

TESIS DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Efecto combinado de la radiación ultravioleta y la temperatura sobre especies y comunidades fitoplanctónicas. Aproximación a un escenario de cambio climático.

por

Mag. Silvana Raquel Halac

Director: Virginia E. Villafañe

Co-Director: E. Walter Helbling

**Estación de Fotobiología Playa Unión
Instituto Nacional del Agua- INA-CIRSA**

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

Córdoba, Argentina

Mayo 2013

COMISIÓN ASESORA

Dr. Marcos Tatián, FCEFyN, Universidad Nacional de Córdoba

Dra. Irina Izaguirre, FCEyN, Universidad de Buenos Aires

Dra. María Luisa Pignata, FCEFyN, Universidad Nacional de Córdoba

DEFENSA ORAL Y PÚBLICA

Lugar y Fecha:

Calificación:

TRIBUNAL

Firma:

Aclaración:

Firma:

Aclaración:

Firma:

Aclaración:

*“Lo más fascinante de la ciencia es que nunca se
acaban las preguntas”*

A Sandra y José

Agradecimientos

Antes que todo agradezco a mi familia y amigos que estuvieron conmigo durante todo este trayecto, y que con su compañía y apoyo me ayudaron a concretar este proyecto. A mis incansables compañeros de viaje, Natalia, Nicolás, Marcos y Héctor; a Gaby y Silvia, a Sandra y José. Sin ellos, este camino hubiera sido mucho más difícil. A Pablo, Celeste y Cipriano. A mis amigos mexicanos, que me alentaron a la distancia, Maribel, Nadine, Wendo, Arturo y Carlos.

A los que me invitaron y acompañaron en esta aventura, mi directora y mi co-director; ellos aportaron de manera valiosa a a mi formación como investigadora, y me apoyaron constantemente en la gestión de las actividades vinculadas a mi doctorado. Agradezco a la Dra. Virginia Villafañe por su valioso aporte en la elaboración del proyecto doctoral y del diseño experimental, por su orientación en la identificación y cuantificación de especies de fitoplancton, por su guía en la interpretación y análisis de datos, por la revisión y corrección exhaustiva de cada una de las etapas de esta tesis y del escrito final, y muchos más. Al Dr. Walter Helbling por su participación constante en el proyecto, su apoyo en la fase experimental y su ayuda permanente en la interpretación de resultados, así como en el seguimiento de los avances y revisión final de la tesis. A ellos dos les agradezco el esfuerzo y tiempo invertidos en mi formación profesional, así como el apoyo moral brindado durante el desarrollo de mi posgrado.

Además, agradezco a los integrantes de mi comisión asesora que dedicaron tiempo y esfuerzo en el seguimiento de mi proyecto y colaboraron como parte del tribunal, realizando observaciones para el mejoramiento del manuscrito final. Mi agradecimiento al Dr. Marcos Tatián por su buena disposición durante el desarrollo del proyecto, por las ideas aportadas en las reuniones de avance y por sus comentarios, correcciones e interrogantes planteados en el escrito final. A la Dra. Irina Izaguirre por las sugerencias aportadas en las reuniones de avance y por sus comentarios en el escrito final.

También agradezco a la Dra. María Luisa Pignata por su participación en el tribunal y por las observaciones y preguntas planteadas sobre el manuscrito, que ayudaron a clarificar y completar algunos temas.

Quiero reconocer el valioso aporte de mis compañeros de la Estación de Fotobiología Playa Unión (EFPU) y la solidaridad, compañía y buena onda que me brindaron siempre. Gracias a Valeria Fiorda y a Rodrigo Hernández por su buena disposición y ayuda constante en el laboratorio! A Rodrigo Gonçalves por su participación en trabajo de campo, experimentos y procesamiento de datos; a Sebastian Strauch por su apoyo con instrumentos de medición y en la obtención de datos; a Emilia Heimsch por las mediciones de pigmentos. También agradezco a Sergio Fernández y a toda la tripulación de la Estación Marítima Comersonii por el apoyo brindado en la obtención de muestras en el Estuario del Río Chubut.

Agradezco a mis compañeros del Instituto Nacional del Agua, Centro de la Región Semiárida (CIRSA-INA) por acompañarme a lo largo de este camino. A Martín Gauna por el apoyo técnico en informática, a Alejandra Blanco, Ada D'Agostino y Ana Ruibal por su ayuda en gestión administrativa, a María Inés Rodríguez por su asesoramiento en microscopía óptica, a Silvio Ambrosino por su ayuda en diseño y a todos los integrantes del Área de Limnología - Calidad de Aguas y del Área de Hidrología que aportaron con sus comentarios en seminarios y charlas relacionadas a mi tesis. Un especial agradecimiento al director del CIRSA, Juan Serra, por su apoyo en las gestiones relacionadas a mi beca y proyecto doctoral, que permitieron la realización de viajes de campaña, participación en cursos y congresos. Gracias a Patricia Olivera, Florencia Nadal y Martín Gauna por su amistad!

Mi gratitud a los investigadores del Instituto de Ciencias de Mar y Limnología de la Universidad Autónoma de México (ICMyL, UNAM; Puerto Morelos, México); a la Dra. Anastazia Banaszak y al Biól. Sergio Guendulain-García por su importante participación en experimentos, obtención y análisis de datos del Caribe. A Sandra Mendoza-Quiroz y Claudia Galindo-Martínez por su ayuda durante los experimentos; a la Dra. Nadine Schubert por su apoyo logístico y a los Dres. Roberto Iglesias, Susana Enriquez y Paty Thomé por el préstamo de equipo. Agradezco también a Amauri Mendoza-López por su apoyo durante los muestreos en Puerto Morelos.

Mil gracias a todo el equipo del Doctorado en Ciencias Biológicas que posibilitaron el avance de este proyecto, y a la investigadora Nancy Larrosa (FCEFYN, UNC) por su buena disposición en el préstamo de equipo.

Este proyecto de tesis doctoral fue financiado por diversas instituciones y proyectos, sin el aporte de los mismos no hubiera sido posible su realización. En primer lugar agradezco al Instituto Nacional del Agua (INA) y al Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación Productiva (MINCyT) por la beca doctoral cofinanciada en el marco del “*Programa de Formación de Doctores en Areas Tecnológicas Prioritarias*”. Además a las instituciones que facilitaron sus instalaciones, instrumental y dieron apoyo logístico: Estación de Fotobiología Playa Unión (Fundación Playa Unión), INA-Centro de la Región Semiárida (CIRSA), Instituto de Ciencias del Mar y Limnología (Universidad Nacional Autónoma de México) y Cooperativa Eléctrica y de Servicios de Rawson, así como a las instituciones que otorgaron subsidios en los diversos proyectos relacionados con esta tesis: MINCyT (Argentina-Proyecto MX/09/13) - Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT, Mexico-Proyecto J010.191 y B330.332), Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica – ANPCyT (PICT2007-01651, Argentina) y Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas – CONICET (PIP No. 112-201001-00228).

Listado de publicaciones derivadas de la Tesis

Halac SR, Villafañe VE & EW Helbling (2010) “Temperature benefits the photosynthetic performance of the diatoms *Chaetoceros gracilis* and *Thalassiosira weissflogii* when exposed to UVR”. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 101: 196-205

Halac, S.R., V.E. Villafañe, R.J. Gonçalves & E.W. Helbling. 2011. Long term UVR effects upon phytoplankton natural communities of Patagonian coastal waters. En: Atazadeh, I. (ed.). *Remote sensing of biomass: Principles and applications. Book 2*. Intech Open Access Publishers, pp.229-248. [<http://www.intechweb.org>].

Halac SR, Guendulain-García SD, Villafañe VE, Helbling EW & Banaszak AT (2013) Responses of tropical plankton communities from the Mexican Caribbean to solar ultraviolet radiation exposure and increased temperature. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. En prensa.

ÍNDICE

COMISIÓN ASESORA.....	i
DEFENSA ORAL Y PÚBLICA	i
Agradecimientos.....	iii
Listado de publicaciones derivadas de la Tesis	vi
ÍNDICE	vii
Índice de Tablas y Figuras	1
Abreviaturas	3
Resumen.....	5
Summary	6
1 CAPÍTULO 1. Introducción	7
1.1 CONCEPTOS GENERALES	8
1.1.1 Radiación solar	8
1.1.2 Cambio global	10
1.2 EL FITOPLANCTON EN UN ESCENARIO DE CAMBIO GLOBAL.....	13
1.2.1 Escalas temporales de respuesta / adaptación-aclimatación.....	15
1.2.2 Efecto de la RUV y de la temperatura a corto plazo sobre el fitoplancton	16
1.2.3 Efecto de la RUV y temperatura a mediano plazo sobre fitoplancton	17
1.2.4 Mecanismos para reducir el estrés causado por la radiación en el fitoplancton	22
1.3 FUNDAMENTACIÓN Y LINEAMIENTOS DE LA TESIS	24
1.3.1 Objetivos específicos e hipótesis	26
1.3.2 Justificación de las hipótesis consideradas en esta Tesis	27
1.4 ESTRUCTURA DE LA TESIS	29
2 CAPÍTULO 2. Metodología General	30
2.1 INTRODUCCIÓN.....	31
2.2 SITIOS DE ESTUDIO	31
2.2.1 Bahía Engaño, Provincia del Chubut, Argentina.....	31
2.2.2 Puerto Morelos, Quintana Roo, México.....	34
2.3 OBTENCIÓN DE MUESTRAS	36
2.3.1 Comunidades naturales	36
2.3.2 Cultivos	37
2.4 EXPERIMENTACIÓN	38
2.4.1 Manipulación experimental de variables asociadas al cambio global.....	40
2.5 PROCESOS EVALUADOS EN LOS EXPERIMENTOS.....	42

2.5.1	Actividad fotosintética del fitoplancton	42
2.5.2	Crecimiento de poblaciones de fitoplancton	43
2.5.3	Aclimatación	43
2.5.4	Migración vertical.....	43
2.5.5	Cambios en la estructura de la comunidad fitoplanctónica	43
2.6	ANÁLISIS DE DATOS.....	44
2.6.1	Actividad fotosintética	44
2.6.2	Tasas de crecimiento.....	45
2.6.3	Análisis estadísticos.....	45
3	CAPÍTULO 3. Efectos a corto plazo de la RUV y de la temperatura en especies fitoplanctónicas.....	46
3.1	INTRODUCCIÓN.....	47
3.2	MATERIALES Y MÉTODOS	49
3.2.1	Cultivos de microalgas/ sitio de estudio.....	49
3.2.2	Protocolo de muestreo y experimentación	49
3.2.3	Análisis y mediciones	51
3.3	RESULTADOS.....	53
3.3.1	Condiciones de radiación solar.....	53
3.3.2	Experimentos con radiación natural.....	54
3.3.3	Experimentos con radiación artificial	58
3.4	DISCUSIÓN	63
4	CAPÍTULO 4. Efectos de la RUV y de la temperatura a mediano plazo. Mecanismos de fotoprotección	70
4.1	INTRODUCCIÓN.....	71
4.2	MATERIALES Y MÉTODOS	72
4.2.1	Cultivos de microalgas/ sitio de estudio.....	72
4.2.2	Protocolo de muestreo y experimentación	73
4.2.3	Análisis y mediciones	76
4.3	RESULTADOS.....	77
4.3.1	Condiciones de radiación solar.....	77
4.3.2	Efectos de la RUV y temperatura a mediano plazo sobre el PSII.....	79
4.3.3	Mecanismos de fotoprotección.....	87
4.3.4	Mecanismos de evasión: Migración vertical	90
4.4	DISCUSIÓN	93

5	CAPÍTULO 5. Efectos de la RUV a mediano plazo sobre comunidades fitoplanctónicas de la costa Patagónica.....	98
5.1	INTRODUCCIÓN.....	99
5.1.1	Evaluación de los efectos de la RUV a mediano plazo sobre el fitoplancton	100
5.1.2	¿Por qué estudiar los efectos de la RUV sobre las comunidades fitoplanctónicas de la Patagonia?.....	102
5.2	CASO DE ESTUDIO: EFECTOS DE LA RUV SOBRE EL FITOPLANCTON DE BAHÍA ENGAÑO, PATAGONIA, ARGENTINA.....	103
5.3	IMPLICANCIAS ECOLÓGICAS	120
6	CAPÍTULO 6. Respuesta de comunidades planctónicas del Caribe Mexicano a la exposición a radiación ultravioleta y al incremento de temperatura	122
6.1	INTRODUCCIÓN.....	123
6.2	MATERIALES Y MÉTODOS	125
6.2.1	Recolección y manipulación de muestras	125
6.2.2	Experimento de exposición	126
6.2.3	Identificación / cuantificación de especies y estimación de biomasa	126
6.2.4	Mediciones de radiación solar y temperatura	127
6.2.5	Análisis de datos y estadística	127
6.3	RESULTADOS.....	128
6.3.1	Condiciones ambientales.....	128
6.3.2	Crecimiento de las comunidades planctónicas	129
6.3.3	Composición de la comunidad planctónica.....	134
6.4	DISCUSIÓN	141
7	CAPÍTULO 7. Conclusiones Generales.....	147
7.1	PRUEBA DE HIPÓTESIS PLANTEADAS.....	148
7.2	PERSPECTIVAS DE LÍNEAS FUTURAS DE INVESTIGACIÓN.....	150
8	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	152

Índice de Tablas y Figuras

Figura 1.1.	Espectro de la radiación.....	8
Figura 1.2.	Esquema de la capa estratosférica de ozono.....	10
Figura 1.3.	Vista polar del “agujero de ozono”.....	11
Figura 2.1.	Sitios de experimentación y muestreo en la Patagonia.....	32
Figura 2.2.	Ubicación geográfica del sitio de estudio en la Patagonia.....	32
Figura 2.3.	Sitios de experimentación y muestreo en el Caribe Mexicano.....	35
Figura 2.4.	Ubicación geográfica del sitio de estudio en el Caribe Mexicano.....	36
Figura 2.5.	Dispositivo de incubación en condiciones simuladas <i>in situ</i>	39
Figura 2.6.	Simulador solar y espectro de emisión de la lámpara.....	40
Figura 2.7.	Espectros de transmisión de filtros y bolsas.....	41
Figura 2.8.	Tratamientos de intensidad de radiación.....	41
Figura 3.1.	Irradiancias durante experimentos de corto plazo con cultivos.....	54
Figura 3.2.	Respuesta fotosintética bajo exposición a radiación natural.....	56
Figura 3.3.	<i>Non photochemical quenching</i> bajo exposición a radiación natural.....	58
Figura 3.4.	Respuesta fotosintética bajo exposición a radiación artificial.....	60
Figura 3.5.	Tasas de inhibición y de recuperación bajo exposición a radiación.....	62
Figura 4.1.	Arreglo de columnas utilizado en los experimentos de migración vertical...	75
Figura 4.2.	Irradiancias durante experimento de mediano plazo con cultivos.....	78
Figura 4.3.	<i>Yield</i> bajo exposición al 100% de radiación natural.....	80
Figura 4.4.	<i>Yield</i> bajo exposición al 50% de radiación natural.....	82
Figura 4.5.	Diferencia entre el <i>yield</i> de la mañana y del mediodía.....	84
Figura 4.6.	Porcentaje de la inhibición del <i>yield</i> debido a la RUV.....	86
Figura 4.7.	<i>Non photochemical quenching</i>	88
Figura 4.8.	Concentración de MAAs.....	89
Figura 4.9.	Abundancia de células de <i>D. salina</i> a diferentes profundidades.....	91
Figura 4.10.	Abundancia de células de <i>I. galbana</i> a diferentes profundidades.....	92
Figura 5.1.	Ubicación de la Patagonia y del sitio de estudio.....	104
Figura 5.2.	Irradiancias durante experimentos con fitoplancton de la Patagonia.....	106
Figura 5.3.	Crecimiento de las comunidades fitoplanctónicas.....	108
Figura 5.4.	Frecuencia acumulada de tamaños de las comunidades fitoplanctónicas....	112
Figura 5.5.	Biomasa de las clases de tamaño del fitoplancton.....	113
Figura 5.6.	Biomasa de los grupos taxonómicos del fitoplancton.....	115
Figura 5.7.	Contribución relativa de cada grupo taxonómico a la biomasa total.....	116
Figura 5.8.	Contribución relativa de especies de diatomeas frecuentes.....	116
Figura 5.9.	Espectro de absorción y concentración de MAAs.....	118
Figura 5.10.	<i>Yield</i> de las comunidades fitoplanctónicas.....	120
Figura 6.1.	Irradiancias durante experimentos con fitoplancton del Caribe.....	129
Figura 6.2.	Biomasa de los grupos taxonómicos.....	131
Figura 6.3.	Contribución relativa de cada grupo taxonómico a la biomasa total.....	135

Figura 6.4.	Contribución relativa de cada grupo taxonómico a la abundancia celular...	136
Figura 6.5.	Riqueza específica e Índice de Diversidad de Shannon-Weaver.....	137
Figura 6.6.	Riqueza específica y porcentaje de contribución de las diatomeas.....	139
Figura 6.7.	Riqueza específica y porcentaje de contribución de los dinoflagelados.....	140
Figura 6.8.	Riqueza específica y porcentaje de contribución de los flagelados.....	141
Tabla 3.1.	Fotoinhibición por RUV en cultivos expuestos a radiación natural.....	57
Tabla 3.2.	Fotoinhibición por RUV en cultivos expuestos a radiación artificial.....	61
Tabla 3.3.	Resultados de ANOVAs para establecer diferencias en el <i>yield</i>	63
Tabla 4.1.	Irradiancia media al mediodía local durante experimentos de mediano.....	79
Tabla 4.2.	Resultados de ANOVAs para establecer diferencias en el Y_{8h}	81
Tabla 4.3.	Resultados de ANOVAs para establecer diferencias en el $\Delta(Y_{8h}-Y_{13h})$	85
Tabla 4.4.	Resultados de ANOVAs para establecer diferencias en inhibición por RUV.....	87
Tabla 5.1.	Tasas de crecimiento del fitoplancton de la Patagonia.....	107
Tabla 5.2.	Cociente entre carbono y clor <i>a</i> y concentración de clor <i>a</i> por célula.....	110
Tabla 6.1.	Tasas de crecimiento del fitoplancton del Caribe por biomasa.....	132
Tabla 6.2.	Resultados de ANOVAs para establecer diferencias en crecimiento.....	132
Tabla 6.3.	Tasas de crecimiento del fitoplancton del Caribe por abundancia celular...	133
Tabla 6.4.	Resultados de ANOVAs para establecer diferencias en crecimiento.....	133

Abreviaturas

RUV: Radiación ultravioleta

RUV-A: Radiación ultravioleta A

RUV-B: Radiación ultravioleta B

RUV-C: Radiación ultravioleta C

PAR: *Photosynthetic Active Radiation*, radiación visible o fotosintéticamente activa

CFCs: Compuestos clorofluorcarbonados

HCFCs: Compuestos hidrofluorcarbonados

IPCC: Panel Intergubernamental de Cambio Climático

PS: Fotosistema

PSII: Fotosistema II

RUBISCO: 1,5-ribulosa bifosfato carboxilasa

Q₁₀: Coeficiente de temperatura

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ARN: Ácido ribonucleico

CPDs: Dímeros de ciclobutanos y pirimidina

MAAs: Aminoácidos tipo micospolina

Clor *a*: Clorofila *a*

EFPU: Estación de Fotobiología Playa Unión

ELDONET: European Light Dosimeter Network

ICMyL: Instituto de Ciencias del Mar y Limnología

UNAM: Universidad Nacional Autónoma de México

P: Fósforo

C: Carbono

Tratamiento P: Tratamiento de radiación PAR

Tratamiento PA: Tratamiento de radiación PAR + RUV-A

Tratamiento PAB: Tratamiento de radiación PAR + RUV-A + RUV-B

Y: *Yield* o eficiencia fotoquímica efectiva del fotosistema II

Y_P: *Yield* en el tratamiento P

Y_{PA}: *Yield* en el tratamiento PA

Y_{PAB}: *Yield* en el tratamiento PAB

Y_{8h/7h}: *Yield* a la mañana

Y_{13h}: *Yield* al mediodía

Y_{19h}: *Yield* a la tarde

NPQ: *Non-photochemical quenching* o mecanismo de disipación de calor

TSO: Temperatura superficial oceánica

CSM: Capa superficial de mezcla

MI: Microcosmos 1

MII: Microcosmos 2

t₀: Tiempo inicial

t_f: Tiempo final

Y_{t0}: *Yield* al inicio del experimento

DO: Densidad óptica

DIN: Nitrógeno inorgánico disuelto

Resumen

Efecto combinado de la radiación ultravioleta y de la temperatura sobre especies y comunidades fitoplanctónicas. Aproximación a un escenario de cambio climático

Silvana R. Halac

Doctorado en Ciencias Biológicas

Universidad Nacional de Córdoba, 2013

El cambio global ocurre por la acción de las actividades antrópicas sobre algunas variables físicas. La radiación ultravioleta (RUV) es potencialmente dañina para los organismos, mientras que el incremento de la temperatura superficial oceánica, podría causar efectos antagónicos o sinérgicos con la RUV. El objetivo general de esta tesis fue estudiar el efecto combinado de la RUV-temperatura sobre la fotosíntesis y el crecimiento de especies fitoplanctónicas y el impacto de estas variables en la estructura de las comunidades marinas de la Patagonia; a modo comparativo, se realizaron trabajos con comunidades marinas del Caribe. Para lograr este objetivo se realizaron experimentos de corto y mediano plazo bajo radiación solar y/o artificial con cultivos monoespecíficos y con comunidades naturales.

En general, el efecto negativo de la RUV sobre la fotosíntesis se contrarrestó parcialmente por el aumento de la temperatura, aunque existieron diferencias interespecíficas en la tolerancia a la RUV, lo que se relacionó con los mecanismos de fotoprotección. El efecto de la RUV no fue tan evidente en las comunidades de la Patagonia, ya que su composición inicial fue el principal factor que condicionó los cambios en su estructura. Las comunidades del Caribe, en cambio, fueron afectadas negativamente por la combinación RUV-temperatura, especialmente las diatomeas grandes.

Summary

Combined effects of ultraviolet radiation and temperature on species and phytoplankton communities. An approach to a scenario of climate change.

Silvana R. Halac

Doctorado en Ciencias Biológicas

Universidad Nacional de Córdoba, 2013

Global change is the result of the anthropogenic activities on several physical variables. Ultraviolet radiation (UVR), is potentially damaging for organisms while increased sea-surface temperatures, could cause antagonistic or synergistic effects with UVR. The general objective of this thesis was to assess the combined effects of UVR-temperature on photosynthesis and growth of phytoplankton species and their impact on the structure of marine communities of Patagonia; for comparative purposes, some studies with marine communities of the Caribbean were carried out. To achieve the objective, short- and mid-term experiments under solar and/or artificial radiation were carried out with monospecific cultures and natural communities

In general, the negative effect of UVR on photosynthesis was partially counteracted by increased temperatures, although there were interspecific differences in the UVR tolerance, which was related with photoprotective mechanisms. UVR effects were not particularly evident in communities of Patagonia, as their initial composition was the main factor conditioning structural changes. Caribbean communities, however, were negatively affected by the combination of UVR-temperature, especially large diatoms.

CAPÍTULO 1. Introducción

1.1 CONCEPTOS GENERALES

1.1.1 Radiación solar

La radiación solar que llega a la estratósfera contiene una considerable cantidad de radiación de longitudes de onda más cortas, y por lo tanto más energéticas, que la radiación visible o fotosintéticamente activa (PAR, 400-700 nm). La radiación comprendida en el rango de 100-400 nm constituye la región del espectro denominada radiación ultravioleta, (RUV). Las longitudes de onda más cortas (radiación ultravioleta C, RUV-C, 100-280 nm) son absorbidas por completo por el oxígeno (O_2) y el ozono (O_3) estratosféricos, mientras que las longitudes de onda en el rango de 280-315 nm (radiación ultravioleta B, RUV-B) son filtradas eficiente pero no completamente por el O_3 ; finalmente, las comprendidas entre 315-400 nm (radiación ultravioleta A, RUV-A) son bloqueadas muy poco por el O_3 y por lo tanto transmitidas más fácilmente a la superficie terrestre (Fig. 1.1). La intensidad de la radiación solar en cualquier banda del espectro solar puede cuantificarse mediante la irradiancia, que es la magnitud de radiación instantánea incidente en un área y sus unidades son generalmente watts por metro cuadrado ($W.m^{-2}$). La dosis de radiación, por su parte, depende tanto de la intensidad de radiación como de la duración de la exposición y se mide en joules por metro cuadrado ($J.m^{-2}$).

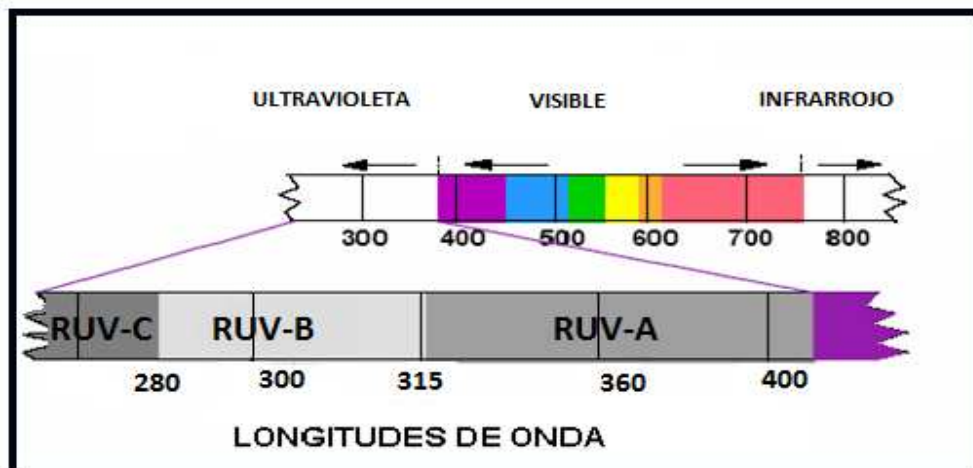


Figura 1.1. Espectro de la radiación solar indicando las longitudes de onda correspondientes a la radiación visible (PAR) y ultravioleta (RUV). En la ampliación se muestran las tres bandas de RUV: RUV-C, RUV-B y RUV-A.

Los niveles de RUV-B que llegan a la superficie terrestre son altamente variables de acuerdo al ángulo cenital y a efectos locales tales como presencia de contaminantes, reflexión y nubosidad. Estos factores producen generalmente una disminución de la transmisión atmosférica de la RUV-B, como así también de otras longitudes de onda (Madronich et al., 1998). Otro factor importante que contribuye a la distribución de la radiación solar en la superficie terrestre es la ubicación geográfica, debido a los efectos asociados con el ángulo cenital (i.e., latitud). Así, las regiones tropicales son aquellas donde se registran las irradiancias solares máximas debido a que en estas latitudes los rayos solares son perpendiculares a la superficie terrestre. Por otro lado, en latitudes medias y altas, la intensidad de la radiación solar es menor debido a que el ángulo cenital en que ésta llega a la superficie terrestre es mayor. Asimismo, las proporciones de las diferentes bandas de radiación solar (por ej. PAR/RUV; RUV-A/RUV-B) varían latitudinalmente no solo debido a cambios en el ángulo cenital (i.e., absorción diferencial en función de la longitud de onda) sino también a la diferente concentración de O₃. El grosor de la capa estratosférica de O₃ aumenta desde los trópicos hacia los polos, resultando en irradiancias menores de RUV-B en los polos en comparación con latitudes menores (Fig. 1.2). Finalmente, existe evidencia que la RUV y la PAR aumentan en aproximadamente un 20 y un 10% respectivamente cada 1000 metros de altura (Blumthaler et al., 1992; Andrade et al., 1998). Por lo tanto, los sistemas acuáticos de montaña se encontrarían expuestos a mayores irradiancias que aquellos ubicados al nivel del mar, en la misma latitud.

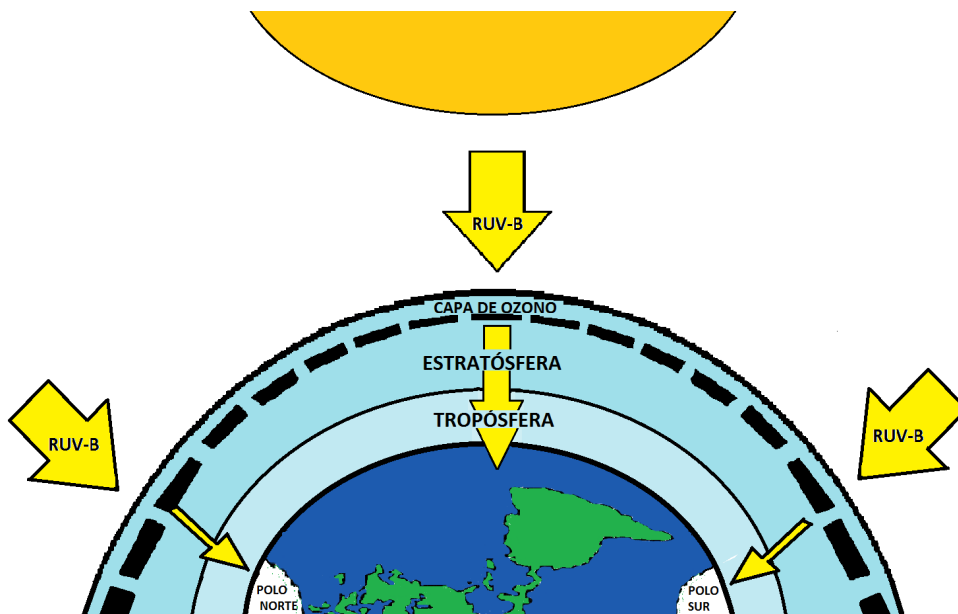


Figura 1.2. Esquema de la capa estratosférica de ozono donde se muestra la variación latitudinal de su grosor y la diferencia en la proporción de RUV-B que llega a la tropósfera entre los polos y el trópico.

1.1.2 Cambio global

El cambio global es un fenómeno complejo que ocurre debido a que algunas variables físicas son influidas por las actividades antrópicas. Una de ellas es la RUV, afectada por la reducción de la capa de O₃ estratosférico debido a la presencia de compuestos clorofluorocarbonados (CFCs), entre otros (ver revisión de Staehelin et al., 2001). En particular, la pérdida de O₃ incrementa la fracción de la RUV más energética y potencialmente dañina para los organismos vivos, la RUV-B. Esta disminución es muy marcada en la Antártida, aunque también ha sido observada en el Ártico y en latitudes medias de ambos hemisferios, por lo que muchos ecosistemas marinos y de agua dulce templados estarían potencialmente expuestos a niveles de RUV-B más altos de los que han recibido históricamente (De Mora et al., 2000; Helbling & Zagarese, 2003; Häder et al., 2003). El “agujero de ozono” sobre la Antártida se hace notorio durante la primavera austral (Septiembre a Noviembre), ya que se encuentra confinado en una estructura atmosférica llamada “vórtice polar” (Fig. 1.3).

