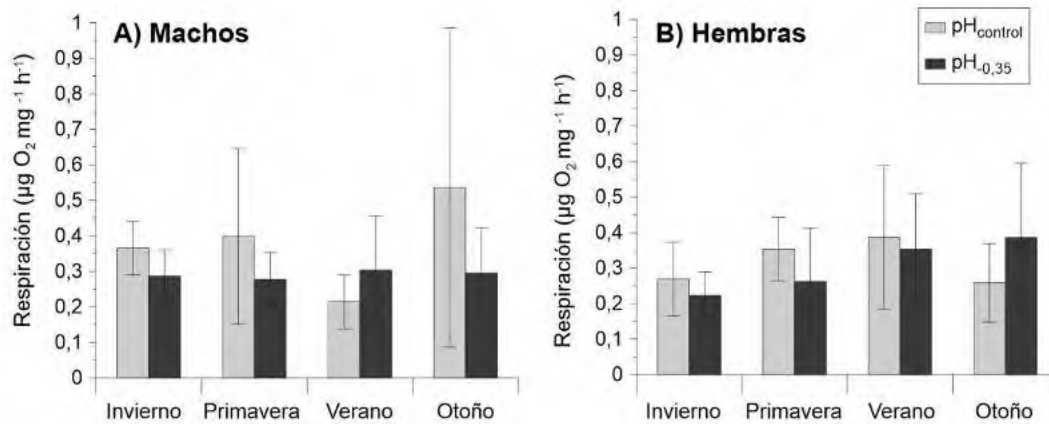
0,65 ± 0,15 µg de O<sub>2</sub> mg<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>. En contraste, durante invierno y primavera las tasas respiratorias no superaron los 0,49 ± 0,10 µg de O<sub>2</sub> mg<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> en ningún tratamiento (Fig. 3.5 B).

**Tabla 3.4** Resultado de los análisis estadísticos de las tasas de respiración de *A. valida* en función de la estación y el tratamiento en los experimentos de radiación. Para los machos, se aplicó la versión permutada de la estadística tipo Wald (WTPS, Friedrich et al., 2017), mientras que para las hembras se realizó un ANOVA de dos vías. Los asteriscos indican el nivel de significancia: \*: p < 0,5; \*\*: p < 0,1; \*\*\*: p < 0,001.

		<b>W / F</b>	<b>df</b>	<b>p</b>
Machos	Estación	36,25	3	< 0,001***
	Tratamiento	5,52	2	0,078
	Estación x tratamiento	12,06	6	0,134
Hembras	Estación	8,04	3	< 0,001***
	Tratamiento	1,98	2	0,148
	Estación x tratamiento	1,33	6	0,258

### 3.3.3. Experimentos de acidificación

En los experimentos de acidificación no se detectaron diferencias significativas en las tasas de respiración entre tratamientos ni entre estaciones (Fig. 3.6; Tabla 3.5). En los machos, las tasas de respiración variaron entre 0,21 ± 0,08 y 0,54 ± 0,50 µg de O<sub>2</sub> mg<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>, observándose una alta variabilidad entre réplicas, particularmente en el tratamiento pH<sub>control</sub>, durante los experimentos de primavera y otoño (Fig. 3.6 A). En las hembras, las tasas de respiración oscilaron entre 0,22 ± 0,07 y 0,39 ± 0,21 µg de O<sub>2</sub> mg<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> a lo largo de las estaciones, observándose un patrón general de incremento en los valores promedio desde el invierno hacia el verano (Fig. 3.6 B).



**Fig. 3.6** Tasas de respiración expresadas en µg de oxígeno consumido por peso húmedo por hora ( $\pm$  DE) en machos (A) y hembras (B) de *A. valida* bajo los dos tratamientos de acidificación en las cuatro estaciones.

**Tabla 3.5** Resultado de los análisis estadísticos de las tasas de respiración de *A. valida* en función de la estación y el tratamiento en los experimentos de acidificación. Para los machos, se aplicó la versión permutada de la estadística tipo Wald (WTPS, Friedrich et al., 2017), mientras que para las hembras se realizó un ANOVA de dos vías de los datos log-transformados. Los asteriscos indican el nivel de significancia: \*:  $p < 0,5$ ; \*\*:  $p < 0,1$ ; \*\*\*:  $p < 0,001$ .

		W / F	df	p
Machos	Estación	4,24	3	0,315
	Tratamiento	2,31	1	0,135
	Estación x tratamiento	6,07	3	0,119
Hembras	Estación	1,71	3	0,176
	Tratamiento	0,42	1	0,522
	Estación x tratamiento	1,54	3	0,215

### 3.4. Discusión

Los resultados de este capítulo mostraron que, como respuesta a corto plazo (i.e., horas) de un aumento de 3 °C en la temperatura *A. valida* incrementó sus tasas de respiración, mientras que cambios en los niveles de radiación solar o la acidificación no tuvieron un efecto significativo sobre los individuos. Asimismo, se observó un patrón consistente de mayores tasas de respiración durante el verano en comparación con el invierno, en ambos sexos y en al menos dos de las tres series de experimentos realizados. Cabe señalar que, si bien el diseño

experimental buscó estimar la tasa metabólica basal, minimizando la influencia de procesos transitorios como la digestión y las interacciones intraespecíficas, no fue posible descartar completamente la ocurrencia de actividad locomotora durante las mediciones. En consecuencia, las tasas de respiración registradas podrían estar parcialmente afectadas por variaciones en los niveles de actividad espontánea de los individuos. Por su parte, en el caso de las hembras cabe aclarar que aproximadamente un 78% de los individuos portaron huevos y/o juveniles en diferentes estados de desarrollo en el marsupio, lo cual puede haber agregado una variabilidad adicional a los datos obtenidos. Por un lado, la tasa de respiración de los individuos ovígeros sería la suma de la respiración de la hembra y la progenie, por lo cual los valores determinados podrían estar sobreestimados. Por otro lado, el cuidado de la progenie en el marsupio puede representar un gasto energético adicional para las hembras, por lo cual su TBM puede haber estado alterada comparado con la de las hembras no ovígeras (Fernández et al., 2020). Sin embargo, no resultó posible realizar el experimento solo utilizando hembras no ovígeras, ya que el porcentaje de las mismas en el total de las hembras maduras suele ser muy bajo (~25%, Alonso et al., 1995). Además, un tratado previo de las hembras para remover la progenie del marsupio antes de realizar los experimentos hubiese representado un factor de estrés demasiado alto, agregando otra fuente de error a las mediciones de respiración. Por lo tanto, se optó por utilizar hembras al azar como la mejor aproximación. A continuación, se discuten en detalle los resultados obtenidos en los experimentos de temperatura, radiación solar y acidificación que forman parte del presente capítulo.

### **3.4.1. Efectos de un aumento de temperatura**

La temperatura constituye un factor ambiental clave para los organismos ectotermos, dado que regula una amplia gama de procesos fisiológicos esenciales, como la actividad enzimática, la tasa metabólica, el desarrollo ontogénico y el crecimiento (Pörtner, 2001). Los resultados del presente capítulo mostraron que un incremento de 3 °C en la temperatura provocó un aumento significativo en las tasas de respiración de *A. valida*. Esta especie es de distribución cosmopolita (ver Capítulo 1, sección 1.4.2) y presenta un amplio rango de tolerancia térmica (Barrett, 1966; Zheng et al., 2013; Faasse, 2015). En el área de estudio, los individuos están expuestos a marcadas fluctuaciones térmicas, con valores que oscilan

entre 0 °C y más de 30 °C a lo largo del año, y variaciones de hasta 20 °C en pocas horas como consecuencia del régimen de mareas (ver Capítulo 2, sección 2.3.1).

El aumento observado en las tasas de respiración en el tratamiento  $T_{+3^{\circ}\text{C}}$  concuerda con estudios previos que demuestran la capacidad de los organismos intermareales para ajustar rápidamente su metabolismo frente a incrementos agudos de temperatura (Gee, 1985, Scheffler et al., 2019). Si bien el efecto del incremento de temperatura se evidenció en todas las estaciones, su magnitud mostró una marcada variación estacional, siendo menos pronunciada durante el verano. Estudios previos documentaron un patrón similar en copépodos intermareales, donde el aumento en las tasas de respiración frente a un incremento de 5 °C fue considerablemente menor a temperaturas elevadas que a temperaturas más bajas (Gee, 1985). Por su parte, en la centolla *Maja squinado* se ha observado que las tasas respiratorias aumentaron con la temperatura hasta alcanzar un umbral térmico óptimo, a partir del cual el incremento se ralentiza (Frederich & Pörtner, 2000). Este umbral fisiológico marcaría un punto crítico, más allá del cual se produce un desajuste entre la demanda de oxígeno del organismo y su capacidad para satisfacerla. Así, la tolerancia térmica de los organismos estaría limitada por la disponibilidad de oxígeno a nivel sistémico (Pörtner, 2001; Semsar-kazerouni & Verberk, 2018). En el caso de *A. valida*, es probable que, durante los experimentos de verano, los individuos hayan alcanzado su umbral térmico, lo que habría limitado su capacidad para ajustar las tasas metabólicas frente a un incremento adicional de temperatura. Este resultado coincide con estudios previos que indican que especies con amplio rango de tolerancia térmica, como las que habitan zonas intermareales, enfrentan temperaturas cercanas a su umbral crítico de termotolerancia durante el verano, aumentando así su vulnerabilidad frente a escenarios de calentamiento global (Stillman, 2003; Hopkin et al., 2006).

La respuesta fisiológica de una especie frente a cambios en la temperatura depende de su capacidad de aclimatación y de su historia térmica previa (Brockington & Clarke, 2001; Doyle et al., 2012; Crickenberger et al., 2015). Durante el proceso de aclimatación, el organismo experimenta múltiples cambios en sus condiciones fisiológicas, como la expresión de proteínas de choque térmico (Roberts et al., 1997), modificaciones en la composición y afinidad de la hemolinfa por el oxígeno (Whiteley et al., 1997) y alteraciones en la estructura de las membranas celulares (Pruitt, 1990). Estos cambios modulan tanto los

requerimientos energéticos del organismo, como su rango de tolerancia y capacidad de respuesta frente a fluctuaciones de la temperatura. En el presente capítulo, la mayor amplitud de respuesta a los tratamientos de temperatura se registró en primavera y otoño. Estas estaciones representan períodos de transición entre las condiciones térmicas más extremas del ciclo anual (i.e., verano e invierno) y se caracterizan por marcados cambios en la temperatura. En la zona de estudio, la temperatura media del agua de mar puede variar hasta 5 °C entre meses consecutivos durante otoño y primavera, mientras que en invierno y verano los cambios mensuales, por lo general, no superan los 2 °C (Capítulo 2, sección 2.3.1; Bermejo et al., 2018). La mayor amplitud de respuesta observada en otoño y primavera podría reflejar una mayor plasticidad fisiológica asociada a procesos de aclimatación frente a la transición entre condiciones invernales y estivales.

### **3.4.2. Efectos de cambios en los niveles de radiación solar**

La duración, intensidad y composición espectral de la radiación solar constituyen señales ambientales clave para los organismos acuáticos, que actúan como reguladores de diversos procesos fisiológicos y conductuales, como los ritmos circadianos y estacionales de actividad (Williams, 1980; Teschke et al., 2007). Por otro lado, la RUV (280 nm - 400 nm), especialmente la RUV-B (280 nm - 315 nm), representa un importante factor de estrés para las especies que habitan aguas someras, ya que puede inducir daños a nivel celular en el ADN, las proteínas y las membranas, generando efectos adversos como el aumento en el metabolismo basal, la reducción del crecimiento y una menor tasa de supervivencia (Häder et al., 2011). Los resultados de este capítulo mostraron que, a corto plazo, ni el aumento ni la disminución en los niveles de radiación solar afectaron significativamente las tasas de respiración de *A. valida*. Sin embargo, se observó una tendencia general hacia tasas de respiración más elevadas bajo condiciones de radiación incrementada (Rad<sub>+50%</sub>), con excepción de los machos en invierno y las hembras en verano.

Las tasas de respiración de los machos mostraron una elevada variabilidad, especialmente durante los experimentos de verano y otoño. Estudios previos reportaron una alta variabilidad intraespecífica en marcadores de estrés oxidativo en anfípodos antárticos recién capturados, sugiriendo que esta variabilidad podría favorecer la capacidad ecofisiológica de la especie para adaptarse a fluctuaciones en las condiciones ambientales, como los niveles

de RUV (Obermüller et al., 2005). De manera similar, se ha reportado un aumento en la amplitud y variabilidad de las tasas de respiración tras la exposición de anfípodos a RUV, interpretando estas respuestas como reflejo de una mayor actividad locomotora (i.e., respuesta de escape), y de la activación de mecanismos de reparación celular frente al daño inducido por la radiación (Obermüller et al., 2007). Si bien en los experimentos del presente capítulo no se registró la actividad locomotora de los anfípodos, observaciones realizadas en el marco de esta tesis y en estudios previos han mostrado una marcada variabilidad intraespecífica en la movilidad de *A. valida*, lo que podría contribuir -al menos parcialmente- a la variabilidad observada en las tasas de respiración. Esta alta variabilidad podría, a su vez, haber enmascarado diferencias entre tratamientos, limitando la detección de efectos significativos de la radiación solar.

En los machos, las tasas de respiración promedio bajo el tratamiento Rad<sub>+50%</sub> durante el experimento de verano superaron las registradas en los experimentos de temperatura y de acidificación correspondientes a la misma estación por un factor de ~1,6 y ~2,8, respectivamente. Este incremento podría estar relacionado con la activación de mecanismos enzimáticos de reparación del ADN frente a los potenciales daños inducidos por la exposición a niveles elevados de RUV (Fischer et al., 2006). Dichos mecanismos pueden estar acelerados bajo condiciones de elevadas temperaturas como las que experimentan los organismos en los meses de verano (Williamson et al., 2002). Así, la combinación de altos niveles de RUV en el tratamiento Rad<sub>+50%</sub> y de temperaturas naturalmente elevadas de la estación podrían haber actuado de manera sinérgica, potenciando las tasas de respiración en los machos de *A. valida*.

### **3.4.3. Efectos de la acidificación**

La acidificación oceánica modifica la química del carbono en el agua, aumentando la concentración de CO<sub>2</sub> disuelto y reduciendo tanto el pH como la saturación de carbonato de calcio (Doney et al., 2009). Estos cambios afectan diversos procesos fisiológicos en los crustáceos (Pörtner et al., 2004; Whiteley, 2011). Sin embargo, muchas especies poseen mecanismos de regulación que les permiten mantener la homeostasis en la hemolinfa, entre los que se destaca el intercambio iónico a través del epitelio branquial (Pörtner et al., 2004; Whiteley, 2011). Estos procesos compensatorios implican ajustes metabólicos que pueden

incrementar la demanda energética y, en consecuencia, las tasas de respiración, incluso en escalas temporales cortas. No obstante, tales respuestas son especie-específica y dependen del valor absoluto de pH al que los organismos son expuestos. Por ejemplo, estudios previos observaron un incremento en las tasas de respiración de juveniles de cangrejos reales (*Paralithodes camtschaticus*, *P. platypus*) durante la primera hora de exposición a condiciones de acidificación extrema (i.e., pH 7,5), aunque no detectaron cambios bajo condiciones de acidificación moderada (i.e., pH 7,8) (Long et al., 2019). Otros autores propusieron que los efectos fisiológicos de la acidificación oceánica se intensifican a medida que los niveles experimentales de pCO<sub>2</sub> se alejan de los rangos extremos a los que los organismos están naturalmente expuestos (Vargas et al., 2017). Muchos organismos marino-costeros, particularmente aquellos que habitan ambientes intermareales, experimentan naturalmente grandes fluctuaciones de pCO<sub>2</sub>, que incluyen episodios frecuentes de acidificación extrema (Alenius, 2012). Por ejemplo, en las zonas media y alta del intermareal, el pH en las pozas de marea puede descender hasta 0,5 unidades durante las mareas bajas nocturnas debido a la actividad respiratoria de los organismos (Wolfe et al., 2020). En las pozas de marea de Playa Bonita, área de estudio de esta tesis, se registraron valores de pH cercanos a 7,9 antes del amanecer durante la marea baja, es decir 0,11 unidades por debajo del pH del agua de mar en marea alta para ese mismo período (observación personal). Por lo tanto, las condiciones simuladas en el tratamiento pH<sub>-0,35</sub> probablemente no hayan representado un nivel de estrés fisiológico relevante para los anfipodos, lo que explicaría la ausencia de diferencias significativas entre tratamientos.

#### **3.4.4. Patrones estacionales**

En los experimentos de temperatura y radiación se observaron diferencias significativas en las tasas de respiración entre estaciones, independientemente del escenario experimental simulado. En general, tanto en machos como en hembras de *A. valida*, las tasas de respiración aumentaron progresivamente con la temperatura del agua de mar a lo largo de las estaciones. En contraste, en los experimentos de acidificación, las tasas de respiración de los anfipodos no difirieron significativamente entre estaciones. Una posible explicación para estos resultados radica en las diferencias en las condiciones experimentales. Mientras que los experimentos de acidificación se realizaron en cámara bajo condiciones controladas de

oscuridad y temperatura constante, los experimentos de temperatura y radiación se llevaron a cabo bajo condiciones ambientales fluctuantes, simulando los cambios ambientales naturales asociados al ciclo de marea. Estudios previos demostraron que las condiciones ambientales fluctuantes generan mayores niveles de estrés en organismos intermareales que las condiciones estables (Alenius, 2012). Por lo tanto, las diferencias estacionales en las tasas de respiración de los anfípodos podrían estar determinadas no solo por diferencias en la temperatura del agua de mar, sino también por la magnitud de las fluctuaciones de temperatura a corto plazo, los niveles de radiación solar, o por la interacción entre estos factores.

### **3.5. Conclusiones**

Los resultados de este capítulo mostraron que un aumento de temperatura de 3 °C incrementó las tasas de respiración de machos y hembras de *A. valida* en el corto plazo (i.e., horas), mientras que la acidificación y los cambios en los niveles de radiación solar no provocaron efectos significativos. Si bien se observaron diferencias en las tasas de respiración entre tratamientos de irradiancia, la elevada variabilidad entre réplicas puede haber enmascarado posibles efectos, dificultando la detección de diferencias estadísticamente significativas. Estos resultados sugieren que, bajo escenarios futuros de CG, el aumento de temperatura podría ejercer un impacto directo sobre *A. valida* al incrementar sus tasas metabólicas y, por ende, su demanda energética. Un aumento sostenido del gasto energético podría comprometer procesos clave como el crecimiento, la reproducción y la supervivencia, especialmente si las condiciones de estrés persisten en el tiempo.

En términos generales, la magnitud de la respuesta fisiológica al incremento de temperatura fue mayor en otoño y primavera, siendo esta última la principal estación reproductiva de la especie, en la que predominan hembras de mayor tamaño y con mayor producción de huevos (ver Capítulo 2, sección 2.3.3). Por lo tanto, un incremento en el gasto energético durante la primavera podría tener consecuencias significativas a nivel poblacional al comprometer la asignación de recursos destinados a la reproducción. En conjunto, estos resultados destacan la importancia de considerar tanto la estacionalidad como la variabilidad intraespecífica al evaluar la vulnerabilidad de las especies intermareales frente a escenarios futuros de CG.

## **Capítulo 4:**

**Efectos combinados de un aumento de temperatura, de acidificación y de los niveles de radiación solar en el anfípodo *Ampithoe valida***

## 4.1. Introducción

El CG provoca múltiples alteraciones en las condiciones físico-químicas de los ecosistemas marino-costeros, tales como el aumento de la temperatura, la disminución del pH y cambios en los niveles de radiación solar que penetra la columna de agua (IPCC, 2021). Numerosos estudios han demostrado los efectos de cada una de estas variables por separado en los crustáceos, los cuales pueden experimentar alteraciones en los procesos metabólicos, que repercuten en su comportamiento trófico, desarrollo, crecimiento y tasas de mortalidad, entre otros (Fischer et al., 2006; Whiteley, 2011; Gutow et al., 2016; Long et al., 2019). En el caso de *A. valida*, los resultados presentados en el Capítulo 3 de esta tesis mostraron que el aumento de la temperatura provocó un incremento significativo en las tasas de respiración en el corto plazo (i.e., horas), mientras que las mismas no se vieron afectadas por una disminución del pH. En el caso de la radiación solar, se observó un patrón general de mayores tasas de respiración bajo condiciones de irradiancia elevada, aunque el mismo no fue significativo en términos estadísticos.

Si bien el estudio de los efectos individuales de cada variable del CG permite comprender los mecanismos fisiológicos subyacentes en la respuesta de una especie, resulta esencial evaluar el impacto de múltiples variables actuando de manera simultánea, tal como ocurre en la naturaleza. Esto se debe a que su acción conjunta puede generar efectos aditivos, sinérgicos o antagónicos, siendo el efecto combinado igual, mayor o menor que la suma de los efectos individuales (Crain et al., 2008; Bass et al., 2021). Por ejemplo, los crustáceos se consideran generalmente poco vulnerables a una disminución del pH (Whiteley et al., 1997); sin embargo, se ha demostrado que la acidificación puede reducir el rango de termotolerancia en algunas especies, aumentando su vulnerabilidad frente a escenarios de aumento de temperatura (Metzger et al., 2007; Walther et al., 2009). Asimismo, se ha reportado que un aumento de temperatura puede contrarrestar los efectos nocivos de la RUV (<400 nm) sobre el ADN, al acelerar los mecanismos de reparación mediados por enzimas (Moresino & Helbling, 2010).

En las últimas décadas se han publicado una gran cantidad de trabajos científicos que evalúan los efectos combinados de dos variables de CG (Crain et al., 2008; Harvey et al., 2013). No obstante, aunque los trabajos que analizan la interacción entre 3 o más variables de CG han ido en aumento, la información disponible sigue siendo limitada (Bass et al., 2021).

La capacidad de aclimatación de los organismos puede modificar sus respuestas frente a las variables de CG y por ende reducir su vulnerabilidad (Semsar-kazerouni & Verberk, 2018). Por ejemplo, se ha demostrado que las tasas de respiración de copépodos intermareales aumentan inmediatamente tras incrementar la temperatura en 5 °C, pero que luego de un período de aclimatación de 48 h no difieren significativamente de los valores control (Scheffler et al., 2019). Asimismo, se observó que una disminución del pH de 0,35 unidades produjo inicialmente una disminución de las tasas de ingestión de copépodos, pero que las mismas aumentaron tras un periodo de aclimatación de 36 h, evidenciando un reajuste metabólico de los organismos (Li & Gao, 2012). Para poder evaluar de manera realista el impacto del CG en los organismos, resulta fundamental evaluar su potencial de aclimatación frente a los cambios esperados.

En este contexto, el objetivo del presente capítulo es evaluar el efecto conjunto de un aumento de temperatura (+3 °C), una disminución del pH (-0,35 unidades) y un incremento en los niveles de radiación solar (+50 %) sobre las tasas de respiración, de ingestión de alimento y de mortalidad de machos y hembras de *A. valida* a lo largo de las cuatro estaciones del año.

## **4.2. Materiales y Métodos**

### **4.2.1. Procedimiento experimental general**

Para evaluar el efecto conjunto de un aumento de temperatura, una disminución del pH y un incremento en los niveles de radiación solar sobre *A. valida*, se realizaron experimentos tipo Clúster, en los cuales los individuos fueron expuestos durante 6 días a dos condiciones experimentales, manipulando todas las variables de interés de manera simultánea (Boyd et al., 2010). Los experimentos se llevaron a cabo por separado para machos y hembras en las cuatro estaciones del año 2019: verano (enero), otoño (mayo), invierno (agosto) y primavera (noviembre). El procedimiento general fue el siguiente: durante la marea baja se recolectaron anfípodos y macroalgas (*Ulva* spp., Chlorophyceae) del intermareal alto de Playa Bonita (complejo Playa Magagna, 43°22'S – 65°03'W). Los individuos fueron colocados en recipientes plásticos y trasladados inmediatamente al laboratorio de la EFPU, donde se mantuvieron bajo las mismas condiciones descritas en el Capítulo 3 (sección 3.2.1) hasta el inicio de cada experimento. Para los experimentos se colocaron grupos de 8 – 10 anfípodos

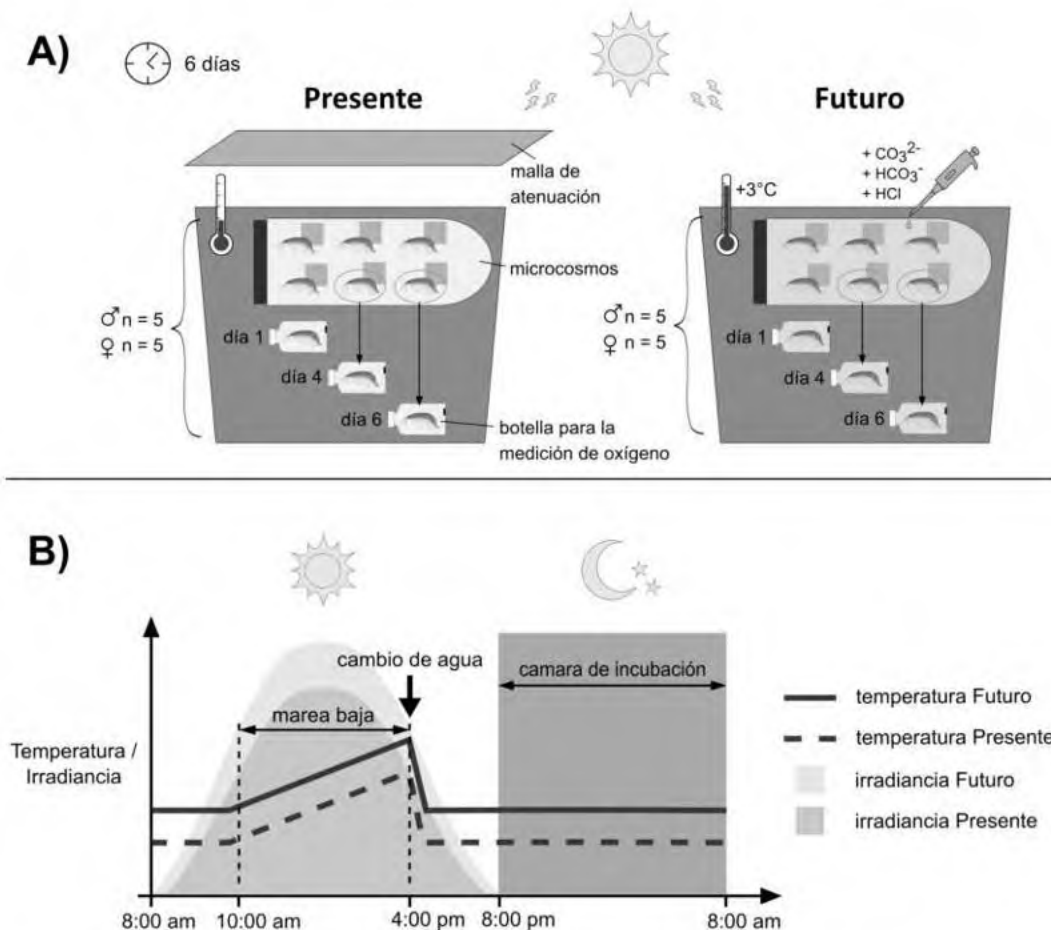
adultos (dependiendo de la cantidad encontrada en cada estación; Tabla 4.1), en tubos de cuarzo transparentes a la RUV (de aquí en adelante: microcosmos). Cada microcosmos se llenó con aproximadamente 400 mL de agua de mar recolectada el mismo día que se llevó a cabo la recolección de los anfípodos. Para los experimentos se seleccionaron los individuos de mayor tamaño de cada estación (Tabla 4.1). Como fuente de alimento se agregó un talo de *Ulva* spp. de 1,5 x 1,5 cm por individuo. Si bien en la zona de estudio se encuentra mayormente *Ulva rigida*, es posible también, aunque en menor abundancia, encontrar otras especies del mismo género, tales como *U. lactuca* y *U. fasciata* (Siniscalchi et al., 2012). Al no haberse determinado la especie de los especímenes recolectados, de aquí en adelante se hará referencia a *Ulva* spp. El alimento se renovó diariamente, dado que ensayos previos demostraron que esta cantidad de alimento resulta suficiente para cubrir los requerimientos alimentarios de los anfípodos durante 24 h.

**Tabla 4.1** Número inicial de individuos por microcosmos y peso promedio por individuo ( $\pm$  DE) en los experimentos tipo Clúster en las cuatro estaciones. El número inicial en cada experimento varió en función de la cantidad de individuos encontrados en cada estación.

		Verano	Otoño	Invierno	Primavera
Nro. inicial de individuos por microcosmos	Machos	10	8	10	9
	Hembras	10	10	9	10
Peso promedio por individuo (mg)	Machos	11,9 $\pm$ 3,6	9,5 $\pm$ 3,0	17,7 $\pm$ 4,6	15,0 $\pm$ 4,2
	Hembras	10,5 $\pm$ 3,6	9,9 $\pm$ 3,1	12,8 $\pm$ 4,5	16,9 $\pm$ 4,0

El experimento estuvo compuesto por un total de 20 microcosmos, de los cuales 10 (i.e., 5 para cada sexo) fueron asignados a cada uno de dos escenarios experimentales (Fig. 4.1 A): (I) Presente: valores de temperatura, pH y radiación solar que representaron las condiciones ambientales actuales y (II) Futuro: que incluyó un aumento de temperatura (i.e., +3 °C) y de radiación solar (i.e., +50 %), junto con una disminución del pH (i.e., -0,35 unidades) respecto al escenario Presente. El agua utilizada para los microcosmos del escenario Presente no recibió ninguna manipulación química, reflejando las condiciones de pH *in situ*. Además, durante el día, los microcosmos fueron cubiertos con una malla de atenuación (Fig. 4.1 A) para simular los niveles promedios de radiación solar experimentados por los organismos a lo largo del ciclo de mareas, tal y como ha sido detallado en el Capítulo 3 (sección 3.2.3).

En los microcosmos del escenario Futuro, el pH del agua se redujo en 0,35 unidades mediante el agregado  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ,  $\text{NaHCO}_3$  y  $\text{HCl}$ , tal y como se describe en el Capítulo 3 (sección 3.2.4). Los microcosmos permanecieron descubiertos para simular un incremento en los niveles de radiación solar, respecto a los microcosmos del escenario Presente (Fig. 4.1 A). Durante la noche (i.e., 8:00 pm – 8:00 am) los microcosmos se mantuvieron en cámaras de incubación (Sanyo MLR-350, MiniCella) en oscuridad, a la temperatura del agua de mar registrada en cada estación ( $T_{\text{Mar}}$ , i.e., Verano: 18 °C, Otoño: 14 °C, Invierno: 7 °C, Primavera: 11 °C, escenario Presente) de acuerdo con las mediciones descritas en el Capítulo 3 (sección 3.2.2) y a  $T_{\text{Mar}} + 3$  °C (escenario Futuro), respectivamente. Durante el día (i.e., 8:00 am – 8:00 pm) los microcosmos fueron trasladados a baños de agua ubicados en el patio de la EFPU, los cuales cuentan con control de temperatura (Fig. 4.1 A y B). En estos baños se simuló una marea baja centrada al mediodía (i.e., 10:00 am – 4:00 pm), permitiendo que la temperatura fluctuara de manera natural, sin exceder la temperatura máxima registrada en el área de estudio para cada estación en el escenario Presente ( $T_{\text{max}}$ , i.e., Verano: 30 °C, Otoño: 20 °C, Invierno: 13 °C, Primavera: 23 °C) y a  $T_{\text{max}} + 3$  °C en el escenario Futuro (Fig. 4.1 B). A las 4:00 pm se simuló el regreso de la marea mediante la caída abrupta de la temperatura hasta los niveles iniciales, lo que se logró renovando el agua de los microcosmos y trasladándolos a un baño de agua a la temperatura  $T_{\text{Mar}}$  (escenario Presente) o  $T_{\text{Mar}} + 3$  °C (escenario Futuro) de cada estación. Diariamente, durante cada cambio de agua provocado al simular la llegada de la marea alta, se registraron y retiraron los individuos muertos, y se renovó el alimento. Por razones logísticas, los experimentos para machos y hembras se realizaron desfasados, con un intervalo de 1 día entre ambas incubaciones. Al finalizar cada experimento, se registró el peso húmedo de los individuos con una precisión de 0,1 mg utilizando una balanza digital (Ohaus Pioneer PA214). En el caso de las hembras los huevos y/o juveniles contenidos en el marsupio fueron removidos antes del pesaje. Al inicio, a tiempo medio y al final del período experimental (i.e., días 1, 4 y 6), se realizaron mediciones de consumo de oxígeno y de ingestión de alimento en los individuos, tal como se detalla a continuación.



**Fig. 4.1** (A) Esquema general del diseño experimental tipo Clúster con los escenarios Presente (izquierda) y Futuro (derecha). El número de individuos inicial en los microcosmos fue de 8-10 según la estación y el sexo (Tabla 4.1). (B) Esquema general de las condiciones de temperatura y radiación solar en los escenarios Presente y Futuro a lo largo de un día de exposición. Tanto la temperatura como los niveles de radiación recibida variaron entre estaciones de acuerdo a las condiciones naturales.

#### 4.2.2. Determinación de las tasas de respiración

Previo al inicio de las mediciones de respiración, los individuos se mantuvieron en ayuno a temperatura  $T_{Mar}$  o  $T_{Mar} + 3$  °C con el fin de vaciar sus tractos digestivos. En el caso de las mediciones del primer día, se utilizaron individuos recolectados directamente del intermareal, mientras que para las mediciones del cuarto y sexto día se utilizaron individuos provenientes de los microcosmos, seleccionados al azar de cada réplica durante el cambio de agua realizado el día previo a las mediciones (Fig. 4.1 A). Cada anfípodo fue colocado

individualmente en botellas de teflón de 42 mL transparentes a la RUV, las cuales se llenaron con agua de mar autoclavada ajustada al pH correspondiente según el escenario. Las botellas fueron cerradas herméticamente y expuestas junto a los microcosmos en los baños de agua bajo las condiciones Presente o Futuro. En el caso del escenario Presente, las botellas fueron cubiertas con una malla de atenuación, tal como fue descrito en el Capítulo 3 (sección 3.2.3). Las incubaciones se realizaron durante 12 h (i.e., 8:00 am – 8:00 pm) registrándose la concentración de oxígeno en cada botella de forma continua (i.e., cada un minuto), utilizando sensores, siguiendo el procedimiento detallado en el Capítulo 3 (sección 3.2.1). Una vez finalizadas las mediciones, los individuos no fueron devueltos a los microcosmos, sino que fueron guardados en freezer para su posterior pesaje. Dado que la concentración de oxígeno en el agua varía con la temperatura, se incluyeron controles experimentales que consistieron en botellas con agua de mar autoclavada (de aquí en adelante: controles<sub>O<sub>2</sub></sub>), incubadas en las mismas condiciones experimentales que los anfípodos (i.e., condiciones Presente y Futuro; n = 5 por tratamiento). La concentración de oxígeno en los controles<sub>O<sub>2</sub></sub> se registró al inicio del experimento y cada dos horas hasta el final de la incubación.

A partir de los datos obtenidos se determinó la relación entre la concentración de oxígeno y la temperatura mediante regresión lineal. El valor de la pendiente se utilizó para corregir las concentraciones de oxígeno en las botellas con anfípodos, compensando los cambios atribuibles a variaciones térmicas, de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$[O_2]_{\text{corregido}} = [O_2]_{\text{medido}} - (\Delta T * \text{pendiente})$$

Este procedimiento evidenció una disminución lineal de la concentración de oxígeno entre las 8:00 am y las 4:00 pm. Sin embargo, luego de simular el regreso de la marea y la consecuente caída abrupta de temperatura, se observaron importantes fluctuaciones de las concentraciones de oxígeno. Por tal motivo, solo se consideraron los datos obtenidos entre las 8:00 am y las 4:00 pm para los análisis posteriores. El consumo de oxígeno durante este periodo se estandarizó por el volumen de agua en las botellas y por el peso húmedo de los individuos. Las tasas de respiración se expresaron como  $\mu\text{g}$  de oxígeno consumido por  $\text{mg}$  de peso húmedo por hora ( $\mu\text{g}$  de  $O_2$   $\text{mg}^{-1}$   $\text{h}^{-1}$ ). Los datos correspondientes a individuos que mudaron o murieron durante la incubación fueron descartados de los análisis.

### **4.2.3. Determinación de las tasas de ingestión de alimento**

Durante el primer, cuarto y sexto día de experimento se realizaron pruebas para estimar las tasas de ingestión de alimento, con el objetivo de evaluar diferencias entre los escenarios experimentales. Para esto, previo a su incorporación a los microcosmos, los talos de *Ulva* spp. fueron cuidadosamente secados con toallas de papel para eliminar el exceso de agua de la superficie y pesados utilizando una balanza digital (precisión: 0,1 mg; Ohaus Pioneer PA214). Luego de 24 h, los talos fueron retirados de los microcosmos, secados y pesados nuevamente. El cambio autogénico en el peso húmedo en talos expuestos a las condiciones Presente y Futuro fue determinado en microcosmos sin anfípodos (de aquí en adelante: controles<sub>Salgas</sub>, n = 3). Estos controles se realizaron en días aleatorios durante el periodo experimental en cada estación del año. La cantidad de alimento ingerido se calculó como la diferencia entre el peso final e inicial, corrigiendo por el crecimiento autogénico de las macroalgas observado en cada escenario y estación, de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\text{Ingestión} = (\text{peso final} + (\text{peso inicial} * \text{porcentaje de crecimiento autogénico})) - \text{peso inicial}$$

La tasa de ingestión se estimó estandarizando los valores obtenidos en la fórmula por el peso húmedo de los individuos y se expresó como mg de macroalga por mg de peso húmedo de anfípodo por día.

### **4.2.4. Mediciones de temperatura, pH e irradiancia**

La radiación solar incidente (PAR, RUV-A y RUV-B) fue registrada de forma continua (una medición por minuto) utilizando un radiómetro de banda ancha tal como fue descrito en el Capítulo 3, sección 3.2.3. La temperatura en los baños de agua (durante el día) y en las cámaras de incubación (durante la noche) fue monitoreada a intervalos de tres minutos utilizando data loggers. Diariamente, al momento del cambio de agua (i.e., 4:00 pm), se midieron el pH del agua utilizado para llenar los microcosmos (i.e., pH inicial) y el pH del agua proveniente de los microcosmos luego de 24 h de incubación (i.e., pH final).

### **4.2.5. Análisis estadísticos**

Todos los análisis fueron realizados por separado para machos y hembras. Para evaluar diferencias en la mortalidad, se calculó la proporción acumulada de individuos muertos

durante todo el experimento (i.e., total de individuos muertos al final del día 6) para cada estación y escenario. El total de individuos se calculó a partir de la suma de individuos muertos y vivos, sin tener en cuenta aquellos que se utilizaron para las determinaciones de consumo de oxígeno. Se evaluaron diferencias en la proporción de individuos muertos entre escenarios y estaciones mediante modelos lineales generalizados (GLM) para la familia binomial con función de enlace link logit (Crawley, 2013). El supuesto de sobredispersión fue evaluado según Crawley (2013). En el caso de los machos, se excluyó del análisis la estación de invierno, dado que la mortalidad promedio fue cero, lo cual conduce a un rango infinito en la escala logit (Crawley, 2013).

Las tasas de respiración se compararon entre estaciones, escenarios y días de medición mediante análisis de varianza (ANOVA) factorial. No se aplicó un análisis de medidas repetidas, dado que en cada medición se utilizaron individuos distintos. En el caso de los machos, solo se analizaron los datos correspondientes al primer y sexto día de exposición, ya que en primavera y verano no se obtuvieron datos durante el cuarto día debido a un corte en la energía eléctrica y a una elevada mortalidad de individuos, respectivamente. Los supuestos de normalidad y homocedasticidad fueron evaluados mediante los test de Shapiro-Wilk y Levene, respectivamente, y se aplicaron transformaciones de datos cuando fue necesario (Zar, 1999). En caso de detectarse diferencias significativas, se realizaron tests *post hoc* de Tukey.

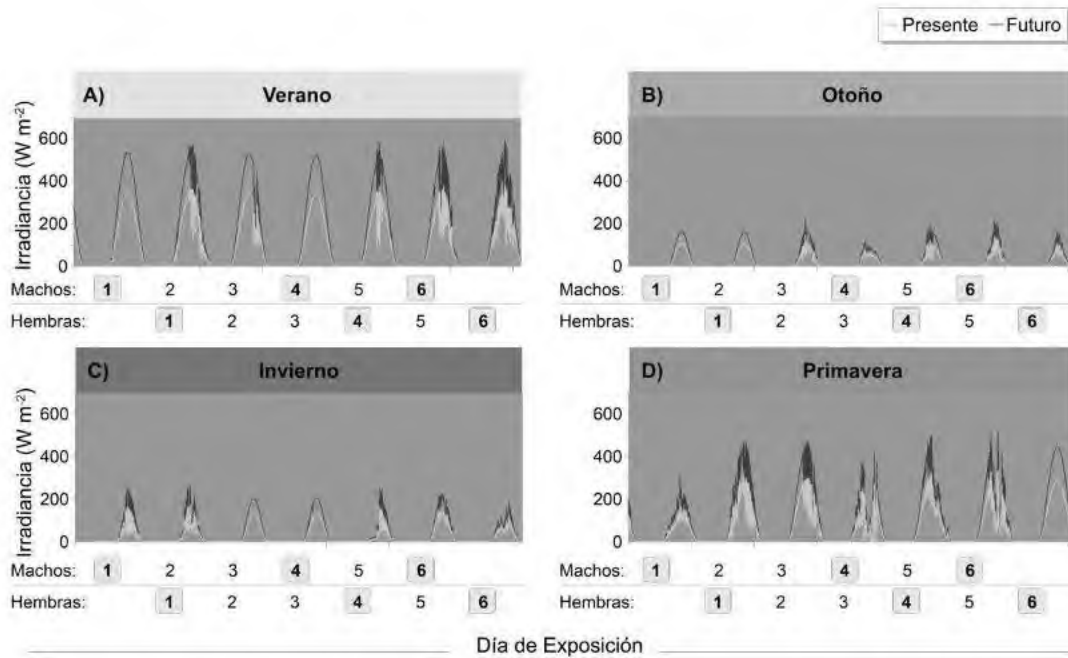
Las diferencias en las tasas de ingestión de alimento entre escenarios, estaciones y días de medición fueron evaluadas mediante modelos lineales mixtos (MLM), considerando los microcosmos como variable de efectos aleatorios para corregir la falta de independencia entre días. Los supuestos de normalidad y homocedasticidad fueron verificados según Pinheiro & Bates (2000). En caso de ser necesario se modeló la heterogeneidad de varianza y/o se aplicaron transformaciones sobre los datos para cumplir dichos supuestos.

Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software R versión 4.0.2 (R Core Team, 2020). Además de las funciones estándar, se utilizaron los paquetes nlme (Pinheiro et al., 2020) y car (Fox & Weisberg, 2019) para ajustar los modelos lineales y realizar los ANOVA. En caso de encontrarse diferencias significativas se realizaron *post hoc* de comparaciones múltiples utilizando los paquetes multcomp (Hothorn et al., 2008) o emmeans (Lenth, 2016).

## **4.3. Resultados**

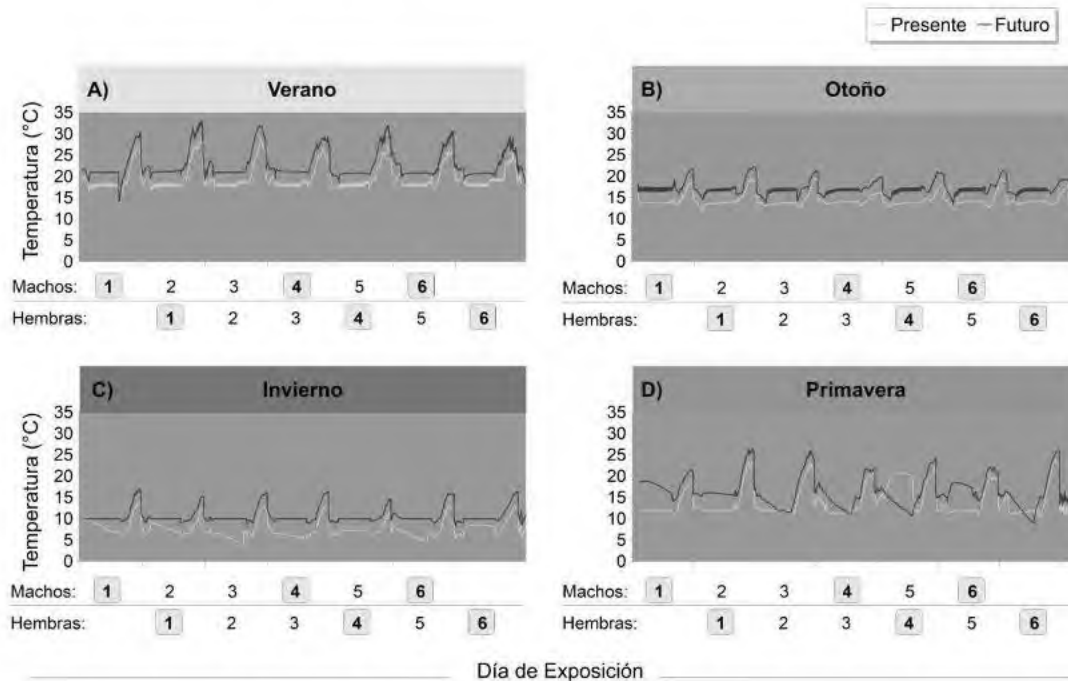
### **4.3.1. Condiciones de radiación solar, temperatura y pH durante los experimentos**

Tal como se observa en la Fig. 4.2, las irradiancias correspondientes al escenario Futuro representaron un incremento de aproximadamente un 50 % respecto al escenario Presente. Los valores máximos diarios se registraron durante los experimentos de verano, alcanzando picos superiores a  $310 \text{ W m}^{-2}$  en el escenario Presente y a  $480 \text{ W m}^{-2}$  en el escenario Futuro (Fig. 4.2), con aproximadamente un 10% de estos valores atribuibles a la fracción RUV. Las dosis diarias promedio de PAR y RUV en verano superaron las registradas en primavera, invierno y otoño por un factor aproximado de 1,3, 3,2 y 4,3, respectivamente (Tabla 4.2). En todas las estaciones, durante el periodo experimental las condiciones atmosféricas se caracterizaron por cielos parcialmente nublados, con escasos días de cielos totalmente despejados (Fig. 4.2 A-D). A pesar de que los experimentos de machos y hembras se iniciaron con un desfase temporal de un día, las dosis promedio de radiación a las que ambos sexos estuvieron expuestos durante los experimentos de verano, otoño e invierno fueron similares (Tabla 4.2). En primavera, las condiciones de mayor nubosidad generaron una elevada variabilidad en los niveles de radiación (Fig. 4.2 D). En esta estación, los machos recibieron dosis diarias promedio menores que las hembras, diferencia atribuible a condiciones de elevada nubosidad durante el primer día de exposición de los machos, y a cielos despejados durante el último día de exposición de las hembras (Fig. 4.2 D, Tabla 4.2).



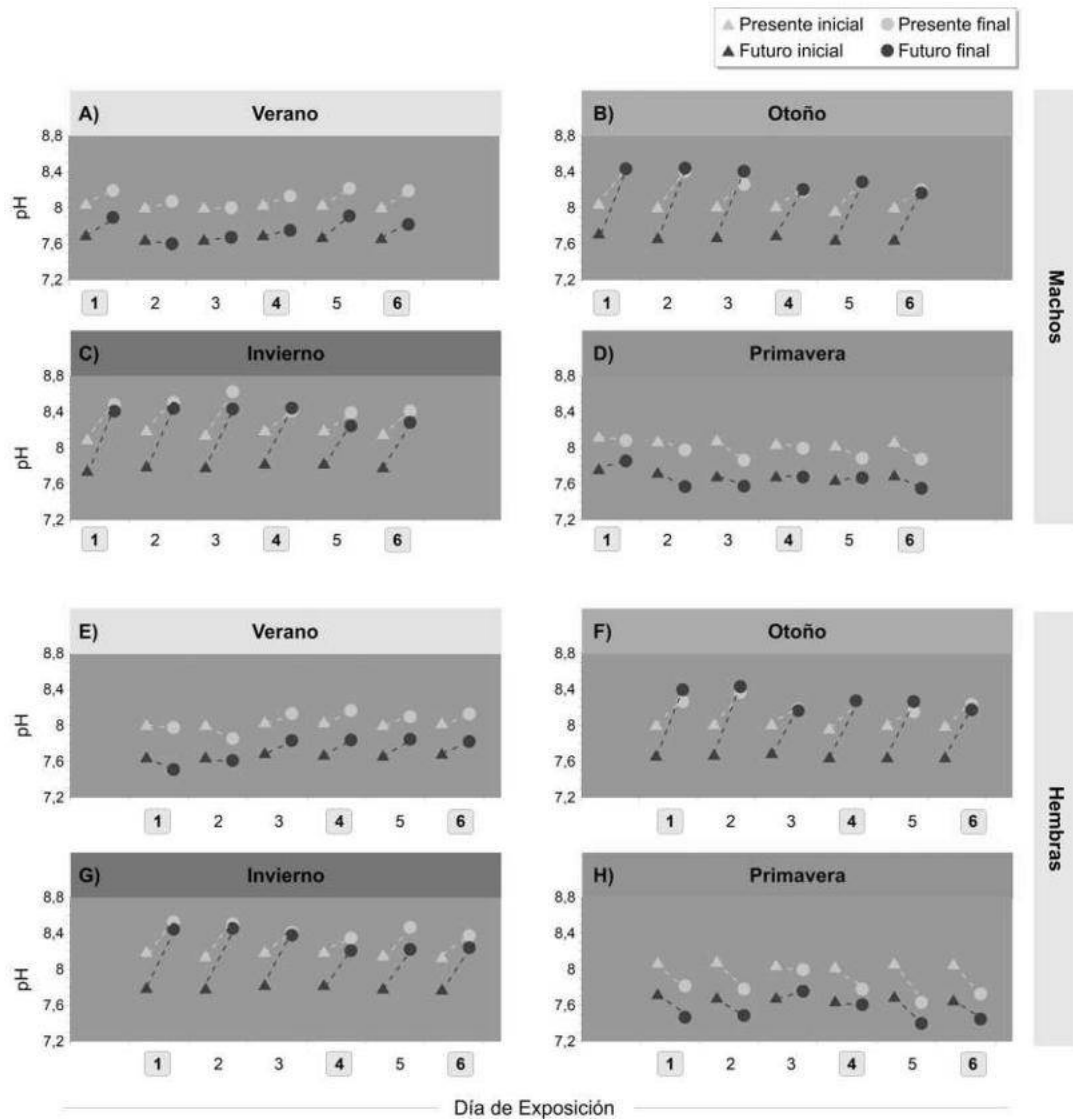
**Fig. 4.2** Condiciones de irradiancia (i.e., PAR + RUV-A + RUV-B) en los escenarios Presente y Futuro durante los experimentos en las cuatro estaciones. Cada nuevo día de experimento comenzó con el recambio de agua en los microcosmos después de la simulación de la marea baja y finalizó con el próximo recambio de agua, i.e., de 4:00 pm – 4:00 pm. Por cuestiones logísticas los experimentos para machos y hembras se realizaron desfasados un día. Los números en negrita dentro de los recuadros grises indican los días en los cuales se realizaron mediciones de respiración y consumo de alimento (i.e., día 1, 4 y 6 de experimento).

Respecto a las condiciones de temperatura, en todas las estaciones se observó un aumento de esta variable durante la simulación de la marea baja (Fig. 4.3), alcanzando valores máximos similares para ambos sexos (Tabla 4.2), seguido por una caída abrupta al momento del recambio de agua que simuló la llegada de la marea alta. En verano, otoño e invierno, la diferencia promedio de temperatura entre los escenarios Presente y Futuro fue de  $3,1 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $2,8 \pm 0,7 \text{ }^\circ\text{C}$  y  $3,0 \pm 0,9 \text{ }^\circ\text{C}$ , respectivamente. En primavera, debido a inconvenientes técnicos, no fue posible mantener estable la temperatura nocturna en los microcosmos del escenario Futuro (Fig. 4.3 D). Adicionalmente, un corte de energía eléctrica durante la noche del cuarto al quinto día del periodo experimental, provocó un incremento transitorio de  $9 \text{ }^\circ\text{C}$  en el escenario Presente durante aproximadamente 11 h (Fig. 4.3 D). En consecuencia, la diferencia de temperatura entre ambos escenarios durante los experimentos de esta estación fue de  $2,2 \pm 3,1 \text{ }^\circ\text{C}$ .



**Fig. 4.3** Condiciones de temperatura en los escenarios Presente y Futuro durante los experimentos en las cuatro estaciones. Los experimentos para machos y hembras se realizaron desfasados un día. Los números en negrita dentro de los recuadros grises indican los días en los cuales se realizaron mediciones de respiración y consumo de alimento (i.e., día 1, 4 y 6 de experimento).

Los valores de pH registrados luego del cambio diario de agua (i.e., pH inicial) variaron entre  $8,01 \pm 0,02$  (otoño) y  $8,18 \pm 0,03$  (invierno) en el escenario Presente y entre  $7,67 \pm 0,02$  (verano) y  $7,80 \pm 0,03$  (invierno) en el escenario Futuro, mostrando patrones similares para machos y hembras (Fig. 4.4, Tabla 4.2). En verano, otoño e invierno se observó un incremento del pH luego de 24 h de exposición (i.e., pH final, Fig. 4.4) en ambos sexos. Este incremento osciló entre  $0,09 \pm 0,13$  (verano) y  $0,30 \pm 0,09$  (invierno) en el escenario Presente y entre  $0,15 \pm 0,16$  (verano) y  $0,63 \pm 0,13$  (otoño) en el escenario Futuro (Tabla 4.2). Debido al mayor incremento de pH en el escenario Futuro, los valores finales en otoño e invierno fueron similares a los del escenario Presente (Fig. 4.4, Tabla 4.2). Con el fin de evaluar la evolución del pH a lo largo del ciclo de exposición, durante el invierno se mantuvieron los microcosmos de los machos durante un día adicional bajo las condiciones experimentales de ambos escenarios, realizando mediciones cada  $\sim 2$  h.



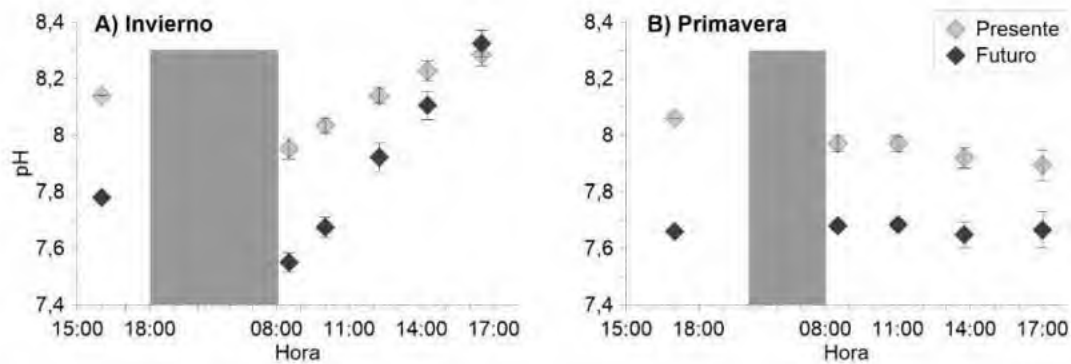
**Fig. 4.4** pH registrado en los microcosmos de los machos (A - D) y hembras (E - H) en los escenarios Presente y Futuro durante los experimentos en las cuatro estaciones. Se realizaron mediciones diarias al momento de cambiar el agua en los microcosmos, tanto del agua que se utilizó para llenar los microcosmos (i.e., pH inicial) así como después de 24 h de incubación (i.e., pH final). Las líneas de puntos muestran el curso del pH para cada día. Los números en negrita dentro de los recuadros grises indican los días en los cuales se realizaron mediciones de respiración y consumo de alimento (i.e., día 1, 4 y 6 de experimento).

**Tabla 4.2** Condiciones experimentales durante los experimentos en las 4 estaciones del año. Se muestran los datos (promedio  $\pm$  DE) de las dosis diarias de irradiancia (PAR y RUV), temperaturas máximas alcanzadas durante la fase de marea baja, así como los valores de pH después del llenado de los microcosmos.

		Verano	Otoño	Invierno	Primavera
Dosis PAR Presente (MJ m <sup>-2</sup> )	Machos	6,4 $\pm$ 0,4	1,6 $\pm$ 0,2	2,0 $\pm$ 0,4	4,5 $\pm$ 1,3
	Hembras	6,2 $\pm$ 0,4	1,5 $\pm$ 223,5	2,0 $\pm$ 0,4	5,2 $\pm$ 1,3
Dosis RUV Presente (MJ m <sup>-2</sup> )	Machos	0,7 $\pm$ 0,05	0,2 $\pm$ 0,02	0,2 $\pm$ 0,04	0,5 $\pm$ 0,1
	Hembras	0,7 $\pm$ 0,4	0,2 $\pm$ 0,02	0,2 $\pm$ 0,04	0,6 $\pm$ 0,1
Dosis PAR Futuro (MJ m <sup>-2</sup> )	Machos	10,0 $\pm$ 0,6	2,4 $\pm$ 0,43	3,1 $\pm$ 0,7	7,1 $\pm$ 2,0
	Hembras	10,0 $\pm$ 0,6	2,32 $\pm$ 0,3	3,1 $\pm$ 0,7	8,2 $\pm$ 2,1
Dosis RUV Futuro (MJ m <sup>-2</sup> )	Machos	1,1 $\pm$ 0,07	0,3 $\pm$ 0,03	0,3 $\pm$ 0,07	0,8 $\pm$ 0,2
	Hembras	1,1 $\pm$ 0,07	0,2 $\pm$ 0,03	0,3 $\pm$ 0,07	1,0 $\pm$ 0,2
T <sub>max</sub> Presente (°C)	Machos	27,5 $\pm$ 0,8	18,6 $\pm$ 1,2	12,9 $\pm$ 0,7	21,3 $\pm$ 1,7
	Hembras	27,0 $\pm$ 1,3	18,4 $\pm$ 1,3	12,7 $\pm$ 0,6	22,3 $\pm$ 1,3
T <sub>max</sub> Futuro (°C)	Machos	31,3 $\pm$ 1,2	21,2 $\pm$ 0,7	15,9 $\pm$ 0,7	23,7 $\pm$ 2,0
	Hembras	31,1 $\pm$ 1,4	20,9 $\pm$ 1,0	15,7 $\pm$ 0,6	24,4 $\pm$ 1,8
pH inicial Presente	Machos	8,03 $\pm$ 0,02	8,01 $\pm$ 0,02	8,17 $\pm$ 0,04	8,07 $\pm$ 0,03
	Hembras	8,02 $\pm$ 0,01	8,01 $\pm$ 0,02	8,18 $\pm$ 0,03	8,06 $\pm$ 0,02
pH final Presente	Machos	8,12 $\pm$ 0,12	8,29 $\pm$ 0,12	8,47 $\pm$ 0,09	7,95 $\pm$ 0,09
	Hembras	8,02 $\pm$ 0,13	8,23 $\pm$ 0,14	8,45 $\pm$ 0,07	7,76 $\pm$ 0,08
pH inicial Futuro	Machos	7,67 $\pm$ 0,02	7,68 $\pm$ 0,03	7,80 $\pm$ 0,03	7,71 $\pm$ 0,04
	Hembras	7,67 $\pm$ 0,02	7,67 $\pm$ 0,02	7,80 $\pm$ 0,02	7,69 $\pm$ 0,03
pH final Futuro	Machos	7,83 $\pm$ 0,13	8,30 $\pm$ 0,17	8,38 $\pm$ 0,07	7,73 $\pm$ 0,09
	Hembras	7,72 $\pm$ 0,18	8,30 $\pm$ 0,10	8,34 $\pm$ 0,14	7,50 $\pm$ 0,10

Los resultados mostraron que la nivelación del pH entre escenarios ocurrió recién durante las últimas 4 h antes del recambio de agua en los microcosmos, manteniéndose la diferencia esperada durante la mayor parte del periodo experimental (Fig. 4.5 A). En contraste, durante

la primavera, se registró una disminución del pH luego de 24 h de exposición en ambos escenarios, durante la mayoría de los días de incubación (Fig. 4.4 D y H). Esta disminución fue más pronunciada en los microcosmos de las hembras, con valores finales de pH de  $0,31 \pm 0,09$  (Presente) y  $0,18 \pm 0,11$  (Futuro) unidades por debajo del pH inicial, y aproximadamente  $0,21 \pm 0,21$  unidades más bajo que en los microcosmos de los machos (Tabla 4.2, Fig. 4.4 D y H). Al igual que en invierno, se realizaron mediciones de pH cada  $\sim 2 - 3$  horas durante un día adicional, observándose un descenso gradual del pH a lo largo de todo el período de exposición, manteniéndose una diferencia sostenida de al menos  $0,23 \pm 0,08$  unidades entre ambos escenarios (Fig. 4.5 B).