OMI Total Ozone for Nov 10, 2011

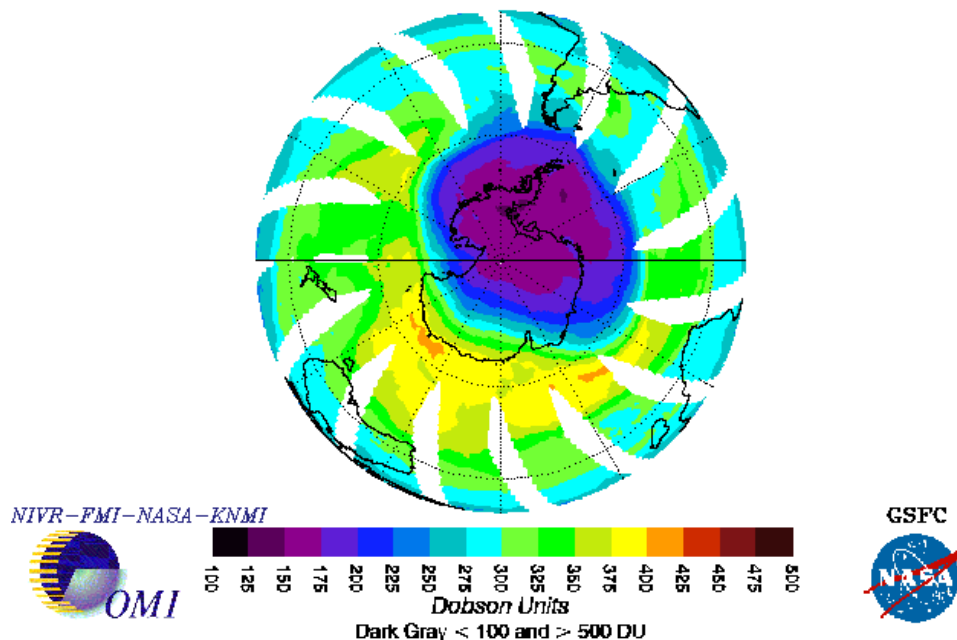


Figura 1.3. Vista polar del “agujero de ozono” para el día 10 de Noviembre de 2011. Se observa la influencia del vórtice polar en el sur de la Patagonia. Datos obtenidos de TOMS (*Goodart Space Flight Center*) (<http://ozoneaq.gsfc.nasa.gov>).

La Región Patagónica está ubicada en el extremo sur de América, y se encuentra relativamente cerca del continente Antártico, por lo que se encuentra ocasionalmente bajo la influencia del vórtice polar, es decir, recibe niveles de RUV-B más elevados en relación al resto del espectro solar durante ciertos períodos (Helbling et al., 2005). En esta región se han establecido varias redes de medición continua de niveles de O_3 e incidencia solar, las cuales han registrado eventos de disminución de O_3 durante los meses de Octubre y Noviembre (Villafañe et al., 2001). Los incrementos de RUV-B asociados a estos eventos han sido demostrados a 300 nm (80% con una reducción de 15% de O_3 ; Bojkov et al., 1995), a 296-297 nm (500% con 65% menos en la concentración de O_3 ; Kirchhoff et al., 1997) o utilizando la razón 305/340 nm (Orce y Helbling, 1997). Este último estudio demostró que aunque el aumento relativo de irradiancia a 305 nm se produce durante el mes de Octubre, los valores de irradiancia absolutos son mayores en verano. Asimismo, Díaz et al. (1994) proponen que la combinación de ángulos cenitales bajos con la disminución de O_3 moderado durante el verano produciría mayor impacto biológico de la

RUV-B que en primavera, cuando la caída de la concentración de O₃ es mucho más pronunciada pero el ángulo cenital es mayor.

Otra de las variables afectadas por el cambio climático es el incremento de la temperatura debido al aumento en la emisión de gases invernadero. El fenómeno de calentamiento global o efecto invernadero ha sido observado en diferentes regiones (Comiso et al., 2008; Velicogna, 2009) y las predicciones hechas por el Panel Intergubernamental de Cambio Climático (IPCC, 2007) indican que la temperatura oceánica incrementaría aproximadamente 3-5 °C hacia el 2100 debido a este proceso. Una de las consecuencias del aumento de la temperatura oceánica sería la mayor estratificación de la columna de agua, no sólo por el efecto de calentamiento directo sino también debido a la fusión de los hielos. En esta condición de mayor estratificación las células también estarían expuestas a mayores niveles de RUV (Behrenfeld et al., 2006). Asimismo, el calentamiento global ha sido reconocido como un factor de incremento potencial del impacto de la RUV en latitudes altas y medias ya que además de producir el calentamiento de la tropósfera, provoca simultáneamente al enfriamiento de la estratósfera, lo que favorecería la destrucción del O₃ (Hartmann et al., 2000). En dicho escenario, las predicciones de recuperación de la capa de ozono, serían retrasadas por aproximadamente dos décadas, lo que prolongaría los efectos de la RUV-B sobre los ecosistemas acuáticos. Por todo lo anterior, el estudio de la interacción entre el calentamiento global y el aumento de la RUV debido a la disminución de O₃ ha despertado especial interés en las últimas décadas y varios autores han destacado la importancia de evaluar el efecto conjunto de la RUV y de la temperatura para predecir la respuesta de los ecosistemas acuáticos en futuros escenarios de cambio climático global (Williamson, 2002; MacFadyen et al., 2004; Sanders et al., 2005).

Otro de los eventos asociados al cambio global debido al aumento del CO₂ atmosférico y la absorción de parte de éste por las aguas superficiales, es la disminución del pH del agua (Caldeira & Wickett, 2005; Doney et al., 2008; Feely et al. 2008). El proceso de acidificación altera los ciclos biogeoquímicos de varios elementos y compuestos; uno de los efectos más conocidos es el descenso del nivel de saturación del carbonato de calcio, CaCO₃ (Orr et al. 2005; Takahashi et al. 2006), lo que afecta especialmente a los organismos calcificadores, desde algunos grupos del plancton a moluscos, equinodermos y

corales. Varios experimentos de laboratorio han demostrado que las tasas de crecimiento de estos organismos disminuye bajo concentraciones de CO₂ elevadas (ver revisión de Doney et al., 2008). Por otro lado, experimentos en mesocosmos demostraron que la disminución del pH del agua causa un incremento en las tasas de fijación de carbono en algunos organismos fotosintéticos (Riebesell et al., 2007); sin embargo el aumento progresivo de dichas tasas depende también de la disponibilidad de nutrientes, de la radiación y de la temperatura (Zondervan 2007). Por lo tanto, la extrapolación de estos resultados a una escala mayor en el océano es complicada: El aumento de la temperatura que acompaña la acidificación oceánica, causa la estratificación de las capas superficiales oceánicas y, por lo tanto, una disminución del ingreso de nutrientes, limitando la productividad y aumento de biomasa del fitoplancton (Behrenfeld et al. 2006).

1.2 EL FITOPLANCTON EN UN ESCENARIO DE CAMBIO GLOBAL

El plancton es un grupo de pequeños organismos acuáticos unicelulares que generalmente se mueven pasivamente en las masas de agua, pero pueden realizar migraciones en la columna de agua ya sea utilizando estructuras específicas (flagelos, cilios) o por cambios de flotabilidad. El fitoplancton es un grupo del plancton que comprende organismos fotosintéticos que, a pesar de representar sólo el 1% de la biomasa fotosintética del planeta, son responsables del 45% de la producción primaria anual (Falkowski et al., 2004). Este grupo incluye especies que están distribuidas en varias Divisiones o Phyla. Entre ellas, se encuentran: las cianobacterias (Cyanophyta) que es el grupo más antiguo, del cual derivaron dos grandes linajes, el de las algas verdes (principalmente Chlorophyta) y el linaje de las algas rojas, del cual provienen gran parte de los Phyla presentes en ambientes oceánicos, entre ellos: Prymnesiophyta, Cryptophyta y Chromophyta, donde se incluyen las clases Bacillariophyceae (diatomeas) y Dinophyceae (dinoflagelados).

El interés del estudio del fitoplancton en un contexto de cambio climático radica en parte a que el plancton en general es un buen indicador del cambio global en los ambientes marinos por diferentes razones: 1.-A diferencia de otros grupos, como peces u organismos bentónicos, hay pocas especies explotadas comercialmente; por lo tanto, cualquier cambio a largo plazo puede ser atribuido al cambio global. 2.- La mayoría de las especies son de corta vida, por lo que el tamaño de la población está menos influido por la persistencia de

individuos de años previos. Lo anterior permite un acoplamiento más cercano entre el cambio de las variables ambientales y la dinámica del plancton. 3.- El plancton puede mostrar cambios radicales en su distribución debido a que al estar flotando, puede responder fácilmente a cambios en la temperatura y en los sistemas de las corrientes marinas, expandiendo o contrayendo su rango de distribución. 4.- Existe evidencia de que el plancton es un indicador más sensible del cambio global que las mismas variables ambientales involucradas, debido a que las respuestas no lineales de las comunidades biológicas pueden amplificar las alteraciones del ambiente. Otro de los puntos de interés sobre este grupo es que la mayor parte del flujo de materia orgánica hacia niveles tróficos superiores depende de estos organismos, por lo que todo cambio potencial en su estado fisiológico y ecológico provocado por el cambio global, tendrá un impacto directo o indirecto sobre el resto de la red trófica. La respuesta del fitoplancton a la combinación de dos o más variables es especie-específica y varía desde interacciones antagónicas, sinérgicas o ausencia de interacción (Thompson et al., 1999; Carvillho et al., 2009). Por lo tanto, el estudio de los efectos interactivos de las variables asociadas al cambio global (e.g., radiación y temperatura) sobre el fitoplancton es de fundamental importancia para poder interpretar y / o eventualmente predecir el impacto del cambio global.

En particular, el fitoplancton en la costa Patagónica representa el sustento de una gran reserva de peces e invertebrados de valor comercial (Caille et al. 1997). El área de estudio seleccionada para el desarrollo de esta Tesis (ver más adelante) - Bahía Engaño-, debido a que se encuentra en la desembocadura del Río Chubut, recibe gran cantidad de nutrientes, por lo cual propicia el desarrollo de estos organismos. Diversas variables tales como la mezcla de la columna de agua (condicionada por la velocidad del viento y la temperatura del agua) y los niveles de irradiancia definen el desarrollo de diferentes grupos de fitoplancton tanto en la bahía de estudio (Villafañe et al., 1991; Barbieri et al., 2002) como en otras áreas de la costa Atlántica (Gayoso, 1999). Asimismo, la ocurrencia de floraciones o “blooms” (rápido incremento de la población de sólo algunas especies, $\sim 1 \times 10^3$ a 1×10^6 de cél mL^{-1}) se encuentra definida por las variables climatológicas mencionadas. Por ejemplo, en el área de estudio, la estación de invierno es el período de “bloom”, propiciado por la estratificación de la columna de agua (vientos leves) y bajas irradiancias, siendo las células de microplancton ($>20\mu\text{m}$) las que dominan (principalmente

diatomeas). Por otro lado, y durante los períodos de “pre-bloom” (verano y otoño) y “post-bloom” (primavera), los fuertes vientos provocan la mezcla de la columna de agua, por lo que la concentración de clorofila *a* (clor *a*) disminuye y la comunidad de fitoplancton se encuentra dominada por pico y nanoplancton (<20 µm), representados principalmente por especies flageladas y diatomeas pequeñas. Asimismo, algunas especies de dinoflagelados, son relativamente abundantes en el período de “pre-bloom” (Villafañe et al., 2004a).

1.2.1 Escalas temporales de respuesta / adaptación-aclimatación

Los organismos planctónicos pueden hacer frente a los cambios de variables ambientales por: 1- Plasticidad fenotípica y fisiológica inherente a cada especie, que no implica cambios genéticos y que confiere tolerancia a las nuevas condiciones (aclimatación, lapsos de tiempo corto: horas/días); 2.- Características genotípicas adquiridas por mecanismos como la mutación y selección (adaptación, lapsos de tiempo largos: semanas/años). Dichos caracteres son especie-específicos y están relacionados con el tipo de hábitat (e.g., especies tropicales adaptadas a altas irradiancias).

En un escenario de cambio global se espera que los efectos biológicos de las variables asociadas a éste sean distintos de acuerdo a la escala temporal considerada. Existen evidencias de que los efectos de la RUV evaluados en lapsos de horas, 1 o 2 días (corto plazo), son diferentes de los resultados obtenidos después de varios días (mediano plazo; Villafañe et al., 1995). Lo anterior se debe a que algunas especies poseen la capacidad de aclimatarse a las condiciones de radiación, lo que resulta en una mejor respuesta después de un lapso de exposición prolongado (días). Como el grado de fotoaclimatación varía según las especies, la sensibilidad especie-específica modulará la respuesta a mediano plazo (Sobrino & Neale, 2007). Asimismo, los efectos de la RUV pueden variar después de varias semanas de exposición (largo plazo; Cabrera et al., 1997). Sin embargo, estos efectos de la RUV a largo plazo se evalúan más frecuentemente en estudios de la interacción entre los componentes de la red trófica (Bothwell et al., 1993, 1994). De manera similar, los estudios de exposición a cambios de temperatura durante lapsos de tiempo cortos y largos, muestran diferentes resultados, siendo menos notorio el efecto del aumento o disminución de la temperatura en células aclimatadas a las

temperaturas de exposición durante varios días que aquellas expuestas a un cambio de temperatura de manera repentina (Sobrino & Neale, 2007).

1.2.2 Efecto de la RUV y de la temperatura a corto plazo sobre el fitoplancton

Diversos estudios realizados con especies fitoplanctónicas han demostrado que uno de los principales efectos a corto plazo de la RUV (tanto normal como aumentada durante eventos de disminución de O₃) es la reducción de las tasas fotosintéticas (Helbling et al., 1992a; Neale et al., 1998a; Banaszak et al., 2001; Villafañe et al., 2003). Este efecto es debido principalmente al daño directo producido por la RUV sobre componentes de los fotosistemas, PS (Heraud & Beardall, 2000; Vincent & Neale, 2000) así como a efectos indirectos, tales como la acumulación de energía de excitación no eficientemente canalizada hacia la ruta fotoquímica. Otra de las vías por las que la RUV afecta negativamente la tasa fotosintética es la disminución en la cantidad y actividad de enzimas que intervienen en la fotosíntesis, la ATP sintetasa (Zhang et al., 1994) y la 1,5-ribulosa bifosfato carboxilasa, RUBISCO (Jordan et al., 1992).

El efecto de la temperatura sobre la fotosíntesis se evalúa a partir del impacto sobre los procesos en los que intervienen enzimas y se estudia por medio de relaciones entre la temperatura y las tasas correspondientes al proceso estudiado. Para describirlas, frecuentemente se utiliza el coeficiente de temperatura Q_{10} , que es el factor por el cual un proceso biológico se incrementa con un aumento de 10°C. Varios trabajos han determinado un Q_{10} cercano a 2 para la mayoría de los procesos biológicos (Alghren, 1987; Davison, 1991). Diversos estudios realizados con especies fitoplanctónicas han reportado que la temperatura es un factor que aumenta la actividad enzimática, por lo que en principio, y dentro de los rangos de termo-tolerancia de cada especie, el aumento de la misma debería promover la reparación de los componentes del PSII (e.g., síntesis de proteína D1). Sin embargo, en rangos de temperatura cercanos al límite de tolerancia especie-específico, el aumento de la temperatura produciría un incremento de las tasas de respiración y daño metabólico (Goldman & Carpenter, 1974). Por otro lado, las temperaturas por debajo del rango óptimo producirían efectos sobre la fotosíntesis que incluyen limitación de las tasas enzimáticas debido a restricciones termodinámicas e inhibición por la acumulación de productos finales (Falk et al., 1996). Por lo anterior, la temperatura tendría un efecto de

incremento de las tasas fotosintéticas hasta un valor óptimo que es especie-específico, después del cual éstas disminuirían (Helbling & Villafañe, 2007).

Con respecto a los efectos conjuntos de la RUV y de la temperatura, Sobrino & Neale (2007) demostraron una menor sensibilidad a la RUV (en términos de fotoinhibición) en la diatomea *Thalassiosira pseudonana* con el aumento de la temperatura, mientras que la disminución de esta variable provocó el efecto contrario; asimismo se determinó que este fenómeno fue principalmente debido a cambios en las tasas de reparación frente a tasas de daño similares. Asimismo, Gao et al. (2008) reportaron que el rendimiento fotoquímico en la cianobacteria *Arthorspira platensis* mejoró debido al aumento de la temperatura, ya que observaron que este parámetro disminuyó a 15°C, mientras que a 30°C se mantuvo relativamente alto, aún bajo el tratamiento de RUV durante 8 h. Por otro lado, Fiorda-Giordanino et al. (2011) concluyeron que el efecto del aumento de la temperatura es especie-específico ya que benefició el rendimiento fotoquímico en las cianobacterias *Anabaena* sp. y *Nostoc* sp., pero no en *Microcystis* sp. ni en *A. platensis*. De manera similar, Roos & Vincent (1998) no encontraron efectos a corto plazo de la temperatura sobre la inhibición de la fotosíntesis producida por la RUV en la cianobacteria antártica *Phormidium murrayi*. Sin embargo, diversos trabajos han encontrado efectos negativos de la RUV más pronunciados con temperaturas altas en especies de dinoflagelados simbioses de ambientes tropicales (Lesser, 1996; Banaszak et al., 2003a) y en cianobacterias de aguas termales (Miller et al., 1998). Por otro lado, Villafañe et al. (2013) reportaron diferentes respuestas sobre la actividad fotoquímica en poblaciones naturales de la costa Patagónica: mientras que el incremento de la temperatura no tuvo un efecto interactivo con la RUV en comunidades fitoplanctónicas correspondientes al “pre-bloom” (verano), durante los períodos de “bloom” (invierno) y “post-bloom” (primavera), la temperatura tuvo un efecto negativo sinérgico con la RUV, incrementando la inhibición del PSII.

1.2.3 Efecto de la RUV y temperatura a mediano plazo sobre fitoplancton

Algunos de los efectos negativos de la RUV a mediano / largo plazo incluyen: daño en el material genético, específicamente el ADN (Boelen et al., 2000; Buma et al., 2001; Helbling et al., 2001a-b; Fafandell et al., 2001), disminución en las tasas de crecimiento y de fotosíntesis (Nilawati et al., 1997; Marcoval et al., 2007), variaciones en el tamaño

celular (Buma et al., 1997) y en la biodiversidad de la comunidad (Mostajir et al., 1999; Davidson & Belbin, 2002; Belzile et al., 2006; Llabrés & Agustí, 2006; Hernando et al., 2006).

La RUV-B causa daño directo sobre la molécula de ADN induciendo la formación de fotoproductos de ADN. La acumulación de ellos puede ser letal para las células debido al bloqueo de la replicación de ADN y de la transcripción del ARN (Pfeifer et al., 1997). Estos efectos inhibitorios de la RUV sobre la replicación y transcripción afectan la división celular y dan como resultado una disminución en el crecimiento celular, pudiendo producir además mutaciones y muerte celular (Britt, 1995). Diversos estudios han demostrado que la exposición del fitoplancton marino a la RUV-B provoca aumento en la concentración de dímeros de pirimidina y ciclobutano - CPDs (Jeffrey et al., 1996; Helbling et al., 2001a-b; Fafandell et al., 2001) e inhibición de síntesis de ADN y proteínas (Lyons et al., 1998). La tasa de acumulación de CPDs es el resultado de la formación de estos fotoproductos y la remoción de los mismos por mecanismos de escisión y de reparación fotodependiente. Por ello la concentración de fotoproductos, es un buen indicador del balance entre daño y reparación de ADN (Jeffrey et al., 1996). Según estudios realizados por Buma et al. (2001) y Boelen et al. (2000), el tamaño celular es un determinante de la sensibilidad diferencial al RUV-B con respecto a la formación de CPDs. Sus trabajos muestran que los valores de dimerización de timinas son significativamente mayores en la fracción $< 2 \mu\text{m}$ que en aquellas $\geq 2 \mu\text{m}$; se cree que ésto se debe principalmente a que la razón superficie/volumen es mayor en células pequeñas, lo que representa una desventaja para éstas en cuanto a la absorción de la RUV.

Con respecto al crecimiento poblacional, las respuestas son variadas: Nilawati et al. (1997) demostraron una reducción del 50% del crecimiento debido a la RUV-B, mientras que la RUV-A no tuvo efectos significativos en el crecimiento de las diatomeas *Pseudonitzschia seriata* y *Nitzschia* sp. Por su parte, Marcoval et al. (2007) observaron un menor crecimiento en las diatomeas *Chaetoceros gracilis* y *Thalassiosira fluviatilis*, y en los dinoflagelados *Prorocentrum micans* y *Heterocapsa triquetra* expuestas a la RUV (RUV-A+RUV-B) en comparación a aquellos cultivos sólo expuestos a RUV-A y PAR durante 7 días. Sin embargo, Halac et al. (1997) reportaron que las especies de diatomeas, crisófitas y dinoflagelados presentes en un lago de alta montaña, no mostraron diferencias

en sus tasas de crecimiento entre los tratamientos con y sin RUV durante un período de 16 días de exposición a radiación natural. Asimismo, diversas especies de diatomeas bentónicas de zonas de marea no mostraron inhibición del crecimiento por RUV (Peletier et al., 1996). La ausencia de efectos significativos de la RUV sobre el crecimiento frecuentemente se asocia a la capacidad de aclimatación de las especies a altas intensidades de este factor de estrés (ver más adelante la sección *Mecanismos de aclimatación del fitoplancton*). Son relativamente pocos los trabajos que reportan una mayor tasa de crecimiento del fitoplancton al ser expuesto a la RUV, y generalmente esto se debe a efectos indirectos e.g., mayor efecto de la RUV sobre predadores (Bothwell et al. 1994; Mostajir et al., 1999). Por su parte, el aumento de la temperatura generalmente incrementa la tasa específica de crecimiento (Goldman & Carpenter, 1974; Montagnes & Franklin, 2001; Berges et al, 2002; Doyle et al., 2005). A pesar de que existe una gran variedad de trabajos sobre el impacto individual de la RUV y de la temperatura sobre microorganismos, los efectos combinados de ambas variables no han sido tan estudiados. En general, la inhibición del crecimiento inducida por la RUV, aumenta linealmente con la disminución de la temperatura. Al respecto, Roos & Vincent (1998) demostraron que la inhibición del crecimiento debida a la RUV en la cianobacteria antártica *Phormidium murrayi* es mayor en temperaturas bajas, lo que coincide con la hipótesis de que el daño celular es independiente de la temperatura, mientras que los procesos de reparación son termo-dependientes. Sin embargo, este estudio también demostró que la especie posee la capacidad de aclimatarse a la RUV. Asimismo, Doyle et al. (2005) reportaron en las diatomeas *Fragilaria crotonensis* y *Asterionella formosa*, el dinoflagelado *Gymnodinium* sp. y la crisófito *Dynobryon* sp. una mayor inhibición del crecimiento a 8°C en comparación a 14°C.

Por otro lado, y respecto a las respuestas fotosintéticas, Sobrino & Neale (2007) demostraron que en la diatomea *Thalassiosira pseudonana* las diferencias en fotoinhibición a mediano plazo (días) fueron mucho menores que las observados en lapsos de tiempo cortos (horas), probablemente debido a mecanismos de aclimatación. Sin embargo, Litchman et al. (2005) no encontraron una disminución de la fotoinhibición causada por la RUV en *Thalassiosira pseudonana* después de 10 días de exposición, mientras que *Cryptomonas* sp. mostró una disminución de la sensibilidad a la RUV en términos de

fotoinhibición. Las diferencias observadas en la respuesta fotosintética a mediano plazo entre especies no sólo se debe a características especie-específicas, sino a procesos de aclimatación, los cuales se ven influidos por las condiciones ambientales. Por ejemplo, el dinoflagelado *Gymnodinium sanguineum* expuesto durante 2 meses a bajas irradiancias mostró una mayor fotoinhibición en comparación a aquellos cultivos aclimatados a intensidades altas de PAR (Neale et al. 1998b). De manera similar, las poblaciones naturales de fitoplancton provenientes de capas profundas de mezcla (en condiciones de baja irradiancia) presentaron tasas fotosintéticas menores que aquellas aclimatadas a altas irradiancias en una columna de agua estratificada (Neale et al. 1998a). Por otro lado, Marcoval et al. (2007) demostraron una mayor aclimatación (estimada como la diferencia entre la eficiencia fotoquímica al mediodía y a tiempo inicial) de los cultivos de las diatomeas *Thalassiosira fluviatilis* y *Chaetoceros gracilis*, y de los dinoflagelados *Heterocapsa triquetra* y *Prorocentrum micans* al final de experimentos de 5-7 días de exposición a radiación solar en comparación con el tiempo inicial. Aunque todas las especies presentaron un grado de inhibición del PSII inducido por la RUV, este efecto disminuyó a lo largo del experimento, siendo este patrón más evidente en los dinoflagelados y en cultivos enriquecidos con macronutrientes. Hasta la fecha no existen muchos estudios de mediano plazo sobre el impacto de la temperatura y la RUV en el rendimiento fotosintético del fitoplancton. Al respecto, Sobrino & Neale (2007) reportaron que los cultivos de *T. pseudonana* aclimatados durante una semana y expuestos a temperaturas bajas (15°C) presentaron mayor inhibición de la fotosíntesis causada por la RUV que aquellos expuestos a temperaturas más altas (20°C). Sin embargo, algunos estudios con comunidades naturales no observaron efectos de la temperatura ni de la RUV sobre el rendimiento fotoquímico durante 8 días de exposición (Lionard et al., 2012).

Es importante destacar que el estudio del impacto conjunto de la temperatura y de la RUV a nivel ecológico implica el análisis de los cambios en las comunidades fitoplanctónicas. Las variaciones a nivel de estructura de tallas y composición taxonómica pueden ser el resultado de la sensibilidad diferencial a la RUV de cada especie (Karentz et al. 1991; Laurion et al., 1998) conjuntamente con la acción de otros factores (Rae et al., 1998; Häder et al., 2003; Williamson y Zagarese, 2003; Llabrés et al., 2006). En este sentido, el aumento de la temperatura es uno de los factores que se ha demostrado que

produce cambios en la composición de comunidades fitoplanctónicas, favoreciendo a las especies r más que a las k estrategias. Las especies de fitoplancton pioneras (r estrategias) son generalmente de pequeño tamaño, tienden a tener ciclos anuales irregulares, son oportunistas y generalistas en sus requerimientos ambientales. En cambio, las especies fitoplanctónicas k estrategias, en general, están adaptadas a condiciones estables, son más grandes, tienden a tener requerimientos más específicos y un hábitat más complejamente definido, por lo que son menos tolerantes a los cambios. Varios autores han reportado que los efectos del incremento de la temperatura afectan más a la estructura de la comunidad fitoplanctónica (composición taxonómica y distribución de tallas) que a la biomasa total. Al respecto, Strecker et al. (2004) observaron que el aumento de la temperatura no afectó a la biomasa total de fitoplancton en un lago de alta montaña, pero sí produjo cambios significativos en la estructura de la comunidad, favoreciendo los fitoflagelados sobre las clorófitas filamentosas de mayor tamaño. Sin embargo, Lewandowska & Sommer (2010) reportaron en su estudio con comunidades fitoplanctónicas del Mar Báltico, que el aumento de la temperatura provoca cambios tanto en la biomasa como en la estructura de la comunidad, aumentando la contribución de células más pequeñas y la disminución de diatomeas grandes hacia el final de los experimentos.

Por su parte, algunos estudios sobre los efectos a mediano plazo de la RUV en comunidades fitoplanctónicas, han demostrado que existe una gran variabilidad de respuestas. En particular, diversos estudios han encontrado que el impacto de la RUV a mediano / largo plazo, es más evidente en la estructura de las comunidades que en el crecimiento o aumento de biomasa, debido a diferencias en la sensibilidad entre las especies fitoplanctónicas (Belzile et al., 2006). Lo anterior se traduce frecuentemente en cambios en la composición taxonómica hacia especies más tolerantes y/o cambios en la distribución de tamaños. Por ejemplo, Villafañe et al. (1995) observaron que el aumento de la biomasa de comunidades de fitoplancton antártico fue muy similar cuando se expusieron a PAR+RUV o sólo a PAR; en cambio, los efectos de la RUV fueron evidentes en la composición taxonómica, aumentando la abundancia de diatomeas y disminuyendo la de flagelados en presencia de RUV. Sin embargo, Mousseau et al. (2000) reportaron un cambio de diatomeas a flagelados desnudos pequeños, que ocurrió más rápido bajo la RUV aumentada que bajo niveles normales de RUV. Por otro lado, algunos estudios encontraron

que el fitoplancton de menor tamaño (nanoplancton, $\leq 20 \mu\text{m}$) es favorecido por la exposición a RUV (Wängberg et al., 1999; 2008).

Con respecto al efecto combinado de la RUV y temperatura sobre el crecimiento de las comunidades fitoplanctónicas, varios autores han demostrado que es positivo, ya que las tasas de crecimiento son mayores a temperaturas más altas bajo RUV (Rae & Vincent, 1998; Doyle et al., 2005). Sin embargo, las respuestas son bastante variables dependiendo del tamaño de las especies y del grupo taxonómico. Por ejemplo, Lionard et al. (2012) concluyen a partir de experimentos en mesocosmos que, en un escenario de cambio global, las diatomeas de mayor tamaño serían más favorecidas que las células pequeñas. Asimismo, Thyssen et al. (2011) reportaron que en comunidades naturales expuestas a tratamientos de radiación y temperatura en mesocosmos, las células $<3\mu\text{m}$ fueron las más afectadas por la RUV y la temperatura, mientras que la mayoría de las células grandes fueron beneficiadas por el efecto combinado de ambas variables. Es obvio, por lo tanto, que los cambios de estructura de las comunidades fitoplanctónicas descriptos podrían resultar en un impacto importante sobre todo el sistema acuático, ya sea por la alteración de la estructura de la red trófica debido a una sensibilidad diferencial a la RUV, o por afectar la distribución del carbono en diferentes biomoléculas, lo que se traduce en cambios en los ciclos del carbono y demás nutrientes en el ecosistema (Mostajir et al. 1999; Sommaruga 2003).