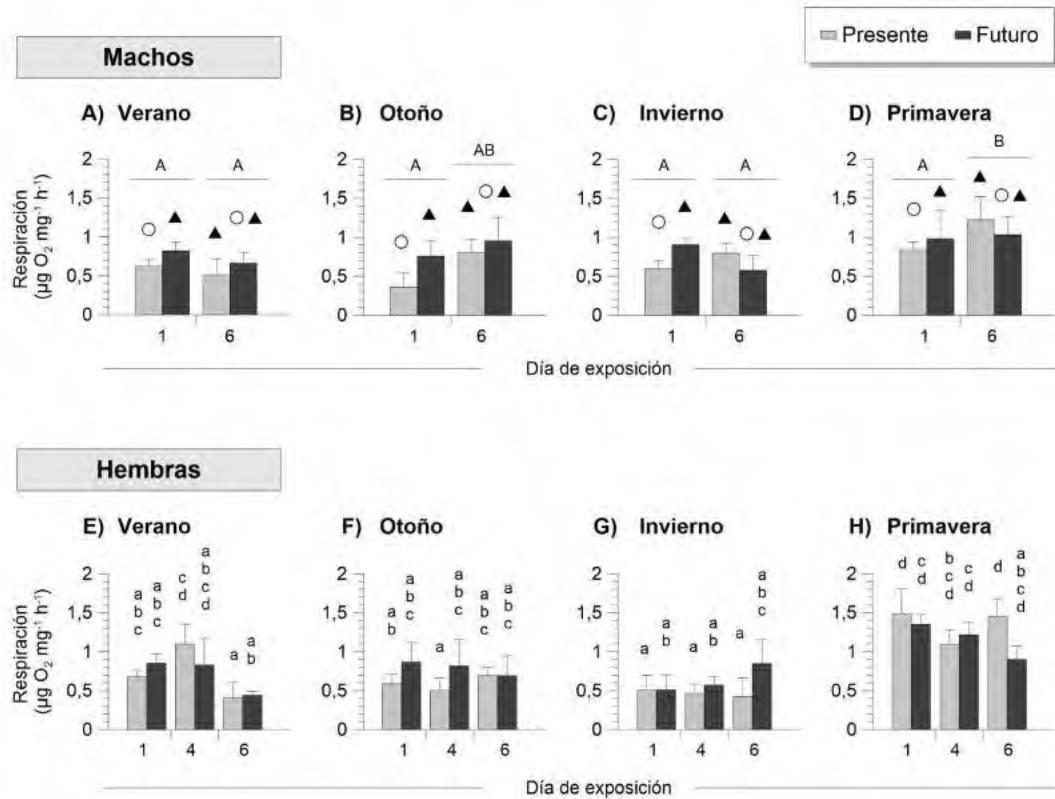


**Fig. 4.5** Condiciones de pH (promedio  $\pm$  DE) en los microcosmos en los escenarios Presente y Futuro a lo largo de un día de exposición en los experimentos de (A) invierno y (B) primavera. La fase de oscuridad está indicada en gris.

### 4.3.2. Respiración

En los machos, durante los experimentos de otoño y primavera se observó un patrón general de aumento en las tasas de respiración entre el primer y el sexto día de incubación en ambos escenarios (Fig. 4.6 B y D). El ANOVA reveló una interacción entre la estación y el día de exposición (Tabla 4.3). Las mayores tasas de respiración se registraron al final del período experimental (sexto día) en primavera, siendo significativamente más altas que en verano e invierno. Sin embargo, las tasas correspondientes al primer día no difirieron significativamente entre estaciones (Fig. 4.6 A-D). Asimismo, se observó una interacción significativa entre el escenario y el día de exposición (Tabla 4.3). En todas las estaciones, las condiciones del escenario Futuro provocaron un aumento en las tasas de respiración

respecto al escenario Presente durante el primer día de exposición, con incrementos que oscilaron entre un 16 % (primavera) y un 113 % (otoño), mientras que durante el sexto día de exposición los valores fueron similares en ambos escenarios (Fig. 4.6 A-D).



**Fig. 4.6** Tasas de respiración medidas desde las 8:00 am hasta las 4:00 pm expresadas en  $\mu\text{g}$  de oxígeno consumido por peso húmedo por hora ( $\pm$  DE) para machos (A-D) y hembras (E-H) de *A. valida* en los escenarios Presente y Futuro en las cuatro estaciones. En el caso de los machos, se excluyeron los datos del cuarto día de exposición, ya que en primavera y verano no se obtuvieron datos de respiración durante ese día debido a un corte en la energía eléctrica (primavera) y a una alta mortalidad de los individuos utilizados para la determinación de las tasas de respiración (verano), respectivamente. Se indican los resultados del *post hoc* test para la interacción entre estación y día de exposición (machos, letras mayúsculas), la interacción entre escenario y día de exposición (machos, símbolos) y la interacción entre estación, día de exposición y escenario (hembras, letras minúsculas).

En las hembras, se observó una tendencia general de mayores tasas de respiración en primavera, en ambos escenarios, respecto de las restantes estaciones (Fig. 4.6 E-H). El ANOVA reveló una interacción significativa entre el escenario, la estación y el día de exposición (Tabla 4.3). En el experimento de verano, las tasas de respiración en el escenario Presente fueron significativamente mayores durante el cuarto día que durante el sexto (Fig.

4.6 E). Sin embargo, dentro de un mismo día de exposición, los valores fueron similares en ambos escenarios (Fig. 4.6 E-H).

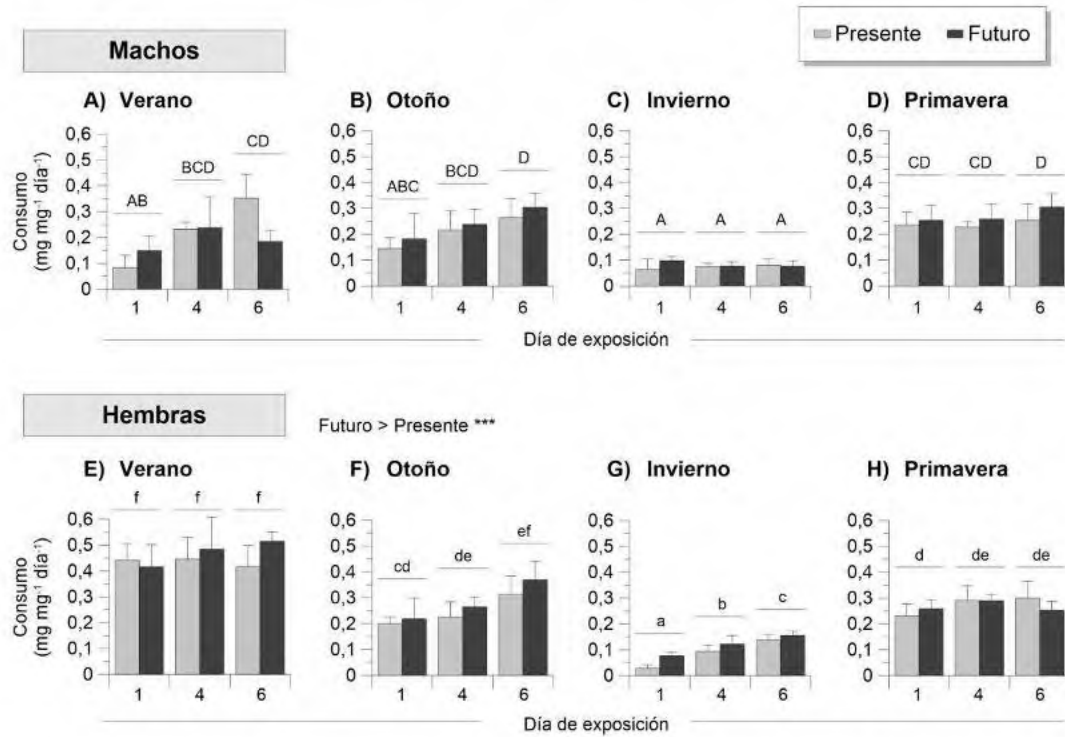
**Tabla 4.3** Resultados del ANOVA de las tasas de respiración en función de la estación, el escenario y el día de exposición. Se muestran los valores del estadístico F, grados de libertad y el valor p. Los asteriscos indican el nivel de significancia de  $p < 0,05$  (\*),  $p < 0,01$  (\*\*) y  $p < 0,001$  (\*\*\*)

		<b>F</b>	<b>gl</b>	<b>p</b>
Machos	Estación	10,77	3	< 0,001***
	Escenario	3,29	1	0,08
	Día	1,47	1	0,23
	Escenario x estación	1,52	3	0,22
	Estación x día	4,32	3	< 0,01**
	Escenario x día	7,83	1	< 0,01**
	Estación x escenario x día	0,93	3	0,43
Hembras	Estación	44,76	3	< 0,001***
	Escenario	0,72	1	0,40
	Día	3,72	2	0,03*
	Escenario x estación	4,23	3	< 0,01**
	Estación x día	6,27	6	< 0,001***
	Escenario x día	0,98	2	0,38
	Estación x escenario x día	3,51	6	< 0,01**

### 4.3.3. Consumo de alimento

En ambos sexos, las tasas de consumo de alimento variaron entre estaciones y días de exposición, observándose una interacción significativa entre ambos factores (Fig. 4.7, Tabla 4.4). En los machos, durante verano y otoño (Fig. 4.7 A y B), así como en las hembras durante otoño e invierno (Fig. 4.7 F y G), las tasas de consumo aumentaron significativamente entre el primer y el sexto día de exposición. Las menores tasas se registraron en invierno para ambos sexos, con individuos que consumieron menos de la mitad del alimento ingerido en las restantes estaciones (Fig. 4.7 C y G). En los machos, el consumo promedio de alimento fue similar entre escenarios en verano, otoño y primavera (Fig. 4.7 A, B y D). En las hembras, las mayores tasas de consumo se registraron durante el

verano, siendo un 60 % y un 80 % superiores a las de otoño y primavera, respectivamente (Fig. 4.7 E, F y H). El escenario tuvo un efecto significativo únicamente en las hembras (Tabla 4.4), las cuales consumieron en promedio un 10 % más de alimento en el escenario Futuro que en el Presente (Fig. 4.7 E-H). En los machos, si bien en otoño y primavera se observó un patrón general de aumento en las tasas de consumo bajo en escenario Futuro (Fig. 4.7 B y D), las diferencias no fueron estadísticamente significativas (Tabla 4.4).



**Fig. 4.7** Tasas de consumo de alimento expresado en mg de macroalga por peso húmedo de anfípodo por día ( $\pm$  DE) para (A) machos y (B) hembras de *A. valida* en los dos escenarios Presente y Futuro en las cuatro estaciones. Letras diferentes indican los resultados del *post hoc* test para la interacción entre estación y día de exposición (i.e., separado para machos y hembras), asteriscos muestran diferencias significativas entre escenarios (hembras).

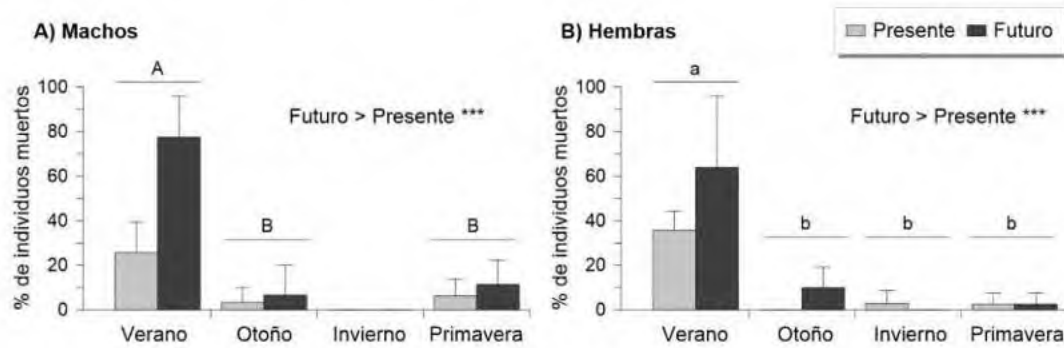
**Tabla 4.4** Resultados de modelo lineal mixto (GLMM) del consumo de alimento en función de la estación, el escenario y el día de exposición. Se muestran los valores del estadístico Chi cuadrado ( $X^2$ ), los grados de libertad y el valor p. Los asteriscos indican el nivel de significancia de  $p < 0,05$  (\*),  $p < 0,01$  (\*\*) y  $p < 0,001$  (\*\*\*).

		$X^2$	gl	p
Machos	Estación	212,95	3	< 0,001***
	Escenario	1,69	1	0,19
	Día	4,67	2	0,10
	Estación x escenario	3,33	3	0,34
	Estación x día	30,02	6	< 0,001***
	Escenario x día	4,49	2	0,11
	Estación x escenario x día	10,71	6	0,10
Hembras	Estación	615,71	3	< 0,001***
	Escenario	12,65	1	< 0,001***
	Día	86,43	2	< 0,001***
	Estación x escenario	3,56	3	0,31
	Estación x día	12,93	6	0,04*
	Escenario x día	1,83	2	0,40
	Estación x escenario x día	4,98	6	0,55

#### 4.3.4. Mortalidad

En algunas réplicas se registró una pérdida de individuos, ya que el número total de individuos (i.e., vivos + muertos) al final del experimento fue menor que el número inicial. Si bien es posible que parte de esta pérdida haya ocurrido durante la manipulación de los microcosmos, especialmente durante el recambio de agua, en varios casos se encontraron restos de individuos, y al menos en una ocasión se observó en primera persona un evento de canibalismo. Dado que no fue posible determinar si los individuos involucrados estaban vivos o muertos previamente al episodio de canibalismo, se decidió no incluirlos en los cálculos de mortalidad. No obstante, la pérdida de individuos por estación y sexo no superó el 4 %, con excepción del experimento de las hembras en primavera, donde alcanzó un 8 %. En ambos sexos de *A. valida*, se observaron diferencias significativas en la mortalidad entre escenarios y estaciones (Fig. 4.8, Tabla 4.5). Luego de 6 días de incubación, la mortalidad fue significativamente mayor en el escenario Futuro que en el escenario Presente (Fig. 4.8).

Esta diferencia fue más pronunciada en verano, donde se registró una mayor mortalidad respecto a las demás estaciones, con valores promedio cercanos al 80 % y 65 % en el escenario Futuro y al 26 % y 36 % en el Presente para machos y hembras, respectivamente (Fig. 4.8). En contraste, durante las demás estaciones la mortalidad promedio no superó el 12 % en ninguno de los sexos, e incluso en algunos casos (i.e., machos en ambos escenarios en invierno, hembras en el escenario Presente en otoño y en el escenario Futuro en invierno) no se registraron individuos muertos durante todo el período experimental.



**Fig. 4.8** Porcentaje de individuos muertos ( $\pm$  DE) de (A) machos y (B) hembras de *A. valida* luego de 6 días de incubación bajo los escenarios Presente y Futuro. Letras diferentes indican diferencias significativas entre estaciones (i.e., separado para machos y hembras), asteriscos muestran diferencias entre escenarios. En el caso de los machos, se excluyó la estación de invierno de los análisis estadísticos dado que la mortalidad fue nula.

**Tabla 4.5** Resultados del GLM del porcentaje de mortalidad después de 6 días de incubación en las condiciones Presente y Futuro en función de la estación del año. Se muestran los valores del estadístico Chi cuadrado ( $X^2$ ), los grados de libertad y el valor p. Los asteriscos indican el nivel de significancia de  $p < 0,05$  (\*),  $p < 0,01$  (\*\*) y  $p < 0,001$  (\*\*\*).

		$X^2$	gl	p
Machos	Escenario	20,64	1	< 0,001***
	Estación	59,21	2	< 0,001***
	Escenario x estación	2,78	2	0,25
Hembras	Escenario	8,38	1	< 0,01**
	Estación	91,56	3	< 0,001***
	Escenario x estación	5,71	3	0,13

## 4.4. Discusión

Los impactos de las variables asociadas al CG sobre los organismos varían entre especies e incluso entre individuos de una misma especie, debido a diferencias en el estado de aclimatación y nutrición de los mismos, el tamaño, el sexo, entre otros factores (Doyle et al., 2012; Valiñas & Helbling, 2015; Missionário et al., 2022). Los resultados obtenidos en este capítulo mostraron que las respuestas de los anfípodos a un escenario de CG de aumento de temperatura, de radiación solar y de acidificación, en términos de tasas respiratorias y de consumo de alimento son sexo-dependientes, mientras que la mortalidad se ve afectada en igual dirección en ambos sexos, con las mayores tasas registradas en el escenario Futuro. Si bien las tasas de consumo y de respiración variaron estacionalmente en ambos sexos, el escenario de CG generó efectos similares en estas variables a lo largo del ciclo anual. En el caso de la mortalidad, sin embargo, las mayores tasas se registraron en verano, lo que sugiere una mayor vulnerabilidad de los anfípodos durante la época estival.

### 4.4.1. Efectos del CG en la respiración y el consumo de alimento en machos y hembras de *A. valida*

Numerosos estudios demostraron que, en crustáceos, los efectos de las variables asociadas al CG pueden variar entre sexos como resultado de diferencias fisiológicas, dimorfismo sexual y/o diferencias comportamentales vinculadas con la actividad reproductiva (p.e. Novo et al., 2005; Valiñas & Helbling, 2015; Blum & Valiñas, 2022; Jimenez et al., 2022; Missionário et al., 2022). Por ejemplo, se demostró en cangrejos intermareales que los límites superiores de termotolerancia son más bajos en hembras que en machos, indicando una mayor sensibilidad térmica de las primeras (Jimenez et al., 2022). En el caso de *A. valida*, estudios previos evidencian que las hembras presentan una mayor susceptibilidad a la RUV, reflejada en mayores tasas de mortalidad (Valiñas & Helbling, 2015), y en una preferencia por refugios que brindan protección frente a este tipo de radiación (Blum & Valiñas, 2022). Esta mayor sensibilidad podría estar asociada a un mayor requerimiento energético para la producción y el mantenimiento de la progenie (Hartnoll, 2006), lo que limitaría las reservas disponibles para sostener otros procesos vitales bajo condiciones de estrés ambiental (Sokolova, 2021). Por lo tanto, el mantenimiento de las reservas energéticas resultaría particularmente crítico para este sexo.

En este capítulo, el aumento en las tasas de consumo de alimento observado en las hembras en el escenario Futuro podría responder a un mecanismo de compensación frente a un potencial incremento en la demanda energética (Li & Gao, 2012). Sin embargo, este aumento en el consumo, no se tradujo en un incremento generalizado de las tasas de respiración. Los resultados del Capítulo 3 de esta tesis mostraron que las tasas respiratorias aumentan significativamente frente a un escenario de aumento de temperatura, aunque este mecanismo compensatorio opera solo hasta un cierto umbral de estrés (Frederich & Pörtner, 2000; Pörtner, 2002). Cuando dicho umbral se supera, algunas especies pueden activar mecanismos de supresión metabólica que les permiten atravesar periodos cortos de estrés ambiental extremo, reduciendo temporalmente sus tasas respiratorias (Paganini, 2014; Sokolova, 2021; Quijada-Rodriguez et al., 2021). Este exceso de estrés se puede producir por la acción conjunta de múltiples estresores, lo cual puede revertir la respuesta metabólica de un organismo. Este mecanismo se ha reportado para cangrejos intermareales, los cuales aumentaron sus tasas de respiración bajo la exposición a condiciones de acidificación, pero disminuyeron las mismas cuando simultáneamente experimentaron incrementos en los niveles absolutos y la variabilidad de la temperatura (Paganini, 2014). El hecho de que no se hayan observado incrementos en las tasas de respiración de las hembras en el escenario Futuro podría interpretarse como el inicio de una supresión metabólica debido a un exceso de estrés generado por la acción simultánea de la acidificación y/o el incremento en los niveles de radiación junto al aumento de temperatura. Sin embargo, cabe señalar que las hembras utilizadas en su mayoría fueron portadoras de huevos y/o juveniles, lo cual puede haber agregado una gran variabilidad a las tasas de respiración observadas debido a las diferencias en el número y el estado de desarrollo de la progenie, así como a alteraciones en el comportamiento de las hembras debido al cuidado de la misma (Fernández et al., 2020). Sin embargo, el uso de hembras al azar sin diferenciar por ovígeras y no ovígeras resultó ser la mejor aproximación, dado que las no ovígeras se encuentran en muy bajas abundancias en el ambiente (Alonso et al., 1995) y se optó por evitar un tratado previo para remover la progenie del marsupio para disminuir el estrés para los animales.

A diferencia de las hembras, en los machos las condiciones del escenario Futuro provocaron un aumento significativo en las tasas de respiración durante el primer día de exposición, aunque luego de 6 días de incubación bajo las condiciones experimentales no se observaron

diferencias entre escenarios. Estos resultados sugieren una rápida capacidad de aclimatación en los machos (Semsar-kazerouni & Verberk, 2018). El proceso de aclimatación involucra ajustes fisiológicos y/o comportamentales, que incrementan la tolerancia frente a factores de estrés (Pruitt, 1990; Voituron et al., 2022). Sin embargo, en algunos casos, estos ajustes pueden alterar el balance energético del organismo, y generar efectos a largo plazo, como la reducción del crecimiento y/o de las tasas de reproducción (Long et al., 2019). Eso es particularmente relevante cuando el aumento en la demanda energética no es compensado por un incremento en el consumo de alimentos. Por ejemplo, estudios previos con cangrejos intermareales expuestos a condiciones de acidificación observaron que las tasas de crecimiento disminuyeron a pesar de una aparente aclimatación en las tasas de respiración, evidenciando un mayor gasto energético que en el grupo control (Long et al., 2019). Este podría ser también el caso de los machos de *A. valida*, en los cuales no se observó un incremento en el consumo; sin embargo, se requieren estudios de mayor duración para evaluar posibles efectos sobre procesos vitales como el crecimiento y la reproducción.

Independientemente del escenario, en algunas estaciones del año se registró un incremento en las tasas de consumo de alimento entre el primer y el sexto día de incubación en ambos sexos. Este aumento podría reflejar un proceso de aclimatación a las condiciones experimentales, aunque también podría deberse a cambios en la calidad nutricional o en la palatabilidad del alimento (Cruz-Rivera & Hay, 2000a), los cuales pueden haberse generado por el mantenimiento de las macroalgas en condiciones de laboratorio durante el periodo experimental.

Durante todos los experimentos, se observaron eventos de canibalismo en ambos sexos. Este comportamiento ha sido reportado en *A. valida* por Barrett (1966), quien señaló que ocurre principalmente luego de la muerte del individuo, o durante la fase final de la muda, cuando la víctima se encuentra en un estado de alta vulnerabilidad. Aunque una dieta de origen animal aporta mayor valor proteico, estudios previos demostraron que la incorporación de materia de origen animal en la dieta no genera beneficios adicionales en la supervivencia, el crecimiento y la reproducción en *A. valida* (Cruz-Rivera & Hay, 2000b). Los mismos autores, además, observaron que el anfípodo *A. longimana*, una especie de características similares a *A. valida* por su baja movilidad y sus hábitos de habitar tubos entre las algas, no muestra preferencias por dietas ricas en proteínas y nitrógeno frente a dietas de menor

calidad nutricional (Cruz-Rivera & Hay, 2000a). Los casos de canibalismo registrados durante los experimentos (i.e., cuando se hallaron restos de individuos muertos con marcas de consumo), involucraron exclusivamente individuos recién mudados; además en las réplicas en las que se registraron estos eventos no se observó una reducción en el consumo de macroalgas. Esto sugiere que el canibalismo en *A. valida* es un comportamiento ocasional, dirigido hacia individuos vulnerables y no un reemplazo del alimento vegetal por uno de origen animal.

#### **4.4.2. Efectos del CG en la mortalidad de *A. valida***

Las variables asociadas al CG pueden provocar efectos letales cuando los límites de tolerancia de los organismos son superados (Frederich & Pörtner, 2000; Pörtner et al., 2004). En este capítulo, las condiciones del escenario Futuro provocaron un incremento significativo en la mortalidad, especialmente durante el verano (Fig. 4.8). En esta estación, el estrés ambiental se maximiza, debido a las temperaturas extremas experimentadas durante la marea baja, y a los altos niveles de RUV. Por ejemplo, estudios previos reportaron niveles significativos de mortalidad en individuos de *A. valida* que recibieron una dosis de RUV-B de 40 kJ/m<sup>2</sup> e incubados a 15 °C (Helbling et al., 2002). En los experimentos de verano, las dosis diarias de RUV-B recibidas por los organismos en el escenario Futuro alcanzaron en promedio 35 ± 2,6 kJ/m<sup>2</sup>, indicando un nivel de estrés potencialmente elevado. Si bien el aumento de temperatura podría atenuar parcialmente los efectos negativos de la RUV (Moresino & Helbling, 2010), la mayor mortalidad observada en el escenario Futuro sugiere que la RUV puede haber contribuido, al menos en parte, a las muertes registradas.

En el área de estudio, las temperaturas registradas en las pozas de marea durante la marea baja diurna en verano alcanzan valores promedio de ~30 °C, con máximos de hasta 35 °C (Capítulo 2). Estudios previos demostraron que, en especies naturalmente expuestas a grandes fluctuaciones de temperatura, los límites de termotolerancia suelen coincidir con las máximas temperaturas ambientales (Stillman, 2003), lo que sería el caso de *A. valida*. Cuando la temperatura excede este límite de tolerancia, se produce una insuficiencia respiratoria en los organismos, debida a dos procesos que actúan en simultáneo: (1) un desajuste entre el aumento en la demanda de oxígeno y la capacidad del organismo para proveerlo y (2) una disminución en la disponibilidad de oxígeno en el agua (Frederich &

Pörtner, 2000, Pörtner, 2001, Audzijonyte et al., 2019). Aunque en *A. valida* no se evaluó directamente el límite de termotolerancia, los resultados del Capítulo 3 mostraron que en verano los individuos tendrían una menor capacidad de ajustar sus tasas de respiración ante un incremento de temperatura. Sumado a eso, se ha demostrado que la disminución del pH puede reducir el rango de termotolerancia en crustáceos, incrementado su vulnerabilidad cuando ambos factores actúan de manera conjunta (Metzger et al., 2007; Walther et al., 2009). En consecuencia, bajo un escenario de CG como el simulado en este capítulo, el éxito poblacional de *A. valida* en el área de estudio podría estar seriamente comprometido.

#### **4.4.3. Patrones estacionales en la respiración y el consumo de alimento de *A. valida***

Las tasas de consumo de alimento y de respiración de *A. valida* variaron a lo largo de las estaciones. En términos generales, el consumo fue menor en invierno y se incrementó en las estaciones cálidas; mientras que las tasas de respiración alcanzaron su máximo en primavera y mostraron poca variabilidad entre las demás estaciones. Estudios previos demostraron que las diferencias estacionales en las tasas metabólicas de crustáceos y otros invertebrados marinos pueden deberse tanto a la variabilidad de factores ambientales -como la temperatura o el fotoperíodo-, como a factores intrínsecos, tales como el estado reproductivo o nutricional de los individuos (Brockington & Clarke, 2001, Doyle et al., 2012). Por ejemplo, se ha demostrado que las tasas de respiración en dos especies de bivalvos varían a lo largo del año, alcanzando valores máximos durante el período reproductivo (Smaal et al., 1997). En *A. valida*, los resultados del Capítulo 2 mostraron que, si bien en el área de estudio se registran hembras ovígeras durante todo el año, la producción de huevos en primavera suele ser mayor que en las demás estaciones. En el presente capítulo, si bien el porcentaje de hembras portadoras de huevos y/o juveniles utilizadas en las mediciones de respiración fue similar en todas las estaciones (verano: 86 %; otoño y primavera: 83 %; invierno: 80 %), en primavera se registró en promedio un mayor número de progenie por hembra (verano:  $13,4 \pm 11,5$ ; otoño:  $13,5 \pm 8,8$ , invierno:  $16,9 \pm 10,9$ ; primavera:  $22,7 \pm 17,0$ ). En este contexto, las mayores tasas de respiración registradas en primavera podrían reflejar un mayor gasto energético debido a la producción de un mayor número de huevos en esa estación, sumado

a la respiración propia de los embriones y/o juveniles en el marsupio a la hora de evaluar las tasas de respiración.

Asumiendo que la tasa de respiración aumenta o disminuye de manera proporcional a la demanda energética del organismo, y que cada unidad de alimento ingerido aporta la misma cantidad de energía, cabría esperar que las tasas de ingesta varíen entre estaciones de forma proporcional a las tasas de respiración, manteniendo así el balance energético del organismo (Lemoine & Burkepile, 2012). Sin embargo, los resultados de este capítulo indican que las tasas de consumo y de respiración no variaron proporcionalmente entre estaciones. Tanto machos como hembras consumieron menos de la mitad de alimento en invierno respecto a las demás estaciones, aunque este patrón no se reflejó en las tasas de respiración. Por otra parte, el consumo de alimento fue mayor en verano, especialmente en el caso de las hembras, mientras que las tasas de respiración en esa estación no fueron significativamente mayores que en las demás estaciones. Algunas especies herbívoras ajustan sus tasas de consumo en función de la calidad nutricional del alimento, aumentando la ingesta cuando la calidad es baja para satisfacer la demanda energética, y reduciéndola cuando el alimento posee mayor valor nutritivo, compensando así cantidad por calidad (Cruz-Rivera & Hay, 2000a; Cruz-Rivera & Hay, 2001). Si bien no se realizaron mediciones durante los experimentos, los resultados del Capítulo 2 evidenciaron que la calidad nutricional de *Ulva* spp. (i.e., relación carbono/nitrógeno) varía estacionalmente, siendo más alta en invierno y más baja en verano. Por lo tanto, la mayor calidad nutricional de *Ulva* spp. en invierno podría explicar, al menos en parte, las menores tasas de ingesta observadas en esta estación, mientras que en verano las hembras habrían incrementado su consumo para compensar la menor calidad del alimento.

#### **4.4.4. Condiciones experimentales**

Las zonas intermareales se caracterizan por intensas fluctuaciones de las condiciones físico-químicas a lo largo del ciclo de mareas. Una de ellas es el pH, que puede variar ampliamente durante la marea baja, aumentando o disminuyendo respecto a los valores del agua de mar según la concentración de CO<sub>2</sub> disuelto debido al balance entre los procesos de respiración y fotosíntesis (Middelboe & Hansen, 2007; Wolfe et al., 2020). En los experimentos de este capítulo, con excepción de los realizados en primavera, se registró un incremento en los

niveles de pH en ambos escenarios luego de 24 h de iniciado el período experimental, atribuible a la actividad fotosintética de las macroalgas. Mediciones complementarias en invierno revelaron que el pH en los microcosmos disminuyó durante la noche y aumentó durante la fase lumínica, replicando el comportamiento natural de las pozas de marea (Middelboe & Hansen, 2007; Wolfe et al., 2020). En el área de estudio, se han registrado valores de pH de más de 9,3 durante mareas bajas diurnas (Capítulo 2) y de 7,9 durante mareas bajas nocturnas (observación personal), aunque en intermareales de zonas templadas, los valores nocturnos típicos pueden alcanzar los 7,5 (Legrand et al., 2018; Wolfe et al., 2020). Por lo tanto, el rango de fluctuaciones de pH experimentado por los organismos en el escenario Presente se mantuvo dentro de los límites naturales del ambiente, mientras que en el escenario Futuro el pH durante la noche alcanzó valores más extremos, consistentes con las proyecciones bajo un escenario de CG (Bindoff et al., 2019). Además, en otoño y primavera se registró un mayor aumento del pH en el escenario Futuro, posiblemente asociado a un aumento de la actividad fotosintética de las macroalgas debido a las condiciones experimentales impuestas (Ji & Gao, 2020). Este mayor aumento del pH puede haber atenuado parcialmente el efecto de la acidificación en dicho escenario. Sin embargo, el mayor rango de variación del pH en el escenario Futuro respecto al Presente puede haber contribuido a un estrés adicional para los anfípodos (Alenius, 2012). En contraste con las demás estaciones, durante la primavera se registró una disminución del pH en ambos escenarios luego de 24 h de exposición, siendo su magnitud mayor en los microcosmos de las hembras que en los de los machos. Los individuos en primavera fueron de mayor tamaño y mostraron las mayores tasas respiratorias *per cápita*, especialmente las hembras. Por lo tanto, en esta estación, el consumo de O<sub>2</sub> por respiración podría haber superado la producción de oxígeno por fotosíntesis, resultando en una producción neta de CO<sub>2</sub> a lo largo del día de exposición.