1.2.4 Mecanismos para reducir el estrés causado por la radiación en el fitoplancton

La aclimatación a una condición ambiental es un proceso de ajuste que surge en respuesta a variaciones de los factores ambientales (en el caso de la fotoaclimatación, ajuste según la radiación), ocurre a mediano / largo plazo (días) y es especie-específica (Falkowski & La Roche, 1991). En particular, la aclimatación a la RUV puede incluir la activación de una amplia gama de mecanismos de protección o de disminución de los efectos negativos (reparación), que ayuden al organismo a enfrentar la situación de estrés. Dentro de los mecanismos de protección a la RUV, se encuentra la producción de un grupo de compuestos que absorben en las longitudes de onda de la RUV denominados aminoácidos tipo micosporina – MAAs (Banaszak et al., 2003b; Korbee et al., 2006). El pico máximo de absorción promedio de estos compuestos se encuentra entre los 310-360

nm, por lo que tendrían, potencialmente, la capacidad de bloquear una de las porciones más dañinas de la radiación solar (Banaszak et al., 2003b). Sin embargo, el rol fotoprotector de estos compuestos parece ser muy variable de acuerdo a la especie en estudio (Korbee et al., 2006), por lo que es necesario demostrar en cada caso que la acumulación de éstos tiene como resultado un aumento en la resistencia a la RUV. Al respecto, Lesser (1996) observó que la disminución de la eficiencia fotosintética, del contenido de clor *a* y de la actividad enzimática de RUBISCO provocados por estrés oxidativo después de la exposición a la RUV en el dinoflagelado *Prorocentrum micans* no fue aminorada por la presencia y acumulación de MAAs. Sin embargo, otros estudios han establecido claramente la disminución de la inhibición de la fotosíntesis en especies con alto contenido de MAAs, e.g., el dinoflagelado *Akashiwo sanguinea* que en condiciones de cultivo bajo alta irradiancia, mostró una disminución de la sensibilidad a la RUV en el rango de 320 a 360 nm, mientras que cultivos de la misma especie aclimatados a baja irradiancia y con bajas concentraciones de MAAs fueron altamente sensibles dentro del rango de longitud de onda estudiado (Neale et al., 1998b). Asimismo, el espectro de absorción de estos compuestos correspondió exactamente al espectro de acción biológica en la RUV, sugiriendo que estos filtros proveen protección completa contra las longitudes de onda más dañinas.

Otra de las estrategias de protección contra intensidades altas de radiación solar y observada frecuentemente en diferentes grupos de fitoplancton (e.g., flagelados) es la evasión, que consiste básicamente en la movilidad de las células hacia profundidades donde la irradiancia solar es menor. Estos mecanismos involucran la presencia de flagelos, cilios o control de la flotabilidad. Por medio de fotorreceptores, tales como las rodopsinas (en *Chlamydomonas sp.* y otras especies de clorofitas) y flavinas y pterinas (en *Euglena gracilis*), cuyos picos máximos de absorción son en longitudes cortas de PAR y a 280 nm respectivamente, las células podrían percibir un incremento en la PAR y la RUV, y responder a éstos por medio del movimiento (Richter et al., 2007). Al respecto, diversos estudios han demostrado la migración en la columna de agua de varias especies. Por ejemplo, la diatomea bentónica *Gyrosigma balticum* (Sundbäck et al., 1996), la clorofita *Dunaliella salina* y el dinoflagelado *Gymnodinium chlorophorum* (Richter et al., 2007) mostraron una migración hacia profundidades mayores en condiciones de alta irradiancia. Sin embargo, la respuesta de evasión en esta última especie fue menos pronunciada que la

de *D. salina*, mostrando una distribución más homogénea en la columna de agua, a excepción del mediodía cuando las células de *G. chlorophorum* migraron hacia las capas más profundas. Por otro lado, Richter et al. (2007) también reportaron que *Tetraselmis suecica* mostró un comportamiento diferente durante las exposiciones, acumulándose preferentemente en la superficie, lo que indicaría una mayor tolerancia a la radiación. A partir de lo anterior, se concluye que tanto los efectos de la RUV como los mecanismos de protección activados son especie-específicos.

Las especies fitoplanctónicas también pueden aclimatarse a la RUV incrementando los procesos de corrección del daño o reparación. Se han descrito varios mecanismos de reparación de ADN (Karentz 1994; Buma et al., 2003) y de las proteínas de los complejos fotosintéticos (especialmente la proteína D1; Strid & Anderson, 1994). Algunos mecanismos de reparación son promovidos por longitudes de onda específicas, por ejemplo, aquellas de 360 a 430 nm (longitudes de onda largas de RUV-A, y cortas de PAR) y promueven la fotorreactivación, mecanismo que permite el restablecimiento de las bases de pirimidinas originales en la molécula de ADN. Por lo tanto, la recuperación de los organismos vivos estará condicionada por la proporción entre las diferentes bandas de radiación solar (PAR, RUV-A, RUV-B). Por otro lado, el ciclo de reparación del PSII funciona continuamente bajo radiación y a medida que la irradiancia aumenta, la tasa de reparación se acelera (Präsil et al., 1992). Ya que el grado de fotoinhibición depende del balance entre el fotodaño y la reparación de la proteína D1, los cambios en las condiciones ambientales, tales como la cantidad y calidad de radiación, pueden llevar a un desbalance entre la energía absorbida por la vía fotoquímica y la energía utilizada por el metabolismo. Lo anterior afectaría en mayor proporción al ciclo de reparación de la proteína D1 que a la tasa de degradación de esta proteína (Bouchard et al., 2005a).

1.3 FUNDAMENTACIÓN Y LINEAMIENTOS DE LA TESIS

El cambio global es un hecho incuestionable (IPCC, 2007), produciendo cambios en los niveles de radiación y temperatura (entre otras variables) lo cual ha afectado en mayor o menor grado los organismos y ecosistemas acuáticos (Häder et al., 2011; Winder & Sommer, 2012). Es evidente, por lo tanto, el gran interés que reviste el hecho de evaluar los efectos conjuntos de estas variables en los primeros eslabones de las cadenas tróficas

acuáticas. Si bien los estudios relacionados con el impacto del cambio global en organismos acuáticos han adquirido gran auge en algunas regiones del mundo (e.g., en el mar Báltico, Lewandowska et al., 2012; Klauschies et al., 2012; Engel et al., 2011), la Región Patagónica ha sido relativamente poco estudiada al respecto. Teniendo en cuenta este contexto, esta tesis tiene como Objetivo General *Estudiar el efecto combinado de la radiación ultravioleta (RUV) y la temperatura sobre la fotosíntesis y el crecimiento de especies fitoplanctónicas y evaluar el potencial efecto de estas variables en la estructura y composición de las comunidades fitoplanctónicas presentes en las regiones Patagónica y del Caribe.*

En esta tesis se trabajó en la zona de la costa atlántica ubicada en latitud media - Bahía Engaño, Playa Unión, Chubut, 43.3°S, 65°O. Esta región es particularmente importante no solo por el potencial impacto que el cambio global pueda tener en la productividad acuática, sino también por su interés especial desde el punto de vista fotobiológico: la zona se caracteriza por estar expuesta a dosis relativamente elevadas de RUV durante la primavera-verano (producto de altas irradiancias conjuntamente con muchas horas de luz solar por día) sumado a la presencia de eventos de disminución de ozono estratosférico, con el consecuente incremento de RUV-B durante estos períodos (Villafañe et al., 2001). Más aún, la región está expuesta a diferentes proporciones de RUV/ PAR a lo largo del año, lo cual afecta el balance daño-inhibición /reparación-aclimatación de los organismos. Sumado a esto, y en un escenario de aumento de temperatura superficial del agua, se espera que no solo la fisiología de los organismos resulte afectada, sino también que una mayor estratificación los exponga a mayores niveles de RUV, potenciando los efectos producidos por estas longitudes de onda.

A modo comparativo, en esta tesis se evaluaron algunos aspectos relacionados con los efectos conjuntos de la radiación y de la temperatura en el fitoplancton de una zona tropical, tal como lo es la costa del Caribe Mexicano. El escenario radiación – temperatura en los trópicos es muy diferente al de las latitudes medias: los trópicos reciben irradiancias de RUV más elevadas que las latitudes altas y medias, y las temperaturas superficiales del mar son mucho más altas que en la Región Patagónica. Estas diferencias entre las dos regiones presupone la presencia de distintos mecanismos de respuestas y de adaptación del fitoplancton, especialmente en condiciones de cambio global. Por lo tanto, esta tesis, que

procura evaluar respuestas particulares en especies características y en comunidades naturales, bajo distintas escalas temporales de experimentación, aporta datos de fundamental importancia al momento de entender y eventualmente predecir los impactos de la radiación solar y de la temperatura no solo bajo las condiciones actuales, sino también en un escenario de cambio global.

1.3.1 Objetivos específicos e hipótesis

Los objetivos específicos e hipótesis de trabajo de esta tesis fueron:

1.-Determinar el efecto conjunto de la RUV y de la temperatura en la respuesta fotoquímica a corto plazo (horas) de diversas especies de fitoplancton de la Región Patagónica;

2.-Determinar el efecto conjunto de la RUV y de la temperatura en la respuesta fotoquímica a mediano plazo (días) y posibles mecanismos de adaptación / aclimatación en diversas especies de fitoplancton de la Región Patagónica;

3.- Determinar el efecto de la RUV en la fotosíntesis, el crecimiento y la estructura (diversidad específica, composición taxonómica y distribución de tamaños) de comunidades planctónicas de verano de la Región Patagónica;

4.- Determinar el efecto conjunto de la RUV y la temperatura en el crecimiento y la estructura de las comunidades planctónicas de la región del Caribe Mexicano.

Las hipótesis de trabajo para esta tesis (ver más adelante detalles de su construcción) fueron:

- Hipótesis 1. El aumento de la temperatura disminuye los efectos negativos de la RUV a corto plazo sobre la eficiencia fotoquímica (*yield*) del fotosistema II (PSII) en especies de fitoplancton;
- Hipótesis 2. El aumento de la temperatura disminuye los efectos negativos de la RUV a mediano plazo sobre el *yield*, en especial en las especies menos tolerantes a la RUV. Las especies que tienen mecanismos de fotoprotección, se aclimatan mejor a la radiación y son más tolerantes a la RUV;

- Hipótesis 3. La RUV produce cambios en la composición taxonómica y en la distribución de tamaños de las comunidades planctónicas de la Región Patagónica hacia especies más resistentes y de mayor tamaño;
- Hipótesis 4. La interacción de la temperatura con la RUV afecta el crecimiento de algunas especies, lo que resulta en un cambio en la estructura de las comunidades planctónicas del Caribe, hacia especies de menor tamaño.

1.3.2 Justificación de las hipótesis consideradas en esta Tesis

Diversos trabajos han determinado que el aumento de la RUV-B generalmente resulta perjudicial para el proceso de fotosíntesis, mientras que un aumento de temperatura resulta en un aumento de la actividad enzimática, y por lo tanto el incremento de la misma promueve la reparación de los componentes del PSII (e.g., síntesis de proteína D1). A partir de lo anterior se planteó la primera hipótesis: *El aumento de la temperatura disminuye los efectos negativos de la RUV a corto plazo sobre la eficiencia fotoquímica (yield) del fotosistema II (PSII) en especies de fitoplancton.* Para comprobar esta hipótesis se diseñaron experimentos de exposición a la radiación natural y artificial a corto plazo (horas). Debido a que la respuesta de los organismos a la radiación y temperatura puede variar de acuerdo al lapso de tiempo considerado, ya que los procesos de aclimatación producen un cambio de las respuestas obtenidas en períodos cortos, se consideró necesario hacer estudios a mediano plazo (días). Dentro de los mecanismos de aclimatación, se estudiaron algunos de fotoprotección que aminoran el daño debido a la RUV (e.g., síntesis de MAAs, migración vertical en la columna de agua) y se planteó la segunda hipótesis: *El aumento de la temperatura disminuye los efectos negativos de la RUV a mediano plazo sobre el yield, en especial en las especies menos tolerantes a la RUV. Las especies que tienen mecanismos de fotoprotección, se aclimatan mejor a la radiación y son más tolerantes a la RUV.* Para comprobar esta hipótesis, se realizaron experimentos de exposición a la radiación solar durante varios días con diversas especies fitoplanctónicas y posteriormente experimentos de migración vertical bajo radiación artificial con algunas de estas especies.

Diversos estudios han demostrado que las diferencias de sensibilidad a la RUV son especie-específicas, por lo que, aunque el crecimiento total de una comunidad fitoplanctónica no se afecte, existe una variedad de respuestas de acuerdo a las especies

presentes en ésta y por ende, un cambio en la estructura de la misma. Los cambios en la composición taxonómica y distribución de tamaños en comunidades de fitoplancton expuestas a RUV han sido reportados en varios estudios; mientras que algunos observan un cambio hacia flagelados pequeños, otros demuestran cambios hacia diatomeas de mayor tamaño. Lo anterior puede deberse a que, por un lado, las células de menor tamaño ($\leq 20\mu\text{m}$; nanoplancton) son más resistentes a la RUV que el microplancton ($>20\mu\text{m}$) en términos de fotosíntesis, mientras que los efectos de la RUV sobre el ADN son más pronunciados sobre las células del nanoplancton en comparación al microplancton. Sin embargo, considerando que los compuestos que absorben en la RUV (MAAs) son frecuentes sólo en las células de mayor tamaño, el microplancton tendría mayor capacidad de fotoprotección.

Por otro lado, los estudios acerca de los efectos combinados RUV-temperatura sobre poblaciones naturales de fitoplancton, en general coinciden con que dichas variables en conjunto afectan de diversas maneras el crecimiento y estructura de la comunidad, ya que hay especies cuyos rangos de tolerancia a la temperatura son muy amplios y en otras, acotado (estenotermas). En estas últimas, un aumento de temperatura resultará perjudicial (si están cerca de su límite máximo de tolerancia) y podrá potenciar el efecto negativo de la RUV. De hecho, diversos estudios demuestran cambios en la composición taxonómica y distribución de tamaños en comunidades expuestas a temperatura aumentada, hacia flagelados de menor tamaño, que reemplazan a clorófitas y/o diatomeas de mayor tamaño. Teniendo en cuenta esto, se plantean las siguientes hipótesis de trabajo: La tercera se refiere a: *La RUV produce cambios en la composición taxonómica y en la distribución de tamaños de las comunidades planctónicas de la Región Patagónica hacia especies más resistentes y de mayor tamaño*, y la cuarta establece que: *La interacción de la temperatura con la RUV afecta el crecimiento de algunas especies, lo que resultará en un cambio en la estructura de las comunidades planctónicas del Caribe, hacia especies de menor tamaño*.

1.4 ESTRUCTURA DE LA TESIS

Esta tesis se ha estructurado de la siguiente manera:

El Capítulo 1 es una Introducción General, donde se desarrollan conceptos básicos sobre la radiación solar y el cambio global, así como provee un marco teórico y antecedentes sobre los efectos de algunas variables asociadas a este proceso (radiación y temperatura) en especies y comunidades fitoplanctónicas. En este Capítulo se presentan también la Fundamentación y lineamientos, y los Objetivos e Hipótesis de trabajo de esta tesis.

El Capítulo 2 se refiere a la metodología de trabajo, donde se explica el diseño experimental y se describen los sitios de estudio, los protocolos de muestreo y experimentación, las técnicas de análisis de muestras y medición de parámetros y los análisis estadísticos aplicados.

En el Capítulo 3 se muestran los resultados del estudio sobre los efectos de la RUV y la temperatura a corto plazo en el rendimiento fotoquímico de especies características y comunidades de verano de la Región Patagónica.

El Capítulo 4 está enfocado en el estudio de las estrategias de aclimatación a la radiación y la temperatura de especies fitoplanctónicas de la Región Patagónica en lapsos de mediano plazo (días). En particular se evaluó la presencia de compuestos potencialmente protectores ante un estrés de radiación y la migración vertical como estrategia de evasión ante niveles elevados de radiación solar.

El Capítulo 5 muestra los resultados del estudio de las comunidades fitoplanctónicas de la Región Patagónica características de la temporada de verano. Este estudio tuvo como objetivo evaluar el impacto de la RUV en el crecimiento y la estructura (composición taxonómica y distribución de tamaños) de dichas comunidades. Estos cambios fueron estudiados por medio de dos experimentos consecutivos de una semana de duración.

En el Capítulo 6 se describen los resultados del estudio sobre los efectos de la RUV-temperatura en el crecimiento y la estructura (composición taxonómica, distribución de tamaños, riqueza de especies, diversidad específica) de comunidades planctónicas de la región del Caribe Mexicano. Los cambios en las comunidades fueron estudiados en la estación de verano y durante el lapso de dos semanas.

El Capítulo 7 presenta las Conclusiones de esta tesis.

CAPÍTULO 2. Metodología General

2.1 INTRODUCCIÓN

En este capítulo se describen los sitios de estudio y se explica la metodología experimental general, incluyendo el detalle de los materiales e instrumental específico para la realización de experimentos. Dado que se realizaron estudios tanto con cultivos monoespecíficos como con comunidades marinas, se describen, por un lado, las características y condiciones de aislamiento y crecimiento de los cultivos utilizados, y, por otro, el procedimiento de obtención y mantenimiento de muestras naturales en cada localidad de estudio. Asimismo, y según el objetivo planteado, se realizaron experimentos en distintas escalas temporales, por lo que se detalla el protocolo tanto para los experimentos de corto (horas) como para los de mediano plazo (días). Además se describen los procedimientos de experimentación para las exposiciones con radiación natural y con radiación artificial. Por otro lado, se explica la metodología para la manipulación de las dos variables de estudio condicionadas por el cambio global, radiación y temperatura, por medio del establecimiento de los diferentes tratamientos. Finalmente, se detallan los procesos evaluados durante los experimentos y las técnicas utilizadas en cada caso. La descripción particular del instrumental y materiales usados, la logística específica de trabajo y las técnicas aplicadas en cada experimento puntual y/o sitio de estudio se describen en la sección de Materiales y Métodos de cada capítulo.

2.2 SITIOS DE ESTUDIO

2.2.1 Bahía Engaño, Provincia del Chubut, Argentina

Generalidades. La mayor parte de los experimentos fueron realizados en la Estación de Fotobiología Playa Unión, EFPU (43.3° S; 65° O) ubicada en la villa balnearia de Playa Unión (Fig. 2.1 A), Rawson, Provincia de Chubut (Argentina). Las muestras de agua de mar para los experimentos realizados con comunidades fitoplanctónicas fueron obtenidas de la Bahía Engaño (Fig. 2.1 B), en la estación costera denominada Egi (Fig. 2.2).

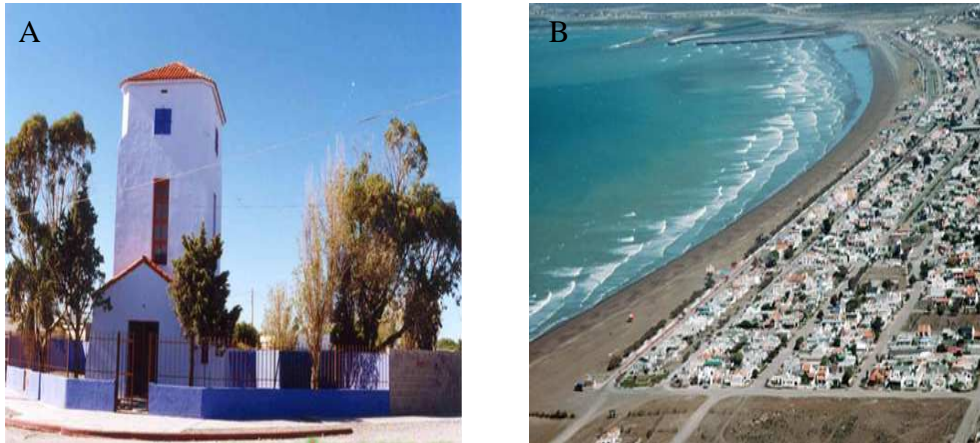


Figura 2.1. A.- Estación de Fotobiología Playa Unión (EFPU) ubicada en la villa balnearia de Playa Unión, Rawson (Chubut, Argentina). B.- Vista de Bahía Engaño desde la costa.

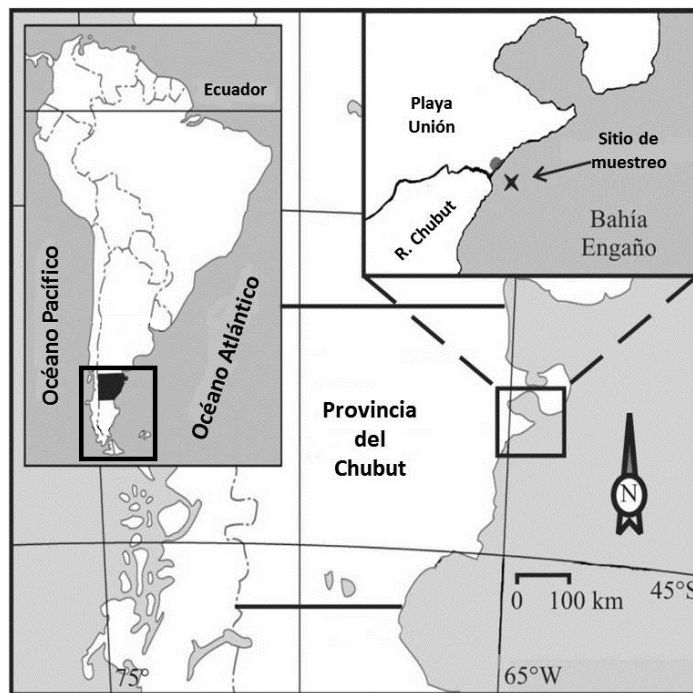


Figura 2.2. Posición relativa de la Región Patagónica (área enmarcada) y de la Provincia del Chubut (área sombreada). La zona de muestreo y localidad donde se realizaron los experimentos (Playa Unión, 43° S, 65° O) se señalan en el recuadro superior derecho.

El río Chubut es el más importante que atraviesa la Provincia de Chubut desde los Andes hasta el Océano Atlántico, y descarga su caudal en el área denominada Bahía Engaño, donde se forma el estuario (Helbling et al., 1992b). Las características físicas y químicas del estuario del río Chubut son altamente variables a lo largo del año: el caudal del río varía desde valores bajos en verano a altos en invierno-primavera, lo que produce

cambios en la estratificación de la columna de agua. Cuando las descargas del río son bajas, la columna de agua se encuentra mezclada, mientras que en períodos de alta descarga, se estratifica por diferencia de salinidad, formando “cuñas salinas” (Helbling et al., 1992b). La concentración de nutrientes es generalmente más alta en el agua de río que en la de mar, por lo que en el estuario se incrementa su disponibilidad en los períodos de descarga, lo que favorece la proliferación de fitoplancton. La composición de este grupo se ve influida por los períodos de estratificación y la concentración de nutrientes, que se combinan y crean las condiciones óptimas para la floración de determinadas especies (Villafañe et al., 1991).

Debido a la gran variabilidad física, química y biológica del área, desde 1999 se lleva a cabo un monitoreo continuo de diversas variables, entre ellas: composición taxonómica del fitoplancton, clor *a*, MAAs, temperatura superficial del agua y conductividad. Cabe mencionar que la estación Egi es uno de los puntos de referencia de la Red Antares, la cual agrupa datos *in situ* de estaciones costeras y datos satelitales (temperatura y clor *a*) de diversos países de América (<http://www.iafe.uba.ar/tele/Antares>). Asimismo, y desde 1999, la EFPU ha pasado a formar parte de la European Light Dosimeter Network (ELDONET), la cual tiene su servidor central localizado en Pisa (Italia) (Häder et al., 2007).

Antecedentes de estudios de fotobiología en la zona de estudio. En Bahía Engaño y áreas costeras vecinas se han realizado diversos estudios sobre la fotobiología de organismos plácticos, entre ellos, de bacterioplancton, de fitoplancton y de zooplancton. Por un lado, los trabajos llevados a cabo con fitoplancton se enfocaron en determinar el impacto de la radiación solar en los procesos fotosintéticos, así como el daño en el material genético (ADN). En general, la inhibición de la fotosíntesis en el fitoplancton es significativa en una pequeña porción de la zona eufótica (1,5 profundidades ópticas), mientras que en la superficie llega aproximadamente a un 40%, siendo la mayor parte de esta inhibición debida a la RUV-A (más del 60%; Helbling et al., 2001a, 2005; Villafañe et al., 2004a, 2008). Sin embargo, estas respuestas varían de acuerdo a las condiciones de mezcla y mareas (Barbieri et al., 2002; Helbling et al., 2010) y de nutrientes (Marcoval et al., 2007). Cuando se realizan estudios a nivel específico, se observa que intervienen diversos mecanismos de fotoprotección, que por estar expresados en mayor o menor medida en cada especie y/o condición, provocan diferentes respuestas (Helbling et al.,

2008; Buma et al., 2009; van de Poll et al., 2010). Con respecto a los efectos sobre el ADN, los estudios realizados con poblaciones naturales de fitoplancton demostraron que la RUV-B produce un daño (formación de CPDs) significativo en aguas superficiales expuestas a niveles de radiación de verano, pero estos efectos negativos son rápidamente reducidos por la atenuación diferencial de la radiación solar (Helbling et al., 2001a, 2005). Asimismo, la composición taxonómica de las comunidades fitoplanctónicas se ve afectada por la RUV (Villafañe et al., 2004a), especialmente cuando se combina con otros factores, e.g.: nutrientes (Marcoval et al., 2008) y temperatura. En relación a esta última, se ha demostrado que las temperaturas elevadas pueden contrarrestar de manera parcial los efectos negativos de la RUV en especies presentes en la región (Helbling et al., 2011; Villafañe et al., 2013). Con respecto al bacterioplancton, Manrique et al. (2012) demostraron que la RUV produce cambios en la composición taxonómica de las comunidades presentes en Bahía Engaño. Por otro lado, los estudios relacionados al zooplancton se han concentrado en los efectos sobre la movilidad de los organismos y en los mecanismos de fotoprotección y fotorreparación (Helbling et al., 2002; Hernández-Moresino et al., 2010, 2011).

2.2.2 Puerto Morelos, Quintana Roo, México

Generalidades. A modo comparativo, se realizaron experimentos en el Instituto de Ciencias del Mar y Limnología (ICMyL), Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) (21°N; 87°O; Fig. 2.3 A) ubicado en la ciudad de Puerto Morelos, Estado de Quintana Roo (México). Los experimentos con comunidades de fitoplancton tropicales fueron realizados con muestras de agua de mar recolectadas en la Laguna Arrecifal de Puerto Morelos (Figs. 2.3B y 2.4), la cual está situada en el NE de la Península de Yucatán y es un sistema abierto con un alto flujo hacia el mar (tiempo de residencia del agua en condiciones normales de oleaje: 3 h; Coronado et al., 2007). Está localizada en el extremo norte de una extensa barrera de corales, que se extiende desde Belize al Canal de Yucatán y tiene una profundidad aproximada de 2-4 metros. Las temperaturas medias varían aproximadamente entre 25 °C en invierno a 29°C en verano y las precipitaciones promedio son de 1060 mm año⁻¹ (Rodríguez-Martínez et al., 2010). Se encuentra compuesta por un basamento de carbonatos, lo que resulta en un sistema con limitación de fósforo y

consecuentemente en aguas oligotróficas (Carruthers et al., 2005), con bajas concentraciones de nitritos ($0.06 \mu\text{M}$), nitratos ($13.9 \mu\text{M}$) y fosfatos ($0.46 \mu\text{M}$) (Merino & Otero, 1991). Asimismo, debido a la porosidad del sustrato, el agua de lluvia se filtra rápidamente a las capas freáticas, lo que resulta en la ausencia de ríos; el agua circula por un sistema de canales y cuevas subterráneos (“cenotes”) que desemboca en las áreas costeras a través de vertientes submarinas (“ojos de agua”). En líneas generales, la bahía se encuentra gobernada principalmente por las condiciones marinas y la salinidad varía poco a lo largo del año (van de Tussenbroek, 2011). Es importante resaltar que en las últimas tres décadas, Puerto Morelos se convirtió en una localidad turística y la ciudad de Cancún, que se encuentra a 40 km al norte, aumentó exponencialmente su desarrollo, lo que representa una fuente importante de ingreso de nutrientes al sistema. El aumento de la disponibilidad de P en la laguna fue observado en la disminución de la proporción C:P (de 731:1 a 564:1) desde 1991 al 2005 en algunos productores primarios (Rodríguez-Martínez et al., 2010).

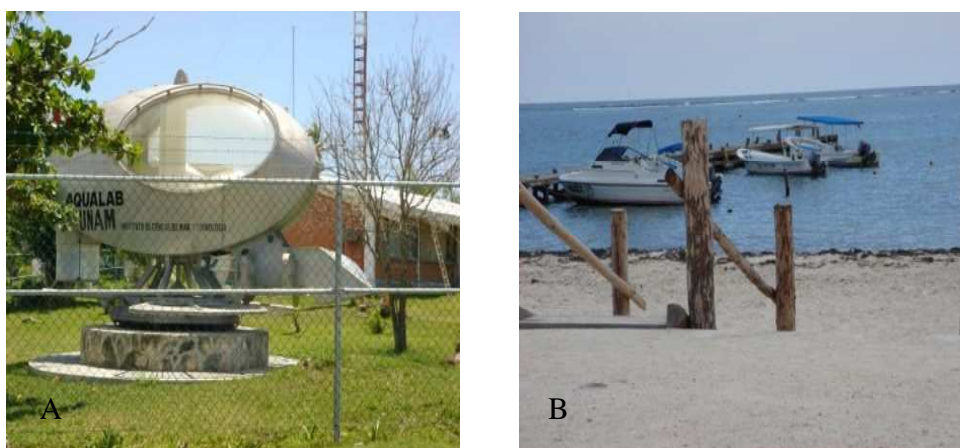


Figura 2.3. A.- Instituto de Ciencias del Mar y Limnología (ICMyL), Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) ubicado en la localidad de Puerto Morelos (Quintana Roo, México). B.- Vista de la Laguna Arrecifal Puerto Morelos desde la costa.

Antecedentes de estudio de fotobiología en la zona. Hasta la fecha no se registran estudios de fotobiología con fitoplancton de la zona, a excepción de aquellos realizados con dinoflagelados simbiotes de corales (Banaszak et al., 2003a; Rodríguez-Román & Iglesias-Prieto, 2005; Rodríguez-Román et al., 2006). Dichos trabajos demuestran que aunque estos organismos se encuentran en general adaptados a altas irradiancias, la

capacidad de aclimatación a diferentes condiciones de radiación y de otras variables como nutrientes y temperatura, son especie-específicas. Asimismo, se han realizado estudios acerca del impacto de la radiación en otros grupos de organismos marinos como pastos marinos (Enríquez et al., 2002; Enríquez & Pantoja-Reyes, 2005; Cayabyab & Enríquez, 2007).

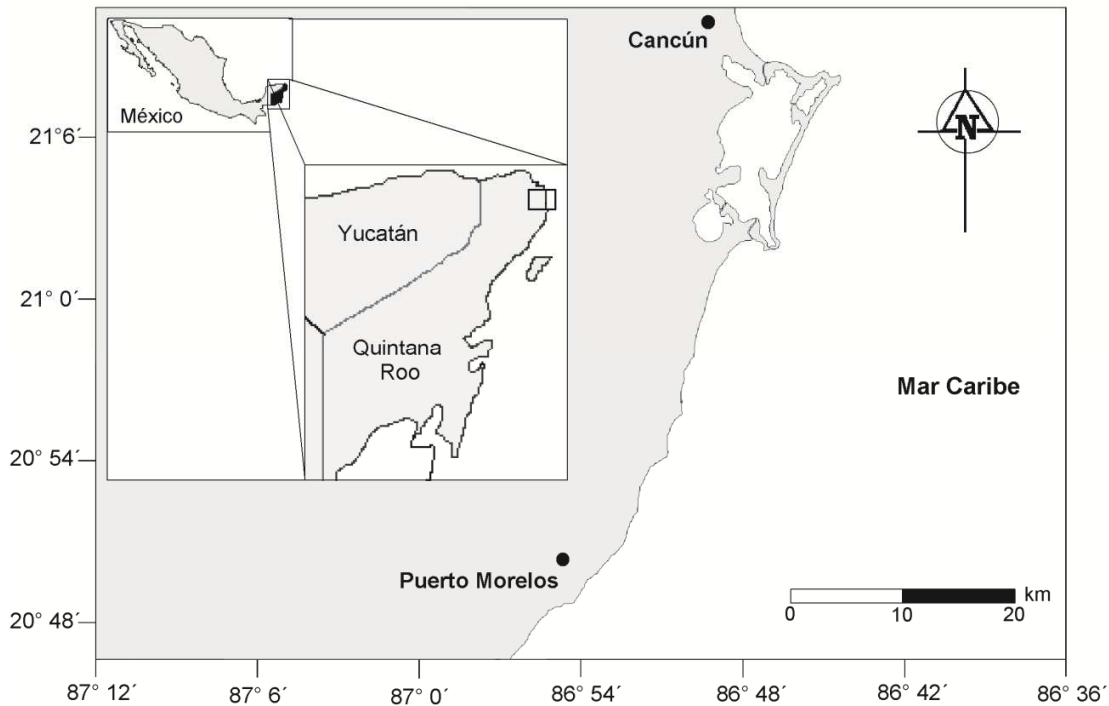


Figura 2.4. Mapa de México con una ampliación del área sombreada que corresponde a la Península de Yucatán (recuadro superior izquierdo). En la Península de Yucatán se indica la posición relativa del Estado de Quintana Roo, donde se encuentra la localidad de estudio (Puerto Morelos, 20° 51' N; 86° 55' O).

2.3 *OBTENCION DE MUESTRAS*

2.3.1 *Comunidades naturales*

Las muestras de agua de mar de Bahía Engaño (Patagonia, Argentina) fueron recolectadas desde una embarcación, aproximadamente a una distancia de 1500 m de la costa. En los trabajos realizados en el Caribe Mexicano el muestreo se realizó desde el extremo de un muelle que se introduce al mar aproximadamente 300 m. En ambos casos, las muestras fueron obtenidas utilizando baldes que se sumergieron aproximadamente a 1 m de la superficie, y se dispusieron en bidones opacos de 80 L de capacidad para su traslado

al laboratorio (en un lapso no mayor que 30 min). Todos los contenedores fueron previamente lavados con HCl 1N.

2.3.2 Cultivos

Los cultivos de microalgas utilizados tanto en los experimentos de corto como de mediano plazo fueron obtenidos de la Colección de Microalgas de la Estación de Fotobiología Playa Unión (EFPU, Argentina). Los cultivos monoespecíficos se obtuvieron a partir del aislamiento de células de las especies de interés provenientes de muestras naturales de la zona. Para aislar las células se colocaron muestras de poblaciones naturales en un portaobjetos, se las observó al microscopio, se recogió cada célula con una micropipeta estéril, y se las colocó en gotas de agua de mar estéril en un disco de Petri (Andersen & Kawachi, 2005). Una vez obtenido un número mínimo de células, se las transfirió a un erlenmeyer con medio f/2 (Guillard & Rhyter, 1962) y se las trasladó a una cámara de incubación con las condiciones de luz y temperatura adecuadas para luego utilizarse en los experimentos.

Las especies utilizadas en los experimentos fueron: *Thalassiosira weissflogii* (Grunow) G. Fryxell & Hasle y *Chaetoceros gracilis* Schütt (Bacillariophyceae), *Prorocentrum micans* Ehrenberg (Dinophyceae), *Dunaliella salina* (Dunal) Teodoresco (Chlorophyceae) e *Isochrysis galbana* Parke (Prymnesiophyceae). Previo a la experimentación, los cultivos se colocaron en erlenmeyers con medio f/2 (Guillard & Ryther, 1962) en dos cámaras de incubación: Sanyo (modelo ML 350) y Minicella (Argentina). Se pre-aclimataron a la temperatura *in situ* y a la aumentada (ver detalles más adelante) durante 2 semanas previas a la experimentación y se mantuvieron a una intensidad de PAR constante ($235 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) con un fotoperíodo 12 luz: 12 oscuridad. La luz fue provista por lámparas fluorescentes (Philips daylight) y las irradiancias medidas con un micro-sensor esférico (Walz GmbH, modelo US-SQS/WB). Todos los cultivos se mantuvieron en fase exponencial de manera semi-continua, es decir agregando medio de cultivo cada 5-7 días, por lo que los experimentos se realizaron siempre con cultivos que se encontraban en fase exponencial de crecimiento. La duración de la fase exponencial se confirmó determinando la concentración de clor *a* inmediatamente después de cada recambio de medio, y posteriormente cada 2 días.

2.4 EXPERIMENTACIÓN

Con el fin de responder al objetivo principal de esta tesis, se realizaron distintos tipos de experimentos, definidos según su duración y nivel de organización estudiado. Los detalles particulares de cada tipo de experimentación se presentan en los respectivos capítulos.

En los trabajos realizados en la Región Patagónica, y para el estudio de los efectos a corto plazo de la RUV y temperatura, se realizaron exposiciones cortas (horas) bajo radiación natural y artificial con cultivos de especies de diferentes grupos de fitoplancton. Los experimentos de corto plazo enfocaron en la evaluación de los efectos de estas variables en el proceso de fotosíntesis. Asimismo, se realizaron experimentos a mediano plazo (varios días de duración), en donde se trabajó tanto con cultivos monoespecíficos como con comunidades naturales de fitoplancton. Los estudios realizados con cultivos estuvieron destinados a evaluar no solo los efectos de la RUV (natural y artificial) / temperatura en la fotosíntesis sino también aspectos relacionados con la aclimatación / adaptación y /o estrategias para disminuir el estrés producido por la radiación. Por su parte, en los trabajos con comunidades naturales se evaluaron los cambios en la fotosíntesis, crecimiento y estructura de comunidades fitoplanctónicas al ser expuestas a la radiación solar. En cuanto a los trabajos realizados en el Caribe Mexicano, éstos fueron de mediano plazo, y estuvieron destinados a evaluar los cambios en el crecimiento y estructura de comunidades fitoplanctónicas al ser expuestas a la radiación solar bajo dos temperaturas experimentales.

Además de considerar distintas escalas temporales de experimentación, se consideraron distintos tipos de incubaciones, las cuales proveyeron de información complementaria: a) Simuladas *in situ*, en incubadores externos (bajo irradiancia solar y temperatura controlada), donde se simularon las condiciones lumínicas de la columna de agua a través del uso de filtros (para simular la calidad y cantidad de radiación, ver más adelante) (Fig. 2.5). Éstas se realizaron tanto en experimentos de mediano como de corto plazo.



Figura 2.5. Incubaciones en condiciones simuladas *in situ*, realizadas en baños térmicos bajo radiación natural y a dos condiciones simuladas de temperatura. Los tratamientos de radiación aplicados fueron PAB (PAR+RUV; 280-700 nm), PA (PAR+RUV-A; 315-700 nm) y P (PAR: 400-700 nm), o PAB y P (ver más adelante en el texto).

b) Incubaciones en laboratorio, en cámaras de cultivo con iluminación artificial y control de temperatura. En este caso se trabaja en condiciones más controladas, independizándose de las variaciones de irradiancia y/o temperatura que existen normalmente entre los distintos días de experimentación. Las muestras se colocaron en contenedores (de distinto tamaño, dependiendo de la duración del experimento y de las variables a considerar) bajo distintos tratamientos de radiación y/o temperatura (ver más adelante) y se expusieron a una irradiancia fija, aunque era posible variar la dosis (variando el tiempo de exposición y la distancia a la fuente de luz). Estos experimentos fueron de corto plazo, y se utilizó como sistema de iluminación artificial un simulador solar Hönle con lámpara de arco de alta potencia (1000 W; Fig. 2.6 A); el espectro de emisión de esta lámpara se muestra en la Fig. 2.6 B.

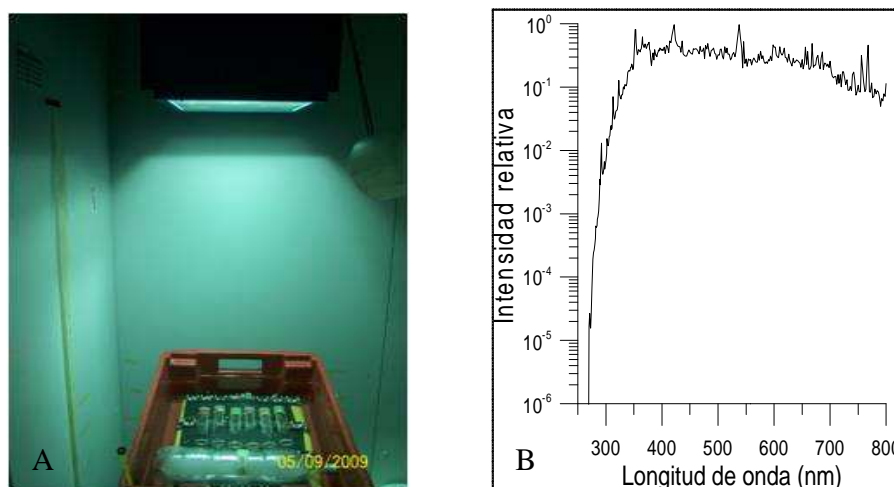


Figura 2.6. A.- Simulador solar utilizado como fuente de radiación artificial. B.- Espectro de emisión de la lámpara Höppler (simulador solar).

2.4.1 Manipulación experimental de variables asociadas al cambio global

En estos experimentos se manipularon dos variables, radiación y temperatura. Los tratamientos aplicados a todas las muestras, ya fueran en trabajos con cultivos monoespecíficos o con poblaciones naturales fueron los siguientes (los detalles y/o variaciones de este esquema general se describen en cada capítulo):

Radiación. Los tratamientos de radiación (tanto natural como artificial) fueron de dos tipos:

- 1) De calidad de radiación, que consistieron básicamente en el bloqueo de ciertas bandas de la radiación ultravioleta (RUV). Los recipientes de experimentación que se usaron fueron de cuarzo, ya sea tubos 50-300 mL (para incubaciones de cultivos a corto y mediano plazo), o contenedores de polietileno transparente a la RUV (microcosmos) con una capacidad de 20-25 L (para incubaciones de poblaciones naturales a mediano plazo). En algunos de los casos los recipientes fueron cubiertos con filtros selectivos para eliminar distintas porciones del espectro solar: En el tratamiento PA (320-700 nm, PAR+RUV-A), cubiertos por filtros que bloquean hasta 320 nm (Montagefolie, No. 10155099, Folex, Dreieich, Germany), y en P (400-700 nm, PAR), cubiertos con filtros

Ultraphan que bloquean hasta 395 nm (UV Opak, Digefra, Munich, Germany) (Fig. 2.7). En el caso del tratamiento PAB (280-315 nm), los recipientes no se cubrieron con filtros.

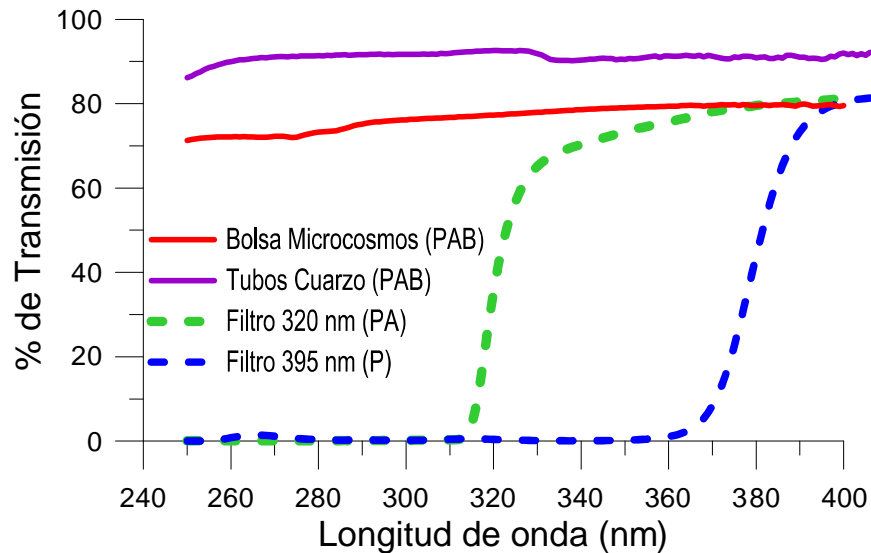


Figura 2.7. Espectros de transmisión de los filtros utilizados para los tratamientos de calidad de radiación: PA (320-700 nm) y P (395-700 nm) y de las bolsas utilizadas para los microcosmos (280-700 nm).

2) De cantidad de radiación, donde se atenuó la radiación natural con filtros neutros (Fig. 2.8) o en el caso de radiación simulada, se manipuló la intensidad de la misma con la distancia de la muestra a la fuente de luz.



Figura 2.8. Tratamientos de intensidad de radiación establecidos con el uso de filtros neutros (50% de radiación) o sin filtros (100% radiación).

Temperatura. Los tratamientos de temperatura implementados en los experimentos fueron:

- a) Temperatura control o *in situ* (promedio de la temperatura superficial costera, TSC, de la zona durante la estación del año correspondiente) y,
- b) Temperatura aumentada: + 4 o 5°C en latitudes medias (estimación para el 2100 en un escenario de cambio climático (Houghton, 2001) y +3°C en el trópico.

En la mayoría de los casos, las temperaturas de aclimatación previa de las muestras o cultivos fue la misma que las de las temperaturas de exposición. Las muestras se aclimataron a las condiciones de temperatura correspondientes durante 15 días previos a los experimentos en dos cámaras de incubación: Minicella (Argentina; temperatura *in situ*) y Sanyo (Japón, Modelo MLR 350, temperatura aumentada). Los tratamientos de temperatura durante las exposiciones a radiación natural de corto y mediano plazo se mantuvieron en dos baños termostáticos, donde la temperatura fue controlada y ajustada automáticamente a las temperaturas *in situ* y aumentada, respectivamente, por medio de un circuito de agua con control termostático (Frío 21, Argentina) el cual funciona con sensores conectados a cada canal de temperatura. Por otro lado, en los experimentos de mediano plazo con poblaciones naturales, la temperatura en los tanques fue medida usando termómetros digitales (frecuencia aproximada de medición: 2 h) (Bahía Engaño) y/o con termógrafos (HOBO, USA) de registro continuo (frecuencia de medición: 15 min), ubicados en el centro de los tanques (Puerto Morelos) y, en ambos casos mantenida por medio de un flujo constante de agua. Durante las exposiciones con radiación artificial, la temperatura se midió con un termómetro de mercurio y su control se favoreció con la realización de los experimentos dentro de una cámara de incubación (Minicella, Argentina) y con la adición de hielo en el tratamiento de temperatura *in situ*.

2.5 PROCESOS EVALUADOS EN LOS EXPERIMENTOS

2.5.1 Actividad fotosintética del fitoplancton

Los efectos de la RUV y temperatura en la fotosíntesis fueron evaluados mediante el análisis de diversos parámetros de fluorescencia de la clor *a* del fotosistema II (PSII). Estas

mediciones se realizaron a partir de muestras provenientes tanto de los experimentos de corto como de mediano plazo.

2.5.2 Crecimiento de poblaciones de fitoplancton

Los efectos en el crecimiento se determinaron en los experimentos de mediano plazo y se estudiaron a partir de la concentración de clor *a*, células y carbono autotrófico. Para ésto, se colectaron muestras con el fin de cuantificar clor *a* por técnicas fluorométricas y espectrofotométricas y/o densidad celular / biomasa por técnicas de microscopía óptica.

2.5.3 Aclimatación

La potencial aclimatación del fitoplancton a lo largo del tiempo se evaluó a través de la determinación de compuestos potencialmente protectores, tanto aquellos que absorben en la región del ultravioleta (e.g., MAAs) como los que absorben en el rango de la radiación visible (e.g., carotenoides). Estos compuestos se determinaron por técnicas espectrofotométricas.

2.5.4 Migración vertical

El mecanismo de evasión de la radiación en la columna de agua por migración fue evaluado por medio del conteo de células por microscopía óptica, a diferentes profundidades de la columna de agua y a diferentes tiempos de exposición en cultivos con y sin exposición previa a radiación natural.

2.5.5 Cambios en la estructura de la comunidad fitoplanctónica

Los cambios en composición taxonómica, distribución de tamaños y diversidad se analizaron a partir de datos de abundancia de células y biomasa. Para ello, se realizó una observación de muestras (conteo y medición de células) por técnicas de microscopía óptica y análisis de imágenes.

2.6 ANÁLISIS DE DATOS

En esta sección se describen los cálculos más comunes realizados en esta tesis, mientras que aquellos específicos, se desarrollan en el capítulo respectivo.

2.6.1 Actividad fotosintética

Con los datos de la eficiencia fotoquímica efectiva o *yield* (Y) obtenidos en los experimentos de corto y mediano plazo, se calculó la disminución del Y en cada intervalo de longitud de onda debido a la RUV, RUV-A y/o RUV-B (e.g., disminución de Y en el tratamiento PAB en relación al control P durante el período de experimentación) tal como se detalla a continuación:

$$\text{Disminución de Y debido a RUV} = (Y_P - Y_{PAB}) / (Y_P) * 100 \quad (1)$$

$$\text{Disminución de Y debido a RUV-B} = [(Y_P - Y_{PAB}) - (Y_P - Y_{PA})] / (Y_P) * 100 \quad (2)$$

$$\text{Disminución de Y debido a RUV-A} = (Y_P - Y_{PA}) / (Y_P) * 100 \quad (3)$$

siendo Y_P , Y_{PA} y Y_{PAB} la eficiencia fotoquímica efectiva para los tratamientos P, PA, y PAB, respectivamente.

De la misma manera se calculó el efecto debido a la temperatura (e.g., aumento de Y en el tratamiento de temperatura aumentada en comparación a temperatura *in situ*) o debido a la atenuación de la radiación (e.g., disminución de Y en el tratamiento 100% de radiación en relación al de 50%).

Además, en los experimentos de mediano plazo se calculó la tasa de cambio del *yield* a la mañana (Y_{8h}) o al mediodía (Y_{13h}) a lo largo de todo el período experimental aplicando un ajuste a una función lineal:

$$Y_{8h} = a + r Y_{8h} * t \quad (4)$$

siendo Y_{8h} el valor del *yield* a la mañana, t el tiempo y $r Y_{8h}$ la tasa de cambio.

$$Y_{13h} = a + r Y_{13h} * t \quad (5)$$

siendo Y_{13h} el valor del *yield* al mediodía, t el tiempo y $r Y_{13h}$ la tasa de cambio.

2.6.2 Tasas de crecimiento

El crecimiento de la comunidad fitoplanctónica y de los principales grupos taxonómicos fue determinado por mediciones de abundancia de células y estimación de carbono orgánico autotrófico. Las tasas de crecimiento fueron calculadas realizando un ajuste a la función exponencial:

$$\mu = \ln(N_2 - N_1) / (t_2 - t_1) \quad (6)$$

siendo $(N_2 - N_1)$ la abundancia de células o contenido de carbono autotrófico durante la fase exponencial y $(t_2 - t_1)$ la duración de esta fase.

2.6.3 Análisis estadísticos

Los tratamientos de radiación se realizaron por duplicado y los resultados fueron expresados como la media y la mitad del rango de las medias (*half mean range*). Con el fin de determinar las diferencias entre los tratamientos de radiación, de temperatura y entre especies en todas las variables de estudio y a lo largo de cada experimento, se aplicó un ANOVA de una vía para mediciones repetidas. Por otro lado, para comparar valores de tasas de crecimiento o de inhibición / recuperación de la actividad fotosintética se utilizó un ANOVA de una vía. Para determinar las interacciones entre radiación y temperatura, se usó un ANOVA de dos vías. En todos los casos se consideró un límite de confianza del 95% (Zar, 1999). Cuando se realizaron ANOVAs con más de dos tratamientos (i.e., PAB, PA y P) se aplicaron pruebas post-hoc con el fin de diferenciar entre qué tratamientos ocurrieron efectos significativos. En el caso que las interacciones entre dos factores fueran significativas, se realizaron gráficos de la variable dependiente y tratamientos de radiación para cada condición de temperatura para determinar si los efectos combinados fueron positivos (sinérgicos) o negativos (antagónicos). La normalidad y homogeneidad de varianzas (homocedasticidad) fue confirmada por medio de un test de Kolmogorov-Smirnov y graficando los residuales, respectivamente. En caso que no se cumplieran estos supuestos, los datos fueron transformados a log.

CAPÍTULO 3. Efectos a corto plazo de la RUV y de la temperatura en especies fitoplanctónicas

Traducción al español del trabajo publicado como:

Halac SR, Villafañe VE, Helbling EW (2010) Temperature benefits the photosynthetic performance of the diatoms *Chaetoceros gracilis* and *Thalassiosira weissflogii* when exposed to UVR. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 101: 196-205.

3.1 INTRODUCCIÓN

El cambio global es un proceso muy complejo que tiene dos resultados principales de origen antrópico i.e., el aumento de gases invernadero con el concomitante aumento de la temperatura, y el incremento de los niveles de la radiación ultravioleta-B (RUV-B, 280-315 nm) debida a eventos de disminución de ozono (Häder et al., 2007). Existe, por lo tanto, un creciente interés en evaluar la magnitud y la dimensión del cambio global sobre los organismos y ecosistemas. Por un lado, la RUV-B aumentada produce estrés en los organismos acuáticos, aunque también se sabe que la radiación ultravioleta (RUV, 280-400 nm), aún en sus niveles normales, puede causar un daño significativo sobre diversos componentes y procesos celulares (Helbling & Zagarese, 2003). Entre los efectos de la RUV que se han reportado para el fitoplancton, se incluyen la reducción en las tasas de crecimiento y de productividad, y daño en la molécula de ADN y proteínas (Buma et al., 2003; Villafañe et al., 2003 y referencias allí citadas). En relación al aumento de la temperatura, diversos estudios han demostrado que produce cambios en la fenología y la biodiversidad (Wrona et al., 2006) así como un efecto positivo sobre la fotosíntesis (Hallegraeff, 2010), tal como se demuestra en un estudio comparativo de curvas Fotosíntesis vs Irradiancia (P versus I) en diferentes taxa de fitoplancton (Hancke et al., 2008).

Aunque existe mucha literatura sobre los efectos de estos dos estresores actuando separadamente sobre el fitoplancton, ha sido difícil determinar el impacto conjunto de ambos, ya que pueden actuar en forma sinérgica o antagónica; más aún, las respuestas parecen tener un alto grado de especie-especificidad. En estudios realizados con cianobacterias antárticas se evaluó la dependencia de la temperatura sobre los efectos de la RUV en la composición pigmentaria, tasas de crecimiento y características fotosintéticas (Roos & Vincent, 1998). Estos autores determinaron que la inhibición del crecimiento inducida por la RUV aumentaba en forma lineal con una reducción de la temperatura, mientras que no había efecto aparente de la temperatura en la magnitud de la inhibición de la fotosíntesis inducida por la RUV. Otros estudios realizados en lagos alpinos (Doyle et al., 2005) determinaron que la RUV reducía las tasas de crecimiento a 6°C en todas las especies estudiadas, cualquiera fueran las condiciones de nutrientes, mientras que a 14°C, no se observaba el efecto negativo de la RUV en ninguna especie si no se agregaban

nutrientes; sólo con el agregado de nutrientes la exposición a la RUV reducía el crecimiento de una diatomea y un dinoflagelado. Finalmente, en investigaciones realizadas en lagos de montaña de USA se encontró que tanto las temperaturas frías, el zooplancton y la RUV tenían efectos negativos en las tasas de aumento de biomasa fitoplanctónica (Williamson et al., 2010). Estos resultados demostraron la importancia tanto de los efectos indirectos como de los directos de los forzantes climáticos tales como RUV y temperatura en la composición de las comunidades fitoplanctónicas de lagos de montaña.

Uno de los principales blancos de la RUV en organismos fitoplanctónicos es el aparato fotosintético (Villafañe et al., 2003). Se sabe que la RUV causa fotoinhibición, i.e., la reducción de las tasas fotosintéticas (Osmond, 1994) debido a daño en los componentes del fotosistema (Vincent & Neale, 2000), particularmente en la proteína D1 del fotosistema II (PSII). La recuperación del daño inducido por la RUV implica la actividad enzimática para degradar el complejo de proteínas dañado del PS, como así también para re-sintetizar los componentes del PS (Bouchard et al., 2006). Dado que la temperatura es un factor clave que aumenta la actividad fotosintética, un incremento en sus niveles podría, en principio, beneficiar a especies que hayan sufrido un daño inducido por la RUV en su aparato fotosintético. De hecho, en un estudio realizado con la diatomea *Thalassiosira pseudonana*, se encontró que la sensibilidad a la RUV (i.e., determinada a través de funciones biológicas de peso para fotoinhibición) era afectada por la temperatura, de manera que aumentaba con una reducción de ésta; sin embargo, y en períodos largos de tiempo, estos efectos fotoinhibitorios eran levemente modificados (i.e., reducidos) debido a procesos de aclimatación (Sobrino & Neale, 2007).

Dada la gran importancia de la Patagonia desde de un contexto fotobiológico i.e., la región normalmente recibe altos niveles de RUV y se encuentra periódicamente bajo la influencia de eventos de reducción de ozono (Helbling et al., 2005) es que se diseñaron experimentos para determinar los efectos combinados de la temperatura y de la RUV en la fotosíntesis de dos diatomeas características del área: *Chaetoceros gracilis* y *Thalassiosira weissflogii*. En particular, se evaluó el rol de la RUV en causar fotoinhibición en estas especies, y se investigó si un potencial incremento en temperatura podría mitigar esos efectos, y, en ese caso, hasta qué punto. El incremento de temperatura que se utilizó en

estos experimentos (+5°C) representa un valor crudo pero realista en un escenario de cambio climático para el año 2100 (Houghton et al., 2001).

3.2 MATERIALES Y MÉTODOS

3.2.1 Cultivos de microalgas/ sitio de estudio

Se utilizaron cultivos de *Thalassiosira weissflogii* (Grunow) G. Fryxell & Hasle y *Chaetoceros gracilis* Schütt (Bacillariophyceae) de la Colección de Cultivos de Microalgas de la Estación de Fotobiología Playa Unión (EFPU, Argentina). Los cultivos fueron mantenidos en erlenmeyers de 1 L con medio f/2 (Guillard & Rhyter, 1962) bajo un fotoperíodo de 12 luz: 12 oscuridad en una cámara de incubación (Sanyo modelo ML 350). Las células fueron pre-aclimatadas a 18°C o 23°C por 2 semanas antes de la experimentación y mantenidas bajo Radiación Fotosintética Activa (PAR, 400-700 nm) ($235 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{ s}^{-1}$). La radiación fue provista por lámparas fluorescentes blancas (Philips daylight) y su intensidad medida con un micro-sensor esférico (Walz GmbH, modelo US-SQS/WB). Los cultivos se utilizaron en los experimentos (tal como se describe más adelante) cuando se encontraron en la fase exponencial de crecimiento. Los experimentos diseñados para determinar los efectos a corto plazo de la radiación solar y artificial en *T. weissflogii* y *C. gracilis* fueron realizados durante el invierno austral (27 de Agosto-7 Septiembre, 2009) en la Estación de Fotobiología Playa Unión, EFPU (43,3° S; 65° O) ubicada en la costa Patagónica de Argentina.

3.2.2 Protocolo de muestreo y experimentación

Los experimentos para evaluar el efecto combinado de la RUV y de la temperatura a corto plazo sobre la fotosíntesis de *T. weissflogii* y *C. gracilis* fueron realizados bajo radiación solar y artificial de la siguiente manera:

(I) *Experimentos bajo radiación solar*: Las muestras se colocaron por duplicado en tubos de cuarzo de 50 mL bajo tres tratamientos de radiación: (a) radiación solar total: RUV + PAR (280-700 nm), tubos sin cubrir, tratamiento PAB; (b) RUV-A + PAR (320-700 nm), tubos cubiertos con filtros que cortan la RUV-B (Montagefolie, N° 10155099, Folex, Dreieich, Alemania), tratamiento PA; y (c) sólo PAR (400-700 nm), tubos cubiertos

con filtros Ultraphan (UV Opak, Digepra, Munich, Alemania), tratamiento P. Los espectros de estos filtros están publicados en Figueroa et al. (1997). Las muestras se colocaron en baños termostáticos (Frío 21, Argentina) con dos circuitos independientes que mantenían la temperatura a 18°C (temperatura *in situ*) y a 23°C (temperatura aumentada). Además, se establecieron dos temperaturas de aclimatación previa, por lo cual se lograron las siguientes combinaciones de pre-aclimatación y exposición: (1) Cultivos pre-aclimatados a 18°C y expuestos a 18°C (18_18); (2) Cultivos pre-aclimatados a 18°C y expuestos a 23°C (18_23); (3) Cultivos pre-aclimatados a 23°C y expuestos a 23°C (23_23). En todos los experimentos, se expusieron las muestras durante 8 h (10 a 18 h, hora local) y se realizaron mediciones de diversos parámetros de fluorescencia de manera continua y alternada entre los distintos tratamientos de radiación (de tal forma que cada muestra fue medida aproximadamente cada 30-35 min). Además, se colectaron sub-muestras para analizar el contenido de clorofila *a* (clor *a*), carotenoides, MAAs y densidad celular al inicio de cada experimento. Todos los experimentos realizados con *C. gracilis* (18_18; 18_23 y 23_23) fueron realizados el 31 de Agosto del 2009, mientras que aquellos con *T. weissflogii* fueron llevados a cabo el 3 de Septiembre (18_18 y 23_23) y el 4 de Septiembre de 2009 (18_23).