## 4.5. Conclusiones

Los resultados de este capítulo mostraron que un escenario de CG de aumento de temperatura, de radiación solar y de acidificación, afecta de manera diferencial a machos y hembras de *A. valida*. Bajo las condiciones del escenario Futuro, las hembras exhibieron un incremento en las tasas de consumo de alimento, mientras que las tasas de respiración solo

se vieron afectadas en los machos, y únicamente al inicio de la exposición. Además, se observó una mayor mortalidad en ambos sexos en el escenario Futuro, la cual fue particularmente pronunciada en verano. Las alteraciones en el balance metabólico, junto con las elevadas tasas de mortalidad en el escenario Futuro podrían comprometer la dinámica poblacional de esta especie, reduciendo las tasas de crecimiento y reproducción y consecuentemente la producción de biomasa. Dado que *A. valida* representa una importante fuente de alimento para numerosas especies, los efectos observados podrían traducirse en una disminución del flujo de energía hacia estos niveles tróficos superiores. Los resultados de este capítulo destacan la importancia de considerar la variabilidad intraespecífica a la hora de evaluar los potenciales efectos del CG. Son escasos los estudios que analizan diferencias en respuestas entre sexos. No obstante, al no contemplar estas diferencias, los impactos del CG podrían subestimarse o pasar inadvertidos.

## **Capítulo 5:**

**Efectos de un aumento de temperatura, de radiación solar, de nutrientes y de acidificación en *Ulva* spp. y sus efectos indirectos en *Ampithoe valida***

## 5.1. Introducción

El impacto del CG sobre una especie no solo depende de los efectos directos de las distintas variables asociadas a este fenómeno, sino también de los efectos indirectos que surgen a través de las interacciones con otras especies afectadas (O'Connor, 2009; Poore et al., 2013). En la naturaleza, los organismos mantienen una red de relaciones complejas que incluyen facilitación, mutualismo, competencia e interacciones tróficas, entre otras (Valiñas et al., 2022). Las distintas variables del CG pueden modificar estas interacciones alterando la abundancia, el estado fisiológico o el comportamiento de las especies involucradas, o bien modificando la intensidad de las interacciones ecológicas (Poore et al., 2013). Las interacciones tróficas, especialmente las relaciones entre productores y consumidores, son fundamentales para el funcionamiento de los ecosistemas, ya que determinan la producción de biomasa, la transferencia de energía y, en última instancia, la estructura y diversidad de especies de las comunidades (Spivak et al., 2009).

*Ampithoe valida* vive asociado a macroalgas, las cuales le proporcionan refugio y alimento (Alonso et al., 1995; Valiñas et al., 2014; Zheng et al., 2013). Estas macroalgas pueden estar afectadas por procesos vinculados al CG, como el aumento de la temperatura oceánica, la acidificación, y los cambios en los niveles de radiación solar que penetra en la columna de agua (Ji & Gao, 2020). Las macroalgas que habitan zonas costeras, especialmente en cercanía a ríos o zonas urbanas, están además expuestas al impacto de actividades antrópicas terrestres. Estas actividades incluyen las agrícola-ganaderas e industriales, que incrementan el aporte de nutrientes a los ecosistemas costeros (He & Silliman, 2019). La creciente urbanización de las zonas costeras (Conley et al., 2009), sumado al aumento en la intensidad y frecuencia de eventos extremos de vientos y precipitaciones asociados al CG, intensifican la escorrentía y el consecuente aporte de materia orgánica y nutrientes hacia los ecosistemas marinos (Vizzo et al., 2021b; IPCC, 2022). Estos cambios pueden afectar a las macroalgas, al alterar las tasas fotosintéticas y de crecimiento, la palatabilidad y la composición bioquímica de sus tejidos (Duarte et al., 2016; Kang & Chung, 2017; Ji & Gao, 2020). Sin embargo, la magnitud y dirección de los efectos varían entre especies y dependen de la interacción entre las distintas variables de CG consideradas (Stengel et al., 2014; Phelps et al., 2017; Ji & Gao, 2020). Por ejemplo, el incremento en la disponibilidad de nutrientes, particularmente de nitrógeno y fósforo, suele acelerar las tasas de crecimiento de muchas

especies de macroalgas (Bracken, 2004), particularmente de las macroalgas verdes (Peckol et al., 1994; Teichberg et al., 2008). Un aumento simultáneo de temperatura y de pCO<sub>2</sub> puede potenciar los efectos positivos de los nutrientes sobre el crecimiento, como se ha observado en *Ulva rigida* expuesta a incrementos en los niveles de nitratos (Gao et al., 2017). No obstante, el efecto de los nutrientes puede depender de los niveles de radiación solar: en *Ulva fasciata*, por ejemplo, el aumento de crecimiento tras el enriquecimiento con nutrientes sólo se registró bajo condiciones de elevada radiación solar (Lapointe & Tenore, 1981).

Por su parte, la acidificación oceánica puede favorecer la fotosíntesis y el crecimiento de muchas especies de macroalgas no calcáreas al aumentar la disponibilidad de carbono inorgánico disuelto (Kroeker et al., 2010; Xu & Gao, 2012; Koch et al., 2013; Chen et al., 2019). Por ejemplo, estudios previos observaron un efecto positivo de la acidificación en el proceso de la fotosíntesis de *Ulva prolifera* (i.e., aumento en las tasas de transporte de electrones, disminución en la actividad de los mecanismos de concentración de carbono y menor extinción no fotoquímica), que se tradujo en un incremento en la tasa de crecimiento de esta especie; sin embargo, al mismo tiempo se incrementó la sensibilidad de las macroalgas al estrés por altos niveles de radiación PAR (Liu et al., 2012; Xu & Gao, 2012). De manera similar, un aumento de pCO<sub>2</sub> incrementó las tasas de crecimiento en *Ulva pertusa* sólo en aquellos casos en los que simultáneamente se incrementaron los niveles de amonio (Kang & Chung, 2017).

No solo el crecimiento, sino también las propiedades físicas y bioquímicas de las macroalgas pueden estar afectadas por el CG, lo que puede modificar su palatabilidad y calidad nutricional para los herbívoros (Spivak et al., 2009; Duarte et al., 2016; Phelps et al., 2017). Por ejemplo, un mayor aporte de nutrientes puede favorecer su acumulación en los tejidos algales, mejorando su calidad nutricional (Peckol et al., 1994; Teichberg et al., 2008). Sin embargo, se ha observado que un incremento en los niveles de radiación PAR puede reducir la tasa de acumulación de nitratos en *Ulva fasciata* (Lapointe & Tenore, 1981). A su vez, un aumento de la actividad fotosintética en respuesta a un incremento en los niveles de radiación PAR o de pCO<sub>2</sub> puede incrementar la fijación de carbono, modificando la composición bioquímica de los tejidos algales y alterando el contenido de azúcares, proteínas y materia orgánica (Celis-Pla et al., 2015; Chen et al., 2019). Se ha demostrado que un incremento de pCO<sub>2</sub> redujo el contenido de proteínas solubles y aumentó la relación C:N en *Pyropia*

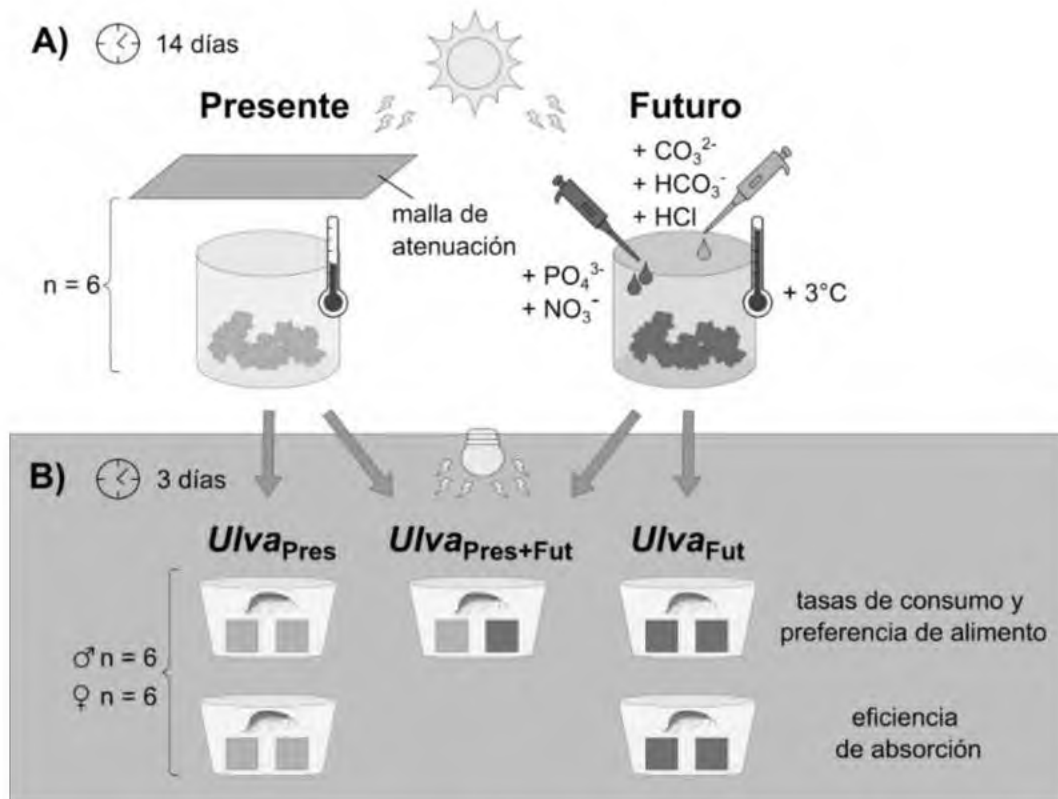
*haitanensis* y *Ulva lactuca* (Chen et al., 2019). Resultados similares fueron reportados en macroalgas pardas, donde escenarios de aumento de pCO<sub>2</sub> redujeron el contenido proteico y de materia orgánica de los tejidos (Duarte et al., 2016).

La palatabilidad y la calidad nutricional de las algas son aspectos cruciales para los herbívoros que las consumen, ya que de ellas dependen para satisfacer sus necesidades energéticas y mantener funciones vitales como el crecimiento y la reproducción (Pennings et al., 1998; Cruz-Rivera & Hay, 2001; Duarte et al., 2016). Los herbívoros han desarrollado mecanismos fisiológicos y comportamentales para optimizar sus estrategias de forrajeo y/o aumentar la eficiencia en la absorción de nutrientes. Se ha demostrado que muchas especies seleccionan preferentemente alimentos de mayor palatabilidad y/o calidad nutricional cuando tienen varias opciones disponibles (Cruz-Rivera & Hay, 2000a; Duarte et al., 2010; Leung et al., 2018). Además, algunos herbívoros pueden incrementar las tasas de consumo cuando la calidad nutricional del alimento es baja, implementando mecanismos de compensación (Cruz-Rivera & Hay, 2001; Duarte et al., 2016). En este contexto, los cambios en la composición bioquímica y estructural de las macroalgas inducidos por el CG podrían alterar las tasas de consumo y las preferencias alimentarias de los herbívoros, afectando su balance energético y su *fitness* (Hemmi & Jormalainen, 2002, Poore et al., 2013, Duarte et al., 2016, Rothäusler et al., 2017).

El objetivo del presente capítulo es evaluar a mediano plazo (i.e. días) los efectos de un escenario de CG de aumento de temperatura, de radiación solar, de nutrientes y de acidificación sobre el crecimiento, la calidad nutricional y la palatabilidad de macroalgas del género *Ulva* (Chlorophyta), una de las principales fuentes de alimento de *A. valida*, y cómo estos cambios impactan en las tasas de consumo, la preferencia de alimento y la eficiencia de absorción de los anfípodos.

## **5.2. Materiales y Métodos**

Para cumplir con el objetivo propuesto, se incubaron especímenes de *Ulva* spp. durante dos semanas bajo dos condiciones contrastantes, Presente y Futuro (Fig. 5.1 A), utilizando un diseño experimental tipo Clúster en el que se manipularon todas las variables de interés en forma simultánea.



**Fig. 5.1** Diseño experimental para evaluar los efectos de un escenario de CG de aumento de temperatura, de radiación solar, de nutrientes y de acidificación en *Ulva* spp. (A) y sus efectos indirectos en machos y hembras de *Amphiphoe valida* (B). Los anfípodos fueron alimentados con macroalgas provenientes de los escenarios Presente (*Ulva<sub>Pres</sub>*) y Futuro (*Ulva<sub>Fut</sub>*), así como con una dieta mixta (*Ulva<sub>Pres+Fut</sub>*)

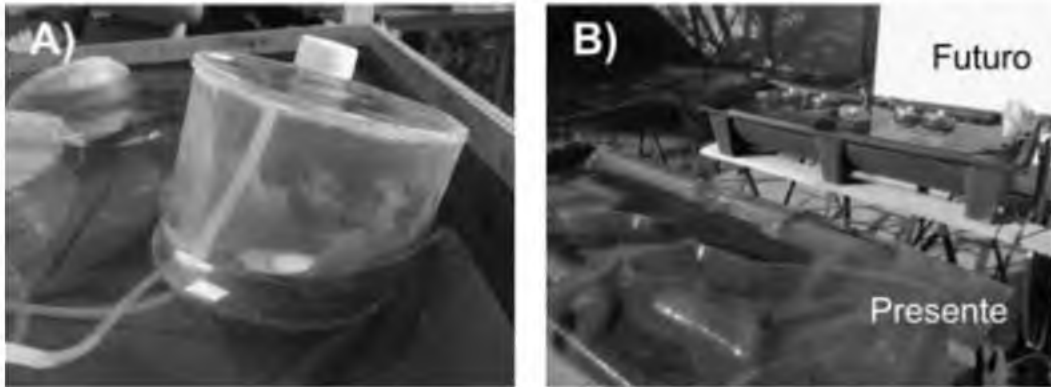
La duración del período de incubación de las macroalgas bajo las condiciones experimentales fue elegida con el objetivo de permitir al menos duplicar la biomasa algal, en base a resultados obtenidos en pruebas preliminares. Al finalizar el periodo de incubación, las macroalgas provenientes de ambos escenarios experimentales se utilizaron para alimentar a machos y hembras de *A. valida* (Fig. 5.1 B). Dado que la respuesta fisiológica y conductual de los organismos puede variar a lo largo del año (Peckol et al., 1994; Capítulos 3 y 4, esta tesis), los experimentos se llevaron a cabo en otoño (mayo) y en primavera (octubre) de 2021. La selección de estas dos estaciones se basó en los resultados del tercer Capítulo, los cuales indicaron que, en primavera y otoño, la magnitud de respuesta de los anfípodos a un aumento de temperatura fue mayor que en las demás estaciones. Además, la primavera representa la época de mayor actividad reproductiva (ver Capítulo 2, esta tesis), siendo una época crítica para la persistencia de la población. A continuación, se detalla la metodología

utilizada tanto para el cultivo de las macroalgas, como para los ensayos de alimentación de los anfípodos.

### **5.2.1. Cultivo de macroalgas**

Los especímenes de *Ulva* spp. fueron recolectados en el intermareal de Playa Bonita (complejo Playa Magagna, 43°22'S – 65°03'W, Capítulo 2) y trasladados inmediatamente al laboratorio. Las macroalgas se limpiaron cuidadosamente bajo lupa binocular con la ayuda de pinceles y se colocaron porciones de talo de  $1,68 \pm 0,03$  g en microcosmos de policarbonato de 1,5 L transparente a la RUV ( $n = 12$ , Fig. 5.2 A), previamente llenados con agua de mar. El agua fue renovada diariamente utilizando un sistema de recirculación. De los doce microcosmos, seis se asignaron al escenario Presente, en el cual se reprodujeron las condiciones de temperatura, pH, radiación solar y nutrientes del ambiente al momento de realizar los experimentos, y los seis restantes al escenario Futuro, donde se incrementaron la temperatura (+3 °C), los niveles de radiación solar (+50 %) y las concentraciones de nutrientes (i.e.,  $\text{NO}_3^- + \text{NO}_2^-$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$ ) y se redujo el pH del agua de mar (-0,35, Fig. 5.1 A), respecto al escenario Presente. Las condiciones de temperatura, radiación solar y pH en ambos escenarios se lograron siguiendo la metodología descrita en el Capítulo 4 (sección 4.2.1). En cuanto a la concentración de nutrientes, en el escenario Presente, se adicionaron  $\sim 2 - 3$   $\mu\text{moles/L}$   $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  tanto en otoño como en primavera, y  $\sim 3 - 4$   $\mu\text{moles/L}$  y  $\sim 1 - 2$   $\mu\text{moles/L}$  de  $\text{NaNO}_3$  en otoño y primavera, respectivamente, a partir de soluciones Stock (Guillard & Ryther, 1962). El agregado de nutrientes en el escenario Presente se realizó con el fin de evitar que los mismos sean limitantes durante el período de incubación. De esa manera, en este escenario se reprodujeron las concentraciones máximas de macronutrientes registradas en el área de estudio según el mes considerado (Bermejo et al., 2018). En el escenario Futuro, se adicionaron  $\sim 8 - 10$   $\mu\text{moles/L}$  de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  y  $\sim 8 - 12$   $\mu\text{moles/L}$  de  $\text{NaNO}_3$  en ambas estaciones, superando así los niveles máximos de nutrientes registrados en el ambiente (Bermejo et al., 2018). Durante el día (i.e., 8:00 am – 8:00 pm), los microcosmos se mantuvieron en baños de agua ubicados en el patio de la EFPU (Fig. 5.2 B), simulando diariamente una fase de marea baja (10:00 am – 4:00 pm), en la que la temperatura y el pH fluctuaron naturalmente, tal como se describe en el Capítulo 4 (sección 4.2.1). Para simular el ascenso de la marea, diariamente a las 4:00 pm se realizó un recambio total del agua en

los microcosmos, utilizando un sistema de recirculación. Para ello, se vaciaron los microcosmos y se conectaron a un tanque de reserva de 10 L (i.e., un tanque por cada escenario) a través de bombas de agua. En los tanques, se realizaron los ajustes de pH, nutrientes y temperatura necesarios, de manera tal que simularan las condiciones de los escenarios Presente y Futuro de acuerdo a la estación considerada (Capítulo 4, sección 4.2.1). Antes y después de la simulación de la marea baja, los microcosmos se mantuvieron a la temperatura promedio del agua de mar registrada durante la marea alta de cada estación ( $T_{Mar}$ , i.e., otoño: Presente 14 °C, Futuro: 17 °C, primavera: Presente: 11 °C, Futuro: 14 °C). Durante la noche (i.e., 8:00 pm – 8:00 am del día siguiente) los microcosmos se mantuvieron en oscuridad en cámaras de cultivo (Sanyo MLR-350, MiniCella) a temperatura  $T_{Mar}$  y  $T_{Mar} + 3$  °C, según el escenario correspondiente.



**Fig. 5.2** (A) Microcosmos utilizados para el cultivo de las macroalgas. (B) Baños de agua con control de temperatura en los dos escenarios Presente (adelante) y Futuro (fondo).

### **5.2.2. Mediciones de temperatura, pH, irradiancia y nutrientes**

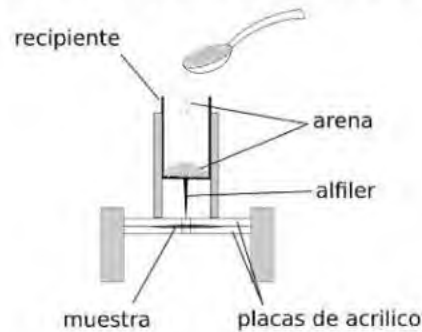
Las condiciones de temperatura e irradiancia (PAR, RUV-A y RUV-B) fueron monitoreadas de forma continua, tal como fue descrito en el Capítulo 4 (sección 4.2.4). El pH fue registrado diariamente al momento del cambio del agua de los microcosmos (i.e., pH inicial: pH del agua que se utilizó para rellenar los microcosmos; pH final: pH del agua en los microcosmos luego de 24 h de incubación), así como al azar en diferentes momentos durante el período de incubación. Para monitorear la concentración de macronutrientes (i.e.,  $\text{NO}_3^- +$

$\text{NO}_2^-$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$ ), cada 2 – 3 días se tomaron muestras del agua utilizada en los recambios diarios en los microcosmos (i.e., nutrientes iniciales,  $n = 3$ ), repitiéndose la toma 24 h más tarde antes del siguiente recambio (i.e., nutrientes finales,  $n = 3$ ). Las muestras para la determinación de nutrientes finales se colectaron de tres microcosmos seleccionados al azar, mientras que las correspondientes a los nutrientes iniciales se obtuvieron de los tanques de reserva. Todas las muestras fueron conservadas a  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  hasta su posterior análisis mediante métodos espectrofotométricos (Strickland & Parsons, 1972), utilizando un espectrofotómetro marca Hewlett Packard modelo HP-8453E.

### **5.2.3. Determinaciones en tejidos de macroalgas**

El crecimiento de las macroalgas en los escenarios Presente y Futuro se estimó a partir de la diferencia en el peso húmedo de los tejidos al inicio y al final del periodo de incubación. Para tal fin, las macroalgas se secaron cuidadosamente con toallas de papel para eliminar el exceso de agua y se pesaron en una balanza digital (Ohaus Pioneer PA214; precisión: 0,1 mg). Adicionalmente, se evaluó el cambio en la relación peso húmedo/área, como medida indirecta del grosor de los talos. Para esto, se incubaron fragmentos de talos (cuadrados de 1,5 x 1,5 cm, cortados con ayuda de un bisturí) bajo ambos escenarios, los cuales fueron pesados y fotografiados al inicio y al final del período experimental. El área de cada talo se estimó a partir de las imágenes utilizando el software ImageJ. Estos mismos talos fueron utilizados posteriormente para evaluar cambios en la dureza de las macroalgas utilizando un penetrómetro, siguiendo la metodología descrita en Gotoh et al. (2011). Esta técnica consiste en colocar una porción de talo entre dos placas de acrílico perforadas, apoyando sobre él la punta de un alfiler entomológico sostenido por una manga vertical estrecha (Fig. 5.3). En el extremo opuesto del alfiler se sitúa un recipiente liviano de plástico, sobre el que cuidadosamente se va agregando arena hasta que la punta del alfiler perfora completamente el talo. La suma del peso de la arena, el recipiente, y el alfiler representan el peso necesario para perforar la lámina. Se realizaron tres mediciones en distintos puntos del talo y se obtuvo el valor promedio. Este procedimiento permite realizar comparaciones de la dureza relativa de talos incubados bajo distintas condiciones experimentales (Duffy & Hay, 1991; Phelps et al., 2017; Rothäusler et al., 2017). Sin embargo, no permite sacar conclusiones acerca de la

fuerza real que realizaría el herbívoro para romper los tejidos, dado que el peso necesario para perforar el talo depende del equipo de medición utilizado y del diámetro del alfiler.



**Fig. 5.3** Esquema del penetrómetro utilizado para determinar la dureza de las macroalgas.

Para evaluar cambios en la calidad nutricional de las macroalgas, se estimó el contenido de materia orgánica (MO) y la relación carbono : nitrógeno (C:N) en especímenes de *Ulva* spp. recolectados en el intermareal (i.e.,  $t_0$ ) y en porciones de talo provenientes de los escenarios Presente y Futuro al final del período de incubación (i.e.,  $t_{final}$ ). Para la determinación del contenido de MO, las macroalgas se secaron en estufa a 40 °C durante 24 h. Una vez secas, se pesaron utilizando una balanza digital y a continuación se colocaron en una mufla a 450 °C durante 5 h, para luego registrar el peso de la ceniza obtenida. El contenido de MO se calculó como el porcentaje de peso seco de tejido libre de cenizas. La determinación del contenido de carbono y de fósforo se realizó mediante combustión seca utilizando un analizador automático (Leco modelo CN628, Centro Nacional Patagónico, CENPAT-CONICET). En los experimentos de primavera, se evaluó adicionalmente el contenido de agua en talos de macroalgas recolectadas en el intermareal (i.e.,  $t_0$ ) y en talos incubados en los escenarios Presente y Futuro al final del período de incubación (i.e.,  $t_{final}$ ). El contenido de agua se estimó a partir de la diferencia entre el peso húmedo y el peso seco de las macroalgas, luego de un período de secado de 24 h a 40 °C. Los valores de contenido de agua fueron expresados en porcentaje.

#### **5.2.4. Ensayos de alimentación de *A. valida***

Finalizado el periodo de incubación de las macroalgas, se utilizaron porciones de talos provenientes de los escenarios Presente y Futuro para alimentar a los anfípodos, con el fin

de evaluar sus tasas de consumo, preferencia de alimento y eficiencia de absorción de la MO. Los ensayos de alimentación se realizaron separadamente para machos y hembras, utilizando individuos adultos de los mayores tamaños de cada estación (ver Tabla 5.1), colectados en el intermareal de Playa Bonita. Los individuos se mantuvieron en recipientes plásticos con agua de mar hasta el inicio de cada ensayo (máximo tres días de mantenimiento en el laboratorio), y fueron alimentados con *Ulva* spp. Durante el día, los recipientes se colocaron al aire libre en las instalaciones externas de la EFPU, permitiendo que los organismos estuvieran expuestos a las condiciones naturales de radiación y temperatura del ambiente. Durante la noche, los recipientes fueron colocados en una cámara de cultivo (Sanyo modelo MLR-350) a temperatura controlada, utilizando como referencia la temperatura del agua de mar registrada en cada estación en la que se realizaron los experimentos (i.e., otoño: 14 °C, primavera: 11 °C), y bajo un fotoperiodo de 12 h luz: 12 h oscuridad. El día previo al comienzo de los ensayos, las algas ofrecidas como alimento fueron retiradas, y los individuos se mantuvieron en ayunas para vaciar sus tractos digestivos.

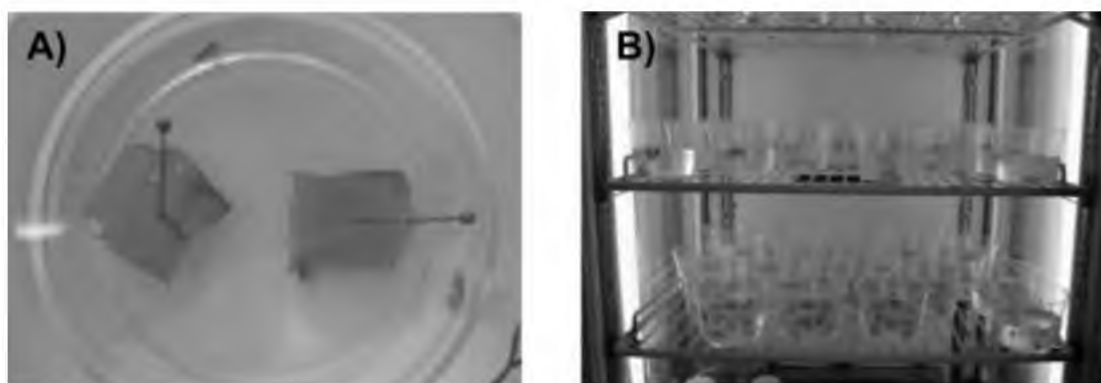
Para evaluar las tasas de consumo y la preferencia de alimento, se colocaron grupos de 3 – 4 individuos en recipientes plásticos con agua de mar autoclavada ( $V = 100$  mL). Se asignaron seis réplicas a cada uno de los siguientes tratamientos de dieta: I) *Ulva*<sub>Pres</sub>: anfípodos alimentados con algas incubadas en el escenario Presente, II) *Ulva*<sub>Fut</sub>: anfípodos alimentados con algas incubadas en el escenario Futuro y III): *Ulva*<sub>Pres+Fut</sub>: anfípodos alimentados con algas incubadas en los escenarios Presente y Futuro (dieta mixta). Para evaluar el crecimiento autogénico de las algas, se realizaron controles sin anfípodos ( $n = 6$ ) para cada tratamiento de dieta.

Para los ensayos de alimentación se utilizaron talos de 1,5 x 1,5 cm. En los tratamientos *Ulva*<sub>Pres</sub> y *Ulva*<sub>Fut</sub>, en cada recipiente se colocaron dos talos de alga provenientes del mismo microcosmos, ya sea del escenario Presente o Futuro según correspondiera, mientras que para el tratamiento de dieta mixta (*Ulva*<sub>Pres+Fut</sub>) se utilizó un talo de alga proveniente de cada escenario. Las macroalgas utilizadas como alimento fueron secadas cuidadosamente con toallas de papel y pesadas en balanza digital antes de ser ofrecidas a los anfípodos. Los talos fueron fijados a los recipientes con alfileres entomológicos (Fig. 5.4 A). En el caso del tratamiento de dieta mixta, se realizaron marcas sobre el borde de cada recipiente, para diferenciar los talos provenientes del escenario Presente de los del Futuro. Los ensayos de

alimentación se realizaron en una cámara de cultivo (Sanyo MLR-350, Fig. 5.4 B) a temperatura controlada (i.e., otoño: 14 °C, primavera: 11 °C), con un fotoperiodo de 12 h luz: 12 h oscuridad y tuvieron una duración de 24 h. Transcurrido este período, los talos fueron removidos de los recipientes, limpiados bajo lupa con un pincel, secados y pesados nuevamente. Los ensayos de alimentación se repitieron durante tres días consecutivos, renovándose diariamente el agua de los recipientes. En los experimentos de primavera, las hembras consumieron todo el alimento durante el primer día, por lo que la duración de los ensayos en los días siguientes se redujo a 19 y 21 h, respectivamente. Finalizados los ensayos de alimentación, los talos del tratamiento *Ulva*<sub>Pres+Fut</sub> fueron utilizados para realizar la estimación de la dureza de los tejidos, siguiendo la técnica previamente descrita.

**Tabla 5.1** Número de individuos por réplica y peso promedio ( $\pm$  DE) de los individuos utilizados en los ensayos de alimentación para evaluar tasas de consumo y preferencia de alimento, así como eficiencia de absorción de la MO. Para los experimentos se seleccionaron los individuos de mayor tamaño encontrados para cada estación.

	<b>Ensayo</b>	<b>Otoño</b>	<b>Primavera</b>
Individuos por réplica	Consumo y preferencia	4	3
	Eficiencia de absorción	4	4
Peso (mg)	Machos	5,83 $\pm$ 1,95	13,93 $\pm$ 6,99
	Hembras	8,31 $\pm$ 3,70	19,41 $\pm$ 6,09



**Fig. 5.4** (A) Talos de *Ulva* spp. montados sobre alfileres entomológicos para los ensayos de alimentación de los anfípodos. (B) Cámara de cultivo con los recipientes utilizados en los ensayos de alimentación.

La eficiencia de absorción de la MO se estimó en los diferentes tratamientos de dieta a partir de la relación entre el contenido de MO en las heces y en el alimento, siguiendo la metodología propuesta por Conover (1966). Este método no requiere la recolección del total de la materia fecal, lo cual resulta especialmente ventajoso en el caso de *A. valida*, dado que esta especie utiliza parte de sus heces en la construcción de sus tubos (observación personal). Para evaluar la relación de Conover, se alimentaron grupos de anfípodos (3 o 4 individuos dependiendo la estación; Tabla 5.1, n = 6 réplicas por sexo) durante 5 días consecutivos, con talos provenientes de los escenarios *Ulva*<sub>Pres</sub> y *Ulva*<sub>Fut</sub>, respectivamente. Durante este periodo, los individuos se mantuvieron en recipientes de vidrio con agua de mar filtrada y autoclavada (V = 100 mL), bajo las mismas condiciones de temperatura y fotoperíodo descritas anteriormente. El agua y el alimento fueron renovados cada 24 h. Los talos que se removieron de los recipientes fueron limpiados cuidadosamente bajo lupa con un pincel y se conservaron en freezer hasta su posterior análisis. Las heces fueron recolectadas entre 4 y 5 veces al día utilizando una pipeta plástica, y conservadas en freezer, en tubos Falcon de 15 mL. Para determinar el contenido de MO, las muestras conteniendo las heces se descongelaron y se enjuagaron dos veces con agua destilada, para eliminar las sales. Luego de cada lavado, se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 min y el exceso de agua fue removido cuidadosamente con una pipeta. El contenido de MO en las heces y en los talos de *Ulva* spp. fue estimado utilizando la misma metodología descrita en la sección 5.2.3 de este capítulo.

### **5.2.5. Análisis de datos**

El crecimiento de las macroalgas luego de 14 días de incubación se calculó como la diferencia entre el peso húmedo final e inicial del tejido, y se expresó como porcentaje respecto al peso inicial. Asimismo, se evaluaron los cambios en la relación peso húmedo/área y en la dureza de los talos (i.e., fuerza de ruptura) como la diferencia entre los valores medidos al final del periodo de incubación respecto del inicial. Para evaluar diferencias entre escenarios (Presente y Futuro) y estaciones (otoño y primavera) en el crecimiento, la dureza y la relación peso húmedo/área de las algas se realizaron ANOVA de dos vías utilizando el software R versión 4.0.2 (R Core Team, 2020) con el paquete adicional car (Fox & Weisberg, 2019). En el caso de la MO y la relación C:N, se realizó el mismo análisis estadístico descrito anteriormente, evaluando los cambios en dichos parámetros entre las macroalgas colectadas

en el intermareal (i.e.,  $t_0$ ) y aquellas incubadas en los escenarios Presente y Futuro, y entre estaciones. El contenido de agua de las macroalgas del experimento de primavera se comparó entre escenarios (i.e.,  $t_0$ , Presente, Futuro) mediante un ANOVA de una vía. En todos los casos se verificaron los supuestos de normalidad y homocedasticidad mediante los tests de Shapiro-Wilk y Levene, respectivamente. En caso de no cumplirse los supuestos, se aplicaron transformaciones a los datos (Zar, 1999). En aquellos casos en los que se detectaron diferencias significativas en el ANOVA, se aplicó el test *a posteriori* de Tukey. Las tasas de consumo de alimento de los anfípodos se compararon entre dietas (i.e.  $Ulva_{Pres}$ ,  $Ulva_{Fut}$  y  $Ulva_{Pres} + Ulva_{Fut}$ ), estaciones (i.e., otoño, primavera) y días de alimentación (i.e., 1, 2, 3) mediante modelos lineales mixtos (MLM), incluyendo las réplicas como variable de efectos aleatorios para corregir la falta de independencia entre días (i.e., diseño de medidas repetidas, Crawley, 2013). Los análisis se realizaron por separado para machos y hembras, utilizando el paquete nlme (Pinheiro et al., 2020) del software R. Los supuestos de normalidad y homocedasticidad fueron evaluados siguiendo a Pinheiro & Bates (2000) y de ser necesario se modeló la heterogeneidad de la varianza. En el caso de detectarse diferencias significativas, se realizaron comparaciones *post hoc* por pares, utilizando el paquete emmeans (Lenth, 2016).

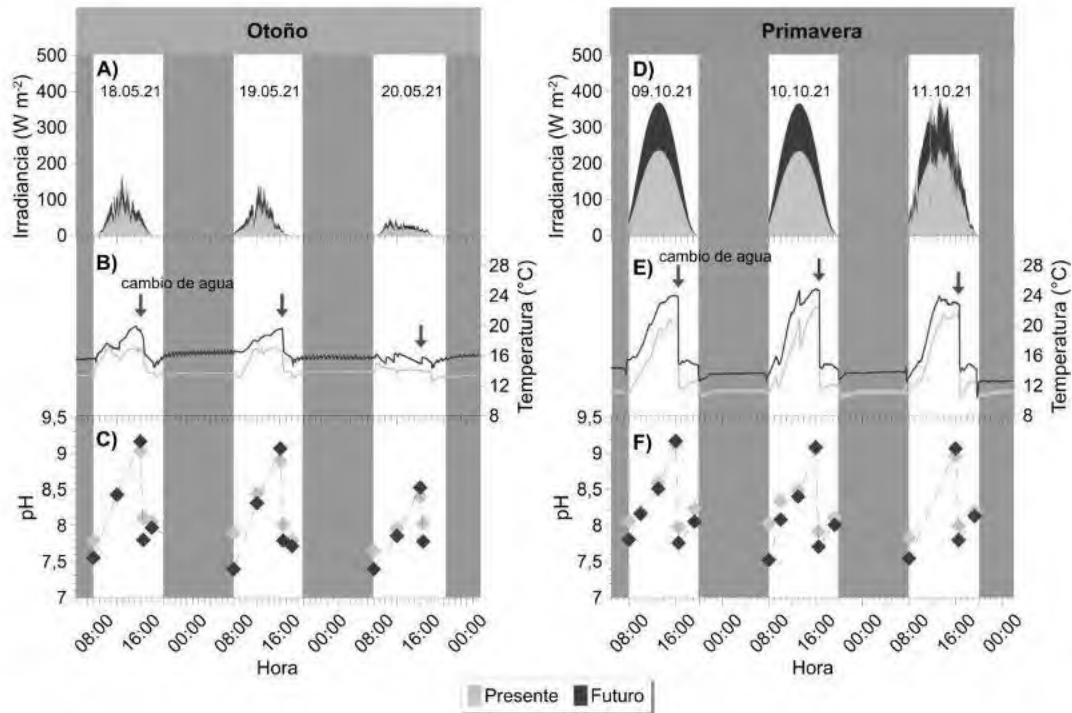
La preferencia de alimento en el tratamiento de dieta mixta ( $Ulva_{Pres} + Ulva_{Fut}$ ), se evaluó estimando la proporción (en porcentaje) de talos consumidos de cada escenario respecto del consumo total, y se realizaron comparaciones para cada día de medición mediante pruebas t para datos pareados (Underwood, 1997). Adicionalmente, se evaluó la relación entre la preferencia de alimento y la dureza de las algas mediante un análisis de regresión. Para ello, se calculó en cada réplica y para cada día, la diferencia en el consumo de los talos  $Ulva_{Pres}$  y  $Ulva_{Fut}$  ofrecidos a los anfípodos, así como la diferencia en su dureza. La eficiencia de absorción de la MO se comparó entre dietas y estaciones mediante ANOVA de dos vías.

## **5.3. Resultados**

### **5.3.1. Condiciones de radiación solar, temperatura, pH y nutrientes durante los experimentos de macroalgas**

Tal como se observa en la Figura 5.5 para tres días representativos del periodo de incubación de las macroalgas así como en la Tabla 5.2 para el periodo total, durante las incubaciones de

primavera, se registraron cielos mayormente despejados con solo algunos días nublados, mientras que los días de otoño se caracterizaron por elevados niveles de nubosidad y una mayor variabilidad en las dosis diarias de PAR y RUV que recibieron las macroalgas (Fig. 5.5 A y D, Tabla 5.2). En primavera, las dosis diarias promedio de PAR y RUV alcanzaron valores de ~4800 y ~500 kJ, respectivamente, en el escenario Presente y de ~7500 y ~890 kJ, en el escenario Futuro, superando ampliamente -más de 5 veces- los valores registrados en otoño (Tabla 5.2).



**Fig. 5.5** Condiciones de irradiancia (i.e., PAR + RUV-A + RUV-B; A, D), temperatura (B, E) y pH (C, F) en los escenarios Presente y Futuro durante 3 días representativos del periodo de incubación de *Ulva* spp. en los experimentos de otoño (i.e., mayo de 2021) y primavera (i.e., octubre de 2021). Las áreas grises indican la fase nocturna, durante la cual los microcosmos se mantuvieron en cámaras de cultivo. Las flechas rojas indican el momento de recambio de agua.

En ambas estaciones se observó un marcado incremento de la temperatura durante la simulación de la marea baja (i.e., 10:00 am – 4:00 pm, Fig. 5.5 B y E). Sin embargo, este incremento fue más pronunciado en primavera, donde la temperatura máxima promedio superó la temperatura  $T_{Mar}$  en ~10,5 °C en ambos escenarios (Fig. 5.5 E). En otoño, el incremento fue de ~3,3 °C (Fig. 5.5 B; Tabla 5.2). A lo largo del periodo experimental, se

mantuvo una diferencia promedio entre escenarios de  $2,3 \pm 0,9$  °C en otoño, y de  $2,7 \pm 0,9$  °C en primavera. Respecto a las condiciones nocturnas (i.e., 8:00 pm – 8:00 am del día siguiente), la temperatura de incubación en las cámaras de cultivo fue de  $13,5 \pm 0,5$  °C (Presente) y  $16,1 \pm 0,6$  °C (Futuro) en otoño y de  $11,2 \pm 0,4$  °C (Presente) y  $13,5 \pm 0,5$  °C (Futuro) en primavera. En relación al pH, los valores iniciales -registrados luego del recambio diario de agua realizado a las 4:00 pm- fueron de  $8,07 \pm 0,08$  y  $7,97 \pm 0,05$  en otoño y primavera, respectivamente, en el escenario Presente. En el escenario Futuro, estos valores fueron  $0,28 \pm 0,06$  (primavera) y  $0,25 \pm 0,08$  (otoño) unidades más bajo respecto del Presente (Tabla 5.2). En ambos escenarios y estaciones se registraron importantes fluctuaciones de pH a lo largo del ciclo diario de incubación (Fig. 5.5 C y F). Durante el día, el pH aumentó progresivamente, alcanzando valores superiores a 9 antes del recambio de agua (Fig. 5.5 C y F, Tabla 5.2). Durante la noche, el pH descendió a valores de  $\sim 7,50$  en el escenario Futuro, mientras que en el Presente los valores mínimos fueron al menos 0,35 unidades superiores. Por lo tanto, la amplitud diaria de fluctuación fue de  $\sim 1,5$  unidades en el escenario Futuro y  $\sim 1$  unidad de pH en el escenario Presente (Tabla 5.2).

En relación a los nutrientes, las concentraciones iniciales de  $\text{NO}_3^- + \text{NO}_2^-$  en el escenario Presente fueron de  $7,34 \pm 0,85$   $\mu\text{M}$  en otoño y de  $2,59 \pm 0,43$   $\mu\text{M}$  en primavera (Tabla 5.2). En el escenario Futuro, las concentraciones iniciales aumentaron un 85 % en otoño y un 260 % en primavera respecto al escenario Presente. Luego de 24 h de incubación, no se detectaron  $\text{NO}_3^- + \text{NO}_2^-$  disueltos en el agua, para ninguno de los escenarios o estaciones (Tabla 5.2). En el caso del  $\text{PO}_4^{3-}$ , las concentraciones iniciales en el escenario Presente fueron de  $4,56 \pm 0,94$   $\mu\text{M}$  en otoño y  $3,44 \pm 0,97$  en primavera (Tabla 5.2), mientras que en el escenario Futuro representaron incrementos del 132 % y 213 %, respectivamente, respecto al Presente. En ambas estaciones, se registró una disminución de la concentración de  $\text{PO}_4^{3-}$  de  $\sim 1,5$   $\mu\text{M}$  en Presente y  $\sim 2,5$   $\mu\text{M}$  en Futuro, tras 24 h de incubación, manteniéndose concentraciones de al menos  $1,97 \pm 0,53$   $\mu\text{M}$  en Presente y  $7,78 \pm 3,40$   $\mu\text{M}$  en Futuro (Tabla 5.2).

**Tabla 5.2** Condiciones experimentales durante la incubación de las macroalgas en los experimentos de otoño (i.e., mayo de 2021) y primavera (i.e., octubre de 2021). Se muestran los valores promedio ( $\pm$  DE) de las dosis diarias de irradiancia (PAR y RUV), las temperaturas máximas alcanzadas durante la fase de marea baja, los valores de pH después del llenado de los microcosmos (i.e., inicial) así como los valores mínimos y máximos alcanzados durante la noche y el día, y las concentraciones de nutrientes ( $\text{NO}_3^- + \text{NO}_2^-$  y  $\text{PO}_4^{3-}$ ) iniciales y luego de 24 h de incubación (i.e., final).

	<b>Escenario</b>	<b>Otoño</b>	<b>Primavera</b>
Dosis PAR ( $\text{MJ m}^{-2}$ )	Presente	$0,9 \pm 0,4$	$4,8 \pm 1,2$
	Futuro	$1,3 \pm 0,7$	$7,5 \pm 1,9$
Dosis RUV ( $\text{MJ m}^{-2}$ )	Presente	$0,09 \pm 0,05$	$0,5 \pm 0,1$
	Futuro	$0,1 \pm 0,07$	$0,8 \pm 0,2$
$T_{\text{max}}$ ( $^{\circ}\text{C}$ )	Presente	$16,9 \pm 1,8$	$21,4 \pm 2,2$
	Futuro	$19,1 \pm 2,0$	$24,2 \pm 1,8$
pH inicial	Presente	$8,07 \pm 0,08$	$7,97 \pm 0,05$
	Futuro	$7,81 \pm 0,10$	$7,69 \pm 0,07$
pH <sub>min</sub>	Presente	$7,87 \pm 0,13$	$7,93 \pm 0,09$
	Futuro	$7,50 \pm 0,23$	$7,58 \pm 0,12$
pH <sub>max</sub>	Presente	$8,87 \pm 0,36$	$8,97 \pm 0,16$
	Futuro	$9,00 \pm 0,54$	$9,07 \pm 0,12$
$\text{NO}_3^- + \text{NO}_2^-$ inicial ( $\mu\text{M}$ )	Presente	$7,34 \pm 0,85$	$2,59 \pm 0,43$
	Futuro	$13,60 \pm 3,78$	$9,35 \pm 1,05$
$\text{NO}_3^- + \text{NO}_2^-$ final ( $\mu\text{M}$ )	Presente	no detectable	no detectable
	Futuro	no detectable	no detectable
$\text{PO}_4^{3-}$ inicial ( $\mu\text{M}$ )	Presente	$4,56 \pm 0,94$	$3,44 \pm 0,97$
	Futuro	$10,58 \pm 2,50$	$10,76 \pm 2,48$
$\text{PO}_4^{3-}$ final ( $\mu\text{M}$ )	Presente	$2,90 \pm 1,33$	$1,97 \pm 0,53$
	Futuro	$7,78 \pm 3,40$	$8,44 \pm 2,13$

### 5.3.2. Efectos directos en *Ulva* spp.

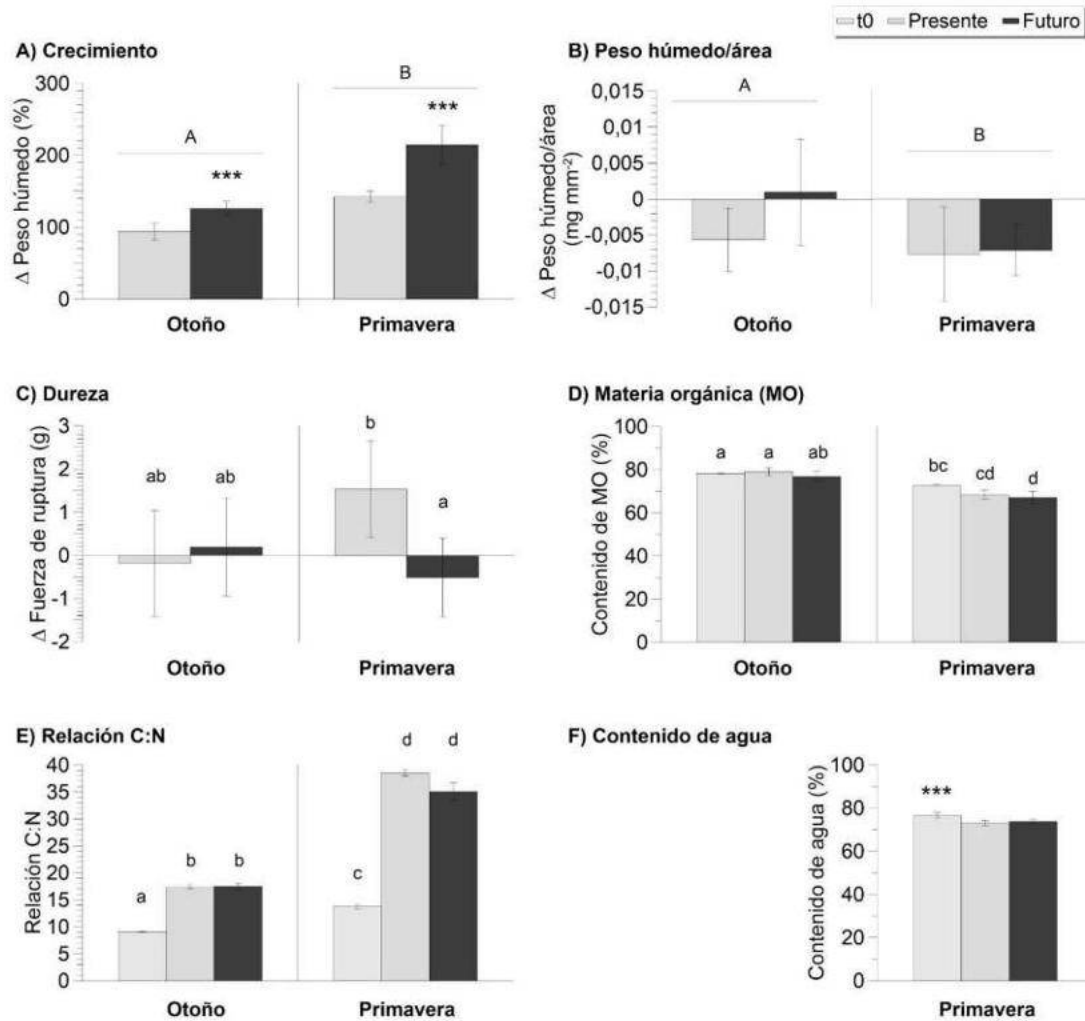
En ambos escenarios y estaciones, las macroalgas crecieron a lo largo del periodo de incubación, lo cual se reflejó en el marcado incremento del peso húmedo de sus tejidos (Fig. 5.6 A). Respecto a los valores iniciales, se registró un aumento del peso de las macroalgas

del  $94 \pm 12$  % y  $126 \pm 10$  %, durante los experimentos de otoño y del  $142 \pm 8$  % y  $214 \pm 27$  % durante los experimentos de primavera, para los escenarios Presente y Futuro, respectivamente. Este incremento fue, en promedio, un 60 % mayor en primavera que en otoño, siendo el efecto de la estación significativo (Tabla 5.3). Asimismo, en ambas estaciones, el crecimiento en el escenario Futuro fue significativamente mayor que en el escenario Presente (Fig. 5.6 A, Tabla 5.3).

Además del aumento en el peso húmedo, se observaron cambios en la relación peso húmedo/área de los talos, con un efecto significativo de la estación (Tabla 5.3). En primavera, esta relación disminuyó y fue significativamente mayor que en otoño (Fig. 5.6 B). En otoño se observó como patrón general una disminución de la relación peso húmedo/área en el escenario Presente, pero no en el Futuro (Fig. 5.6 B); sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre escenarios a nivel estadístico.

En cuanto a la dureza de los tejidos, se observó un efecto interactivo entre el escenario y la estación (Tabla 5.3). En primavera, la dureza de los talos en el escenario Presente fue mayor al final del periodo de incubación respecto del inicio, mientras que en el escenario Futuro se registró una leve disminución (Fig. 5.6 C). En otoño, por el contrario, no se observaron cambios significativos en la dureza para ninguno de los dos escenarios (Fig. 5.6 C).

Respecto al contenido de MO y la relación C:N, el ANOVA reveló, en ambos casos, una interacción significativa entre el escenario (i.e.,  $t_0$ , Presente, Futuro) y la estación (Tabla 5.3). Las macroalgas del  $t_0$  presentaron un mayor contenido de MO y una menor relación C:N en otoño que en primavera (Fig. 5.6 D y E). En otoño, el contenido de MO en las algas del  $t_0$  fue de  $78,3 \pm 0,5$  %, sin variaciones significativas luego de las incubaciones bajo los escenarios Presente y Futuro (Fig. 5.6 D). En primavera, en cambio, el contenido de MO en las algas del  $t_0$  fue de  $72,7 \pm 0,5$  %, observándose una disminución significativa de  $5,7 \pm 2,9$  % en las macroalgas incubadas en el escenario Futuro (Fig. 5.6 D).



**Fig. 5.6** Valores promedio ( $\pm$  DE) de (A) crecimiento, (B) cambio en la relación peso húmedo/área, (C) cambio en la dureza, (D) contenido de materia orgánica, (E) relación C:N y (F) contenido de agua en las macroalgas en los experimentos de otoño y primavera. Las letras mayúsculas muestran diferencias significativas entre estaciones (i.e., otoño y primavera), los asteriscos muestran diferencias significativas entre escenarios (i.e., Presente, Futuro, t0), y las letras minúsculas muestran efectos significativos en la interacción entre el escenario y la estación ( $p < 0,05$ ).

**Tabla 5.3** Resultados de los ANOVA para evaluar cambios en el crecimiento (%), la relación peso húmedo/área, la dureza, el contenido de materia orgánica (MO), la relación carbono/nitrógeno (C:N) y el contenido de agua de *Ulva* spp. en función del escenario y de la estación. Se muestran los valores del estadístico F, los grados de libertad y el valor p. Los asteriscos indican el nivel de significancia de  $p < 0,05$  (\*),  $p < 0,01$  (\*\*) y  $p < 0,001$  (\*\*\*)

		<b>F</b>	<b>gl</b>	<b>p</b>
Crecimiento	Escenario	54,41	1	< 0,001***
	Estación	100,98	1	< 0,001***
	Escenario x estación	1,18	1	0,29
Peso húmedo/área	Escenario	2,32	1	0,14
	Estación	4,42	1	0,049*
	Escenario x estación	1,16	1	0,29
Dureza	Escenario	2,82	1	0,11
	Estación	1,07	1	0,31
	Escenario x estación	5,98	1	0,02*
MO	Escenario	4,91	2	0,02*
	Estación	133,58	1	< 0,001***
	Escenario x estación	3,39	2	0,049*
C:N	Escenario	2516,1	2	< 0,001***
	Estación	3251,2	1	< 0,001***
	Escenario x estación	17,2	2	< 0,001***
Contenido de agua	Escenario	11,37	2	< 0,001***

Por su parte, la relación C:N se incrementó significativamente en ambos escenarios respecto al  $t_0$ . En otoño aumentó de  $9,1 \pm 0,1$  a  $17,4 \pm 0,5$  en el escenario Presente y a  $17,5 \pm 0,6$  en el Futuro; mientras que en primavera se elevó de  $13,8 \pm 0,4$  a  $38,5 \pm 0,6$  en el escenario Presente y a  $35,1 \pm 1,6$  en el Futuro, respectivamente (Fig. 5.6 E). Los valores finales entre escenarios dentro de cada estación fueron similares.

El contenido de agua en las algas al final del periodo de incubación en primavera fue similar entre los escenarios Presente y Futuro. En ambos casos se observó una disminución significativa de  $3,1 \pm 1,8$  % respecto del  $t_0$  (Fig. 5.6 F, Tabla 5.3).

### 5.3.3. Efectos indirectos en anfipodos

#### 5.3.3.1. Tasas de consumo y preferencia de alimento

Tal como se observa en la Fig. 5.7, en ambas estaciones y sexos, las tasas de consumo variaron entre  $0,30 \pm 0,06$  y  $0,49 \pm 0,06$  mg macroalga mg de peso húmedo<sup>-1</sup> día<sup>-1</sup> (Fig. 5.7 A y B).

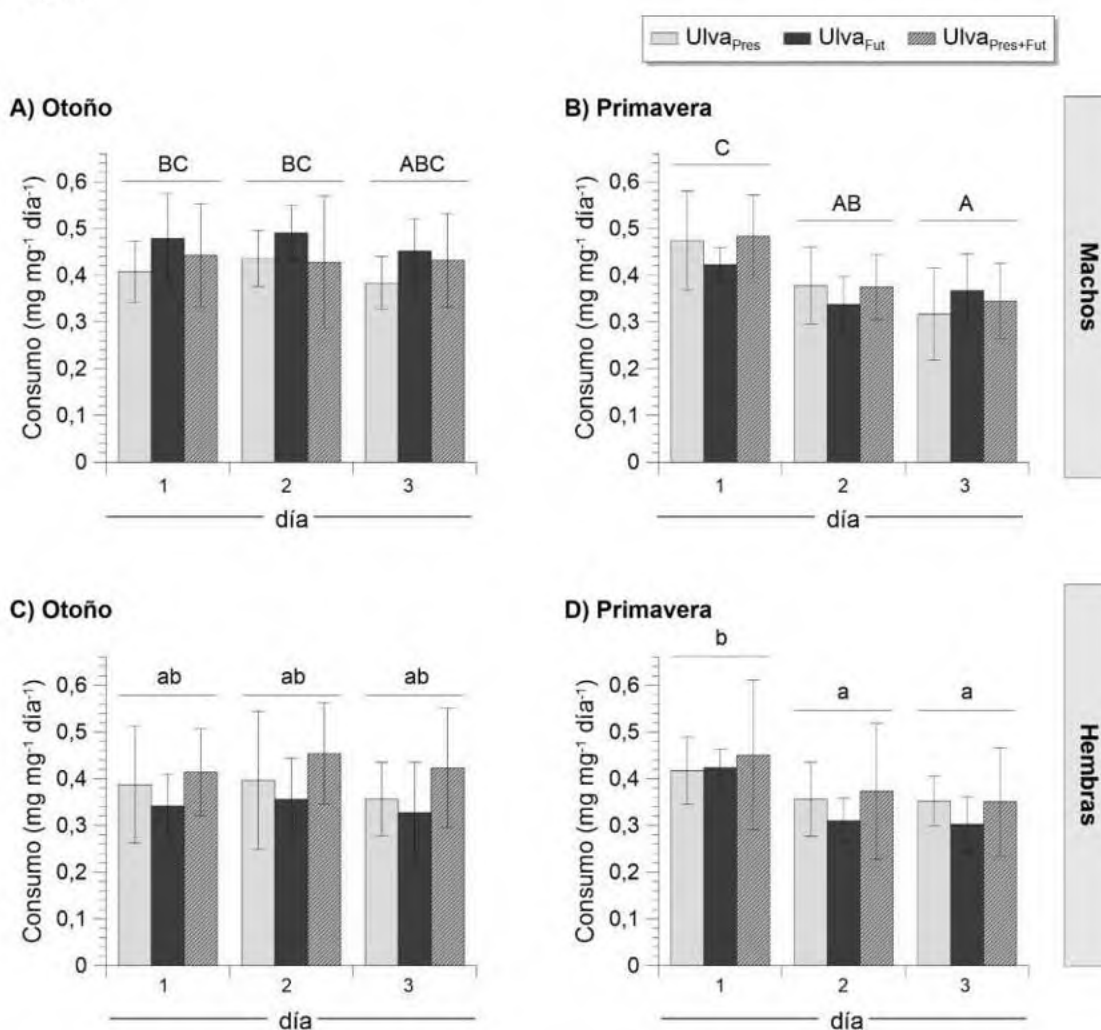


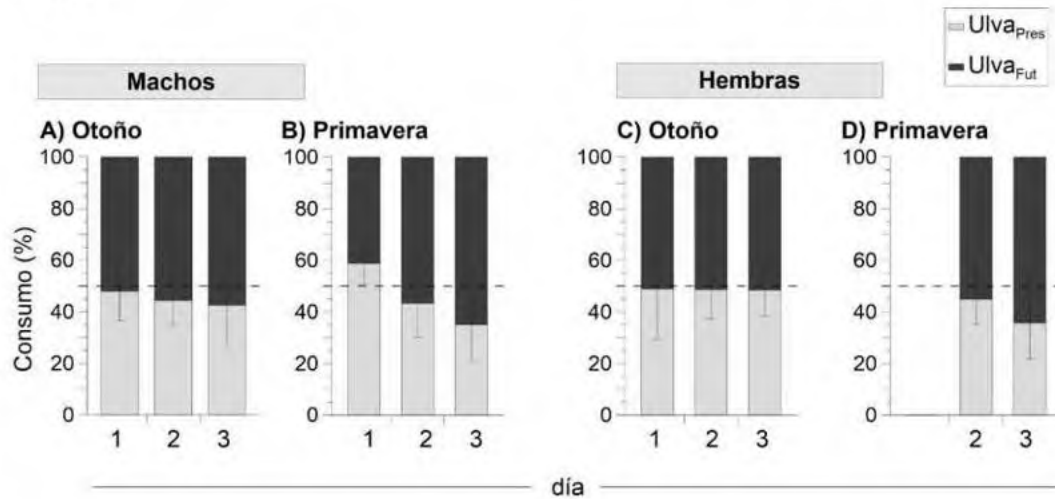
Fig. 5.7 Tasas de consumo (promedio  $\pm$  DE) por mg de peso húmedo por día de machos y hembras de *A. valida* para los tres tratamientos de dieta: *Ulva*<sub>Pres</sub>: algas provenientes del escenario Presente, *Ulva*<sub>Fut</sub>: algas provenientes del escenario Futuro y *Ulva*<sub>Pres+Fut</sub>: dieta mixta, durante tres días consecutivos en los experimentos de otoño y primavera. Las letras indican los resultados de un análisis *post hoc* para la interacción entre estaciones y días de alimentación, separados para machos y hembras.