(II) *Experimentos bajo radiación artificial*: Las muestras se colocaron por duplicado en tubos de cuarzo de 50 mL bajo tres tratamientos de radiación (como se describió previamente) y se expusieron a tres irradiancias diferentes de PAR y RUV, ajustando la distancia de las muestras al simulador solar (Hönle System Sol 1200, Hönle, Alemania): (1) RUV-B: 0,73 W m⁻², RUV-A: 28,5 W m⁻²; PAR: 375 μmol fotones m⁻² s⁻¹; (2) RUV-B: 1,45 W m⁻², RUV-A: 58,9 W m⁻²; PAR: 698 μmol fotones m⁻² s⁻¹; (3) RUV-B: 2,19 W m⁻², RUV-A: 89,4 W m⁻²; PAR: 1041 μmol fotones m⁻² s⁻¹. Las muestras se expusieron sumergidas en un baño de agua debajo del simulador solar, el cual se encontraba dentro de una cámara (Minicella, Argentina) para el control de la temperatura aunque, cuando fue necesario, se agregó hielo de manera que la temperatura no excedió los 18 o 23°C por más de 1°C (dependiendo el experimento). Las diferentes combinaciones de temperatura de pre-aclimatación y exposición fueron las mismas que las descritas anteriormente. Cada experimento consistió en 1 h de exposición bajo el simulador solar y 1 h de recuperación en luz tenue (30 μmol fotones m⁻² s⁻¹) con mediciones continuas de los parámetros de

fluorescencia durante estos períodos. Además se realizó una medición de recuperación extra, 1 h después de la última medición de recuperación.

3.2.3 Análisis y mediciones

Se realizaron las siguientes mediciones y análisis:

Mediciones de radiación y temperatura. La intensidad de la radiación fue monitoreada de manera continua, usando un radiómetro de banda ancha (ELDONET, Real Time Computer, Möhrendorf, Alemania) que mide RUV-B (280-315 nm), RUV-A (315-400 nm) y PAR (400-700 nm) cada un segundo, promedia los datos por intervalo de minuto y almacena los datos en una computadora. Este instrumento se calibra cada año por un procedimiento de calibración solar y está instalado en forma permanente en el techo de la Estación de Fotobiología Playa Unión. Por su parte, la temperatura del agua dentro de los baños termostáticos se controló por sensores conectados a cada canal de temperatura y fue ajustada automáticamente a lo largo del experimento.

Mediciones de fluorescencia. La eficiencia fotoquímica de separación de cargas del PSII está relacionada con la proporción de centros de reacción fotoquímicamente activos en éste. Este parámetro se determinó midiendo la emisión de la fluorescencia *in vivo* de la clor *a* con un fluorómetro de pulsos de amplitud modulada (Water-ED PAM, Walz, Alemania). La eficiencia fotoquímica de separación de cargas del PSII ($\Delta F/F_m'$ o Y) se calculó usando las ecuaciones de Genty et al. (1989):

$$Y = \Delta F / F'_m = (F'_m - F_t) / F'_m \quad (1)$$

donde F'_m es la máxima intensidad de la fluorescencia de la clor *a* en una célula irradiada e inducida por un pulso de luz de saturación ($\sim 5300 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ en 0,8 s) en presencia de una luz actínica tenue, y F_t es el estado basal de fluorescencia inducida por una luz actínica débil en células adaptadas a luz. El *non-photochemical quenching* (NPQ) de la fluorescencia de la clor *a* es un indicador de la disipación de energía de la luz absorbida en exceso, y es el mecanismo de fotoprotección a corto plazo más importante activado por intensidades de PAR en niveles de saturación. El NPQ se determinó midiendo F_m al

principio del experimento en muestras mantenidas en la oscuridad durante 5 min y F'_m durante el período de exposición, y fue calculado como:

$$NPQ = (F_m - F'_m) / F'_m \quad (2)$$

No se encontraron diferencias significativas entre los valores de NPQ calculados de esta manera y aquellos obtenidos directamente del fluorómetro PAM, por lo que se usaron los datos obtenidos con este instrumento. En todos los casos, las mediciones de la fluorescencia de la clor *a* fueron realizadas 6 veces para cada muestra.

Concentración de células y cuantificación de pigmentos. Se fijaron alícuotas de 10 mL de cada cultivo con formalina neutralizada (concentración final de formaldehído en la muestra = 0.4%) y se contaron en una cámara Neubauer con un microscopio óptico (Zeiss modelo D-7082, Alemania). La concentración de clor *a* y carotenoides se determinó a partir de la filtración de 20-50 mL de muestra en filtros Whatman GF/F (25 mm) y extrayendo los pigmentos fotosintéticos y compuestos que absorben en la RUV (MAAs) en metanol absoluto (Holm-Hansen & Riemann, 1978). La absorbancia fue medida entre 250 y 700 nm usando un espectrofotómetro de barrido (Hewlett Packard, modelo HP 8453E) y el contenido de clor *a* y de carotenoides se calculó usando las ecuaciones de Porra (2002). La concentración de los MAAs fue estimada a partir del pico a 337 nm (Helbling et al., 1996). A pesar de que algunos autores han sugerido que el metanol al 20% es el solvente más eficiente para la extracción de estos compuestos (Tartarotti & Sommaruga, 2002), debido a la limitación del volumen de las muestras y teniendo en cuenta el objetivo de nuestra investigación, consideramos que el procedimiento que aplicamos fue apropiado, aún cuando la cantidad de compuestos que absorben en la RUV pueden haber sido subestimados. Una vez realizado el barrido, el mismo extracto fue utilizado para obtener una medición de clor *a* por métodos fluorométricos (Holm-Hansen et al., 1965).

Análisis de datos y estadística. Los tratamientos de radiación se realizaron por duplicado y los resultados se expresaron como la media y la mitad del rango de las medias (*half mean range*). Con el fin de determinar las diferencias entre los tratamientos de radiación, de temperatura y entre especies, se aplicó un ANOVA de una vía para mediciones repetidas, mientras que se utilizó un ANOVA de dos vías para determinar las interacciones entre la radiación y la temperatura, ambos con un límite de confianza del 95%

(Zar, 1999). La normalidad y homocedasticidad de los datos se confirmaron mediante un test de Kolmogorov-Smirnov y una gráfica de los residuales, respectivamente. Por lo tanto, la transformación de los datos no fue necesaria. Para distinguir los tratamientos significativamente diferentes entre sí se utilizó el test de Newman-Keuls. En el caso de encontrar una interacción significativa entre los dos factores (radiación y temperatura) se realizó una gráfica de inhibición del Y vs. niveles de radiación para cada tratamiento de temperatura, para determinar si el efecto combinado era positivo (sinérgico) o negativo (antagónico) (Dunne, 2010).

La reducción del Y para cada intervalo de longitud de onda (i.e., en los tratamientos PAB y PA en relación al control P) durante el período de incubación se calculó de la siguiente manera:

$$\text{Disminución de Y debido a la RUV-B} = [(Y_P - Y_{PAB}) - (Y_P - Y_{PA})] / (Y_P) * 100 \quad (3)$$

$$\text{Disminución de Y debido a la RUV-A} = (Y_P - Y_{PA}) / (Y_P) * 100 \quad (4)$$

donde Y_P , Y_{PA} y Y_{PAB} son las eficiencias fotoquímicas efectivas para los tratamientos P, PA, y PAB, respectivamente. Para comparar las tasas de inhibición y recuperación bajo los diferentes tratamientos de radiación / temperatura, se calculó la pendiente $\Delta Y / \Delta t$ para cada intervalo (exposición / recuperación) aplicando un ajuste a una función lineal.

3.3 RESULTADOS

3.3.1 Condiciones de radiación solar

Las condiciones de radiación solar durante el período de estudio se muestran en la Fig. 3.1. En general, las condiciones durante los días de experimentación fueron de poca nubosidad, pero algo de ella fue evidente en las mañanas de los días Julianos 245 y 246, y del día 248. Los valores máximos de PAR fueron de $\sim 250 \text{ W m}^{-2}$ (Fig. 3.1A) y similares entre los días que se realizaron experimentos con *C. gracilis* y *T. weissflogii* – días Julianos 246-247. Tanto la RUV-A (Fig. 3.1B) como la RUV-B (Fig. 3.1C) siguieron la misma tendencia que el PAR, con valores máximos de ~ 30 y $\sim 0.55 \text{ W m}^{-2}$ para RUV-A y RUV-B, respectivamente.

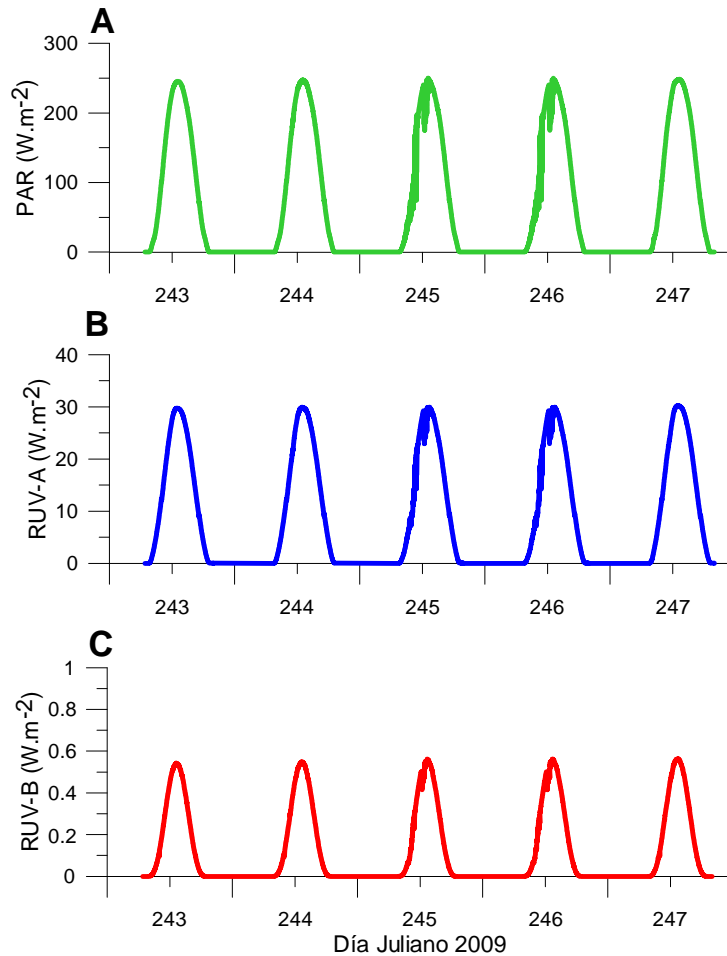


Figura 3.1. Condiciones de radiación durante el período 31 de Agosto-5 de Septiembre, 2009. Los experimentos se llevaron a cabo el 31 de Agosto (día Juliano 243), 3 de Septiembre (día Juliano 246) y 4 de Septiembre, 2009 (día Juliano 247). Irradiancia diaria de: (A) PAR, 400-700 nm; (B) RUV-A, 315-400 nm y; (C) RUV-B, 280-315 nm (en $W m^{-2}$).

3.3.2 Experimentos con radiación natural

Por simplicidad, se presentan solo los datos obtenidos en los tratamientos PAB y P, y los obtenidos bajo PA se presentan en la Tabla 1. Tanto *C. gracilis* como *T. weissflogii* mostraron un claro patrón de inhibición de Y tan pronto como las muestras se expusieron a la radiación solar, en todos los tratamientos de radiación y temperatura (Fig. 3.2). Sin embargo, se produjo una recuperación durante la tarde, aunque en diferente grado según la especie y la combinación de tratamientos de temperatura (Fig. 3.2). *C. gracilis* (Fig. 3.2 A-B) mostró una mayor recuperación que *T. weissflogii* (Fig. 3.2 D-E) al final del experimento.

Durante los ciclos diurnos se observaron efectos debidos a la RUV y a la temperatura. Comparando los tratamientos de temperatura, las células presentaron valores de Y bajo ambos tratamientos de radiación significativamente más altos ($p \leq 0,001$) en las muestras expuestas a 23°C que a 18°C – i.e., ya sea pre-aclimatadas a 18°C y expuestas a 23°C, o pre-aclimatadas y expuestas a 23°C (Fig. 3.2 A-B y D-E y Tabla 3.1). Por otro lado, y para ambas especies, los valores más bajos de Y se observaron en muestras expuestas a 18°C. En relación a los tratamientos de radiación, se observó, en general, que la mayor parte de la inhibición del Y fue debida al PAR (Fig. 3.2 B y E). Sin embargo, la RUV contribuyó a la inhibición en un 37% y 60% en *C. gracilis* y *T. weissflogii*, respectivamente a 18°C, y en menor proporción a 23°C (Fig. 3.2 C y F; Tabla 3.1). La Tabla 3.1 resume los datos de la inhibición media debida a la RUV en *C. gracilis* y *T. weissflogii*. En ambas especies, las muestras expuestas a 18°C fueron aquellas que mostraron mayor inhibición debido a la RUV durante el día (Fig. 3.2 C y F; Tabla 3.1). A 18°C, sin embargo, la inhibición en *T. weissflogii* fue significativamente más alta ($p \leq 0,001$) que en *C. gracilis*. Ambas especies expuestas a 23_23, mostraron menor inhibición que aquellas a 18_18 (i.e., 13%, $p \leq 0,001$ y 15%, $p \leq 0,005$ en *C. gracilis* y *T. weissflogii* respectivamente). Cabe destacar que cuando se compararon las especies entre sí, se observaron algunas respuestas interesantes: El porcentaje de inhibición debido a la RUV en el tratamiento 18_23 en *C. gracilis* (Fig. 3.2 C) fue similar al de 23_23 en *T. weissflogii* (Fig. 3.2 F). Asimismo, el efecto combinado de temperatura y radiación fue significativo para todos los tratamientos en *T. weissflogii*, y sólo para algunos en *C. gracilis* (Tabla 3.3).

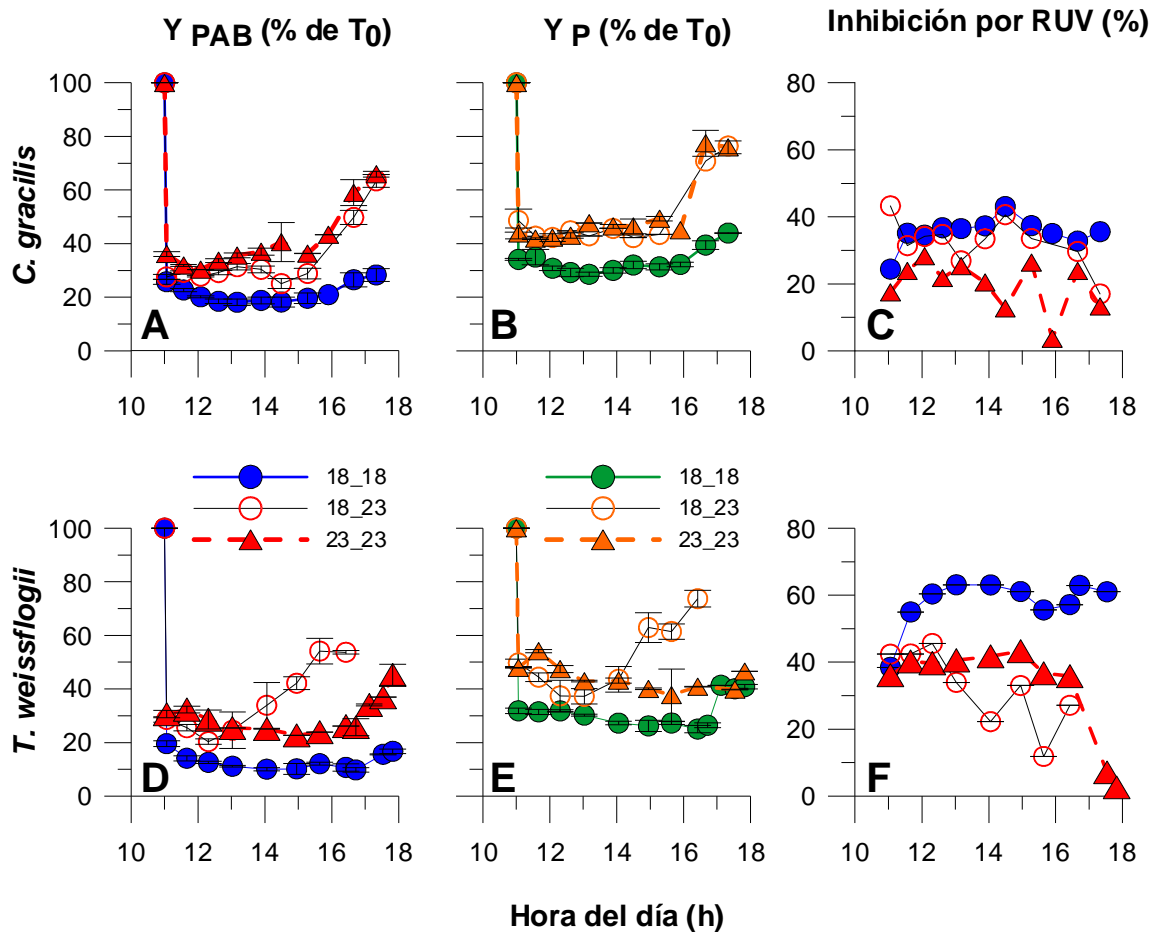


Figura 3.2. Respuestas fotosintéticas de *Chaetoceros gracilis* (A-C) y *Thalassiosira weissflogii* (D-F) en experimentos realizados bajo condiciones de radiación solar. Porcentaje de cambio del yield (Y) relativo al tiempo cero (t_0) en muestras de *Chaetoceros gracilis* expuestas a: (A) PAR+RUV-A+RUV-B (tratamiento PAB) y; (B) solo PAR (tratamiento P). (C) Porcentaje de inhibición debida a la RUV (relativo a muestras bajo el tratamiento P) durante estos ciclos diarios. Porcentaje de cambio del yield (Y) relativo al tiempo cero (t_0) en muestras de *Thalassiosira weissflogii* expuestas a: (D) PAR+RUV-A+RUV-B (tratamiento PAB) y; (E) solo PAR (tratamiento P). (F) Porcentaje de inhibición debida a la RUV (relativo a muestras bajo el tratamiento P) durante estos ciclos diarios. Los símbolos indican los diferentes tratamientos de temperatura: 18_18 (círculos azules y verdes), 18_23 (círculos blancos) y 23_23 (triángulos rojos y naranjas). Las líneas verticales sobre los símbolos indican la mitad del rango de las medias (*half mean range*).

Tabla 3.1. Promedio máximo (\pm la mitad del rango de las medias) de la fotoinhibición inducida por la RUV-A y la RUV-B (como porcentaje relativo al tratamiento P) de las muestras expuestas a radiación solar bajo los diferentes tratamientos de temperatura (18_18; 18_23 y 23_23). La inhibición media se calculó en el período entre 12-15 h. La explicación se presenta en el texto.

Tratamientos de temperatura	Radiación natural			
	<i>Chaetoceros gracilis</i>		<i>Thalassiosira weissflogii</i>	
	Inhibición por RUV-A	Inhibición por RUV-B	Inhibición por RUV-A	Inhibición por RUV-B
18_18	29,8 \pm 3,7	7,4 \pm 4,0	46,1 \pm 5,4	13,6 \pm 3,2
18_23	25,7 \pm 5,8	7,8 \pm 3,9	34,4 \pm 4,8	5,3 \pm 4,5
23_23	15,9 \pm 3,9	7,7 \pm 3,8	36,7 \pm 6,6	7,5 \pm 3,9

Con el fin de evaluar los potenciales mecanismos de fotoprotección en *C. gracilis* y *T. weissflogii* contra el estrés producido por la radiación solar, se estudió la respuesta del *non-photochemical quenching* (NPQ) a lo largo de los ciclos diurnos (Fig. 3.3). Cuando se comparó la respuesta de ambas especies, se observaron valores de NPQ significativamente más altos en *C. gracilis* (Fig. 3.3 A-B) que en *T. weissflogii* (Fig. 3.3 C y D). En general, los valores más altos de NPQ en *C. gracilis* se observaron en 18_23 para ambos tratamientos de radiación, mientras que los más bajos se encontraron en 18_18 (Fig. 3.3 A-B). Aunque los valores de NPQ en *T. weissflogii* fueron significativamente más bajos que en *C. gracilis* (Fig. 3.3 C-D), se observaron algunas diferencias entre los tratamientos de temperatura, con valores de NPQ más altos en las muestras bajo el tratamiento 23_23 (Fig. 3.3 C-D).

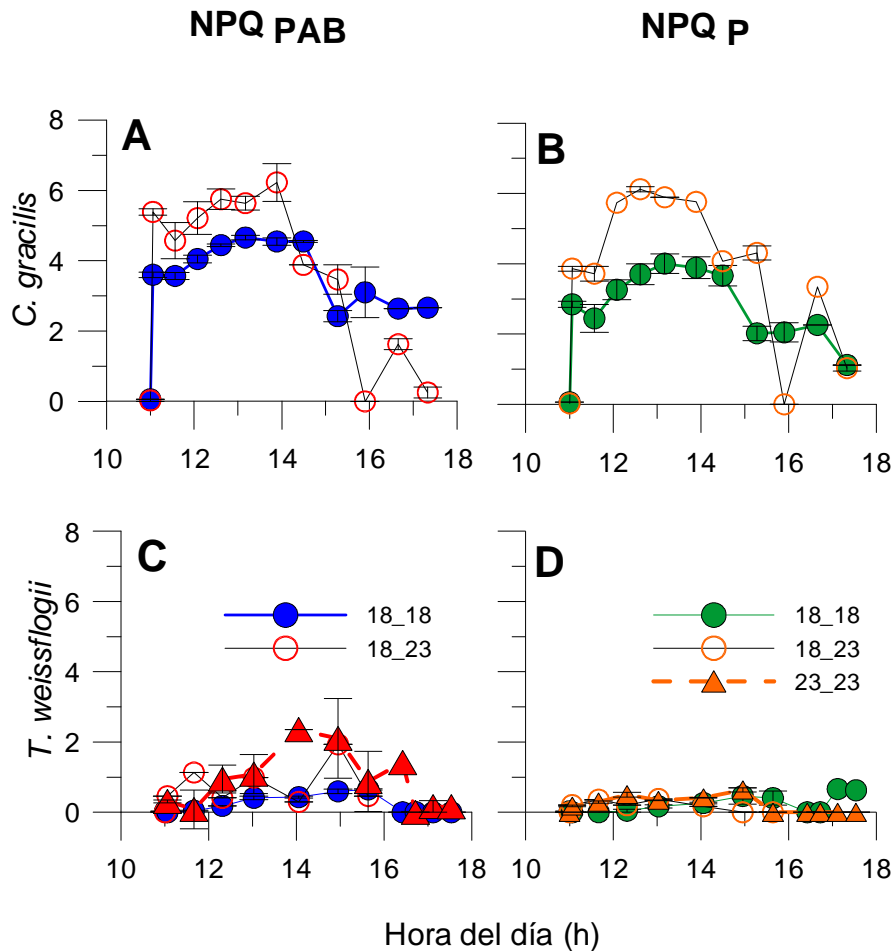


Figura 3.3. *Non photochemical quenching* (NPQ) del PSII a lo largo de exposiciones bajo radiación solar en: (A) Muestras de *Chaetoceros gracilis* expuestas a la radiación solar total (tratamiento PAB); (B) Muestras de *Chaetoceros gracilis* expuestas a solo PAR (tratamiento P). No se disponen datos para el tratamiento 23_23; (C) Muestras de *Thalassiosira weissflogii* expuestas a la radiación solar total (tratamiento PAB); (D) Muestras de *Thalassiosira weissflogii* expuestas a solo PAR (tratamiento P). Los símbolos indican los diferentes tratamientos de temperatura: 18_18 (círculos azules y verdes), 18_23 (círculos blancos) y 23_23 (triángulos rojos y naranjas). Las líneas verticales sobre los símbolos indican la mitad del rango de las medias (*half mean range*).

3.3.3 Experimentos con radiación artificial

Con la finalidad de estudiar en más detalle la inhibición y recuperación del Y en *C. gracilis* y *T. weissflogii* en condiciones de irradiancias crecientes (i.e., comparados con condiciones de radiación natural), se diseñaron varios experimentos bajo un simulador solar. Como datos representativos de los experimentos realizados, en la Fig. 3.4 se presentan los resultados obtenidos en condiciones intermedias de irradiancia: RUV-B=1,45 W m⁻², RUV-A=58,9 W m⁻² y PAR= 152 W m⁻² (698 μ mol fotones m⁻² s⁻¹). De manera

similar a los experimentos realizados con radiación natural, se identificó un claro patrón de inhibición y de recuperación una vez eliminado el estrés (Fig. 3.4 A-B y D-E). Sin embargo, se observaron respuestas diferentes en *C. gracilis* y *T. weissflogii*. En *C. gracilis*, los valores de Y más altos durante la exposición se determinaron en el tratamiento 23_23, mientras que los más bajos se encontraron bajo el 18_18 (Fig. 3.4 A). Sin embargo, durante la recuperación, los valores de Y en 18_23 fueron significativamente más altos que en los demás tratamientos de temperatura. En las exposiciones sólo con PAR (Fig. 3.4 B) los valores en el tratamiento 18_23 fueron significativamente más altos durante todo el experimento, tanto en la etapa de inhibición como en la de recuperación. Después de una hora de recuperación, *C. gracilis* alcanzó un 90% del valor inicial del Y en el tratamiento PAB, mientras que cuando fue expuesta sólo a PAR llegó al 100%. En *T. weissflogii*, en cambio, se obtuvieron valores de Y mucho más bajos en el tratamiento PAB (Fig. 3.4 D) que en el P (Fig. 3.4-E). Dentro de cualquier tratamiento de radiación, los valores de Y más altos fueron registrados en el tratamiento 23_23 y los más bajos en las muestras expuestas a 18°C. *T. weissflogii* tuvo una recuperación menor que *C. gracilis* durante la primera hora y alcanzó ~ 60% y ~ 80% en el tratamiento PAB (Fig. 3.4 D) y P (Fig. 3.4 E) respectivamente, alcanzando el valor de Y inicial a las dos horas de recuperación. La contribución de la RUV a la inhibición del Y durante los experimentos se observa en las Figs. 3.4 C y F: en *C. gracilis* (Fig. 3.4 C) la inhibición más baja debida a la RUV fue observada en el tratamiento 23_23, mientras que la más alta en el 18_23. En *T. weissflogii* (Fig. 3.4 F) la inhibición más alta (hasta de 65%) fue determinada en el tratamiento 18_18 mientras que la más baja en el 23_23. La Tabla 3.2 muestra la principal contribución de la RUV-A y RUV-B en inducir inhibición en *C. gracilis* y *T. weissflogii* durante estos experimentos con radiación artificial, siendo la RUV-A la fracción de la RUV que contribuyó en mayor medida a la inhibición. En particular, para *C. gracilis*, la inhibición más alta inducida por RUV-A se encontró generalmente en el tratamiento 18_18, con una tendencia de aumento con la irradiancia. En líneas generales, los valores de inhibición más altos (61, 35% y 28, 45% para RUV-A y RUV-B respectivamente) fueron determinados en el tratamiento 18_18 cuando las muestras fueron expuestas a irradiancias de RUV y PAR de 315 W.m⁻². De manera similar, *T. weissflogii* presentó los valores de inhibición más altos inducidos por la RUV-A (i.e., 80%) en el tratamiento 18_18 bajo las irradiancias más

altas usadas en los experimentos, aunque se registraron valores altos de inhibición (~74%) en el tratamiento 23_23. Finalmente, la inhibición inducida por la RUV-B llegó a los valores más altos en el tratamiento 18_18 (~20%) bajo las irradiancias más altas aplicadas en estos experimentos.

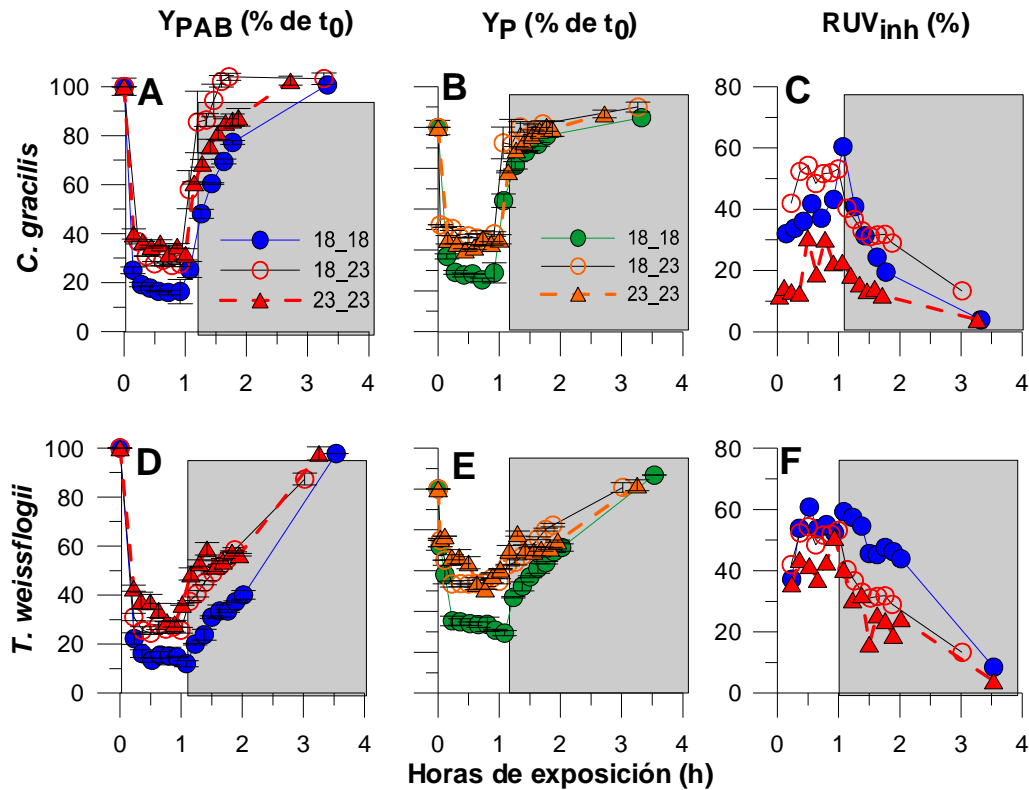


Figura 3.4. Respuestas fotosintéticas de *Chaetoceros gracilis* (A-C) y *Thalassiosira weissflogii* (D-F) en experimentos llevados a cabo bajo condiciones de radiación artificial (RUV-B: $1,45 \text{ W m}^{-2}$, RUV-A: $58,9 \text{ W m}^{-2}$, PAR: $698 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{ s}^{-1}$). Porcentaje de cambio del yield (Y) relativo al tiempo cero (t_0) en muestras de *Chaetoceros gracilis* expuestas a: (A) PAR+RUV-A+RUV-B (tratamiento PAB) y; (B) solo PAR (tratamiento P). (C) Porcentaje de inhibición debida a la RUV (relativos a muestras bajo el tratamiento P) durante estos ciclos diarios. Porcentaje de cambio del yield (Y) relativo al tiempo cero (t_0) en muestras de *Thalassiosira weissflogii* expuestas a: (D) PAR+RUV-A+RUV-B (tratamiento PAB) y; (E) solo PAR (tratamiento P). (F) Porcentaje de inhibición debida a la RUV (relativos a muestras bajo el tratamiento P) durante estos ciclos diarios. Los símbolos indican los diferentes tratamientos de temperatura: 18_18 (círculos azules y verdes), 18_23 (círculos blancos) y 23_23 (triángulos rojos y naranjas). Las líneas verticales sobre los símbolos indican la mitad del rango de las medias (*half mean range*). Las áreas blancas y grises indican los períodos de exposición y recuperación, respectivamente.