**Tabla 5.4** Resultados del GLMM del consumo de alimento en función de la estación, la dieta y el día de exposición. Se muestran los valores del estadístico Chi cuadrado ( $X^2$ ), los grados de libertad y el valor p. Los asteriscos indican el nivel de significancia de  $p < 0,05$  (\*),  $p < 0,01$  (\*\*) y  $p < 0,001$  (\*\*\*)

		$X^2$	gl	p
Machos	Estación	4,32	1	0,04*
	Dieta	0,78	2	0,68
	Día	17,44	2	<0,001***
	Estación x dieta	2,03	2	0,36
	Estación x día	12,17	2	<0,01**
	Dieta x día	2,64	4	0,62
	Estación x dieta x día	2,62	4	0,62
Hembras	Estación	0,14	1	0,71
	Dieta	3,36	2	0,19
	Día	14,05	2	< 0,001***
	Estación x dieta	0,36	2	0,84
	Estación x día	13,34	2	< 0,01**
	Dieta x día	0,74	4	0,95
	Estación x dieta x día	1,24	4	0,87

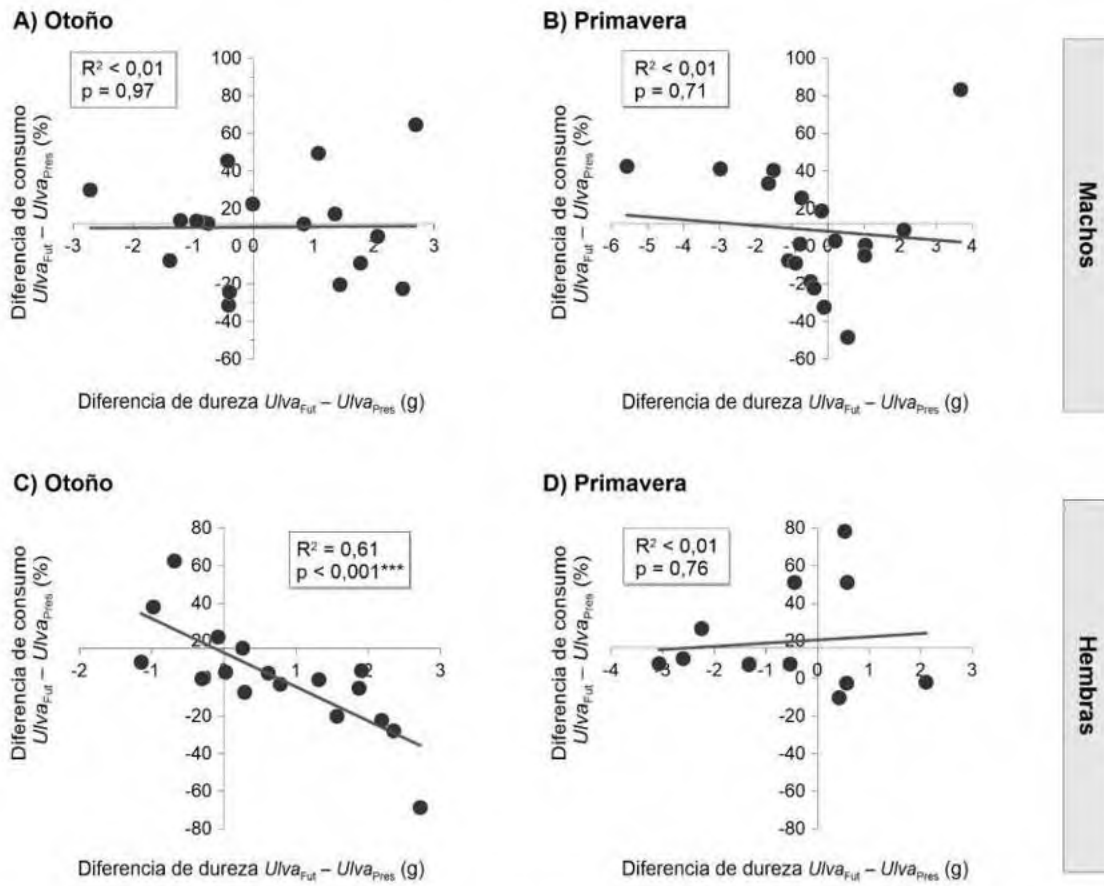
La cantidad de alimento ingerido por los machos y las hembras fue similar entre dietas (Fig. 5.7 A y B; Tabla 5.4). En ambos sexos, el ANOVA reveló una interacción significativa entre la estación y el día de exposición (Tabla 5.4). En primavera, las tasas de consumo fueron en promedio un 30 % más altas durante el primer día, en comparación con los días 2 y 3, mientras que en otoño no se observaron diferencias significativas entre días (Fig. 5.7 A y B). Respecto a la preferencia de alimento en el tratamiento de dieta mixta (i.e., *Ulva*<sub>Pres+Fut</sub>), en la mayoría de los casos y para ambos sexos, se observó un patrón general de mayores tasas de consumo de las algas provenientes del escenario Futuro (Fig. 5.8 A-D); sin embargo, este patrón no se tradujo en diferencias significativas en términos estadísticos. En otoño, las algas del escenario Futuro constituyeron en promedio entre el 51 % y el 58 % del alimento ingerido por ambos sexos (Fig. 5.8 A y C). En primavera, este porcentaje aumentó a valores entre 55 % y 65 % (Fig. 5.8 B y D), excepto en el caso de los machos durante el primer día de ensayo,

en donde solo un 41% del alimento ingerido correspondió a algas del escenario Futuro (Fig. 5.8 B).



**Fig. 5.8** Porcentaje de macroalgas ( $\pm$  DE) provenientes de los escenarios Presente y Futuro consumidas por machos y hembras de *A. valida*, cuando estas fueron ofrecidas en forma simultánea a los anfípodos (i.e., tratamiento de dieta mixta;  $Ulva_{Pres+Fut}$ ) durante los experimentos de otoño y primavera. La línea discontinua marca el 50% de consumo en cada una de las dos opciones de alga ofrecida a los anfípodos.

La Fig. 5.9 muestra la preferencia de alimento en el tratamiento de dieta mixta (i.e.,  $Ulva_{Pres+Fut}$ ) en función de la diferencia en la dureza de los dos tipos de talos ofrecidos a los anfípodos. En el caso de los machos, la preferencia de alimento no se relacionó con la dureza de las algas (Fig. 5.9 A y B). En contraste, para las hembras, se observó, durante el experimento de otoño, una correlación significativa entre la preferencia de alimento y la dureza de los talos (Fig. 5.9 C). En esta estación, las hembras consumieron preferentemente algas de menor dureza, independientemente del escenario del cual éstas provenían. No obstante, en primavera, no se observó una relación significativa entre la preferencia de alimento y la dureza (Fig. 5.9 D).

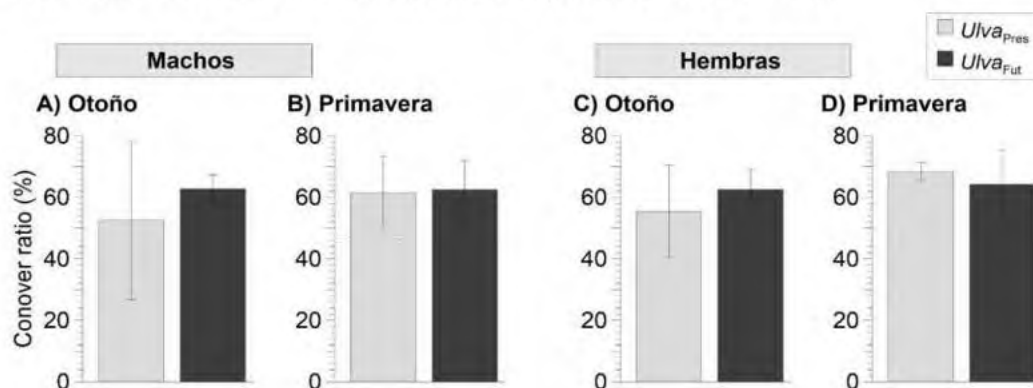


**Fig. 5.9** Preferencia de alimento de machos y hembras de *A. valida* en función de la dureza de las algas en el tratamiento de dieta mixta (i.e.,  $Ulva_{Pres} + Ulva_{Fut}$ ), para los experimentos de otoño y primavera. Valores positivos indican mayor dureza (eje X) o mayor consumo (eje Y) de  $Ulva_{Fut}$  respecto a  $Ulva_{Pres}$ , mientras que valores negativos indican mayor dureza (eje X) o mayor consumo (eje Y) de  $Ulva_{Pres}$ . Cada punto representa una réplica sin discriminar el día de ensayo. Las líneas de la regresión lineal se muestran en azul. Los asteriscos muestran el nivel de significancia:  $p < 0,05$  (\*),  $p < 0,01$  (\*\*) y  $p < 0,001$  (\*\*\*).

### 5.3.3.2. Eficiencia de absorción

La Fig. 5.10 muestra la eficiencia de absorción de la MO, estimada mediante la relación de Conover, la cual expresa el porcentaje de MO presente en el alimento que fue absorbido por los anfípodos. En ambos sexos, la eficiencia de absorción varió entre  $53 \pm 26$  % y  $68 \pm 3$  % (Fig. 5.10 A-D), observándose una gran variabilidad en los datos, especialmente en los anfípodos alimentados con algas provenientes del escenario Presente durante el otoño (Fig. 5.10 A y C). Si bien en los experimentos de otoño se observó un patrón general de mayor

eficiencia de absorción en el escenario Futuro para ambos sexos (Fig. 5.10 A y C), estas diferencias no resultaron estadísticamente significativas (Tabla 5.5).



**Fig. 5.10** Eficiencia de absorción (Conover ratio) de la materia orgánica (MO) ( $\pm$  DE) en machos y hembras de *A. valida* que consumieron algas provenientes de los escenarios Presente o Futuro, en los experimentos realizados en otoño y primavera.

**Tabla 5.5** Resultados de los ANOVA de eficiencia de absorción de la MO en machos y hembras de *A. valida* en función de la estación y la dieta. Se muestran los valores del estadístico F, los grados de libertad (gl) y el valor p.

		F	gl	p
Machos	Estación	0,52	1	0,48
	Dieta	0,33	1	0,57
	Estación x dieta	0,40	1	0,54
Hembras	Estación	0,15	1	0,71
	Dieta	2,73	1	0,11
	Estación x dieta	1,45	1	0,24

## 5.4. Discusión

La calidad nutricional y la palatabilidad de las macroalgas son factores clave para los herbívoros que dependen de ellas como recurso alimenticio (Pennings et al., 1998; Cruz-Rivera & Hay, 2000a; Cruz-Rivera & Hay, 2001). Los resultados del presente capítulo indican que la dureza del talo constituye un criterio de selección de alimento para las hembras de *A. valida*, las cuales mostraron preferencia por algas más blandas, al menos en los experimentos realizados en otoño. Esto pone en evidencia que, además de presentar

respuestas sexo-dependientes, las condiciones particulares de cada estación del año modulan la respuesta de esta especie frente a un escenario de CG. Por otro lado, se demostró que la dureza de las macroalgas podría disminuir en un escenario de mayores niveles de temperatura, nutrientes, radiación solar y acidificación, al menos en primavera, mientras que su calidad nutricional no se vería afectada en el mediano plazo. En relación a los efectos indirectos sobre *A. valida*, los resultados sugieren que el escenario de CG simulado podría afectar la selección de alimento, principalmente como consecuencia de cambios en la dureza de las macroalgas.

#### **5.4.1. Condiciones experimentales durante las incubaciones de *Ulva* spp.**

En ambas estaciones, las condiciones de temperatura, pH e irradiancia fluctuaron a lo largo del ciclo diario, con marcadas diferencias entre el día y la noche, así como a lo largo de los ciclos de marea simulados experimentalmente. En el escenario Presente, estas fluctuaciones reprodujeron las condiciones naturales de las pozas de marea del área de estudio. Por ejemplo, en pozas del intermareal alto, durante una marea baja diurna, el pH puede incrementarse más de una unidad y alcanzar valores de hasta 9,3 (Capítulo 2, esta tesis), mientras que durante una marea baja nocturna puede disminuir hasta 0,5 unidades respecto al pH del agua de mar (Legrand et al., 2018; Wolfe et al., 2020). Si bien el pH en ambos escenarios experimentales se mantuvo dentro de estos rangos, la amplitud diaria de fluctuación fue entre 0,4 y 0,5 unidades mayor en el escenario Futuro, posiblemente debido al mayor crecimiento algal registrado en este tratamiento. De este modo, frente a un escenario de CG, la acidificación en áreas con elevada biomasa de macroalgas podría estar parcialmente compensada por la actividad fotosintética (Becherucci et al., 2021). No obstante, una mayor amplitud de fluctuación del pH podría tener efectos relevantes sobre los organismos asociados a las macroalgas, como *A. valida* (Alenius, 2012; Wahl et al., 2018). Durante el período de incubación, ambos escenarios experimentales recibieron pulsos de  $\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$  y de  $\text{PO}_4^{3-}$  con el recambio diario de agua. Sin embargo, no se detectó la presencia de  $\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$  en las muestras colectadas cada 24 h, lo que indica que las macroalgas estuvieron diariamente expuestas a periodos de limitación de este macronutriente. Esto ocurrió incluso en el escenario Futuro, donde las concentraciones que

se proporcionaron con el cambio diario de agua fueron, en promedio, entre un 85 % y un 260 % más altas que las del escenario Presente. A pesar de la mayor disponibilidad inicial de  $\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$  en el escenario Futuro, no se observaron diferencias significativas en el contenido de N en los tejidos de las macroalgas incubadas en ambos escenarios. Eso sugiere que la mayor tasa de crecimiento de las algas observada en el escenario Futuro puede haber incrementado la demanda de este nutriente, conduciendo a periodos de limitación durante la simulación de la marea baja. Estas condiciones representan regímenes de nutrientes realistas que las macroalgas de ambientes intermareales experimentan a diario, especialmente durante las fases de marea baja. Por ejemplo, se ha observado que, en pozas con alta densidad de macroalgas, las concentraciones de nitratos y nitritos disminuyeron desde  $1,5 \mu\text{M}$  en marea alta a valores inferiores a  $0,5 \mu\text{M}$  en marea baja (Jensen & Muller-Parker, 1994). Asimismo, se ha demostrado que las concentraciones de este macronutriente pueden agotarse severamente ( $< 2 \mu\text{M}$ ) en pozas del intermareal alto, incluso en ambientes con altos niveles de nitratos ( $> 20 \mu\text{M}$ ) (Bracken, 2004). Por lo tanto, es esperable que las macroalgas puedan tolerar periodos recurrentes de limitación de nutrientes.

#### **5.4.2. Efectos directos de un escenario de CG en *Ulva* spp.**

Numerosos estudios han documentado los efectos positivos de las variables asociadas al CG estudiadas en el presente capítulo sobre el crecimiento de macroalgas no calcáreas, particularmente de Chlorophytas del género *Ulva* (Ji & Gao, 2020; Gao et al., 2017, Kang & Chung, 2017). Por ejemplo, se ha observado que una reducción de pH de 0,5 unidades combinada con un incremento de nutrientes (en forma de  $\text{NH}_4^+$ ) casi duplicó las tasas de crecimiento de *U. pertusa* (Kang & Chung, 2017). De manera similar, se observó un mayor crecimiento de *U. fasciata* cuando se combinaron simultáneamente un incremento en los niveles de irradiancia (i.e., PAR) y de  $\text{NO}_3^-$  (Lapointe & Tenore, 1981). Por su parte, un aumento de la temperatura (i.e.,  $+4^\circ \text{C}$ ), de los niveles de nitratos (i.e., por un factor de 25) y una reducción del pH (i.e., de 0,4 unidades) promovieron las tasas de crecimiento de *U. rigida* durante los primeros 8 días de incubación, registrándose los mayores efectos cuando las tres variables fueron manipuladas en simultáneo (Gao et al., 2017). Los resultados obtenidos en este capítulo concuerdan con estos hallazgos, dado que, si bien en ambos escenarios la biomasa de macroalgas aumentó al final del período de incubación, dicho

incremento fue significativamente mayor en el escenario Futuro. Un incremento moderado del crecimiento algal podría beneficiar a los organismos asociados a las macroalgas, como *A. valida*, al aumentar la disponibilidad de alimento y/o refugio disponible. Sin embargo, si el crecimiento de una o pocas especies dominantes es excesivo, la estructura y diversidad de la comunidad podría verse alterada, reduciendo la riqueza y diversidad de macrófitas y, en consecuencia, la de los organismos asociados a ellas (Valiela et al., 1997).

En los experimentos de primavera se observó, en ambos escenarios, una disminución en la relación peso húmedo/área de las macroalgas, lo que podría indicar una disminución del grosor del talo (Witkowski & Lamont, 1991) o resultar del menor contenido de agua en los tejidos al final del período de incubación. En general, una menor relación peso húmedo/área de los talos se correlaciona con una menor resistencia de los tejidos contra rupturas (Phelps et al., 2017). Curiosamente, y contrario a lo esperado, la dureza de las macroalgas se incrementó tras la incubación de primavera en el escenario Presente, pero no en el Futuro. Esto sugiere que otros factores, como cambios a nivel celular, podrían ser los responsables de las diferencias observadas entre escenarios (Rothäusler et al., 2017, Starko et al., 2018). Por ejemplo, estudios previos reportaron que los tejidos viejos de macroalgas pardas presentan mayor dureza que los tejidos jóvenes, debido a un mayor espesor cortical, paredes celulares más gruesas y mayores proporciones de polisacáridos (Starko et al., 2018). Los autores argumentaron que la fortificación de las paredes celulares puede asociarse a bajos niveles de nutrientes y a menores tasas de crecimiento (Starko et al., 2018), tal y como puede haber ocurrido en el caso de las macroalgas del escenario Presente en primavera en comparación con el Futuro. Además, se ha demostrado que algunos de los procesos asociados al CG tales como el calentamiento, la hiposalinidad y la acidificación pueden disminuir la dureza de las macroalgas (Simonson et al., 2015; Phelps et al., 2017; Rothäusler et al., 2017). Por ejemplo, se ha observado que un incremento de temperatura provoca daños en la estructura celular de macroalgas pardas, incluyendo la formación de huecos entre las capas celulares y un adelgazamiento de la epidermis, lo que incrementa la fragilidad de los talos (Simonson et al., 2015). Si bien en el presente capítulo no se realizaron análisis histológicos de los tejidos, las condiciones del escenario Futuro podrían haber debilitado a las macroalgas respecto al Presente, disminuyendo sus defensas físicas y aumentando su

vulnerabilidad frente a la herbivoría (Pennings et al., 1998; Hemmi & Jormalainen, 2002; Rothhäusler et al., 2017).

Un incremento en las concentraciones de nutrientes, especialmente de nitrógeno, se considera en general favorable para mejorar la calidad nutricional de los productores primarios (Hemmi & Jormalainen, 2002; Leung et al., 2018). Por ejemplo, estudios previos observaron que la adición de  $\text{NH}_4^+$  aumentó el contenido de nitrógeno y disminuyó la relación C:N en *Zostera marina* después de 5 semanas de incubación (Spivak et al., 2009). Por su parte, se observó un incremento en el contenido de proteínas y lípidos en *Ulva rigida* expuesta durante 12 días a un incremento en los niveles de nutrientes, en combinación con un incremento de la temperatura de 4 °C y una disminución del pH de 0,4 unidades (Gao et al., 2017). Los resultados del presente capítulo difieren de estos estudios, dado que las macroalgas no mostraron diferencias en su calidad nutricional, evaluada a través del contenido de MO y la relación C:N, entre escenarios. A diferencia de los trabajos citados, las concentraciones de nutrientes utilizadas para simular el escenario Futuro, especialmente las de nitratos y nitritos, fueron solo entre 1,8 y 3,6 veces superiores a las del Presente, mientras que, en los trabajos citados anteriormente, el  $\text{NH}_4^+$  se incrementó entre 5-30 veces (Spivak et al., 2009) y el  $\text{NO}_3^-$  se incrementó 25 veces respecto al control (Gao et al., 2017). Otra posible explicación por las diferencias en los resultados obtenidos es la corta duración del experimento, al menos comparado con el trabajo de Spivak et al. (2009). Además, las condiciones de acidificación del escenario Futuro pueden haber estimulado la asimilación de carbono, manteniendo una relación C:N estable. Por ejemplo, estudios previos observaron una mayor asimilación de nitrógeno en *Ulva pertusa* en respuesta a la acidificación y un incremento de  $\text{NH}_4^+$ ; sin embargo, la relación C:N no se vio afectada luego de 14 días de incubación (Kang & Chung, 2017). No obstante, existen otros parámetros que pueden brindar información acerca de la calidad nutricional, tales como la composición de ácidos grasos o el contenido de proteínas, carbohidratos y lípidos (Duffy & Hay, 1991, Jormalainen et al., 2001, Britton et al., 2021). Por ejemplo, se ha demostrado que la adición de  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NH}_4^+$  y  $\text{PO}_4^-$  durante un periodo entre 7 – 13 días incrementó la cantidad de azúcares solubles y redujo el contenido de carbono total en *Fucus vesiculosus*, con un efecto positivo en las tasas de consumo, de crecimiento y en la fecundidad del isópodo *Idotea baltica* (Hemmi & Jormalainen, 2002). Sin embargo, la relación de C:N del alga no se vio afectada. Por lo tanto,

no puede descartarse que la composición bioquímica de las macroalgas haya cambiado, afectando su calidad nutricional, sin modificar la relación C:N.

### **5.4.3. Efectos indirectos en *A. valida***

La calidad nutricional y la palatabilidad del alimento son dos de los factores más importantes que modulan las tasas de consumo y las preferencias de alimento de los herbívoros (Nicotri, 1980; Pennings et al., 1998, Cruz-Rivera & Hay, 2000a; Duarte et al., 2016). Las tasas de consumo de *A. valida* no variaron entre dietas, posiblemente debido a que la calidad nutricional -evaluada en términos del contenido de MO y la relación C:N- no difirió entre las macroalgas provenientes de los escenarios Presente y Futuro. Respecto a la palatabilidad, en los experimentos de otoño las hembras consumieron preferentemente algas de menor dureza, independientemente del escenario bajo el cual estas fueron incubadas. Estos resultados coinciden con estudios previos que demostraron que la dureza del tejido constituye un componente clave de la palatabilidad para los crustáceos (Robertson & Lucas, 1983; Hemmi & Jormalainen, 2002; Rothäusler et al., 2017). Cortar y manipular el alimento implica un costo energético que depende, entre otros factores, del tamaño de los individuos y la morfología de las estructuras bucales (Kolts et al., 2013). Los individuos de mayor tamaño pueden manipular tejidos de mayor dureza, mientras que individuos más pequeños requieren alimento más blando (Kolts et al., 2013). En los experimentos de este capítulo, las hembras utilizadas en los ensayos de primavera fueron más del doble de grandes que las utilizadas en otoño, lo que sugiere que la dureza del alimento podría ser un criterio de selección para las hembras más pequeñas, pero no para aquellas de mayor tamaño.

En el caso de los machos, la dureza no actuó como criterio de selección del alimento, a pesar de que los individuos presentaron tamaños promedio menores que las hembras. Estos resultados concuerdan con trabajos previos que indican que los machos de *A. valida* son menos selectivos que las hembras a la hora de elegir un determinado tipo de alimento o refugio (Valiñas & Helbling, 2015; Blum & Valiñas, 2022). Una posible explicación es su mayor rango de movilidad (Borowsky, 1983; Blum & Valiñas, 2022), que les permite explotar una mayor diversidad de recursos. Estudios previos indicaron que los mesoherbívoros con un mayor rango de movilidad suelen ser menos estrictos a la hora de seleccionar un refugio o fuente de alimento, dado que pueden aprovechar una mayor

diversidad de recursos (Cruz-Rivera & Hay, 2000b; Vesakoski et al., 2008). En cambio, las especies con movilidad reducida tienden a seleccionar mejor su refugio o fuente de alimento, de manera de obtener la máxima calidad posible. Esto podría ser también el caso de las hembras de *A. valida*, que suelen permanecer por periodos prolongados dentro de los tubos que construyen entre las algas (Borowsky, 1983). Teniendo en cuenta que las condiciones del escenario Futuro provocaron una disminución en la dureza de las macroalgas, al menos en primavera, un escenario de CG de aumento de temperatura, radiación solar, nutrientes y de acidificación podría favorecer a las hembras de menor tamaño al proveer alimento de mayor palatabilidad.

Las tasas de consumo de una especie pueden variar en función de la calidad nutricional del alimento, pudiendo compensarse una menor calidad nutricional con un incremento en las tasas de ingestión para satisfacer las necesidades energéticas del organismo (Cruz-Rivera & Hay, 2000a; Valiñas et al., 2014). Las macroalgas en otoño presentaron mayor calidad nutricional (i.e., mayor contenido de MO, menor relación C:N) que las macroalgas en primavera. No obstante, no se observaron diferencias en las tasas de consumo entre estaciones. Además, la eficiencia de asimilación tampoco varió significativamente entre estaciones, por lo que en otoño la ganancia energética neta de los individuos sería mayor que en primavera. Los resultados del Capítulo 4 mostraron que durante el invierno los individuos consumen significativamente menores cantidades de alimento, por lo que *A. valida* podría acumular reservas energéticas durante el otoño, para afrontar la época de menor consumo. Esto concuerda con resultados de estudios previos que demostraron que los crustáceos pueden acumular reservas energéticas para sobrepasar periodos de menor disponibilidad de alimento (Hagen & Schnack-Schiel, 1996).

Las tasas de consumo de ambos sexos en ambas estaciones oscilaron entre  $\sim 0,3$  y  $\sim 0,5$  mg de macroalga  $\text{mg de peso húmedo}^{-1} \text{ día}^{-1}$  y fueron notablemente mayores que las registradas en los experimentos del Capítulo 4 (i.e.  $\sim 0,1 - 0,4$  mg de macroalga  $\text{mg de peso húmedo}^{-1} \text{ día}^{-1}$ ). Estudios previos realizados en el área de estudio reportaron valores de tasas de consumo en *A. valida* que oscilaron entre 0,15 y 0,3 mg de macroalga  $\text{mg de peso húmedo de individuo}^{-1} \text{ día}^{-1}$  en individuos expuestos a 20 °C, aunque las mismas aumentaron cuando la calidad nutricional del alimento disminuyó, al menos en los machos (Valiñas et al., 2014). Estos autores sugirieron que *A. valida* podría compensar una menor calidad nutricional del

alimento con un incremento en las tasas de consumo, como también se ha observado en otras especies de anfípodos (Cruz-Rivera & Hay, 2000a; Cruz-Rivera & Hay, 2001). En los ensayos realizados en el presente capítulo, la calidad nutricional del alimento -en términos de la relación C:N y del contenido de MO- disminuyó luego del periodo de incubación respecto a las algas provenientes del ambiente al  $t_0$ , mientras que en los experimentos descritos en el Capítulo 4 y en el estudio previamente mencionado se utilizaron algas directamente del ambiente para alimentar a los anfípodos. Por lo tanto, las tasas de consumo observadas en los experimentos del presente capítulo podrían estar sobreestimadas respecto de las que los anfípodos presentan en su ambiente natural, donde potencialmente tienen a disposición alimentos de mayor calidad nutricional.

## 5.5. Conclusiones

Los resultados del presente capítulo muestran que un escenario de CG de aumento de temperatura, radiación solar, nutrientes y acidificación promueve el crecimiento de las macroalgas en el mediano plazo (i.e. días), sin afectar su calidad nutricional. Las tasas de consumo y la eficiencia de asimilación de los anfípodos fueron similares entre aquellos que consumieron macroalgas provenientes de los escenarios Presente y Futuro. *A. valida* podría beneficiarse de los cambios inducidos por el escenario Futuro en *Ulva* spp., ya sea mediante un incremento en la cantidad de alimento disponible y/o a través de un aumento en la palatabilidad de las macroalgas (i.e., menor dureza), al menos durante la primavera. Este potencial efecto positivo podría estar contrarrestado si el incremento en la biomasa de productores primarios alcanzara valores extremos, capaces de reducir los niveles de oxígeno, generando condiciones hipóxicas o incluso anóxicas. Tales condiciones afectarían no sólo a la comunidad de macroalgas, sino también a la fauna de invertebrados asociada, de la cual *A. valida* forma parte.

Los resultados obtenidos ponen en evidencia que las propiedades físicas del alimento pueden modular la fuerza de interacción entre los productores primarios y los herbívoros, con impactos potencialmente significativos sobre la estructura y el funcionamiento de los ecosistemas (Robertson & Lucas, 1983; Pennings et al., 1998; Granado & Caballero, 2001, Alberti et al., 2011). Dado que la respuesta de los anfípodos frente a diferencias en la dureza del alimento varió entre sexos y estaciones del año, estos resultados subrayan la importancia

de considerar la variabilidad intraespecífica y estacional a la hora de evaluar los efectos potenciales del CG.

# **Capítulo 6:**

## **Conclusiones generales**

## 6.1. Prueba de hipótesis planteadas

El CG provoca múltiples cambios en las condiciones físico-químicas de los ambientes marinos, que incluyen incrementos de temperatura, cambios en los niveles de radiación solar recibida por los organismos, acidificación del agua de mar y un mayor aporte de nutrientes hacia las zonas costeras. En este contexto, los resultados obtenidos a lo largo de esta tesis aportan evidencia experimental sólida sobre los efectos directos e indirectos de múltiples variables de CG en *A. valida* y en una de sus principales fuentes de alimento, *Ulva* spp.

Los experimentos del Capítulo 3 mostraron que un aumento de la temperatura incrementó las tasas de respiración de machos y hembras en el corto plazo (i.e., horas), mientras que la acidificación y los cambios en los niveles de radiación solar no provocaron efectos significativos. En base a estos resultados, la hipótesis **H1 se rechaza para el caso de la acidificación y la radiación solar, pero no para la temperatura.**

*H1: A corto plazo, el aumento de la temperatura, la acidificación y el incremento en los niveles de radiación solar, aumentan las tasas de respiración en A. valida (i.e., efectos directos individuales).*

Si bien el incremento de temperatura provocó un aumento en las tasas de respiración en todas las estaciones, la magnitud del incremento fue mayor en otoño y primavera, y menor en verano e invierno. Por lo tanto, la hipótesis H2 **se rechaza** para invierno, pero **no se rechaza** para otoño y primavera:

*H2: La magnitud del incremento en las tasas de respiración de A. valida frente a un aumento de temperatura, de acidificación o de cambios en los niveles de radiación solar es menor durante verano que en el resto del año (i.e., efectos directos individuales).*

Los resultados del Capítulo 4 mostraron que la acción conjunta del incremento de temperatura, radiación solar y acidificación incrementó la mortalidad de los anfípodos, especialmente durante el verano. Sin embargo, las respuestas de los individuos en términos de respiración y consumo de alimento fueron sexo-dependientes: las hembras mostraron mayores tasas de consumo en el escenario Futuro, independientemente de la estación, mientras que los machos aumentaron sus tasas de respiración únicamente al inicio de la

exposición. En consecuencia, la hipótesis **H3a se rechaza parcialmente**, dado que los efectos se manifestaron de manera diferenciada entre sexos y variable respuesta, mientras que la hipótesis **H3b no se rechaza**.