Tabla 3.2. Promedio máximo (\pm la mitad del rango de las medias) de la inhibición (como porcentaje relativo al tratamiento P) de las muestras expuestas a tres intensidades de radiación artificial bajo diferentes tratamientos de temperatura (i.e., 18_18; 18_23 y 23_23). Explicación completa en el texto.

		Radiación artificial			
		<i>Chaetoceros gracilis</i>		<i>Thalassiosira weissflogii</i>	
Tratamientos de temperatura	Irradiancias	Inhibición por RUV-A	Inhibición por RUV-B	Inhibición por RUV-A	Inhibición por RUV-B
18_18	110 W m ⁻²	24,7 \pm 5,7	13,4 \pm 2,9	49,3 \pm 3,8	10,0 \pm 2,2
	210 W m ⁻²	36,5 \pm 3,0	6,9 \pm 3,9	53,2 \pm 7,7	7,2 \pm 4,1
	315 W m ⁻²	34,5 \pm 5,7	6,5 \pm 2,6	73,8 \pm 4,0	15,1 \pm 4,7
18_23	110 W m ⁻²	30,4 \pm 4,9	3,4 \pm 2,6	40,6 \pm 3,7	10,0 \pm 2,9
	210 W m ⁻²	31,9 \pm 4,3	7,6 \pm 2,9	50,5 \pm 4,2	7,1 \pm 3,5
23_23	110 W m ⁻²	21,0 \pm 1,8	5,8 \pm 1,8	32,2 \pm 6,4	7,0 \pm 4,9
	210 W m ⁻²	14,4 \pm 2,1	0	41,7 \pm 4,9	8,0 \pm 5,5
	315 W m ⁻²	21,6 \pm 3,9	0	55,4 \pm 18,0	0

La dinámica fotoquímica de *C. gracilis* y *T. weissflogii* expuestas a diferentes irradiancias y temperaturas se presenta en la Fig. 4.5. Por simplicidad, se muestran las tasas de inhibición y de recuperación en función a la irradiancia para los tratamientos PAB y P. Cuando se analizaron las tasas de inhibición y recuperación para las especies de estudio, se extrajeron dos conclusiones principales: una es que las tasas de inhibición se incrementan con el aumento de la irradiancia, mientras que las de recuperación disminuyen en ambas especies y condiciones de radiación / temperatura. Además, el aumento de la temperatura tiene un efecto significativo disminuyendo las tasas de inhibición, pero su efecto sobre las tasas de recuperación es muy bajo. Cuando se compararon las respuestas particulares de las dos especies estudiadas, se observó que mientras las tasas de inhibición en *C. gracilis* fueron más bajas en el tratamiento P (Fig. 4.5 A-B), en *T. weissflogii* la diferencia entre PAB y P fue mucho más marcada (Fig. 4.5 C-D). En relación a las tasas de recuperación, la tasa de cambio con la irradiancia fue más pronunciada en PAB que en P, para ambas especies (Fig. 4.5 A-D).

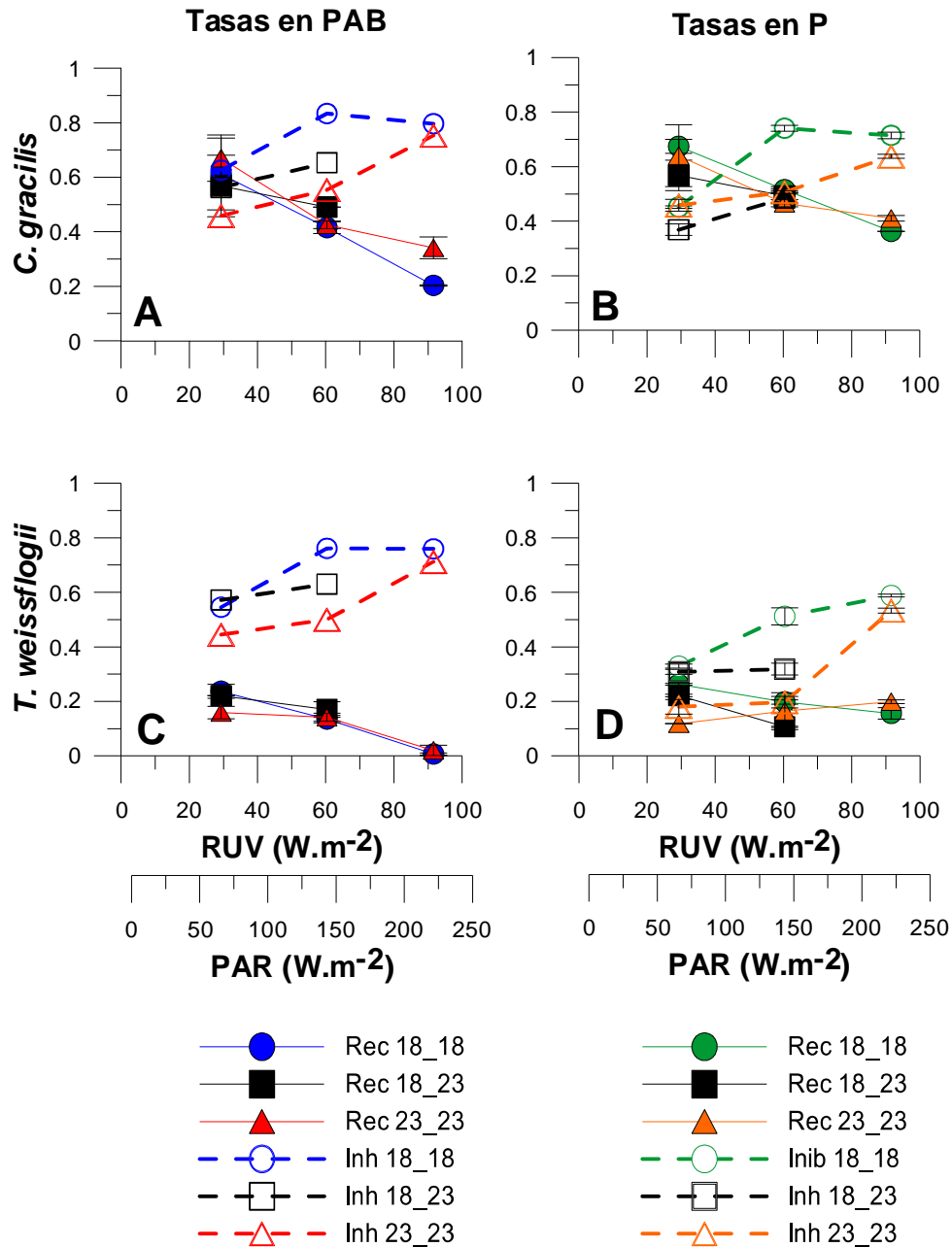


Figura 3.5. Tasas de inhibición y de recuperación en *Chaetoceros gracilis* (A y B) y *Thalassiosira weissflogii* (D y E) calculadas a partir de datos obtenidos en experimentos realizados bajo condiciones de radiación artificial y bajo irradiancias crecientes. Tasas de *C. gracilis* bajo: (A) PAR+RUV-A+RUV-B (tratamiento PAB) y; (B) solo PAR (tratamiento P). Tasas de *T. weissflogii* bajo: (C) PAR+RUV-A+RUV-B (tratamiento PAB) y; (D) solo PAR (tratamiento P). Los símbolos coloreados y vacíos indican las tasas de inhibición y recuperación, respectivamente. Los círculos, cuadrados y triángulos son muestras expuestas a los tratamientos 18_18, 18_23 y 23_23. Las líneas sobre los símbolos indican la mitad del rango de las medias (*half mean range*).

Tabla 3.3. Resultados de ANOVA de una y dos vías para establecer las diferencias en la inhibición del Y entre los tratamientos de radiación, de temperatura y de ambos combinados radiación * temperatura durante las exposiciones a la radiación solar. Los tratamientos de radiación son: PAB= PAR + RUV-A + RUV-B; PA= PAR + RUV-A; P= PAR. Los tratamientos de temperatura son: a=18_18; b= 18_23; c= 23_23.

EXPOSICIONES A RADIACIÓN NATURAL			
Análisis Estadísticos			
	Tratamientos de Radiación	Tratamientos de Temperatura	Radiación* Temperatura
<i>C. gracilis</i>	18_18 (a) p≤0.001 PAB=PA≠P	PAB p≤0.05 c=b≠a	PABa =PABb= PABc; p>0.05 PABa ≠ PABc; p<0.05 Pa ≠ (Pb, Pc); p<0.05 Pb= Pc; p>0.05 PABa ≠ (Pa, Pb, Pc); p<0.05 PABb≠ (Pc, Pb); p<0.05 PABb=Pa; p>0.05 PABc = (Pa, Pb, Pc) ; p>0.05
	18_23 (b) p≤0.001 PAB=PA≠P	PA p≤0.001 c =b≠a	
	23_23 (c) p>0.05	P p≤0.001 c≠b≠a	
<i>T. weissflogii</i>	18_18 (a) p≤0.001 PAB=PA≠P	PAB p≤0.05 c=b≠a	PABa ≠ (PABb;PABc) ; p<0.05 PABb=PABc; p>0.05 Pa ≠ (Pb;Pc) ; p<0.05 Pb=Pc; p>0.05 PABa ≠ (Pa;Pb;Pc) ; p<0.05 PABb ≠ (Pb; Pc) ; p<0.05 PABb=Pa; p>0.05 PABc ≠ (Pb; Pc) ; p<0.05 PABc=Pa; p>0.05
	18_23 (b) p≤0.001 PAB=PA≠P	PA p≤0.001 c≠b≠a	
	23_23 (c) p>0.05	P p≤0.001 c≠b≠a	

3.4 DISCUSIÓN

Esta investigación se enfocó en los efectos combinados de PAR/RUV y la temperatura sobre la fotosíntesis (estudiada por medio de la fluorescencia emitida por la clor *a* del PSII) de dos especies de diatomeas, *C. gracilis* y *T. weissflogii*. El resultado más importante de este estudio fue el efecto beneficioso que produce el aumento de la temperatura en células expuestas a radiación, contrarrestando de manera parcial el efecto inhibitorio de la RUV sobre la fotosíntesis.

De manera similar, estudios previos realizados con la diatomea *Thalassiosira pseudonana* (Sobrino & Neale, 2007) determinaron que durante exposiciones de corto plazo, esta especie muestra mayor sensibilidad a la RUV bajo condiciones de temperaturas

bajas. Sin embargo, este efecto beneficioso del aumento de la temperatura no ocurre en todas las especies, ya que en un estudio realizado con dinoflagelados simbiontes (Lesser, 1996) se demostró que los efectos negativos de la RUV se potencian bajo temperaturas elevadas en las especies estudiadas, debido a la producción de gran cantidad de radicales superóxido. Asimismo, en otro estudio llevado a cabo con cianobacterias causantes de floraciones (Ibelings, 1996) se confirmó que a temperaturas elevadas el daño producido por exposiciones a irradiancias altas sobre el proceso de fotosíntesis es mayor. Por otro lado, Roos & Vincent (1998) no encontraron ningún efecto de la temperatura sobre la inhibición inducida por la RUV en la cianobacteria *Phormidium murrayi* pre-aclimatada a 20°C y expuesta a RUV y PAR a 5, 10, 15 y 20°C. Es obvio, por un lado, que las respuestas a la RUV-temperatura son específicas de cada especie, y por otro, que los procesos involucrados en la exposición multifactorial de organismos son complejos. Por ejemplo, dentro de los efectos producidos por las temperaturas sub-óptimas se incluyen la reducción de las tasas enzimáticas debido a restricciones termodinámicas, la limitación de incorporación de fosfato inorgánico y la inhibición de la fotosíntesis por el mecanismo de retroalimentación desencadenado ante la acumulación de productos fotosintéticos finales (Falk et al., 1996).

Los resultados presentados en este trabajo demuestran que la fotosíntesis de las dos especies estudiadas, aclimatadas a 18°C, tal como si estuvieran en aguas superficiales durante el verano en el área de estudio (Helbling et al., 2010) es inhibida tanto por la radiación solar como por la artificial, como se evidencia en la consistente reducción del Y durante las exposiciones (Figs. 3.2 y 3.4). Varios estudios sobre los efectos de las diferentes bandas espectrales de la radiación solar sobre la eficiencia fotoquímica del PSII en fitoplancton, han demostrado que la mayor parte de la inhibición es debida al PAR; sin embargo, la RUV causa una inhibición adicional. La inhibición por RUV observada fue significativamente más alta en *T. weissflogii* que en *C. gracilis* (Fig. 3.2 C y F; 3.4 C y F). Esto indicaría que *T. weissflogii* presenta una mayor sensibilidad a la RUV que *C. gracilis* durante exposiciones de corto plazo. Parte de esta sensibilidad diferencial podría estar relacionada con el tamaño celular, *T. weissflogii* (~20 µm) y *C. gracilis* (~5 µm). De hecho, otros autores han demostrado que las células grandes son más sensibles que las pequeñas cuando se considera la fotoinhibición (Helbling et al., 2001a) probablemente debido a la

rápida cinética de aclimatación de estas últimas (Helbling et al., 2001b) lo cual se relaciona con su alta relación superficie / volumen. La dependencia de los efectos de la RUV con el tamaño también se relaciona con la capacidad de las células de sintetizar compuestos que absorben RUV (MAAs), lo cual es más importante en células grandes que chicas, probablemente debido al alto costo energético que representa para estas últimas (García-Pichel, 1994). En el marco temporal de este estudio no se registraron cantidades significativas de estos compuestos protectores en ninguna de las dos especies estudiadas (datos no mostrados), pero durante experimentos de largo plazo (7 días de duración) se determinó que tienen la capacidad de sintetizarlos en pequeñas cantidades (Marcoval et al., 2007). Por lo tanto, aunque se encontraron diferencias obvias inter-específicas en la respuesta fotosintética a corto plazo, no se puede afirmar si éstas variarían en períodos de tiempo más largos, es decir, si los MAAs pueden reducir o aún contrarrestar los efectos negativos causados por la RUV.

Existen otros compuestos que son también importantes para hacer frente al exceso de radiación, como es el caso de la conversión enzimática de las xantófilas, que protegen a las células de altos niveles de PAR (Olaizola et al., 1994) o del estrés producido por la RUV (Zudaire & Roy, 2001; Buma et al., 2009). La de-epoxidación de la diadinoxantina, violaxantina y anteraxantina promueve la disipación de energía debida al exceso de radiación y reduce daños potenciales al PSII (van de Poll et al., 2010). Esta de-epoxidación es disparada por la acidificación del lumen de los cloroplastos y ocurre en un lapso de tiempo de minutos (Müller et al., 2001) desde la transferencia de las células a altas irradiancias y puede ser ajustada a escalas de tiempo mayores (días) mediante la síntesis *de novo* de pigmentos (Kana et al., 1997). No sólo se han reportado diferencias en la contribución del ciclo de las xantófilas entre clorófitas y diatomeas (Zudaire & Roy, 2001; Wagner et al., 2006) sino también en la capacidad de regular el exceso de energía entre especies de diatomeas (Lavaud et al., 2007). Una manera de estimar esta capacidad de regulación es analizando el proceso de *non-photochemical quenching* (NPQ), el cual ocurre en casi todos los organismos eucariotas fotosintéticos y ayuda a regular y proteger la fotosíntesis en condiciones en las cuales la absorción de energía luminosa excede la capacidad de su uso (Müller et al., 2001). En este estudio, este mecanismo demostró ser importante en *C. gracilis* pero en mucha menor proporción (o casi nulo) en *T. weissflogii*

(Fig. 3.3). Sin embargo, estudios recientes (van de Poll et al., 2010) reportaron que *T. weissflogii* tiene la capacidad de regular el exceso de energía por medio del ciclo de las xantófilas pero en aquellos experimentos las células fueron expuestas a mayor irradiancias solares (i.e., durante el verano, enero - febrero) que las de nuestro estudio. Asimismo, Buma et al. (2009) observaron un aumento en la capacidad de disipación del exceso de energía en *T. weissflogii* expuesta a irradiancias altas (verano) pero en nuestro estudio, es probable que la historia lumínica de estos organismos no fue lo suficientemente alta como para incrementar el mecanismo de disipación, tal como fuera reportado en otras especies (Falkowski & La Roche, 1991; van de Poll et al., 2005). Más aún, en un estudio llevado a cabo con diatomeas de diferente distribución espacial, se observó que el NPQ en diatomeas oceánicas se induce en condiciones de baja intensidad lumínica; en cambio, en las diatomeas estuarinas, el NPQ se dispara a intensidades lumínicas 3 a 5 veces más altas que las irradiancias de crecimiento (Lavaud et al., 2007). La adaptación de las diatomeas estuarinas a un régimen lumínico variable es tal que el NPQ puede dispararse solo si el estado redox del PSII se encuentra cercano a la saturación (Ruban et al., 2004). Por lo tanto, las diferentes respuestas observadas en las dos especies de estudio probablemente sea adaptativa (i.e., genética). Otra explicación para los valores bajos de NPQ en *T. weissflogii* podría estar relacionado con el hecho de que este mecanismo en diatomeas presenta diversas fases: (1) un componente transitorio inducido inmediatamente bajo radiación, (2) un componente fijo que ocurre durante períodos tardíos luego de alta radiación y (3) un componente rápido de relajación que se activa durante la transición de alta radiación a oscuridad (Grouneva et al., 2008). En este estudio, las mediciones de NPQ fueron realizadas a partir del F_m medido después de una incubación corta en oscuridad, por lo que es posible que este tiempo no haya sido suficiente para relajar algunos componentes del NPQ, y en consecuencia, los valores de éste podrían haber sido levemente sub-estimados (i.e., *T. weissflogii*).

En los párrafos previos, se consideraron las respuestas de las células cuando fueron aclimatadas a la temperatura *in situ* de verano (18°C). Sin embargo, en este estudio también se consideró un potencial aumento de la temperatura de 5°C, como se plantea en uno de los escenarios de cambio climático para el 2100 (IPCC, 2007). Esta temperatura aumentada fue simulada de dos maneras, una como un aumento repentino (en escalas de minutos),

incubando las células previamente aclimatadas a 18°C y exponiéndolas a 23°C, y aclimatando células por períodos de tiempo más largos a 23°C. Aunque un incremento repentino podría parecer irrealista a primera vista, estudios previos usando boyas sugirieron que las células de fitoplancton pueden quedar atrapadas en capas superficiales de mezcla (CMS) transitorias muy delgadas, dentro de las cuales no sólo se encontrarían expuestas a altas irradiancias, sino también a repentinos incrementos de temperatura (Neale et al., 2003).

Nuestros resultados apoyan la idea inicial de que las células de *C. gracilis* y *T. weissflogii* se benefician por el incremento de la temperatura, y mostraron una mejor respuesta fotosintética bajo esas condiciones, teniendo un mejor funcionamiento al contrarrestar (al menos parcialmente) el estrés debido a la RUV. De hecho, el efecto antagónico entre temperatura y la RUV fue observado en todos los tratamientos en *T. weissflogii*, pero sólo en algunos en *C. gracilis* (Tabla 3.3), demostrándose una interacción negativa con la RUV sobre la inhibición del *yield* (Dunne, 2010). Las diferentes respuestas observadas en la eficiencia fotoquímica efectiva del PSII no sólo muestran que las células fueron beneficiadas por la pre-aclimatación a 23°C (tratamiento 23_23) sino también que son capaces de responder muy rápido al aumento de temperatura repentino (de 18 a 23°C). Lo anterior resulta en una mejor respuesta, no sólo al disminuir la inhibición del Y (Figs. 3.2 y 3.4) sino también al incrementar la capacidad de regulación del exceso de energía a través del NPQ, en particular en *C. gracilis* (Fig. 3.3). De manera similar, una mejor respuesta en cuanto a la actividad fotosintética en células que tuvieron una rápida aclimatación a altas temperaturas se observó en *T. pseudonana* aclimatada a 20 °C y expuesta a 15, 20 y 25 °C (Sobrinó & Neale, 2007).

Uno de los principales blancos de la fotoinhibición es la proteína D1 del PSII, la cual controla el transporte electrónico después de la absorción primaria de fotones; esta proteína es removida por proteasas, dando como resultado una disminución de la eficiencia fotoquímica (Hanelt et al., 1993). Durante la recuperación, sin embargo, esta proteína es restaurada y este proceso es facilitado por un rápido reemplazo de la proteína (Komenda et al., 2000). En este estudio, se esperaba que un incremento de la temperatura resultara en una actividad metabólica más rápida y por lo tanto en una síntesis más eficiente de proteína D1, tal como se ha observado en otros estudios (Greer et al., 1986; Rae et al., 2000;

Bouchard et al., 2005a) o en una rápida recuperación como la reportada en *T. pseudonana* (Sobrino & Neale, 2007). Sin embargo, esto no fue muy evidente a partir de los datos, ya que se observaron leves diferencias entre las condiciones de temperatura e irradiancia (Fig. 3.5). Sin embargo, durante la exposición, fue evidente que el aumento de la temperatura disminuyó las tasas de inhibición (Fig. 3.5). Lo anterior indica que durante la exposición, el balance entre los efectos negativos (inhibición) y los positivos (reparación-disipación) se inclina hacia un balance positivo con el aumento de la temperatura, sugiriendo que aunque se alcanza una máxima inhibición durante los experimentos, la reparación-disipación aumenta con el aumento de la temperatura. Por supuesto, este balance tiene sus limitaciones, dado que las diferencias entre los tratamientos de temperatura se observaron a las irradiancias más bajas, pero no fueron evidentes a la más alta. Lo anterior podría estar relacionado con un umbral del efecto de la temperatura a irradiancias saturantes. De hecho, Miller et al. (1998) observaron que la dimensión del efecto de la temperatura (evaluada a partir de mediciones de asimilación de carbono) depende de la intensidad de la luz, y esta dependencia de la temperatura con la luz puede haber provocado una eficiencia fotoquímica menor a irradiancias sub-saturantes, y a bajas irradiancias tanto a temperaturas supra- como a sub-óptimas.

El interrogante sobre por qué las especies responden en forma diferencial a las mismas variables puede deberse al uso de diferentes nichos. Se sabe que en los ambientes marinos existe un gradiente de luz, que va desde aguas estuarinas turbias y con mucho movimiento, a aguas oceánicas claras y tranquilas (MacIntyre & Geider, 2000). De hecho, las especies utilizadas en este estudio son características de diferentes nichos: mientras *C. gracilis* es frecuentemente costera, *T. weissflogii* es una especie estuarina. Por lo tanto, el mejor desempeño bajo un estrés de RUV observado en *C. gracilis* puede ser una consecuencia de la aclimatación a irradiancias altas (incluida la de RUV) que experimenta durante los eventos de estratificación de la columna de agua. Por su lado, *T. weissflogii* se encuentra adaptada a aguas turbias características de los ambientes estuarinos, con mezcla continua, lo que implicaría una menor capacidad de tolerar exposiciones prolongadas a irradiancias superficiales simuladas.

En resumen, los resultados de este trabajo ponen en evidencia la respuesta diferencial de las dos especies estudiadas debida, por un lado, a la sensibilidad específica de

cada especie, y por otro, a sus diferencias en la capacidad de aclimatación por pertenecer a diferentes ambientes lumínicos. Esta diferencia en las respuestas entre las especies de fitoplancton son críticas al momento de evaluar el impacto del cambio global. En este estudio se demostró que el aumento de la temperatura podría contrarrestar el impacto negativo de la RUV. Sin embargo, debe considerarse que la extrapolación a partir situaciones simuladas *in situ* y a corto plazo debe realizarse con mucho cuidado, ya que el tipo de datos obtenidos puede explicar solo parte de las respuestas debidas al cambio climático de los organismos que viven en sus ecosistemas naturales. De hecho, hay estudios que comparan los efectos combinados de RUV-temperatura a corto y mediano plazo que demuestran que los organismos responden de una manera diferente dependiendo de la escala temporal (Sobrino & Neale, 2007). Más aún, y como ya se mencionó anteriormente, existe una gran variabilidad de respuestas entre distintas especies y sistemas, dando lugar a una diversidad de respuestas en diferentes regiones. Por lo tanto, es necesario realizar más estudios que consideren los efectos combinados de la radiación y la temperatura en poblaciones naturales de fitoplancton durante períodos de tiempo más largos, con el objeto de comprender mejor las posibles consecuencias del cambio global en la Patagonia.

**CAPÍTULO 4. Efectos de la RUV y de la
temperatura a mediano plazo.
Mecanismos de fotoprotección**

4.1 INTRODUCCIÓN

Entre los principales efectos de la RUV a corto y mediano plazo en el fitoplancton se encuentran la disminución de sus tasas de fotosíntesis y de crecimiento, debido a daño en los componentes del PSII y en el material genético (Buma et al., 1997; Nilawati et al., 1997; Marcoval et al., 2007). Sin embargo, las células de fitoplancton poseen mecanismos para disminuir o evitar los efectos negativos de la RUV. Una forma común es realizar migraciones verticales hacia aguas más profundas en horas de alta irradiancia, lo que comúnmente se denomina evasión (Roy, 2000). Lo anterior es posible debido a la capacidad de movimiento propio que exhiben las especies de fitoplancton flageladas (e.g., dinoflagelados, algunas clorófitas, primsesiófitas, etc). Los patrones de movimiento son respuestas a una diversidad de condiciones ambientales, dentro de las cuales la radiación es una de las más importantes (Buskey et al., 1996). La distribución espacial de las especies de fitoplancton móviles es afectada tanto por su movimiento activo como por su movimiento pasivo (*drift*). Su movimiento activo consiste en migraciones verticales y en patrones de desplazamiento al azar, mientras que su movimiento pasivo está relacionado con la turbulencia de la columna de agua (Visser & Thygesen, 2003). Hay situaciones en las que los organismos permanecen expuestos a la radiación por períodos más prolongados, ya sea por encontrarse a expensas de los eventos de estratificación y mezcla de la columna de agua o por cuestiones adaptativas. En estos casos, una de las estrategias más eficaces para protegerse de la RUV, es a través de la síntesis de compuestos fotoprotectores. Los compuestos fotoprotectores más comúnmente hallados en organismos acuáticos son los carotenoides, que actúan como antioxidantes, y los aminoácidos tipo micosporina (MAAs, *mycosporine like aminoacids*) que tienen su máximo de absorción entre los 310 y 360 nm cumpliendo la función de “escudos” solares (Dunlap et al., 1995; Gröniger et al., 2000; Shick & Dunlap, 2002; Banaszak, 2003b; Korbee et al 2006). Estos compuestos tienen amplia distribución, encontrándose en organismos de ambientes acuáticos tropicales, templados y polares. Sin embargo, no todas las especies de fitoplancton producen MAAs, y hay grupos donde la síntesis de estos compuestos es muy poco común o muy baja e.g., Chlorophyta (Llewellyn & Airs, 2010). Al respecto, algunos autores han reportado que la capacidad de aclimatación a una determinada condición ambiental, por ejemplo a la RUV, es característica de cada especie fitoplanctónica, y/o grupo taxonómico. Helbling et al.

(1996) y Díaz et al (1997) observaron una menor disminución de la fotosíntesis debido al RUV y una mayor síntesis de MAAs en especies de diatomeas centrales que en pennadas de la Antártida, mientras que Hannach & Sigleo (1998), en un estudio donde compararon especies de Bacillariophyceae, Chlorophyceae, Prasinophyceae, Dinophyceae y Prymnesiophyceae, reportaron que la capacidad de producción de MAAs es más alta en los representantes de estos dos últimos grupos taxonómicos.

En el capítulo 3 se determinó que las especies de diatomeas estudiadas, *Chaetoceros gracilis* y *Thalassiosira weissflogii*, presentan diferencias en su respuesta fotoquímica a corto plazo cuando son expuestas a la radiación solar, y que la temperatura influye en dicha respuesta. Estas diferencias probablemente se deben en parte a mecanismos a corto plazo, ya sea de fotoprotección (disipación del exceso de energía en el PSII) y/o de reparación (síntesis *de novo* de la proteína D1). Como ya se mencionó, cuando la exposición a ciertas condiciones ambientales se prolonga por lapsos de tiempo mayores (días), se pueden producir cambios fisiológicos más permanentes. Por ello, el objetivo general de este capítulo es evaluar la respuesta fotoquímica a mediano plazo y algunas estrategias de aclimatación a la RUV en diferentes especies de fitoplancton de distintos Phyla, así como la influencia de la temperatura sobre éstas. Dentro de las respuestas estudiadas, se incluyó la eficiencia fotoquímica efectiva, y dentro de los posibles mecanismos de fotoprotección se evaluaron el NPQ, síntesis de MAAs y de carotenos, y un mecanismo de evasión tal como lo es la migración vertical. Dado que los niveles de radiación son determinantes en la aclimatación a la RUV (Roy, 2000), en este capítulo se comparan también las respuestas de aclimatación a dos irradiancias distintas, del 100% y del 50% de la radiación solar incidente.

4.2 MATERIALES Y MÉTODOS

4.2.1 Cultivos de microalgas/ sitio de estudio

Se utilizaron cultivos semi-continuos de *Prorocentrum micans* Ehrenberg (Dinophyceae), *Dunaliella salina* (Dunal) Teodoresco (Chlorophyceae) e *Isochrysis galbana* Parke (Prymnesiophyceae) de la Colección de Cultivos de Microalgas de la Estación de Fotobiología Playa Unión (EFPU, Argentina). Los cultivos fueron mantenidos en erlenmeyers de 1 L con medio f/2 (Guillard & Ryther, 1962) bajo un fotoperíodo de 12

luz: 12 oscuridad en una cámara de incubación (Sanyo modelo ML 350). Las células fueron pre-aclimatadas a la temperatura *in situ* para la estación del año en que se hizo cada experimento: 18°C (*P. micans*) o 15°C (*D. salina* e *I. galbana*) durante 2 semanas previas a la experimentación y mantenidas a una intensidad de PAR constante (235 $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{ s}^{-1}$). Los cultivos fueron utilizados en los experimentos cuando estuvieron en la fase exponencial de crecimiento. Los experimentos con *P. micans* fueron realizados durante el verano austral (9-15 de Febrero, 2011), mientras aquellos realizados con *D. salina* e *I. galbana* se llevaron a cabo en la primavera (12-16 y 21-25 de Noviembre, 2011, respectivamente) en la Estación de Fotobiología Playa Unión, EFPU (43.3° S; 65° O).

4.2.2 Protocolo de muestreo y experimentación

Los experimentos para evaluar el efecto combinado de la RUV y de la temperatura a mediano plazo sobre la fotosíntesis y la fotoaclimatación mediante mecanismos de fotoprotección en *P. micans*, *D. salina* e *I. galbana* se llevaron a cabo de la siguiente manera: antes de la experimentación, se agregó medio f/2 (Guillard & Ryther, 1962) a cada cultivo en una proporción aproximada de 6:1. Las muestras (duplicado para cada combinación de los tres tratamientos aplicados: radiación, cantidad y calidad, y temperatura) fueron colocadas en tubos de cuarzo (volumen de muestra: 300 mL) y expuestas a radiación natural 11 h cada día (8 a 19 h, hora local) durante un lapso de 7 (*P. micans*) o 5 días (*D. salina* e *I. galbana*). Los tratamientos aplicados a las muestras fueron: 1.- de calidad de radiación, PAB (RUV + PAR, 280-700 nm), tubos no cubiertos y P (PAR, 400-700 nm), tubos cubiertos con filtro Ultraphan (UV Opak, Digefra, Munich, Alemania). 2.- de temperatura, control o *in situ* (promedio de temperatura superficial costera local) y aumentada (+5°C). Para tal fin, los tubos fueron colocados en baños termostáticos (Frío 21, Argentina) con dos circuitos independientes que mantuvieron la temperatura a 18 °C (*P. micans*) o a 15 °C (*D. salina* e *I. galbana*), para establecer el tratamiento de temperatura *in situ* y a 23 °C (*P. micans*) o a 20 °C (*D. salina* e *I. galbana*), como tratamiento de temperatura aumentada. 3.- de cantidad de radiación, 100% y 50% (tubos cubiertos con malla de densidad neutra). Diariamente, a partir de las 19 h, las muestras eran llevadas al laboratorio y mantenidas en oscuridad bajo las mismas condiciones de temperatura de exposición, en dos cámaras de incubación con las temperaturas respectivas. Al día

siguiente, a partir de las 8 h, las muestras eran colocadas nuevamente en los baños térmicos correspondientes para su exposición a radiación solar.

Para la medición de diversos parámetros de fluorescencia, se colectaron muestras tres veces al día: mañana (8 h), mediodía (13 h) y tarde (19 h). Asimismo, se realizaron mediciones a lo largo de ciclos diurnos para determinaciones de eficiencia fotoquímica durante el primer y último día de los experimentos, colectando muestras de manera alternada entre los distintos tratamientos de radiación; dado que el número total de tubos era 16, cada muestra fue medida aproximadamente cada 60 min. Además, se colectaron día por medio 50-100 mL de muestra para la determinación de la concentración de clor *a*, carotenoides, compuestos que absorben en la RUV (MAAs) y densidad celular desde el inicio hasta el final de cada experimento. Posteriormente a la toma de muestras para la determinación de pigmentos y de abundancia celular, se redujeron las muestras a un volumen de 200 mL y se les agregó 100 mL de medio f/2, alcanzando un volumen final de 300 mL en todos los casos. De esta manera, los cultivos se mantuvieron en fase exponencial, lo que fue confirmado con los valores de densidad celular que se mantuvieron similares a lo largo del experimento.

Los experimentos para evaluar la migración vertical se realizaron por medio de la exposición a radiación artificial bajo un simulador solar (Hönle System Sol 1200, Hönle, Alemania) el cual se encontraba dentro de una cámara (Minicella, Argentina) para el control de la temperatura. Los cultivos fueron colocados en 4 columnas de vidrio de ~8 x 15 x 60 cm y 7 L de capacidad, en 5 L de agua de mar autoclavada (concentración final de los cultivos, ~500-750 cél. mL⁻¹), las cuales fueron colocadas dentro de un baño de agua (cilindro de 50 L de capacidad) para reducir cualquier potencial variación de temperatura (Fig. 4.1). El arreglo de columnas diseñado para este trabajo es muy similar a otros utilizados en estudios de migración vertical de especies de fitoplancton (Richter et al. 2007a-b) y de zooplancton (Leech et al., 2005; Leibold & West, 1993).

Con el fin de que las células se distribuyeron de manera homogénea en la columna de agua, antes de iniciar los experimentos de exposición, se mezclaron las muestras colocadas en las columnas con una varilla de vidrio. Se aplicaron 2 tratamientos de radiación, PAB y P (por duplicado) de manera simultánea y 2 tratamientos de temperatura que se realizaron a distintos tiempos debido al espacio efectivo bajo el simulador solar.

Mientras que los tratamientos de radiación fueron establecidos con los materiales ya mencionados (ver en la sección *Materiales y Fuentes de Iluminación*, Capítulo 2), la temperatura correspondiente a cada tratamiento fue alcanzada y mantenida por medio de la adición de hielo (temperatura *in situ*) o con la regulación de la temperatura de la cámara (temperatura aumentada). La distancia de la superficie del agua en las columnas al simulador solar fue ajustada de manera tal que los cultivos en superficie recibieron intensidades de ~ 150 , 60 y 1.5 W m^{-2} de PAR, RUV-A y RUV-B, respectivamente. Estos experimentos solo se pudieron realizar con *D. salina* e *I. galbana* y se llevaron a cabo con cultivos provenientes del día final de las exposiciones de mediano plazo a radiación solar (cultivos pre-aclimatados) y con cultivos que no fueron pre-aclimatados a radiación solar (i.e., aquellos utilizados para realizar los experimentos detallados anteriormente), sino mantenidos en condiciones de luz constante ($235 \text{ } \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{ s}^{-1}$). Es importante destacar que las especies seleccionadas para este estudio poseen flagelos, por lo que tienen motilidad propia. El desplazamiento de las células (estimado por la concentración de células a distintas profundidades) se evaluó durante 4 h de exposición, tomando muestras de 4 profundidades diferentes de la columna de agua: 5, 18, 29 y 40 cm, cada una hora. Para coleccionar las muestras a distintas profundidades, se utilizaron 4 dispositivos (uno para cada columna), contruídos cada uno con 4 jeringas de 50 mL conectadas a una manguera de la longitud correspondiente a cada una de las 4 profundidades de muestreo (i.e., jeringa 1 con una manguera de 5 cm de longitud, jeringa 2 con manguera de 18 cm, etc.).

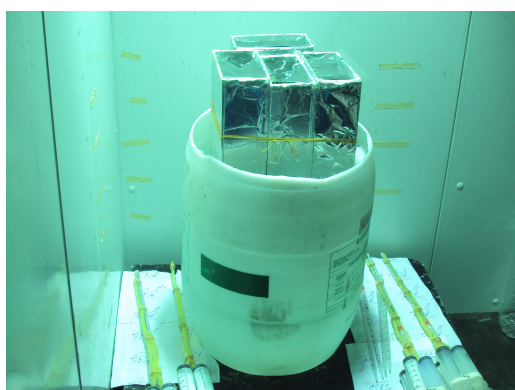


Figura 4.1. Arreglo de columnas de vidrio en baño de agua utilizado para los experimentos de migración vertical de *D. salina* e *I. galbana*.

4.2.3 Análisis y mediciones

Se realizaron las siguientes mediciones y análisis:

Mediciones de radiación y temperatura. La intensidad de la radiación fue monitoreada de manera continua, usando un radiómetro de banda ancha (ELDONET, Real Time Computer, Möhrendorf, Alemania). En los experimentos con radiación natural, la temperatura del agua dentro de los baños termostáticos fue controlada por sensores conectados a cada canal de temperatura y ajustada automáticamente a lo largo del experimento. Por otro lado, en los experimentos bajo el simulador solar, la temperatura superficial de las columnas de agua se midió con termómetros cada 30 min (ver más detalles en la sección *Manipulación experimental de variables asociadas al cambio global*, Capítulo 2).

Mediciones de fluorescencia. La eficiencia fotoquímica de separación de cargas del PSII ($\Delta F/F_m'$ o *yield* - Y) y el *non-photochemical quenching* (NPQ) fueron medidos por técnicas de fluorescencia, tal como se describe en la sección *Análisis y Mediciones*, Capítulo 3.

Concentración de pigmentos y MAAs. La concentración de pigmentos y MAAs fue determinada a partir de la filtración de 30-50 mL de muestra en filtros Whatman GF/C (25 mm) y la extracción en metanol 100% (Holm-Hansen & Riemann, 1978). La medición de los espectros de absorbancia y la cuantificación de la concentración de clor *a*, carotenos y MAAs a partir de los mismos, así como la determinación de clor *a* por técnicas fluorométricas fue realizada tal como se describe en la sección *Análisis y Mediciones*, Capítulo 3. La concentración de MAAs se calculó por unidad de célula.

Cuantificación de abundancia celular. Las muestras provenientes tanto de los experimentos con radiación natural como aquellas de las exposiciones a radiación artificial fueron fijadas con formalina neutralizada (concentración final de formaldehído en la muestra 0.4%) y almacenadas en la oscuridad inmediatamente después del muestreo. La determinación de la abundancia celular se realizó por medio de técnicas de microscopía óptica en una cámara de Fuchs-Rosenthal (Marienfeld, Alemania) con un microscopio compuesto (Zeiss, modelo D-7082, Alemania). Las muestras se tiñeron con una gota de Rosa de Bengala para distinguir mejor entre la materia orgánica y el detrito (Villafañe &

Reid, 1995) y se observaron a un aumento de 250 y 400X, según la especie, contándose al menos 100 células (± 10).

Análisis de datos y estadística. Los tratamientos de radiación se realizaron por duplicado y los resultados fueron expresados como la media y la mitad del rango de las medias (*half mean range*). Con el fin de determinar las diferencias entre los tratamientos de radiación y de temperatura, se aplicó un ANOVA de una vía para mediciones repetidas, mientras que se utilizó un ANOVA de dos vías para determinar las interacciones entre radiación y temperatura, ambos con un intervalo de confianza del 95% (Zar, 1999).

La diferencia entre el Y de la mañana y del mediodía a lo largo del experimento fue normalizado por la intensidad media de PAR desde las 12-13 h de cada día, para descartar el efecto de la variabilidad de la irradiancia entre días, y se calculó de la siguiente manera:

$$\Delta(Y_{8h}-Y_{13h})= [(Y_{8h}- Y_{13h}) * (PAR)^{-1}] \quad 1$$

siendo Y_{8h} el Y de la mañana; Y_{13h} el Y del mediodía local y PAR la intensidad media de PAR desde las 12-13 h, en todos los casos para cada uno de los días de exposición.

Por otro lado, para comparar las tasas de cambio del Y_{13h} a lo largo del experimento, bajo los diferentes tratamientos de radiación / temperatura, se graficaron los distintos valores de Y_{13h} en función del tiempo a lo largo del experimento y se realizó un ajuste lineal.

La inhibición del Y inducida por la RUV durante los períodos de exposición, fue calculada como:

$$\text{Inhibición de Y debido a la RUV} = (Y_P - Y_{PAB}) / (Y_P) * 100 \quad 2$$

siendo Y_P y Y_{PAB} la eficiencia fotoquímica efectiva para los tratamientos P y PAB, respectivamente.

4.3 RESULTADOS

4.3.1 Condiciones de radiación solar

Las intensidades de PAR, RUV-A y RUV-B fueron registradas en los tres períodos experimentales: 9 al 15 de Febrero (Días Julianos 40-46, experimentos realizados con

Prorocentrum micans), 12 al 16 de Noviembre (Días Julianos 316-320, experimentos realizados con *Dunaliella salina*) y 21 al 25 de Noviembre (Días Julianos 325-329, experimentos realizados con *Isochrysis galbana*). En general, y dentro del período de exposición de cada especie, las irradiancias fueron bastante similares entre sí (Fig. 4.2). En cambio, cuando se compararon los promedios de las irradiancias de los tres períodos de exposición, se encontraron algunas diferencias. El promedio de las irradiancias al mediodía local (12 a 13 h) durante todo el período de exposición se muestran en la Tabla 4.1. Las irradiancias fueron más altas durante la experimentación realizada con *D. salina*, debido probablemente a una menor nubosidad: el PAR un 9 y 32%, RUV-A un 6 y 29% y RUV-B un 22 y 28% más altos que durante los experimentos realizados con *P. micans* e *I. galbana*, respectivamente.

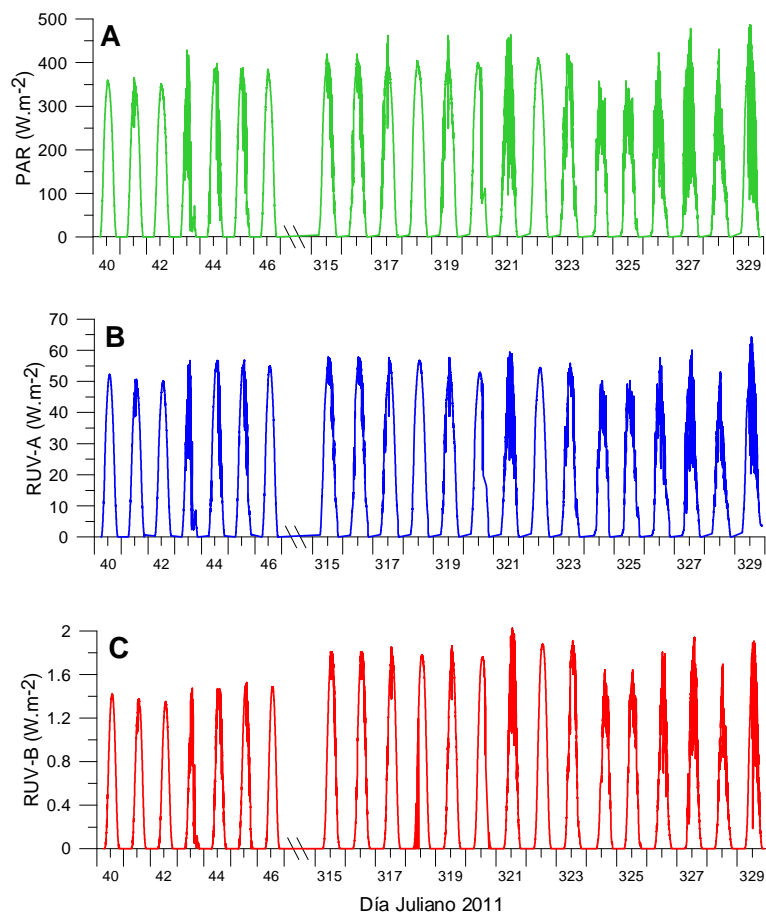


Figura 4.2. Condiciones de radiación durante los experimentos realizados con *Prorocentrum micans*, *Dunaliella salina* e *Isochrysis galbana*. Irradiancia diaria en $W \cdot m^{-2}$ de: PAR, 400-700 nm (A); RUV-A, 315-400 nm (B); RUV-B, 280-315 nm, (C).

Tabla 4.1. Irradiancia media de PAR, RUV-A y RUV-B (en $W\ m^{-2}$) al mediodía local (12-13 h) durante los experimentos realizados con *Prorocentrum micans*, *Dunaliella salina* e *Isochrysis galbana*.

Especie	PAR	RUV-A	RUV-B
<i>Prorocentrum micans</i>	353 ± 30	51 ± 4	1,4 ± 0,1
<i>Dunaliella salina</i>	387 ± 6	54 ± 2	1,7 ± 0,03
<i>Isochrysis galbana</i>	261 ± 50	38 ± 5	1,2 ± 0,19

4.3.2 Efectos de la RUV y temperatura a mediano plazo sobre el PSII

Variaciones del yield. A partir del estudio del *yield* (Y) en tres momentos del día: mañana (8 h), mediodía (13 h) y tarde (19 h) durante exposiciones a la radiación solar de mediano plazo, se observó un patrón general, con una disminución del Y al mediodía (Y_{13h}) y un aumento de éste (recuperación) durante la tarde, que alcanzó valores aún más altos a la mañana del siguiente día (Y_{8h} , Fig. 4.3). Sin embargo, las 3 especies estudiadas presentaron diferentes grados de disminución del Y al mediodía y de recuperación a la mañana, y distintas respuestas a los tratamientos de radiación y temperatura. En relación al efecto de la RUV, y cuando las muestras se expusieron al 100% de la radiación (i.e., sin filtros de atenuación) no se observaron diferencias significativas en los valores de Y_{8h} y Y_{13h} ya sea en los cultivos de *P. micans* o de *D. salina* expuestos a PAR + RUV o sólo a PAR (Fig. 4.3 A-D; $p > 0,05$, Tabla 4.2). En cambio, *I. galbana* presentó diferencias significativas entre los tratamientos de radiación: los valores del Y de la mañana (Y_{8h}) y de la tarde (Y_{19h}) fueron más altos en P que en PAB (Fig. 4.3 E-F; $p \leq 0,05$, Tabla 4.2).

Por otro lado, el efecto del aumento de la temperatura no fue evidente en *P. micans* pero sí en *D. salina*, donde algunos días se observaron valores de Y significativamente más altos en el tratamiento de temperatura aumentada que en el de temperatura *in situ* (Fig. 4.3 C-D; $p \leq 0,01$, Tabla 4.2). Asimismo, *I. galbana* presentó diferencias significativas entre los tratamientos de temperatura: los valores del Y de la mañana (Y_{8h}) fueron más altos a temperatura aumentada, en especial en presencia de RUV (Fig. 4.3 E-F; $p \leq 0,01$, Tabla 4.2). Sólo se confirmó un efecto combinado de ambas variables de estudio en los valores de Y_{8h}

de *I. galbana*, donde la temperatura contrarrestó en parte el efecto inhibitorio de la radiación ($p \leq 0,01$; Tabla 4.2).

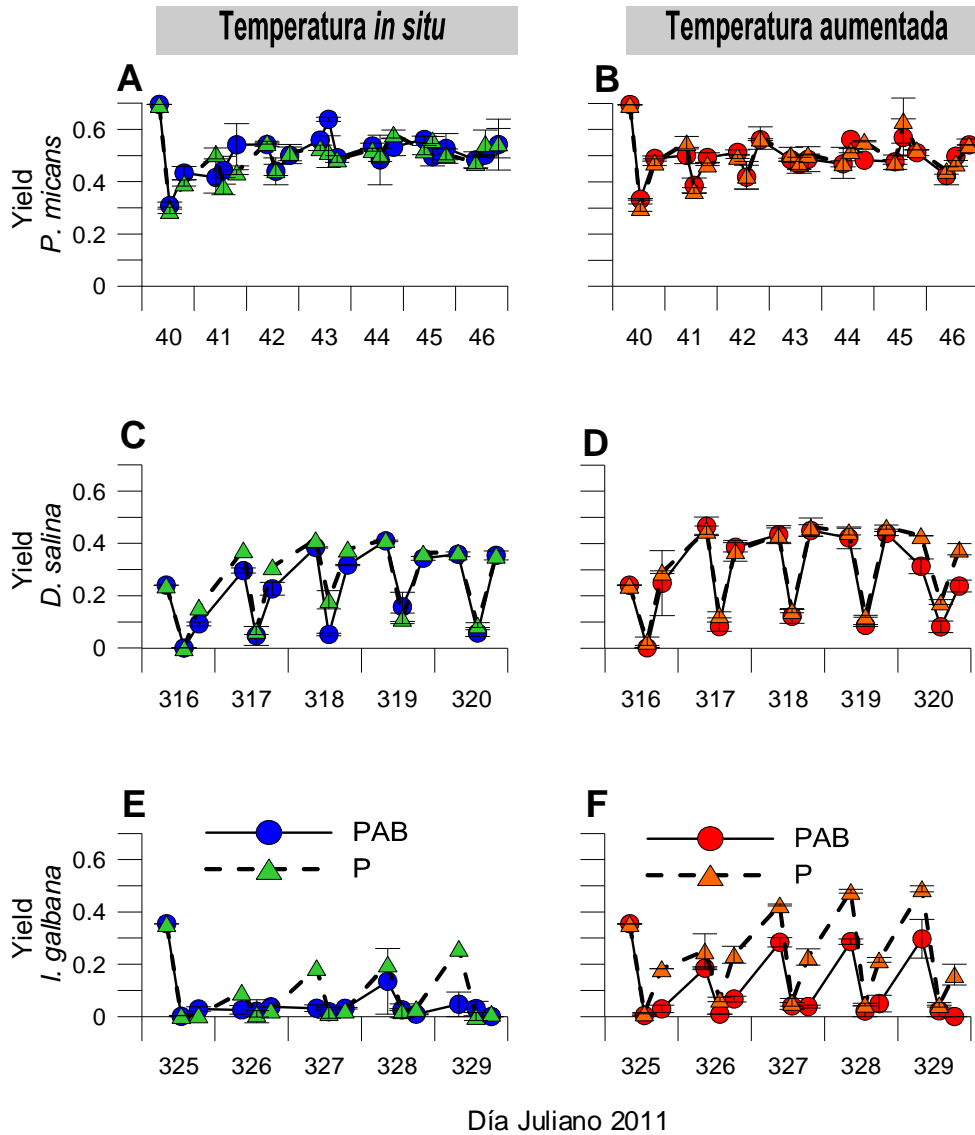


Figura 4.3. Eficiencia efectiva del PSII (*yield*) en cultivos de *Prorocentrum micans* (A y B), *Dunaliella salina* (C y D) e *Isochrysis galbana* (E y F) expuestos al 100% de radiación natural a lo largo de 5-7 días. Los cambios en el *yield* se muestran en células aclimatadas y mantenidas a temperatura *in situ* (A, C y E; símbolos azules y verdes) y aclimatadas y mantenidas a temperatura aumentada (B, D y F; símbolos rojos y naranjas) bajo los tratamientos PAR + RUV (PAB; círculos) o PAR (P; triángulos). Los valores fueron calculados como el promedio de dos réplicas. Las barras representan la mitad del rango de las medias (*half mean range*).

Tabla 4.2. Resultados de ANOVA de mediciones repetidas y de ANOVA de dos vías para establecer las diferencias en el *yield* de la mañana (Y_{sh}) entre los tratamientos de radiación, los tratamientos de temperatura y la combinación de radiación*temperatura durante exposiciones a radiación solar de 5-7 días. Los tratamientos de radiación son: PAB = PAR + RUV-A + RUV-B, P = PAR; los tratamientos de temperatura son: temperatura *in situ* (18 ó 15°C) y temperatura aumentada (+5°C; 23 ó 20°C). Las dos condiciones de irradiancia son: intensidad de la radiación 100 y 50%.

	Diferencias en Y_{sh} entre los tratamientos de radiación		Diferencias en Y_{sh} entre los tratamientos de temperatura		Diferencias en Y_{sh} entre los tratamientos de radiación*temperatura		
		Intens Rad.	p		Intens Rad.	p	
<i>P. micans</i>	18°C	100%	p>0.05	PAB	100%	p>0.05	100% de Radiación PAB 18°C=P 23°C; p>0.05 PAB 23°C=P 18°C; p>0.05 50% de Radiación PAB 18°C=P 23°C; p>0.05 PAB 23°C=P 18°C; p>0.05
		50%	p>0.05		50%	p>0.05	
	23°C	100%	p>0.05	P	100%	p>0.05	
		50%	p>0.05		50%	p>0.05	
<i>D. salina</i>	15°C	100%	p>0.05	PAB	100%	p<0.001	100% de Radiación PAB 18°C=P 23°C; p>0.05 PAB 23°C=P 18°C; p>0.05 50% de Radiación PAB 18°C=P 23°C; p>0.05 PAB 23°C=P 18°C; p>0.05
		50%	p>0.05		50%	p<0.05	
	20°C	100%	p>0.05	P	100%	p<0.01	
		50%	p>0.05		50%	p<0.05	
<i>I. galbana</i>	15°C	100%	p<0.01	PAB	100%	p<0.001	100% de Radiación PAB 18°C≠P 23°C; p<0.001 PAB 23°C=P 18°C; p>0.05 50% de Radiación PAB 18°C≠P 23°C; p<0.01 PAB 23°C=P 18°C; p>0.05
		50%	p<0.01		50%	p<0.01	
	20°C	100%	p<0.05	P	100%	p>0.05	
		50%	p>0.05		50%	p>0.05	

De manera simultánea, las mismas especies de estudio fueron expuestas al 50% de la radiación natural, simulando una situación donde las células se encontrarán en una capa más profunda de la columna de agua. Los resultados del Y en las exposiciones con radiación atenuada fueron, en *P. micans*, muy similares a los de radiación al 100% (Fig. 4.4 A-B; Tabla 4.2). Por otro lado, *D. salina* mostró valores de Y más altos en la condición del 50% de radiación (Fig. 4.4 C-D; Tabla 4.2). Finalmente, *I. galbana* fue la especie que presentó diferencias más marcadas entre las células expuestas al 50 y al 100% de la radiación solar (Figs. 4.3 E-F y 4.4 E-F). Con respecto a la evolución del Y, si bien las

respuestas en cada tratamiento de radiación y temperatura, así como la interacción entre ellos, fueron muy similares a las descritas para las condiciones de radiación al 100% (Fig. 4.4 E-F; Tabla 4.2) las células bajo el 50% de radiación mostraron Y_{8h} significativamente más altos ($p \leq 0,01$) que bajo el 100%, cuando estuvieron en condiciones de temperatura *in situ* (Fig. 4.4 E; Tabla 4.2), mientras que en condiciones de temperatura aumentada esta diferencia no fue observada (Fig. 4.4 F; Tabla 4.2).

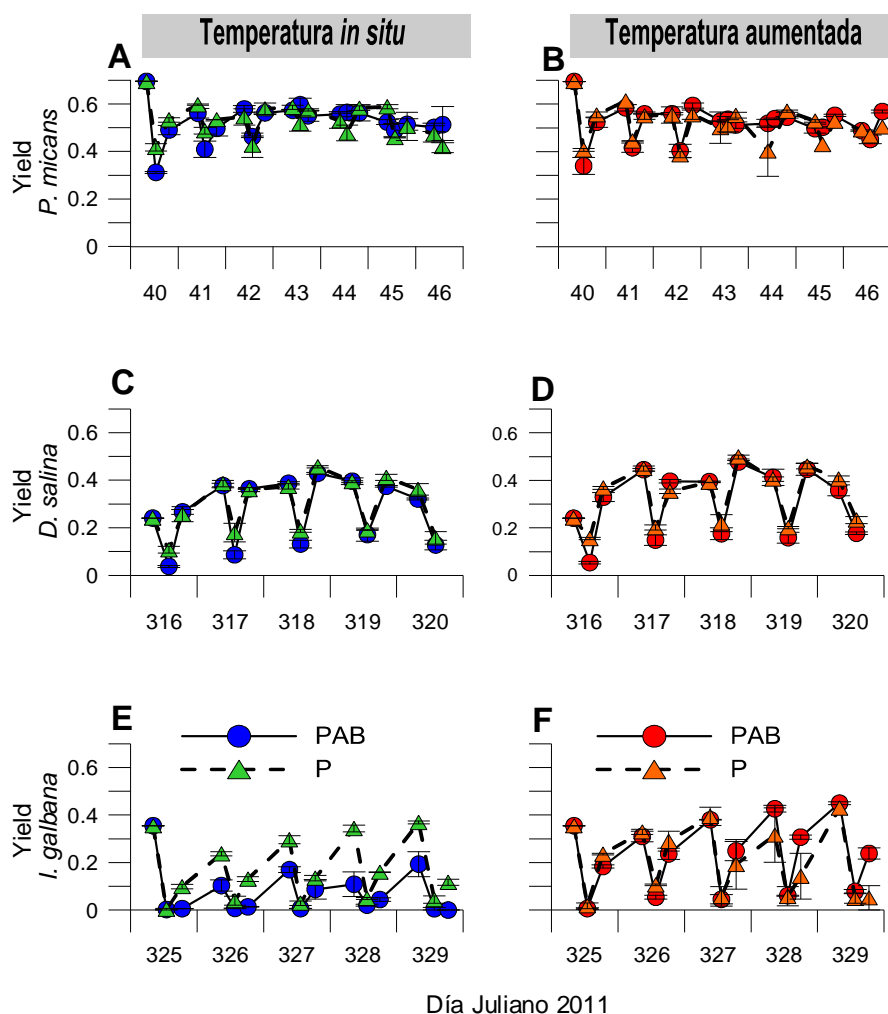


Figura 4.4. Eficiencia efectiva del PSII (*yield*) en cultivos de *Prorocentrum micans* (A y B), *Dunaliella salina* (C y D) e *Isochrysis galbana* (E y F) expuestos al 50% de radiación natural a lo largo de 5-7 días. Los cambios en el *yield* se muestran en células aclimatadas y mantenidas a temperatura *in situ* (A, C y E; símbolos azules y verdes) y aclimatadas y mantenidas a temperatura aumentada (B, D y F; símbolos rojos y naranjas) bajo los tratamientos PAR + RUV (PAB; círculos) o PAR (P; triángulos). Los valores fueron calculados como el promedio de dos réplicas. Las barras representan la mitad del rango de las medias (*half mean range*).

Para mayor claridad en la presentación de los datos, y debido a que en la mayoría de los casos las diferencias en respuestas entre las células expuestas al 100 y 50% de radiación no fueron significativas, se presentarán solamente los resultados de las exposiciones a máxima irradiancia, los cuales representan la situación de mayor estrés lumínico.

Con el fin de estudiar la variación de la inhibición y recuperación en cada una de las especies de estudio durante la experimentación, se calculó la diferencia entre el Y de la mañana y del mediodía $\Delta(Y_{8h}-Y_{13h})$. Según la especie, se determinaron diferentes tendencias: en *P. micans*, el $\Delta(Y_{8h}-Y_{13h})$ disminuyó a lo largo del tiempo de exposición en todos los tratamientos (Fig. 4.5 A-B) sin encontrarse diferencias significativas entre los tratamientos de radiación y/o temperatura ($p>0,05$, Tabla 4.3). Lo anterior ocurrió principalmente por un aumento del Y_{13h} durante el experimento, lo que se confirmó con la tasa de cambio del Y_{13h} (rY_{13h}) que fue $\sim 0,09 d^{-1}$. En cambio, *D. salina* no mostró variaciones en el $\Delta(Y_{8h}-Y_{13h})$ durante los días de exposición (Fig. 4.5 C-D). Además, el $\Delta(Y_{8h}-Y_{13h})$ a lo largo del experimento no fue afectado de manera significativa por los tratamientos de radiación y temperatura ($p>0,05$, Tabla 4.3). Esta respuesta probablemente se debe a que esta especie presentó tanto el Y_{13h} como el Y_{8h} con tasas de cambio bajas en todos los tratamientos ($\sim 0,02-0,03 d^{-1}$). Por su parte, y en general, *I. galbana*, no mostró variaciones significativas del $\Delta(Y_{8h}-Y_{13h})$ (Fig. 4.5 E-F) pero se observaron valores significativamente más altos en P que en PAB (Tabla 4.3). Con respecto al efecto de la temperatura, las células bajo condiciones de temperatura aumentada mostraron un $\Delta(Y_{8h}-Y_{13h})$ significativamente más alto que bajo temperatura *in situ* en PAB (Tabla 4.3). El aumento del parámetro estudiado en esta especie responde a un aumento del Y_{8h} a lo largo del experimento (Fig. 4.3 E-F) sin un cambio significativo en el Y_{13h} ($r Y_{13h} = \sim 0-0,02$), por lo que en este caso un aumento del mismo indica una mejor respuesta (e.g., bajo condiciones de menor estrés: P y temperatura aumentada). Asimismo, la temperatura en combinación con la RUV produjo un efecto antagónico en esta especie ($p\leq 0,001$, Tabla 4.3), ya que la temperatura contrarrestó en parte la inhibición producida por la RUV.