*H3: La acción conjunta de un aumento de temperatura, la acidificación y un incremento en los niveles de radiación solar aumentan las tasas de respiración y de consumo de alimento de A. valida en otoño, invierno y primavera (H3a) y las tasas de mortalidad en verano (H3b) (i.e., efectos directos combinados).*

Finalmente, los resultados del Capítulo 5 demostraron que un escenario de CG, caracterizado por aumentos de temperatura, radiación solar, acidificación y nutrientes, promueve el crecimiento de macroalgas del género *Ulva*, una de las principales fuentes de alimento de *A. valida*, sin afectar su calidad nutricional (en términos de contenido de MO y relación C:N). No obstante, la dureza de los talos fue menor bajo las condiciones del escenario Futuro respecto al Presente, al menos durante la primavera, factor que podría favorecer positivamente en la preferencia de alimento y el consumo por parte de los anfípodos. Durante el experimento de otoño, se demostró que las hembras consumieron preferentemente algas de menor dureza. No obstante, no se observaron diferencias significativas en las tasas de consumo, preferencia de alimento o eficiencia de absorción de la MO entre anfípodos alimentados con macroalgas provenientes de los escenarios Presente y Futuro. En base a estos resultados, la hipótesis **H4a no se rechaza, pero sí se rechazan las hipótesis H4b y H5**.

*H4) Un escenario futuro de CG de aumento de temperatura, de acidificación, de incremento en los niveles de radiación solar y un incremento en los niveles de nutrientes aumenta la tasa de crecimiento de las macroalgas (H4a), pero disminuye su calidad nutricional (H4b) (i.e., efecto directo sobre las macroalgas).*

*H5) Para compensar la menor calidad del alimento, resultado de los efectos de las variables de CG estudiadas sobre las macroalgas (H4b), A. valida aumenta sus tasas de consumo y eficiencia de absorción (i.e., efecto indirecto sobre los anfípodos).*

## 6.2. Perspectivas futuras de investigación

Los experimentos realizados en esta tesis evaluaron las respuestas de los organismos en el corto (i.e., horas) y mediano (i.e., días) plazo. Sin embargo, estos experimentos no permiten evaluar procesos de aclimatación y/o adaptación que pueden ocurrir a escalas temporales mayores, los cuales podrían afectar las tasas de crecimiento y reproducción de los organismos. Por ello, resulta imprescindible y al mismo tiempo un desafío, avanzar hacia experimentos de mayor duración, para estimar con mayor realismo aún el impacto del CG sobre las poblaciones naturales.

Los resultados obtenidos muestran que las respuestas frente a escenarios de CG dependen de factores intrínsecos tales como el sexo y el tamaño de los individuos. Esto subraya la importancia de incorporar la variabilidad intraespecífica a la hora de evaluar el impacto del CG, especialmente cuando se busca extrapolar respuestas individuales al nivel poblacional o comunitario. En este sentido, resultaría interesante evaluar cómo el estado reproductivo de los individuos puede modificar su respuesta frente a las variables del CG, así como evaluar los posibles efectos en el desarrollo embrionario y en los individuos juveniles, los cuales representan los estadios más vulnerables dentro del ciclo de vida de la especie. Asimismo, los resultados del Capítulo 2 mostraron que existen diferencias en la estructura poblacional de *A. valida* entre el intermareal alto y bajo, posiblemente asociadas a variaciones en la disponibilidad del alimento y a la intensidad del estrés abiótico. Por lo tanto, en estudios futuros resultaría interesante comparar la respuesta a las variables de CG entre individuos provenientes de distintos estratos del intermareal, lo que permitiría evaluar si las poblaciones exhiben estrategias diferenciadas de tolerancia o adaptación frente a las condiciones proyectadas en escenarios futuros.

## Bibliografía

- Alberti, J., Cebrian, J., Casariego, A. M., Canepuccia, A., Escapa, M., & Iribarne, O. (2011). Effects of nutrient enrichment and crab herbivory on a SW Atlantic salt marsh productivity. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 405(1-2), 99-104.
- Alenius, B., & Munguia, P. (2012). Effects of pH variability on the intertidal isopod, *Paradella diana*. *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology*, 45(4), 245-259.
- Alonso, G., Tablado, A., Lopez Gappa, J., & Magaldi, N. (1995). Seasonal changes in an intertidal population of the amphipod *Ampithoe valida* Smith, 1873. *Oealia*, 21, 77-91.
- Arias, P. A., Bellouin, N., Coppola, E., Jones, R. G., Krinner, G., Marotzke, J., Naik, V., Palmer, M. D., Plattner, G.-K., Rogelj, J., et al. (2021). Technical summary. In V. Masson-Delmotte, et al. (Eds.), *Climate Change 2021: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Sixth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change* (pp. 33-144). Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA: Cambridge University Press.
- Audzijonyte, A., Barneche, D. R., Baudron, A. R., Belmaker, J., Clark, T. D., Marshall, C. T., Morrongiello, J. R., & van Rijn, I. (2019). Is oxygen limitation in warming waters a valid mechanism to explain decreased body sizes in aquatic ectotherms? *Global Ecology and Biogeography*, 28(2), 64-77.
- Augusto, A., Ramaglia, A. C., & Mantoan, P. V. (2018). Effect of carbon dioxide-induced water acidification and seasonality on the physiology of the sea-bob shrimp *Xiphopenaeus kroyeri* (Decapoda, Penaeidae). *Crustaceana*, 91(8), 947-960.
- Axenov-Gribanov, D., Bedulina, D., Shatilina, Z., Jakob, L., Vereshchagina, K., Lubyaga, Y., Gurkov, A., Shchapova, E., Luckenbach, T., & Lucassen, M. (2016). Thermal preference ranges correlate with stable signals of universal stress markers in Lake Baikal endemic and Holarctic amphipods. *PLoS ONE*, 11(10), e0164226.
- Bais, A. F., Bernhard, G., McKenzie, R. L., Aucamp, P., Young, P. J., Ilyas, M., Jöckel, P., & Deushi, M. (2019). Ozone–climate interactions and effects on solar ultraviolet radiation. *Photochemical and Photobiological Sciences*, 18(3), 602-640.
- Barnes, P. W., Bornman, J. F., Pandey, K. K., Bernhard, G. H., Bais, A. F., Neale, R. E., Robson, T. M., Neale, P. J., Williamson, C. E., Zepp, R. G., et al. (2021). The Success of the Montreal Protocol in Mitigating Interactive Effects of Stratospheric Ozone Depletion and Climate Change on the Environment. *Global Change Biology*, 27(22), 5681-5683.
- Barnes, P. W., Williamson, C. E., Lucas, R. M., Robinson, S. A., Madronich, S., Paul, N. D., Bornman, J. F., Bais, A. F., Sulzberger, B., Wilson, S. R., et al. (2019). Ozone

- depletion, ultraviolet radiation, climate change and prospects for a sustainable future. *Nature Sustainability*, 2(7), 569-579.
- Barrett, B. E. (1966). *A contribution to the knowledge of the amphipodous crustacean, Ampithoe valida, Smith 1873*. (Doctoral Dissertation). University of New Hampshire, (824).
- Bass, A., Wernberg, T., Thomsen, M., & Smale, D. (2021). Another Decade of Marine Climate Change Experiments: Trends, Progress and Knowledge Gaps. *Frontiers in Marine Science*, 8, 1-11.
- Becherucci, M. E., Pereyra, P., Narvarte, M., Fanjul, E., Iribarne, O., & Martinetto, P. (2021). Tidal action and macroalgal photosynthetic activity prevent coastal acidification in an eutrophic system within a semi-desert region. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 256, 107374.
- 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.
- Bertness, M. D., Crain, C. M., Silliman, B. R., Bazterrica, M. C., Reyna, M. V., Hildago, F., & Farina, J. K. (2006). The community structure of western Atlantic Patagonian rocky shores. *Ecological Monographs*, 76(3), 439-460.
- Bindoff, N. L., Cheung, W. W., Kairo, J. G., Aristegui, J., Guinder, V. A., Hallberg, R., Hilmi, N. J. M., Jiao, N., Karim, M. S., Levin, L., et al. (2019). Changing ocean, marine ecosystems, and dependent communities. In H.-O. Pörtner, et al. (Eds.), *IPCC special report on the ocean and cryosphere in a changing climate* (pp. 477-587). Cambridge, UK and New York, NY, USA: Cambridge University Press.
- Björn, L. O., & Murphy, T. M. (1985). Computer calculation of solar ultraviolet radiation at ground level. *Physiologie Vegetale*, 23, 555-561.
- Blum, R., & Valiñas, M. S. (2022). Shelter selection by intertidal amphipods: the role of UVR and photoprotective compounds. *Aquatic Ecology*, 56, 1055-1067.
- Borowsky, B. (1983). Reproductive behavior of three tube-building peracarid crustaceans: the amphipods *Jassa falcata* and *Ampithoe valida* and the tanaid *Tanais cavolinii*. *Marine Biology*, 77(3), 257-263.
- Boström, C., & Mattila, J. (1999). The relative importance of food and shelter for seagrass-associated invertebrates: a latitudinal comparison of habitat choice by isopod grazers. *Oecologia*, 120(1), 162-170.

- Boyd, P. W., Strzepek, R., Fu, F., & Hutchins, D. A. (2010). Environmental control of open-ocean phytoplankton groups: Now and in the future. *Limnology and Oceanography*, 55(3), 1353-1376.
- Bracken, M. E. (2004). Invertebrate-mediated nutrient loading increases growth of an intertidal macroalga. *Journal of Phycology*, 40(6), 1032-1041.
- Britton, D., Schmid, M., Revill, A. T., Virtue, P., Nichols, P. D., Hurd, C. L., & Mundy, C. N. (2021). Seasonal and site-specific variation in the nutritional quality of temperate seaweed assemblages: Implications for grazing invertebrates and the commercial exploitation of seaweeds. *Journal of Applied Phycology*, 33(1), 603-616.
- Brockington, S., & Clarke, A. (2001). The relative influence of temperature and food on the metabolism of a marine invertebrate. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 258(1), 87-99.
- Brown, J. H., Gillooly, J. F., Allen, A. P., Savage, V. M., & West, G. B. (2004). Toward a metabolic theory of ecology. *Ecology*, 85(7), 1771-1789.
- Bueno, M., Dias, G. M., & Leite, F. P. (2017). The importance of shore height and host identity for amphipod assemblages. *Marine Biology Research*, 13(8), 870-877.
- Bueno, M., Flores, A. A. V., & Leite, F. (2019). Seasonal dynamics of amphipod assemblages in intertidal coralline algal mats on two Brazilian shores. *Bulletin of Marine Science*, 95(1), 83-100.
- Canadell, J. G., Monteiro, P. M. S., Costa, M. H., Cunha, L. C. d., Cox, P. M., Eliseev, A. V., Henson, S., Ishii, M., Jaccard, S., Koven, et al. (2021). Global Carbon and other Biogeochemical Cycles and Feedbacks. In V. Masson-Delmotte, et al. (Eds.), *Climate Change 2021: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Sixth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change* (pp. 673-816). Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA: Cambridge University Press.
- Carcedo, M. C., & Fiori, S. M. (2012). Long-term study of the life cycle and growth of *Heleobia australis* (Caenogastropoda, Cochliopidae) in the Bahía Blanca estuary, Argentina. *Ciencias Marinas*, 38(4), 589-597.
- Carpenter, S. R., Caraco, N. F., Correll, D. L., Howarth, R. W., Sharpley, A. N., & Smith, V. H. (1998). Nonpoint pollution of surface waters with phosphorus and nitrogen. *Ecological Applications*, 8(3), 559-568.
- Carstensen, J., & Duarte, C. M. (2019). Drivers of pH variability in coastal ecosystems. *Environmental Science & Technology*, 53(8), 4020-4029.

- Celis-Pla, P. S., Hall-Spencer, J. M., Horta, P. A., Milazzo, M., Korbee, N., Cornwall, C. E., & Figueroa, F. L. (2015). Macroalgal responses to ocean acidification depend on nutrient and light levels. *Frontiers in Marine Science*, 2, 26.
- Chapman, J. W. (2007). Amphipoda. In J. T. Carlton (Ed.), *The Light and Smith Manual: Intertidal Invertebrates from Central California to Oregon*. Berkeley, CA: University of California Press.
- Chen, B., Lin, L., Ma, Z., Zhang, T., Chen, W., & Zou, D. (2019). Carbon and nitrogen accumulation and interspecific competition in two algae species, *Pyropia haitanensis* and *Ulva lactuca*, under ocean acidification conditions. *Aquaculture International*, 27, 721-733.
- Cheng, L., Abraham, J., Zhu, J., Trenberth, K. E., Fasullo, J., Boyer, T., Locarnini, R., Zhang, B., Yu, F., Wan, L., Chen, X., Song, X., Liu, Y., & Mann, M. E. (2020). Record-Setting Ocean Warmth Continued in 2019. *Advances in Atmospheric Sciences*, 37(2), 137-142.
- 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. (2016). Human activities and climate variability drive fast-paced change across the world's estuarine-coastal ecosystems. *Global Change Biology*, 22(2), 513-529.
- 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(5917), 1014-1015.
- Connell, J. H. (1961). The influence of interspecific competition and other factors on the distribution of the barnacle *Chthamalus stellatus*. *Ecology*, 42(4), 710-723.
- Conover, R. J. (1966). Assimilation of Organic matter by zooplankton 1. *Limnology and Oceanography*, 11(3), 338-345.
- Crain, C. M., Kroeker, K., & Halpern, B. S. (2008). Interactive and cumulative effects of multiple human stressors in marine systems. *Ecology Letters*, 11(12), 1304-1315.
- Crawley, M. J. (2013). *The R Book* (second ed.): John Wiley & Sons.
- Crickenberger, S., Walther, K., Marchant, S., Marko, P. B., & Moran, A. L. (2015). Population-dependent acclimatization capacity of thermal tolerance in larvae of the rocky-shore barnacle *Pollicipes elegans*. *Invertebrate Biology*, 134(4), 291-302.
- Crutzen, P. (2002). Geology of mankind. *Nature*, 415(3), 23.
- Cruz-Rivera, E., & Hay, M. E. (2000a). Can quantity replace quality? Food choice, compensatory feeding, and fitness of marine mesograzers. *Ecology*, 81(1), 201-219.

- Cruz-Rivera, E., & Hay, M. E. (2000b). The effects of diet mixing on consumer fitness: macroalgae, epiphytes, and animal matter as food for marine amphipods. *Oecologia*, *123*(2), 252-264.
- Cruz-Rivera, E., & Hay, M. E. (2001). Macroalgal traits and the feeding and fitness of an herbivorous amphipod: The roles of selectivity, mixing, and compensation. *Marine Ecology Progress Series*, *218*, 249-266.
- Cuevas, J. M., Martin, J. P., & Bastida, R. (2006). Benthic community changes in a Patagonian intertidal: a forty years later comparison. *Thalassas*, *22*(1), 29-37.
- Depetris, P. J., Gaiero, D. M., Probst, J.-L., Hartmann, J., & Kempe, S. (2005). Biogeochemical output and typology of rivers draining Patagonia's Atlantic seaboard. *Journal of Coastal Research*, *21*(4), 835-844.
- Diaz, P., Gappa, J. L., & Piriz, M. L. (2002). Symptoms of eutrophication in intertidal macroalgal assemblages of Nuevo Gulf (Patagonia, Argentina). *Botanica Marina*, *45*(3), 267-273.
- 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. R., Momo, F. R., Brêthes, J.-C., & Ferreyra, G. A. (2012). Metabolic rate and food availability of the Antarctic amphipod *Gondogeneia antarctica* (Chevreux 1906): seasonal variation in allometric scaling and temperature dependence. *Polar Biology*, *35*(3), 413-424.
- Duarte, C., López, J., Benítez, S., Manríquez, P. H., Navarro, J. M., Bonta, C. C., Torres, R., & Quijón, P. (2016). Ocean acidification induces changes in algal palatability and herbivore feeding behavior and performance. *Oecologia*, *180*(2), 453-462.
- Duarte, C., Navarro, J., Acuna, K., & Gómez, I. (2010). Feeding preferences of the sandhopper *Orchestoidea tuberculata*: the importance of algal traits. *Hydrobiologia*, *651*, 291-303.
- Duffy, J. E., & Hay, M. E. (1991). Food and shelter as determinants of food choice by an herbivorous marine amphipod. *Ecology*, *72*, 1286-1298.
- Duffy, J. E., & Hay, M. E. (2000). Strong impacts of grazing amphipods on the organization of a benthic community. *Ecological Monographs*, *70*(2), 237-263.
- Dunn, A. M., & McCabe, J. (1995). Resource allocation to young: seasonal patterns within and between *Gammarus duebeni* populations. *Oikos*, *73*(2), 199-202.
- Faasse, M. (2015). New records of the non-native amphipod *Ampithoe valida* in Europe. *Marine Biodiversity Records*, *8*, e87.

- Fanjul-Moles, M. L., Bosques-Tistler, T., Prieto-Sagredo, J., Castanón-Cervantes, O., & Fernández-Rivera-Río, L. (1998). Effect of variation in photoperiod and light intensity on oxygen consumption, lactate concentration and behavior in crayfish *Procambarus clarkii* and *Procambarus digueti*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 119(1), 263-269.
- 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(6016), 207-210.
- Fernández, M., Brante, A., & Baldanzi, S. (2020). Costs and benefits of brooding among decapod crustaceans: the challenges of incubating in aquatic systems. In R. Cothran & M. Thiel (Eds.), *Reproductive Biology: The Natural History of the Crustacea* (Vol. 6, pp. 86-114). New York: Oxford University Press.
- Fischer, J. M., Fields, P. A., Pryzbylowski, P. G., Nicolai, J. L., & Neale, P. J. (2006). Sublethal exposure to UV radiation affects respiration rates of the freshwater cladoceran *Daphnia catawba*. *Photochemistry and Photobiology*, 82, 547-550.
- Fox-Kemper, B., Hewitt, H., Xiao, C., Aðalgeirsdóttir, G., Drijfhout, S., Edwards, T., Golledge, N., Hemer, M., Kopp, R., Krinner, G., et al. (2021). Ocean, cryosphere and sea level change. In V. Masson-Delmotte, et al. (Eds.), *Climate Change 2021: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Sixth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change* (pp. 1211–1362). Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA: Cambridge University Press.
- Fox, J., & Weisberg, S. (2019). *An R companion to applied regression* (Third ed.). Thousand Oaks CA: Sage publications.
- Frederich, M., & Pörtner, H. O. (2000). Oxygen limitation of thermal tolerance defined by cardiac and ventilatory performance in spider crab, *Maja squinado*. *American Journal of Physiology: Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 279(5), R1531-R1538.
- Friedrich, S., Konietschke, F., & Pauly, M. (2017). GFD: An R package for the analysis of general factorial designs. *Journal of Statistical Software*, 79(1), 1-18.
- 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(19), 3603-3623.
- Gao, G., Clare, A. S., Rose, C., & Caldwell, G. S. (2017). Eutrophication and warming-driven green tides (*Ulva rigida*) are predicted to increase under future climate change scenarios. *Marine Pollution Bulletin*, 114(1), 439-447.

- Gattuso, J.-P., Lee, K., Rost, B., & Schulz, K. (2010). Approaches and tools to manipulate the carbonate chemistry. In U. Riebesell, V. J. Fabry, L. Hansson, & J.-P. Gattuso (Eds.), *Guide to best practices for ocean acidification research and data reporting* (pp. 41-52). Brussels: Publications Office of the European Union.
- Gauna, M. C., Escobar, J. F., Cáceres, E. J., & Parodi, E. R. (2017). Spatial and temporal variation in algal epiphyte distribution on *Ulva* sp. (Ulvales, Chlorophyta) from northern Patagonia in Argentina. *Phycologia*, *56*(2), 125-135.
- Gee, J. M. (1985). Seasonal aspects of the relationship between temperature and respiration rate in four species of intertidal harpacticoid copepod. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, *93*(1-2), 147-156.
- Gil, M. N., Giarratano, E., Barros, V., Bortolus, A., Codignotto, J. O., Schenke, R. D., Góngora, G. M. E., Lovrich, G., Monti, A. J., & Pascual, M. (2019). Southern Argentina: the patagonian continental shelf. In C. Sheppard (Ed.), *World Seas: An Environmental Evaluation* (Vol. I: Europe, the Americas and West Africa, pp. 783-811). London, UK: Elsevier.
- Gotoh, T., Koyama, M., Hagino, Y., & Doke, K. (2011). Effect of leaf toughness and temperature on development in the lilac pyralid, *Palpita nigropunctalis* (Bremer) (Lepidoptera: Crambidae). *Journal of Asia-Pacific Entomology*, *14*(2), 173-178.
- Granado, I., & Caballero, P. (2001). Feeding rates of *Littorina striata* and *Osilinus atratus* in relation to nutritional quality and chemical defenses in seaweeds. *Marine Biology*, *138*(6), 1213-1224.
- Guillard, R. R., & Ryther, J. H. (1962). Studies of marine planktonic diatoms: I. *Cyclotella nana* Hustedt, and *Detonula confervacea* (Cleve) Gran. *Canadian Journal of Microbiology*, *8*(2), 229-239.
- Gutow, L., Petersen, I., Bartl, K., & Huenerlage, K. (2016). Marine meso-herbivore consumption scales faster with temperature than seaweed primary production. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, *477*, 80-85.
- 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., Lebert, M., Schuster, M., del Ciampo, L., Helbling, E. W., & McKenzie, R. (2007). ELDONET - A decade of monitoring solar radiation on five continents. *Photochemistry and Photobiology*, *83*, 1348-1357.

- Hagen, W., & Schnack-Schiel, S. B. (1996). Seasonal lipid dynamics in dominant Antarctic copepods: energy for overwintering or reproduction? *Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers*, 43(2), 139-158.
- 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. (2008). A global map of human impact on marine ecosystems. *Science*, 319, 948-952.
- Hansson, L.-A., Hylander, S., & Sommaruga, R. (2007). Escape from UV threats in zooplankton: a cocktail of behavior and protective pigmentation. *Ecology*, 88(8), 1932-1939.
- Hansson, L. A., Bianco, G., Ekvall, M., Heuschele, J., Hylander, S., & Yang, X. (2016). Instantaneous threat escape and differentiated refuge demand among zooplankton taxa. *Ecology*, 97(2), 279-285.
- Harley, C. D. G., Hughes, A. R., Hultgre, K. M., Miner, B. G., Sorte, C. J. B., Thornber, C. S., Rodriguez, L. F., Tomanek, L., & Williams, S. L. (2006). The impacts of climate change in coastal marine systems. *Ecology Letters*, 9, 228-241.
- Harper, K. E., Scheinberg, L. A., Boyer, K. E., & Sotka, E. E. (2022). Global distribution of cryptic native, introduced and hybrid lineages in the widespread estuarine amphipod *Ampithoe valida*. *Conservation Genetics*, 23(4), 791-806.
- Hartnoll, R. (2006). Reproductive investment in Brachyura. *Hydrobiologia*, 557, 31-40.
- Harvey, B. P., Gwynn-Jones, D., & Moore, P. J. (2013). Meta-analysis reveals complex marine biological responses to the interactive effects of ocean acidification and warming. *Ecology and Evolution*, 3(4), 1016-1030.
- He, Q., & Silliman, B. R. (2019). Climate change, human impacts, and coastal ecosystems in the Anthropocene. *Current Biology*, 29(19), R1021-R1035.
- Helbling, E. W. (1989). *Estuarine Circulation and Nutrient Variability in the Chubut River Estuary (Argentina) During 1986-1987*. (M.Sc. thesis). University of California, San Diego,
- 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., Menchi, C. F., & Villafañe, V. E. (2002). Bioaccumulation and role of UV-absorbing compounds in two marine crustacean species from Patagonia, Argentina. *Photochemical and Photobiological Sciences*, 1, 820-825.

- Helmuth, B., Mieszkowska, N., Moore, P., & Hawkins, S. J. (2006). Living on the edge of two changing worlds: Forecasting the responses of rocky intertidal ecosystems to climate change. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics*, 37, 373-404.
- Helmuth, B. S., & Hofmann, G. E. (2001). Microhabitats, thermal heterogeneity, and patterns of physiological stress in the rocky intertidal zone. *Biological Bulletin*, 201(3), 374-384.
- Hemmi, A., & Jormalainen, V. (2002). Nutrient enhancement increases performance of a marine herbivore via quality of its food alga. *Ecology*, 83(4), 1052-1064.
- Henry, R. P., & Wheatly, M. G. (1992). Interaction of respiration, ion regulation, and acid-base balance in the everyday life of aquatic crustaceans. *American Zoologist*, 32(3), 407-416.
- Hernández, K., Yannicelli, B., Montecinos, A., Ramos, M., González, H. E., & Daneri, G. (2012). Temporal variability of incidental solar radiation and modulating factors in a coastal upwelling area (36 S). *Progress in Oceanography*, 92, 18-32.
- Hernández Moresino, R. D., Gonçalves, R. J., & Helbling, E. W. (2014). Direct and indirect acquisition of photoprotective compounds in crab larvae of coastal Patagonia (Argentina). *Journal of Plankton Research*, 36(3), 877-882.
- Hidalgo, F. J., Silliman, B. R., Bazterrica, M. C., & Bertness, M. D. (2007). Predation on the rocky shores of Patagonia, Argentina. *Estuaries and Coasts*, 30(5), 886-894.
- Hofmann, G. E., & Todgham, A. E. (2010). Living in the Now: Physiological Mechanisms to Tolerate a Rapidly Changing Environment. *Annual Review of Physiology*, 72, 127-145.
- Hopkin, R. S., Qari, S., Bowler, K., Hyde, D., & Cuculescu, M. (2006). Seasonal thermal tolerance in marine Crustacea. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 331(1), 74-81.
- Horton, T., De Broyer, C., Bellan-Santini, D., Coleman, C. O., Copilaş-Ciocianu, D., Corbari, L., Daneliya, M. E., Dauvin, J. C., Decock, W., Fanini, L., et al. (2023). The World Amphipoda Database: history and progress. *Records of the Australian Museum*, 75(4), 329-342.
- Hothorn, T., Bretz, F., & Westfall, P. (2008). Simultaneous inference in general parametric models. *Biometrical Journal*, 50(3), 346-363.
- Hughes, T. P., Kerry, J. T., Álvarez-Noriega, M., Álvarez-Romero, J. G., Anderson, K. D., Baird, A. H., Babcock, R. C., Beger, M., Bellwood, D. R., Berkelmans, R., et al. (2017). Global warming and recurrent mass bleaching of corals. *Nature*, 543, 373-377.

- IPCC. (2021). *Climate Change 2021: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Sixth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change* (V. Masson-Delmotte, et al. Eds.). Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA: Cambridge University Press.
- IPCC. (2022). *Climate Change 2022: Impacts, Adaptation and Vulnerability. Contribution of Working Group II to the Sixth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change* (H.-O. Pörtner, et al. Eds.). Cambridge University Press, Cambridge, UK and New York, NY, USA: Cambridge University Press.
- Islam, M. S., & Tanaka, M. (2004). Impacts of pollution on coastal and marine ecosystems including coastal and marine fisheries and approach for management: a review and synthesis. *Marine Pollution Bulletin*, 48(7), 624-649.
- Jensen, S. L., & Muller-Parker, G. (1994). Inorganic nutrient fluxes in anemone-dominated tide pools. *Pacific Science*, 48(1), 32-43.
- Ji, Y., & Gao, K. (2020). Effects of climate change factors on marine macroalgae: A review. *Advances in Marine Biology*, 88, 91-136.
- Jimenez, P. J., Vorsatz, L. D., Costa, T. M., & Cannicci, S. (2022). Temperature extremes and sex-related physiology, not environmental variability, are key in explaining thermal sensitivity of bimodal-breathing intertidal crabs. *Frontiers in Marine Science*, 9, 1-16.
- Jormalainen, V., Honkanen, T., & Heikkilä, N. (2001). Feeding preferences and performance of a marine isopod on seaweed hosts: cost of habitat specialization. *Marine Ecology Progress Series*, 220, 219-230.
- Jourdan, J., Piro, K., Weigand, A., & Plath, M. (2019). Small-scale phenotypic differentiation along complex stream gradients in a non-native amphipod. *Frontiers in Zoology*, 16(1), 1-20.
- Kang, J. W., & Chung, I. K. (2017). The effects of eutrophication and acidification on the ecophysiology of *Ulva pertusa* Kjellman. *Journal of Applied Phycology*, 29, 2675-2683.
- Kelly, M. W., Sanford, E., & Grosberg, R. K. (2012). Limited potential for adaptation to climate change in a broadly distributed marine crustacean. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 279(1727), 349-356.
- Koch, M., Bowes, G., Ross, C., & Zhang, X. H. (2013). Climate change and ocean acidification effects on seagrasses and marine macroalgae. *Global Change Biology*, 19(1), 103-132.
- Kolts, J. M., Lovvorn, J. R., North, C. A., Grebmeier, J. M., & Cooper, L. W. (2013). Effects of body size, gender, and prey availability on diets of snow crabs in the northern Bering Sea. *Marine Ecology Progress Series*, 483, 209-220.

- Konietschke, F., Placzek, M., Schaarschmidt, F., & Hothorn, L. A. (2015). nparcomp: an R software package for nonparametric multiple comparisons and simultaneous confidence intervals. *Journal of Statistical Software*, *64*(9), 1-17.
- Kroeker, K. J., Kordas, R. L., Crim, R., Hendriks, I. E., Ramajo, L., Singh, G. S., Duarte, C. M., & Gattuso, J. P. (2013). Impacts of ocean acidification on marine organisms: quantifying sensitivities and interaction with warming. *Global Change Biology*, *19*(6), 1884-1896.
- Kroeker, K. J., Kordas, R. L., Crim, R. N., & Singh, G. G. (2010). Meta-analysis reveals negative yet variable effects of ocean acidification on marine organisms. *Ecology Letters*, *13*(11), 1419-1434.
- Kronenberger, K., Moore, P. G., Halcrow, K., & Vollrath, F. (2012). Spinning a marine silk for the purpose of tube-building. *Journal of Crustacean Biology*, *32*(2), 191-202.
- Kuris, A. M. (1991). A review of patterns and causes of crustacean brood mortality. In A. Wenner & A. Kuris (Eds.), *Crustacean Egg Production* (pp. 117-141). Rotterdam, Netherlands: Brookfield, VT: A.A. Balkema.
- Lapointe, B. E., & Tenore, K. R. (1981). Experimental outdoor studies with *Ulva fasciata* Delile. I. Interaction of light and nitrogen on nutrient uptake, growth, and biochemical composition. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, *53*(2-3), 135-152.
- Lefevre, S. (2016). Are global warming and ocean acidification conspiring against marine ectotherms? A meta-analysis of the respiratory effects of elevated temperature, high CO<sub>2</sub> and their interaction. *Conservation Physiology*, *4*(1), 1-31.
- Legrand, E., Riera, P., Pouliquen, L., Bohner, O., Cariou, T., & Martin, S. (2018). Ecological characterization of intertidal rockpools: Seasonal and diurnal monitoring of physico-chemical parameters. *Regional Studies in Marine Science*, *17*, 1-10.
- Lemoine, N. P., & Burkepile, D. E. (2012). Temperature-induced mismatches between consumption and metabolism reduce consumer fitness. *Ecology*, *93*(11), 2483-2489.
- Lenth, R. (2016). Least-squares means: the R package lsmeans. *Journal of Statistical Software*, *69*, 1-33.
- Leung, J. Y., Nagelkerken, I., Russell, B. D., Ferreira, C. M., & Connell, S. D. (2018). Boosted nutritional quality of food by CO<sub>2</sub> enrichment fails to offset energy demand of herbivores under ocean warming, causing energy depletion and mortality. *Science of The Total Environment*, *639*, 360-366.
- Li, W., & Gao, K. (2012). A marine secondary producer respire and feeds more in a high CO<sub>2</sub> ocean. *Marine Pollution Bulletin*, *64*(4), 699-703.

- Liess, A., & Hillebrand, H. (2005). Stoichiometric variation in C: N, C: P, and N: P ratios of littoral benthic invertebrates. *Journal of the North American Benthological Society*, 24(2), 256-269.
- Liu, Y., Xu, J., & Gao, K. (2012). CO<sub>2</sub>-driven seawater acidification increases photochemical stress in a green alga. *Phycologia*, 51(5), 562-566.
- Long, W. C., Pruisner, P., Swiney, K. M., & Foy, R. J. (2019). Effects of ocean acidification on the respiration and feeding of juvenile red and blue king crabs (*Paralithodes camtschaticus* and *P. platypus*). *ICES Journal of Marine Science*, 76(5), 1335-1343.
- Lopez, H., Lee, S.-K., West, R., Kim, D., & Jia, L. (2025). The longest-lasting 2023 western North American heat wave was fueled by the record-warm Atlantic Ocean. *Nature Communications*, 16(1), 6544.
- Luo, H., Quaas, J., & Han, Y. (2024). Diurnally asymmetric cloud cover trends amplify greenhouse warming. *Science Advances*, 10(25), eado5179.
- Luppi, T., Spivak, E., Anger, K., & Valero, J. (2002). Patterns and processes of *Chasmagnathus granulata* and *Cyrtograpsus angulatus* (Brachyura: Grapsidae) recruitment in Mar Chiquita coastal lagoon, Argentina. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 55(2), 287-297.
- Machado, G. B., Leite, F. P., & Sotka, E. E. (2018). Nutrition of marine mesograzers: integrating feeding behavior, nutrient intake and performance of an herbivorous amphipod. *PeerJ*, 6, e5929.
- Mäkelin, S., & Villnäs, A. (2022). Food sources drive temporal variation in elemental stoichiometry of benthic consumers. *Limnology and Oceanography*, 67(4), 784-799.
- Marcinkevicius, M., Jones, B., Aguirre, C. S., & Álvarez, M. (2021). Food habits of *Patagonotothen cornucola* (Nototheniidae) in Patagonian Shelf (Southwest Atlantic). *Journal of Ichthyology*, 61(6), 891-899.
- Marcinkevicius, M. S., Serrano-Aguirre, C. C., Jones, B. A., & Álvarez, M. V. (2024). Reproductive cycle of the sub-Antarctic nototheniid *Patagonotothen cornucola* (Nototheniidae) in the Argentine Patagonian Shelf. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 59(1), 29-38.
- Martin, J. W., & Davis, G. E. (2001). *An updated classification of the recent Crustacea* (Vol. 39): Los Angeles: Natural History Museum of Los Angeles County .
- Martinetto, P., Daleo, P., Escapa, M., Alberti, J., Isacch, J. P., Fanjul, E., Botto, F., Piriz, M. L., Ponce, G., Casas, G., & Iribarne, O. (2010). High abundance and diversity of consumers associated with eutrophic areas in a semi-desert macrotidal coastal

- ecosystem in Patagonia, Argentina. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 88(3), 357-364.
- Mascaro, M., Hidalgo, L. E., Chiappa-Carrara, X., & Simoes, N. (2003). Size-selective foraging behaviour of blue crabs, *Callinectes sapidus* (Rathbun), when feeding on mobile prey: active and passive components of predation. *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology*, 36(3), 143-159.
- Maszczyk, P., & Brzezinski, T. (2018). Body size, maturation size, and growth rate of crustaceans. *The natural history of the Crustacea*, 5, 35-65.
- Mehvar, S., Filatova, T., Dastgheib, A., De Ruyter van Steveninck, E., & Ranasinghe, R. (2018). Quantifying economic value of coastal ecosystem services: a review. *Journal of Marine Science and Engineering*, 6(1), 1-18.
- Mendez, M. M., Schwindt, E., & Bortolus, A. (2015). Differential benthic community response to increased habitat complexity mediated by an invasive barnacle. *Aquatic Ecology*, 49(4), 441-452.
- Metaxas, A., & Scheibling, R. E. (1993). Community structure and organization of tidepools. *Marine Ecology Progress Series*, 98, 187-198.
- Metzger, R., Sartoris, F. J., Langenbuch, M., & Pörtner, H. O. (2007). Influence of elevated CO<sub>2</sub> concentrations on thermal tolerance of the edible crab *Cancer pagurus*. *Journal of Thermal Biology*, 32(3), 144-151.
- Middelboe, A. L., & Hansen, P. J. (2007). High pH in shallow-water macroalgal habitats. *Marine Ecology Progress Series*, 338, 107-117.
- Mieszkowska, N. (2025). Evidence of climate change (intertidal indicators). In T. M. Letcher & V. M. Fthenakis (Eds.), *Energy and Climate Change* (1st ed., pp. 43-66): Elsevier Science.
- Missionário, M., Fernandes, J. F., Travesso, M., Freitas, E., Calado, R., & Madeira, D. (2022). Sex-specific thermal tolerance limits in the ditch shrimp *Palaemon varians*: Eco-evolutionary implications under a warming ocean. *Journal of Thermal Biology*, 103, 103151.
- Moresino, R. D. H., & Helbling, E. W. (2010). Combined effects of UVR and temperature on the survival of crab larvae (Zoea I) from Patagonia: the role of UV-absorbing compounds. *Marine Drugs*, 8(5), 1681-1698.
- Nagai, S., Yoshida, G., & Tarutani, K. (2011). Change in species composition and distribution of algae in the coastal waters of western Japan. In S. Casalegno (Ed.), *Global Warming Impacts - Case Studies on the Economy, Human Health, and on Urban and Natural Environments* (pp. 209-237): IntechOpen.

- Nicotri, M. (1980). Factors involved in herbivore food preference. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 42(1), 13-26.
- Novo, M. S., Miranda, R. B., & Bianchini, A. (2005). Sexual and seasonal variations in osmoregulation and ionoregulation in the estuarine crab *Chasmagnathus granulatus* (Crustacea, Decapoda). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 323(2), 118-137.
- O'Connor, M. I. (2009). Warming strengthens an herbivore–plant interaction. *Ecology*, 90(2), 388-398.
- Obermüller, B., Karsten, U., & Abele, D. (2005). Response of oxidative stress parameters and suncreening compounds in Arctic amphipods during experimental exposure to maximal natural UVB radiation. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 323(2), 100-117.
- Obermüller, B., Puntarulo, S., & Abele, D. (2007). UV-tolerance and instantaneous physiological stress responses of two Antarctic amphipod species *Gondogeneia antarctica* and *Djerboa furcipes* during exposure to UV radiation. *Marine Environmental Research*, 64(3), 267-285.
- Paganini, A. W., Miller, N. A., & Stillman, J. H. . (2014). Temperature and acidification variability reduce physiological performance in the intertidal zone porcelain crab *Petrolisthes cinctipes*. *Journal of Experimental Biology*, 217(22), 3974-3980.
- Pardal, M. A., Marques, J. C., Metelo, I., Lillebø, A. I., & Flindt, M. R. . (2000). Impact of eutrophication on the life cycle, population dynamics and production of *Ampithoe valida* (Amphipoda) along an estuarine spatial gradient (Mondego estuary, Portugal). *Marine Ecology Progress Series*, 196, 207-219.
- Pauly, M., Brunner, E., & Konietzschke, F. (2015). Asymptotic permutation tests in general factorial designs. *Journal of the Royal Statistical Society: Series B (Statistical Methodology)*, 77(2), 461-473.
- Peckol, P., DeMeo-Anderson, B., Rivers, J., Valiela, I., Maldonado, M., & Yates, J. (1994). Growth, nutrient uptake capacities and tissue constituents of the macroalgae *Cladophora vagabunda* and *Gracilaria tikvahiae* related to site-specific nitrogen loading rates. *Marine Biology*, 121, 175-185.
- Pennings, S. C., Carefoot, T. H., Siska, E. L., Chase, M. E., & Page, T. A. (1998). Feeding preferences of a generalist salt-marsh crab: relative importance of multiple plant traits. *Ecology*, 79(6), 1968-1979.
- Pfeifroth, U., Sanchez-Lorenzo, A., Manara, V., Trentmann, J., & Hollmann, R. (2018). Trends and variability of surface solar radiation in Europe based on surface-and

- satellite-based data records. *Journal of Geophysical Research: Atmospheres*, 123(3), 1735-1754.
- Phelps, C. M., Boyce, M. C., & Huggett, M. J. (2017). Future climate change scenarios differentially affect three abundant algal species in southwestern Australia. *Marine Environmental Research*, 126, 69-80.
- Philippart, C. J., van Aken, H. M., Beukema, J. J., Bos, O. G., Cadée, G. C., & Dekker, R. (2003). Climate-related changes in recruitment of the bivalve *Macoma balthica*. *Limnology and Oceanography*, 48(6), 2171-2185.
- Pilgrim, E. M., & Darling, J. A. (2010). Genetic diversity in two introduced biofouling amphipods (*Ampithoe valida* & *Jassa marmorata*) along the Pacific North American coast: investigation into molecular identification and cryptic diversity. *Diversity and Distributions*, 16(5), 827-839.
- Pinheiro, J., & Bates, D. (2000). *Mixed-effects models in S and S-PLUS*. New York: Springer.
- Pinheiro, J., Bates, D., DebRoy, S., Sarkar, D., & R Core Team (2020). nlme: Linear and nonlinear mixed effects models (Version R package version 3.1-148). Disponible en <https://CRAN.R-project.org/package=nlme>
- Poore, A. G. B., Graba-Landry, A., Favret, M., Brennand, H. S., Byrne, M., & Dworjanyn, S. A. (2013). Direct and indirect effects of ocean acidification and warming on a marine plant–herbivore interaction. *Oecologia*, 173(3), 1113-1124.
- Pörtner, H. O. (2001). Climate change and temperature-dependent biogeography: oxygen limitation of thermal tolerance in animals. *Naturwissenschaften*, 88(4), 137-146.
- Pörtner, H. O. (2002). Climate variations and the physiological basis of temperature dependent biogeography: systemic to molecular hierarchy of thermal tolerance in animals. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 132(4), 739-761.
- Pörtner, H. O., Langenbuch, M., & Reipschläger, A. (2004). Biological impact of elevated ocean CO<sub>2</sub> concentrations: lessons from animal physiology and earth history. *Journal of Oceanography*, 60(4), 705-718.
- Pruitt, N. L. (1990). Adaptations to temperature in the cellular membranes of crustacea: membrane structure and metabolism. *Journal of Thermal Biology*, 15(1), 1-8.
- Pulgar, J., Waldisperg, M., Galbán-Malagón, C., Maturana, D., Pulgar, V. M., & Aldana, M. (2017). UV radiation impacts body weight, oxygen consumption, and shelter selection in the intertidal vertebrate *Girella laevis*. *Science of the Total Environment*, 578, 317-322.

- Qadri, S. A., Camacho, J., Wang, H., Taylor, J. R., Grosell, M., & Worden, M. K. (2007). Temperature and acid–base balance in the American lobster *Homarus americanus*. *Journal of Experimental Biology*, 210(7), 1245-1254.
- Quijada-Rodriguez, A. R., Kuan, P.-L., Sung, P.-H., Hsu, M.-T., Allen, G. J., Hwang, P. P., Tseng, Y.-C., & Weihrauch, D. (2021). Anthropogenic CO<sub>2</sub>-mediated freshwater acidification limits survival, calcification, metabolism, and behaviour in stress-tolerant freshwater crustaceans. *Biogeosciences*, 18(23), 6287-6300.
- R Core Team. (2020). R: A language and environment for statistical computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing.
- Ramírez, F., Afán, I., Davis, L. S., & Chiaradia, A. (2017). Climate impacts on global hot spots of marine biodiversity. *Science Advances*, 3(2), e1601198.
- 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*. London, UK: The Royal Society.
- Rechimont, M. E., Galvan, D. E., Sueiro, M. C., Casas, G., Piriz, M. L., Diez, M. E., Primost, M., Zabala, M. S., Márquez, F., Brogger, M., et al. (2013). Benthic diversity and assemblage structure of a north Patagonian rocky shore: a monitoring legacy of the NaGISA project. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 93(8), 2049-2058.
- Reynolds, L. K., Carr, L. A., & Boyer, K. E. (2012). A non-native amphipod consumes eelgrass inflorescences in San Francisco Bay. *Marine Ecology Progress Series*, 451, 107-118.
- Rico, A., Lanas, P., & López-Gappa, J. (2005). Colonization potential of the genus *Ulva* (Chlorophyta, Ulvales) in Comodoro Rivadavia Harbor (Chubut, Argentina). *Ciencias Marinas*, 31(4), 719-735.
- Roberts, D. A., Hofmann, G. E., & Somero, G. N. (1997). Heat-shock protein expression in *Mytilus californianus*: acclimatization (seasonal and tidal-height comparisons) and acclimation effects. *The Biological Bulletin*, 192(2), 309-320.
- Robertson, A., & Lucas, J. (1983). Food choice, feeding rates, and the turnover of macrophyte biomass by a surf-zone inhabiting amphipod. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 72(2), 99-124.
- Rothäusler, E., Haavisto, F., & Jormalainen, V. (2017). Is the future as tasty as the present? Elevated temperature and hyposalinity affect the quality of *Fucus* (Phaeophyceae, Fucales) as food for the isopod *Idotea balthica*. *Marine Biology*, 164(11), 1-15.

- Roux, A., Piñero, R., Moriondo, P., & Fernández, M. (2009). Diet of the red shrimp *Pleoticus muelleri* (Bate, 1888) in Patagonian fishing grounds, Argentine. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 44(3), 775-781.
- Ruggaber, A., Dlugi, R., & Nakajima, T. (1994). Modelling of radiation quantities and photolysis frequencies in the troposphere. *Journal of Atmospheric Chemistry*, 18, 171-210.
- Rumbold, C., Obenat, S., Velazquez, S. N., Gancedo, B., & Spivak, E. (2017). Seasonal variation of peracarid assemblages in natural and artificial marine environments of the Southwestern Atlantic Ocean. *Marine Biodiversity*, 48(4), 1743-1754.
- Rumbold, C. E. (2019). Life history of peracarid species in South-western Atlantic: Comparison of population traits between native and exotic species. *Austral Ecology*, 44(6), 949-961.
- Sabine, C. L., Feely, R. A., Gruber, N., Key, R. M., Lee, K., Bullister, J. L., Wanninkhof, R., Wong, C., Wallace, D. W., & Tilbrook, B. (2004). The oceanic sink for anthropogenic CO<sub>2</sub>. *Science*, 305(5682), 367-371.
- Scheffler, M. L., Barreto, F. S., & Mueller, C. A. (2019). Rapid metabolic compensation in response to temperature change in the intertidal copepod, *Tigriopus californicus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 230, 131-137.
- Schwarz, M., Folini, D., Yang, S., Allan, R. P., & Wild, M. (2020). Changes in atmospheric shortwave absorption as important driver of dimming and brightening. *Nature Geoscience*, 13(2), 110-115.
- Schwindt, E., Carlton, J. T., Orensanz, J. M., Scarabino, F., & Bortolus, A. (2020). Past and future of the marine bioinvasions along the Southwestern Atlantic. *Aquatic Invasions*, 15(1), 11-29.
- Scrosati, R. A., Ellrich, J. A., & Freeman, M. J. (2020). Half-hourly changes in intertidal temperature at nine wave-exposed locations along the Atlantic Canadian coast: a 5.5-year study. *Earth System Science Data Discussions*, 12, 1-15.
- Semsar-kazerouni, M., & Verberk, W. C. (2018). It's about time: Linkages between heat tolerance, thermal acclimation and metabolic rate at different temporal scales in the freshwater amphipod *Gammarus fossarum* Koch, 1836. *Journal of Thermal Biology*, 75, 31-37.
- Sheader, M. (1996). Factors influencing egg size in the gammarid amphipod *Gammarus insensibilis*. *Marine Biology*, 124, 519-526.

- Silliman, B. R., Bertness, M. D., Altieri, A. H., Griffin, J. N., Bazterrica, M. C., Hidalgo, F. J., Crain, C. M., & Reyna, M. V. (2011). Whole-community facilitation regulates biodiversity on Patagonian rocky shores. *PLoS ONE*, *6*(10), e24502.
- Simonson, E., Scheibling, R., & Metaxas, A. (2015). Kelp in hot water: I. Warming seawater temperature induces weakening and loss of kelp tissue. *Marine Ecology Progress Series*, *537*, 89-104.
- Siniscalchi, A. G., Gauna, M. C., Cáceres, E. J., & Parodi, E. R. (2012). *Myrionema strangulans* (Chordariales, Phacophyceae) epiphyte on *Ulva spp.* (Ulvophyceae) from Patagonian Atlantic coasts. *Journal of Applied Phycology*, *24*, 475-486.
- Skewgar, E., Boersma, P. D., Harris, G., & Caille, G. (2007). Anchovy fishery threat to Patagonian ecosystem. *Science*, *315*(5808), 45-45.
- Smaal, A., Vonck, A., & Bakker, M. (1997). Seasonal variation in physiological energetics of *Mytilus edulis* and *Cerastoderma edule* of different size classes. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, *77*(3), 817-838.
- Sokolova, I. (2021). Bioenergetics in environmental adaptation and stress tolerance of aquatic ectotherms: linking physiology and ecology in a multi-stressor landscape. *Journal of Experimental Biology*, *224*, jeb236802.
- Solomon, S., Daniel, J. S., Sanford, T. J., Murphy, D. M., Plattner, G.-K., Knutti, R., & Friedlingstein, P. (2010). Persistence of climate changes due to a range of greenhouse gases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *107*(43), 18354-18359.
- Somero, G. N. (2002). Thermal physiology and vertical zonation of intertidal animals: optima, limits, and costs of living. *Integrative and Comparative Biology*, *42*(4), 780-789.
- Sotka, E. E. (2007). Restricted host use by the herbivorous amphipod *Peramphithoe tea* is motivated by food quality and abiotic refuge. *Marine Biology*, *151*(5), 1831-1838.
- Spivak, A. C., Canuel, E. A., Duffy, J. E., & Richardson, J. P. (2009). Nutrient enrichment and food web composition affect ecosystem metabolism in an experimental seagrass habitat. *PLoS ONE*, *4*(10), e7473.
- Starko, S., Mansfield, S. D., & Martone, P. T. (2018). Cell wall chemistry and tissue structure underlie shifts in material properties of a perennial kelp. *European Journal of Phycology*, *53*(3), 307-317.
- Steffen, W., Broadgate, W., Deutsch, L., Gaffney, O., & Ludwig, C. (2015). The trajectory of the Anthropocene: the great acceleration. *The Anthropocene Review*, *2*(1), 81-98.
- Steffen, W., Sanderson, R. A., Tyson, P. D., Jäger, J., Matson, P. A., Moore III, B., Oldfield, F., Richardson, K., Schellnhuber, H.-J., Turner, B. L. & Wasson, R. J. (2006). *Global*

- Change and the Earth System: A Planet Under Pressure* (1st ed.). Heidelberg: Springer Science & Business Media.
- Stengel, D., Conde-Álvarez, R., Connan, S., Nitschke, U., Arenas, F., Abreu, H., Barufi, J. B., Chow, F., Robledo, D., Malta, E., et al. (2014). Short-term effects of CO<sub>2</sub>, nutrients and temperature on three marine macroalgae under solar radiation. *Aquatic Biology*, 22, 159-176.
- Stephenson, T., & Stephenson, A. (1949). The universal features of zonation between tide-marks on rocky coasts. *The Journal of Ecology*, 37(2), 289-305.
- Stillman, J. H. (2002). Causes and Consequences of Thermal Tolerance Limits in Rocky Intertidal Porcelain Crabs, Genus *Petrolisthes*. *Integrative and Comparative Biology*, 42(4), 790-796.
- Stillman, J. H. (2003). Acclimation capacity underlies susceptibility to climate change. *Science*, 301(5629), 65-65.
- Strickland, J. D. H., & Parsons, T. R. (1972). *A practical handbook of seawater analysis* (Vol. 167). Ottawa: Fisheries Research Board of Canada.
- Sueiro, M. C., Bortolus, A., & Schwindt, E. (2011). Habitat complexity and community composition: relationships between different ecosystem engineers and the associated macroinvertebrate assemblages. *Helgoland Marine Research*, 65(4), 467-477.
- Tanaka, Y., Matsuo, K., & Yuzuriha, S. (2010). Long-lasting muscle thinning induced by infrared irradiation specialized with wavelengths and contact cooling: a preliminary report. *Eplasty*, 10, 327-335.
- Tang, C., Morel, B., Wild, M., Pohl, B., Abiodun, B., Lennard, C., & Bessafi, M. (2019). Numerical simulation of surface solar radiation over Southern Africa. Part 2: projections of regional and global climate models. *Climate Dynamics*, 53(3-4), 2197-2227.
- Teichberg, M., Fox, S. E., Aguila, C., Olsen, Y. S., & Valiela, I. (2008). Macroalgal responses to experimental nutrient enrichment in shallow coastal waters: growth, internal nutrient pools, and isotopic signatures. *Marine Ecology Progress Series*, 368, 117-126.
- Teschke, M., Kawaguchi, S., & Meyer, B. (2007). Simulated light regimes affect feeding and metabolism of Antarctic krill, *Euphausia superba*. *Limnology and Oceanography*, 52(3), 1046-1054.
- Thompson, R. C., Crowe, T. P., & Hawkins, S. J. (2002). Rocky intertidal communities: past environmental changes, present status and predictions for the next 25 years. *Environmental Conservation*, 29(02), 168-191.

- Trisos, C. H., Merow, C., & Pigot, A. L. (2020). The projected timing of abrupt ecological disruption from climate change. *Nature*, 580(7804), 496-501.
- Tselioudis, G., Remillard, J., Jakob, C., & Rossow, W. B. (2025). Contraction of the world's storm-cloud zones the primary contributor to the 21st century increase in the Earth's sunlight absorption. *Geophysical Research Letters*, 52(11), e2025GL114882.
- Underwood, A. J. (1997). *Experiments in ecology: their logical design and interpretation using analysis of variance*. Cambridge, UK: Cambridge University Press.
- Valiela, I., McClelland, J., Hauxwell, J., Behr, P. J., Hersh, D., & Foreman, K. (1997). Macroalgal blooms in shallow estuaries: controls and ecophysiological and ecosystem consequences. *Limnology and Oceanography*, 42(5, part 2), 1105-1118.
- Valiñas, M. S., Bermejo, P., Galbán, L., Laborda, L., Häder, D. P., Villafaña, V., & W., H. E. (2014). Combined impact of ultraviolet radiation and increased nutrients supply: A test of the potential anthropogenic impacts on the benthic amphipod *Ampithoe valida* from Patagonian waters (Argentina). *Frontiers in Environmental Science*, 2, 1-10.
- Valiñas, M. S., Blum, R., Galván, D. E., Varisco, M., & Martinetto, P. (2022). Global change effects on biological interactions: nutrient inputs, invasive species, and multiple drivers shape marine Patagonian communities. In E. W. Helbling, et al. (Eds.), *Global Change in Atlantic Coastal Patagonian Ecosystems: A Journey Through Time* (1st ed., pp. 291-316). Cham, Switzerland: Springer.
- Valiñas, M. S., & Helbling, E. W. (2015). Sex-dependent effects of ultraviolet radiation on the marine amphipod *Ampithoe valida* (Ampithoidae). *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 147, 75-82.
- Valiñas, M. S., & Helbling, E. W. (2016). Metabolic and behavioral responses of the reef fish *Patagonotothen cornucola* to ultraviolet radiation: Influence of the diet. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 474, 180-184.
- Vargas, C. A., Lagos, N. A., Lardies, M. A., Duarte, C., Manríquez, P. H., Aguilera, V. M., Broitman, B., Widdicombe, S., & Dupont, S. (2017). Species-specific responses to ocean acidification should account for local adaptation and adaptive plasticity. *Nature Ecology & Evolution*, 1(4), 1-7.
- Vázquez, M. G., Bas, C. C., & Spivak, E. D. (2012). Population structure of the intertidal crab *Cyrtograpsus altimanus* (Brachyura: Varunidae) in a northern Patagonia mussel bed. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 92(2), 327-334.

- Vesakoski, O., Merilaita, S., & Jormalainen, V. (2008). Reckless males, rational females: dynamic trade-off between food and shelter in the marine isopod *Idotea balthica*. *Behavioural Processes*, 79(3), 175-181.
- Villares, R., & Carballeira, A. (2003). Seasonal variation in the concentrations of nutrients in two green macroalgae and nutrient levels in sediments in the Rias Baixas (NW Spain). *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 58(4), 887-900.
- Vizzo, J. I., Cabrerizo, M. J., Helbling, E. W., & Villafañe, V. E. (2021a). Extreme and gradual rainfall effects on winter and summer estuarine phytoplankton communities from Patagonia (Argentina). *Marine Environmental Research*, 163, 105235.
- Vizzo, J. I., Cabrerizo, M. J., Villafañe, V. E., & Helbling, E. W. (2021b). Input of Terrestrial Material into Coastal Patagonian Waters and Its Effects on Phytoplankton Communities from the Chubut River Estuary (Argentina). In E. W. Helbling, et al. (Eds.), *Global Change in Atlantic Coastal Patagonian Ecosystems: A Journey Through Time* (1st ed., pp. 291-316). Cham, Switzerland: Springer.
- Voituron, Y., Roussel, D., Teulier, L., Vagner, M., Ternon, Q., Romestaing, C., Dubillot, E., & Lefrancois, C. (2022). Warm acclimation increases mitochondrial efficiency in fish: a compensatory mechanism to reduce the demand for oxygen. *Physiological and Biochemical Zoology*, 95(1), 15-21.
- Wahl, M., Schneider Covachã, S., Saderne, V., Hiebenthal, C., Müller, J., Pansch, C., & Sawall, Y. (2018). Macroalgae may mitigate ocean acidification effects on mussel calcification by increasing pH and its fluctuations. *Limnology and Oceanography*, 63(1), 3-21.
- Waldbusser, G. G., & Salisbury, J. E. (2014). Ocean acidification in the coastal zone from an organism's perspective: multiple system parameters, frequency domains, and habitats. *Annual Review of Marine Science*, 6, 221-247.
- Walther, K., Sartoris, F.-J., Bock, C., & Pörtner, H. O. (2009). Impact of anthropogenic ocean acidification on thermal tolerance of the spider crab *Hyas araneus*. *Biogeosciences*, 6(10), 2207-2215.
- Wernberg, T., Smale, D. A., & Thomsen, M. S. (2012). A decade of climate change experiments on marine organisms: procedures, patterns and problems. *Global Change Biology*, 18(5), 1491-1498.
- Whiteley, N. (2011). Physiological and ecological responses of crustaceans to ocean acidification. *Marine Ecology Progress Series*, 430, 257-271.
- Whiteley, N., Taylor, E., & El Haj, A. (1997). Seasonal and latitudinal adaptation to temperature in crustaceans. *Journal of Thermal Biology*, 22(6), 419-427.

- Williams, J. A. (1980). The effect of dusk and dawn on the locomotor activity rhythm of *Talitrus saltator* (Montagu) (Crustacea: Amphipoda). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 42(3), 285-297.
- Williamson, C. E., Grad, G., De Lange, H. J., Gilroy, S., & Karapelou, D. M. (2002). Temperature-dependent ultraviolet responses in zooplankton: Implications of climate change. *Limnology and Oceanography*, 47(6), 1844-1848.
- Williamson, C. E., Neale, P. J., Hylander, S., Rose, K. C., Figueroa, F. L., Robinson, S. A., Häder, D.-P., Wängberg, S.-Å., & Worrest, R. C. (2019). The interactive effects of stratospheric ozone depletion, UV radiation, and climate change on aquatic ecosystems. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 18(3), 717-746.
- Witkowski, E., & Lamont, B. B. (1991). Leaf specific mass confounds leaf density and thickness. *Oecologia*, 88, 486-493.
- Wolfe, K., Nguyen, H. D., Davey, M., & Byrne, M. (2020). Characterizing biogeochemical fluctuations in a world of extremes: A synthesis for temperate intertidal habitats in the face of global change. *Global Change Biology*, 26(7), 3858-3879.
- Xu, J., & Gao, K. (2012). Future CO<sub>2</sub>-induced ocean acidification mediates the physiological performance of a green tide alga. *Plant Physiology*, 160(4), 1762-1769.
- Yu, O. H., Jeong, S. J., & Suh, H.-L. (2008). Reproductive pattern of the epifaunal amphipod *Pontogeneia rostrata* (Crustacea) on Dolsando Sandy Shore in Korea. *Ocean Science Journal*, 43, 127-133.
- Zar, J. H. (1999). *Biostatistical analysis* (4th ed.). Englewood Cliffs, NJ: Prentice Hall.
- Zheng, X., Huang, L., Huang, B., & Lin, Y. (2013). Factors regulating population dynamics of the amphipod *Ampithoe valida* in a eutrophic subtropical coastal lagoon. *Acta Oceanologica Sinica*, 32(6), 56-65.
- Zou, D., Gao, K., & Ruan, Z. (2007). Daily timing of emersion and elevated atmospheric CO<sub>2</sub> concentration affect photosynthetic performance of the intertidal macroalga *Ulva lactuca* (Chlorophyta) in sunlight. *Botanica Marina*, 50, 275-279.