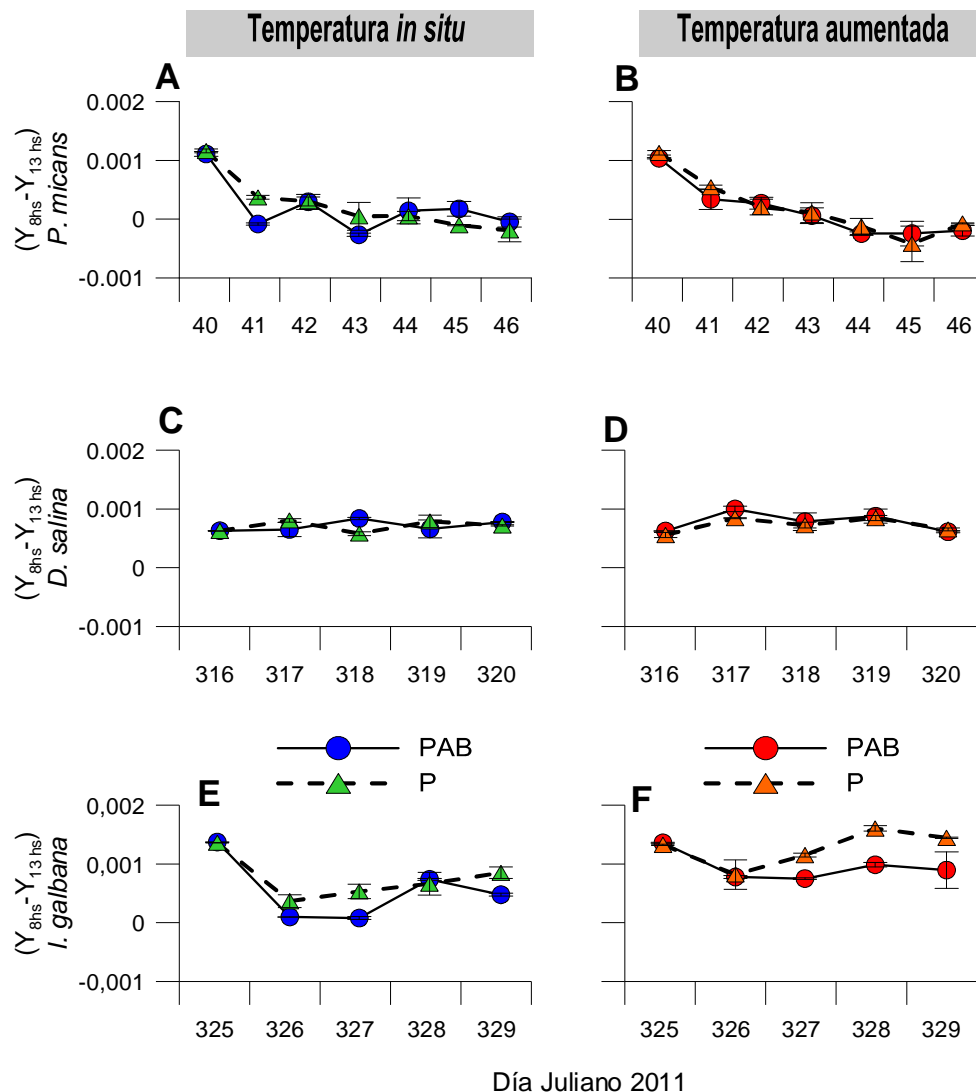


Figura 4.5. Diferencia entre el yield de la mañana y del mediodía, $\Delta(Y_{8h}-Y_{13h})$, normalizado por PAR en cultivos de *Prorocentrum micans* (A y B), *Dunaliella salina* (C y D) e *Isochrysis galbana* (E y F) expuestos al 100 % de radiación natural a lo largo de 5-7 días. Los cambios en el $\Delta(Y_{8h}-Y_{13h})$ se muestran en células aclimatadas y mantenidas a temperatura *in situ* (A, C y E; símbolos azules y verdes) y aclimatadas y mantenidas a temperatura aumentada (B, D y F; símbolos rojos y naranjas) bajo los tratamientos PAR + RUV (PAB; círculos) o PAR (P; triángulos). Los valores fueron calculados como el promedio de dos réplicas. Las barras representan la mitad del rango de las medias (*half mean range*).

Tabla 4.3. Resultados de ANOVA de mediciones repetidas y de ANOVA de dos vías para establecer las diferencias en el $\Delta(Y_{8h}-Y_{13h})$ entre los tratamientos de radiación, los tratamientos de temperatura y la combinación de radiación*temperatura durante exposiciones a radiación solar de 5-7 días. Los tratamientos de radiación son: PAB = PAR + RUV-A + RUV-B, P = PAR; los tratamientos de temperatura son: temperatura *in situ* (18 ó 15°C) y temperatura aumentada (+5°C; 23 ó 20°C). Las dos condiciones de irradiancia son: intensidad de la radiación: 100 y 50%.

	Diferencias en $\Delta(Y_{8h}-Y_{13h})$ entre los tratamientos de radiación		Diferencias en $\Delta(Y_{8h}-Y_{13h})$ entre los tratamientos de temperatura		Diferencias en $\Delta(Y_{8h}-Y_{13h})$ entre los tratamientos de radiación*temperatura		
	Intens Rad.	p	Intens Rad.	p	Intens Rad.	p	
<i>P. micans</i>	18°C	100%	p>0.05	PAB	100%	p>0.05	100% de Radiación PAB 18°C=P 23°C; p>0.05 PAB 23°C=P 18°C; p>0.05 50% de Radiación PAB 18°C=P 23°C; p>0.05 PAB 23°C=P 18°C; p>0.05
		50%	p>0.05		50%	p>0.05	
	23°C	100%	p>0.05	P	100%	p>0.05	
		50%	p>0.05		50%	p>0.05	
<i>D. salina</i>	15°C	100%	p>0.05	PAB	100%	p>0.05	100% de Radiación PAB 18°C=P 23°C; p>0.05 PAB 23°C=P 18°C; p>0.05 50% de Radiación PAB 18°C=P 23°C; p>0.05 PAB 23°C=P 18°C; p>0.05
		50%	p>0.05		50%	p>0.05	
	20°C	100%	p>0.05	P	100%	p>0.05	
		50%	p>0.05		50%	p<0.05	
<i>I. galbana</i>	15°C	100%	p<0.01	PAB	100%	p<0.01	100% de Radiación PAB 18°C≠P 23°C; p<0.001 PAB 23°C=P 18°C; p>0.05 50% de Radiación PAB 18°C=P 23°C; p>0.05 PAB 23°C=P 18°C; p>0.05
		50%	p>0.05		50%	p<0.01	
	20°C	100%	p<0.05	P	100%	p>0.05	
		50%	p>0.05		50%	p>0.05	

Inhibición del PSII inducida por la RUV. Cuando se calculó la inhibición en el PSII inducida por la RUV, se observaron diferentes respuestas en cada especie. *P. micans* sólo mostró efectos debido a la RUV durante los dos primeros días de exposición (~15-18%), mientras que en el resto de los días los valores de inhibición por RUV fueron cercanos a cero o llegaron a ser negativos (Fig. 4.6 A). No se observaron diferencias significativas entre los tratamientos de temperatura (Tabla 4.4). En cambio, *D. salina* mostró una inhibición inducida por RUV muy marcada al mediodía, en especial en los primeros días de exposición, disminuyendo a lo largo del experimento (Fig. 4.6 B). Este efecto fue más bajo (<20%) a la tarde y a la mañana. Con respecto al efecto de la temperatura, se observó que la inhibición del Y debido a la RUV disminuyó significativamente en el tratamiento de

temperatura aumentada en los primeros días, cuando el impacto de esta radiación fue mayor (Fig. 4.6 B; Tabla 4.4). La proporción de inhibición debida a la RUV fue menor bajo 50% de radiación que bajo al 100% (datos no mostrados). En *I. galbana* se observó una inhibición inducida por la RUV más alta que en las otras dos especies siendo, en la mayoría de los casos, muy marcada al mediodía y a la tarde y disminuyendo sólo a la mañana (Fig. 4.6 C). La temperatura no afectó de manera significativa a la inhibición inducida por la RUV (Fig. 4.6 C; Tabla 4.4); sin embargo, las células bajo el 50% de radiación fueron beneficiadas por el aumento de la temperatura de manera significativa (Tabla 4.3) siendo aquellas que presentaron menor inhibición inducida por RUV en esta especie.

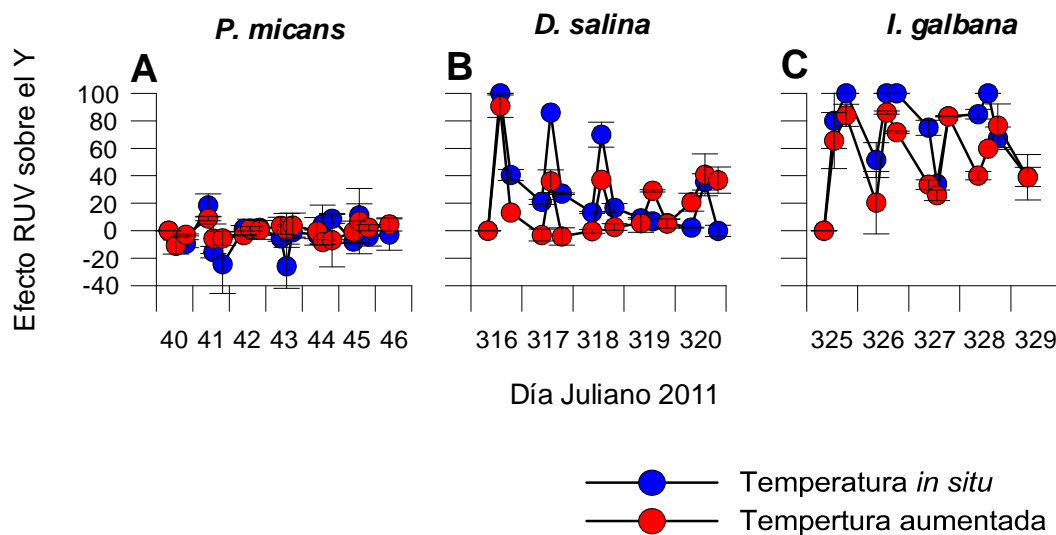


Figura 4.6. Porcentaje de la inhibición del yield debido a la RUV en cultivos de *Prorocentrum micans* (A), *Dunaliella salina* (B) e *Isochrysis galbana* (C) expuestos al 100 % de radiación natural a lo largo de 5-7 días. Los valores se muestran en células aclimatadas y mantenidas a temperatura *in situ* (símbolos azules) y aclimatadas y mantenidas a temperatura aumentada (símbolos rojos). La inhibición inducida por la RUV se muestra como el promedio de dos réplicas. Las barras representan la mitad del rango de las medias (*half mean range*).

Tabla 4.4. Resultados de ANOVA de mediciones repetidas para establecer las diferencias en la inhibición inducida por RUV entre los tratamientos de temperatura durante exposiciones a radiación solar de 5-7 días. Los tratamientos de temperatura fueron: temperatura *in situ* y temperatura aumentada (+5°C); las condiciones de irradiancia fueron: intensidad de la radiación al 100 y 50%.

	Intensidad de Radiación	p
<i>P. micans</i>	100%	p>0,05
	50%	p>0,05
<i>D. salina</i>	100%	p<0,05
	50%	p<0,05
<i>I. galbana</i>	100%	p>0,05
	50%	p<0,001

4.3.3 Mecanismos de fotoprotección

Disipación del exceso de energía (NPQ). Dentro de los mecanismos de fotoprotección estudiados, se estimó la disipación del exceso de energía como calor a partir del *non photochemical quenching* (NPQ). En todos los casos, el NPQ alcanzó valores máximos al mediodía, y disminuyó por la tarde y la mañana (Figs. 4.7). En *P. micans*, este mecanismo sólo fue evidente al mediodía durante el primer día de exposición, disminuyendo a valores cercanos a cero durante el resto del experimento (Fig. 4.7 A-B). En cambio, *D. salina*, presentó valores de NPQ altos al mediodía durante todo el experimento: estos valores fueron similares en presencia o ausencia de RUV, pero presentaron diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre los tratamientos de temperatura, siendo más altos bajo el tratamiento de temperatura *in situ* que en condiciones de temperatura aumentada (Fig 4.7 C-D). Por su parte, y en general, *I galbana* mostró un NPQ significativamente más alto en PAB que en P en condiciones de temperatura aumentada (no se disponen datos de PAB bajo temperatura *in situ*) (Fig. 4.7 F). Comparando los tratamientos de intensidad de radiación se pudo observar que este mecanismo no se presentó de manera tan marcada bajo radiación al 50% (datos no mostrados) comparado con condiciones de radiación al 100%. Cuando las células se expusieron al 50% de la radiación, el NPQ presentó la mayoría de los valores cercanos a cero, a excepción de la condición con mayor estrés: presencia de RUV y temperatura *in situ* (datos no mostrados).

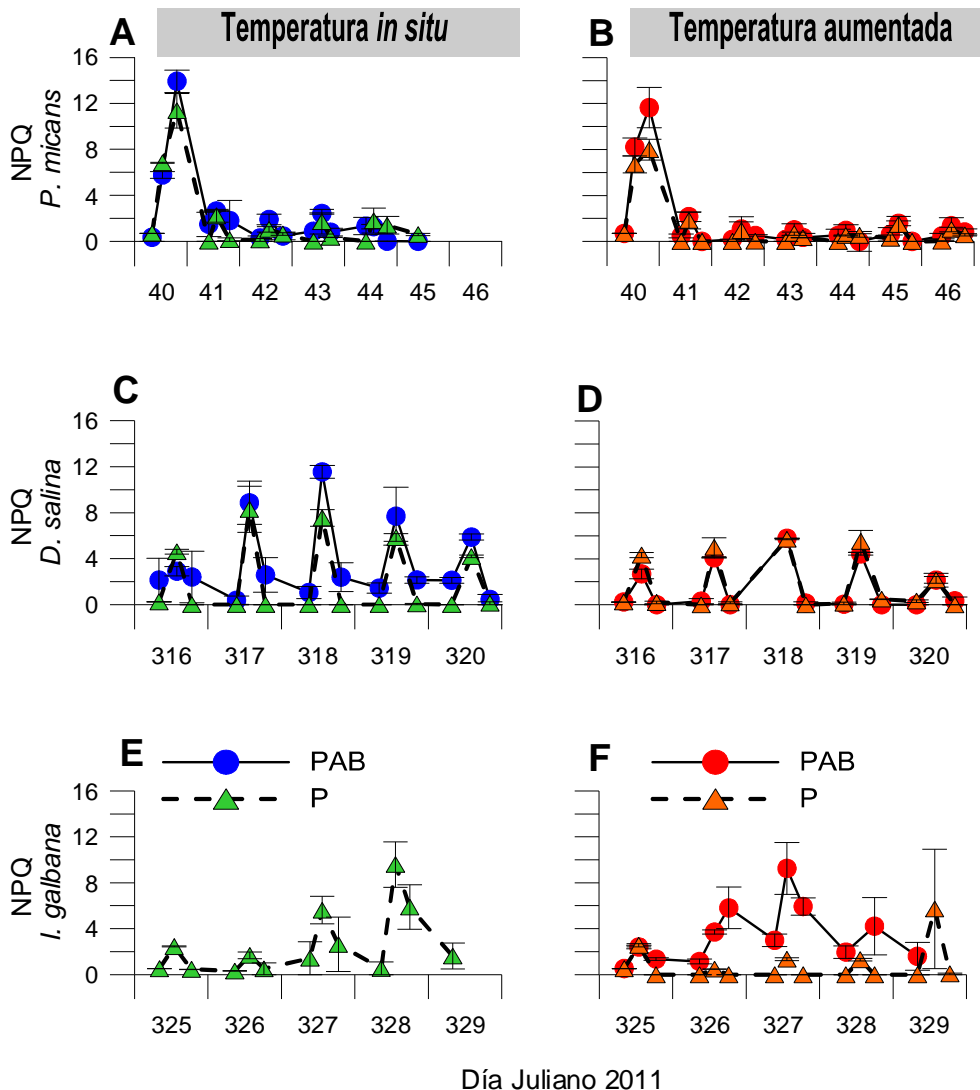


Figura 4.7. Non photochemical quenching (NPQ) del PSII en cultivos de *Prorocentrum micans* (A y B), *Dunaliella salina* (C y D) e *Isochrysis galbana* (E y F) expuestos al 100 % de radiación natural a lo largo de 5-7 días. Los cambios en el NPQ se muestran en células aclimatadas y mantenidas a temperatura *in situ* (A, C y E; símbolos azules y verdes) y aclimatadas y mantenidas a temperatura aumentada (B, D y F; símbolos rojos y naranjas) bajo los tratamientos PAR + RUV (PAB; círculos) o PAR (P; triángulos). Los valores fueron calculados como el promedio de dos réplicas. Las barras representan la mitad del rango de las medias (*half mean range*).

Síntesis de MAAs. Otro de los mecanismos de fotoprotección estudiados fue la síntesis de MAAs. La cantidad de estos compuestos a lo largo del experimento fue estimada a partir de la altura del pico de absorción a 337 nm y normalizada por célula. De las tres especies, sólo *P. micans* mostró un aumento significativo de estos compuestos a lo largo del período de exposición, que fue más marcado bajo las condiciones de radiación al 100% (~20 veces; Fig. 4.8 A) si se compara con las condiciones de radiación atenuada (~15 veces; datos no

mostrados). Las células expuestas al 100% de radiación no mostraron diferencias en el contenido de MAAs entre los tratamientos de radiación (con o sin RUV) ni de temperatura (Fig. 4.8 A); sin embargo, bajo radiación atenuada las células expuestas sólo a PAR y a temperatura aumentada presentaron valores de MAAs significativamente menores que el resto de las muestras (datos no mostrados). *D. salina* e *I. galbana*, en cambio, mantuvieron la concentración de estos compuestos cercana a cero (Fig. 4.8 B-C) durante todo el período de exposición.

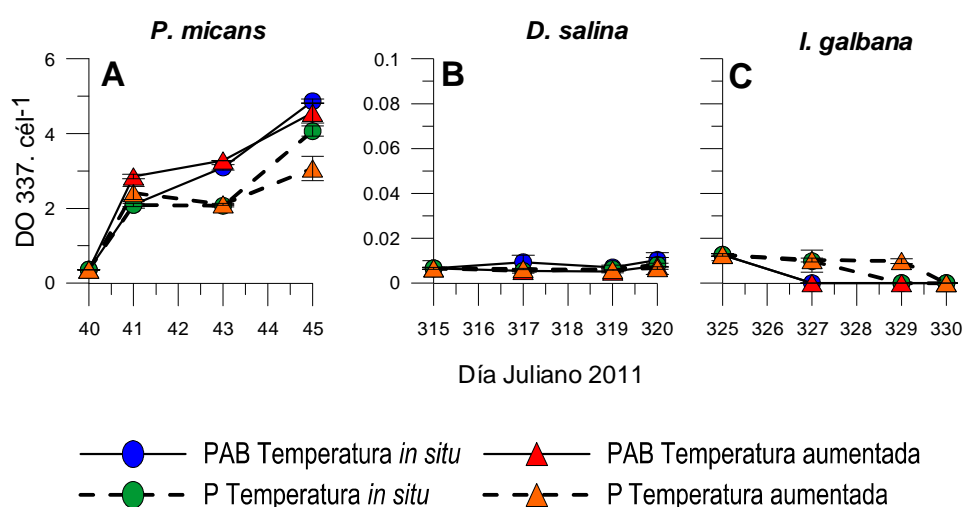


Figura 4.8. Concentración de MAAs normalizado por célula ($\text{DO337 c\acute{e}l}^{-1}$)*1000 en cultivos de *Prorocentrum micans* (A), *Dunaliella salina* (B) e *Isochrysis galbana* (C) a lo largo del período de exposición. El cambio en la concentración de MAAs se muestra en células aclimatadas y mantenidas a temperatura *in situ* (símbolos azules y verdes) y aclimatadas y mantenidas a temperatura aumentada (símbolos rojos y naranjas) bajo los tratamientos PAR + RUV (PAB; círculos) o PAR (P; triángulos). Los valores fueron calculados como el promedio de dos réplicas. Las barras representan la mitad del rango de las medias (*half mean range*). Nótese las diferentes escalas de concentración de MAAs en las distintas especies.

Síntesis de carotenos. En general, la concentración de carotenos (normalizada por clor *a*) disminuyó a lo largo del período experimental i.e., ~ 50% en *P. micans* y ~ 40% en *D. salina* hacia el final de los experimentos (datos no mostrados). Lo anterior indicaría que en ambas especies la síntesis de carotenos fue menor en proporción que la de clor *a*. En cambio, en *I. galbana* se detectó un aumento de carotenos en relación a la clor *a* en la mayoría de los cultivos bajo condiciones de mayor estrés: exposición a la RUV en condiciones de radiación al 100% y disminución de los mismos en ausencia de RUV y bajo

radiación atenuada (datos no mostrados). Esto sugiere que *I. galbana* sintetiza mayor proporción de carotenos bajo condiciones de estrés que en condiciones más favorables.

4.3.4 Mecanismos de evasión: Migración vertical

Cuando se evaluó la proporción de células en las diferentes profundidades de la columna de agua, las muestras de *D. salina* previamente expuestas a radiación solar y aclimatadas a sus temperaturas experimentales no mostraron ningún patrón de migración, manteniéndose en proporciones similares en las cuatro profundidades a lo largo de las 4 h de exposición, tanto a temperatura *in situ* como aumentada (Fig. 4.9 A-B). En cambio, los cultivos de *D. salina* sin exposición previa a radiación solar mostraron un desplazamiento marcado hacia las capas más profundas: a temperatura *in situ*, y a las 2 h, la mayor proporción de células se concentró en 29 cm ($p \leq 0,01$) y a las 4 h a 29-40 cm ($p \leq 0,01$; Fig. 4.9 C). En cambio, bajo condiciones de temperatura aumentada, el desplazamiento hacia la capa de 29 cm se hizo evidente recién a partir de las 4 h de exposición ($p \leq 0,01$; Fig. 4.9 D).

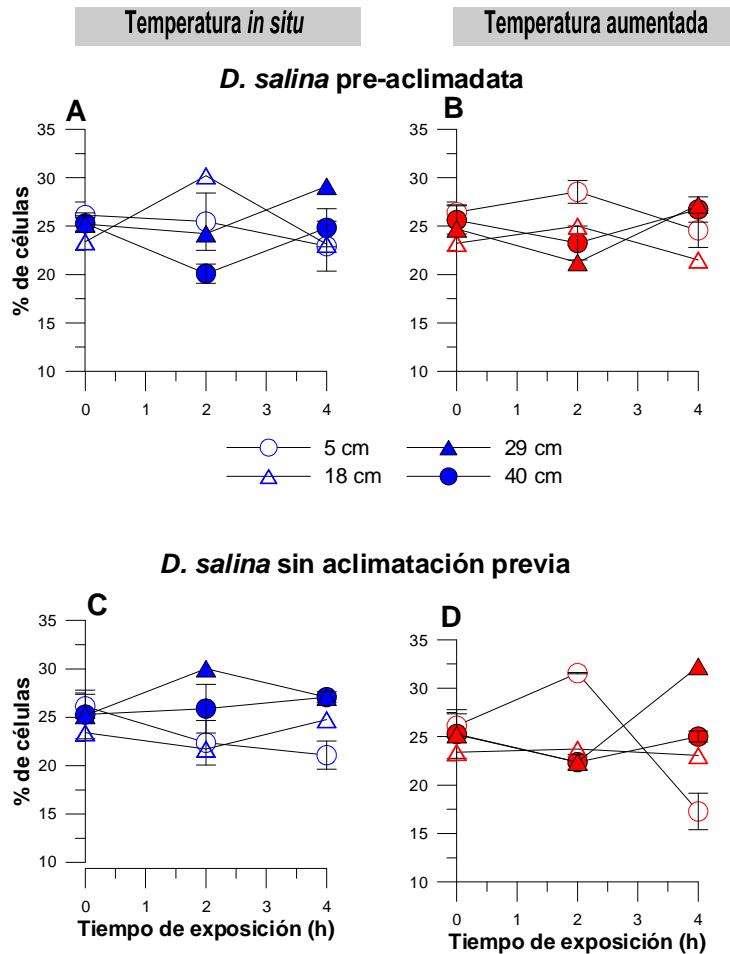


Figura 4.9: Abundancia de células de *D. salina* (% en relación al total) a cuatro profundidades de la columna de agua: 5, 18, 29 y 40 cm. Los valores corresponden al tiempo inicial, 2 y 4 h de exposición a 150, 60 y 1.5 W m⁻² de PAR, RUV-A y RUV-B, respectivamente, bajo un simulador solar. Los cultivos utilizados en los experimentos fueron previamente expuestos a radiación natural durante 5 días a 15°C (A) o 20°C (B) o mantenidos en un incubador a 15°C (C) o 20°C (D). Los valores fueron calculados como el promedio de dos réplicas. Las barras representan la mitad del rango de las medias (*half mean range*).

En *I. galbana* se observó, en la mayoría de los casos, que las células se desplazaron hacia las capas más profundas. Aquellas expuestas previamente a radiación solar, y expuestas a temperatura *in situ* se concentraron en una proporción significativamente mayor a los 29 cm en comparación al resto de las profundidades ($p \leq 0,01$; Fig. 4.10 A), mientras que a temperatura aumentada no se observaron diferencias significativas en el porcentaje de células entre 18, 29 y 40 cm de profundidad a las 4 h de exposición, pero en la superficie, la proporción de células fue significativamente menor que en las demás

profundidades. Las células sin exposición previa se concentraron en la capa de 29 y/o de 40 cm desde la segunda hora del experimento, bajo condiciones de temperatura *in situ* o de temperatura aumentada ($p \leq 0,01$; Fig. 4.10 C-D). Aunque las células no expuestas previamente se desplazaron en mayor proporción a 40 cm y las pre-aclimatadas a 29 cm de profundidad, en todos los casos *I. galbana* migró hacia capas más profundas como mecanismo de evasión a la radiación.

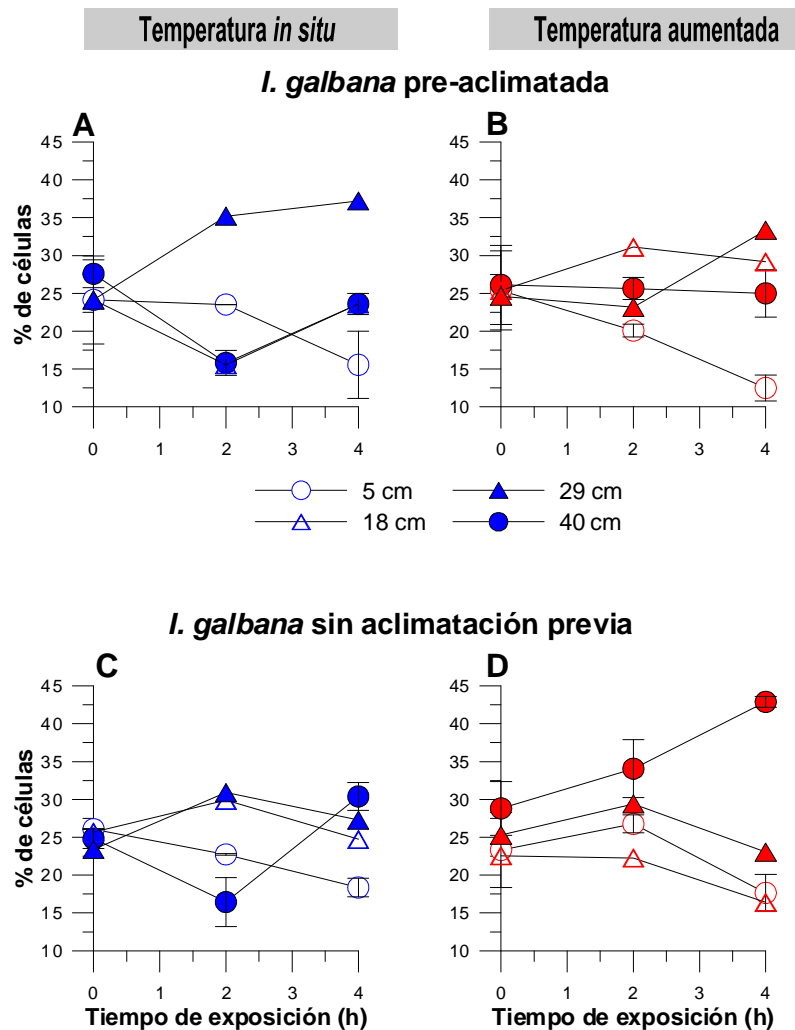


Figura 4.10: Abundancia de células de *I. galbana* (% en relación al total) a cuatro profundidades de la columna de agua: 5, 18, 29 y 40 cm. Los valores corresponden al tiempo inicial, 2 y 4 h de exposición a 150, 60 y 1.5 W m⁻² de PAR, RUV-A y RUV-B, respectivamente, bajo un simulador solar. Los cultivos expuestos fueron previamente expuestos a radiación natural durante 5 días a 15°C (A) o 20°C (B) o mantenidos en un incubador a 15°C (C) o 20°C (D). Los valores fueron calculados como el promedio de dos réplicas. Las barras representan la mitad del rango de las medias (*half mean range*).

4.4 DISCUSIÓN

Estos experimentos enfocaron en los efectos combinados de la radiación y de la temperatura a mediano plazo (días) sobre la fotosíntesis (estudiada por medio de la fluorescencia de la clor *a* del PSII), como así también en la evaluación de algunos mecanismos de protección y evasión de tres especies pertenecientes a diferentes Phyla: el dinoflagelado *Proorocentrum micans*, la clorofita *Dunaliella salina* y la primnesiofita *Isochrysis galbana*. Como era esperable, los resultados resaltan la especie-especificidad de las respuestas de las especies estudiadas. Sin embargo, se observaron algunos patrones generales de respuesta: todas las especies de estudio fueron inhibidas por la radiación solar, como se observa en la disminución del Y al mediodía y la recuperación a la mañana durante todos los días de exposición y en general fueron beneficiadas por el aumento de la temperatura, contrarrestando de manera parcial el efecto inhibitorio de la radiación solar sobre la fotosíntesis (Figs. 4.3 y 4.4). Sin embargo, cada especie presentó una respuesta de fotoaclimatación particular a lo largo de los días de exposición a la radiación solar. Uno de los parámetros indicadores del ajuste del PSII a la exposición a mediano plazo, el $\Delta(Y_{8h} - Y_{13h})$, varió de manera marcada entre las tres especies: en *P. micans* disminuyó, y en *D. salina* e *I. galbana* se mantuvo constante (Fig. 4.5). En forma similar, y en estudios realizados con distintas especies de dinoflagelados y diatomeas, Marcoval et al. (2007) observaron diversas respuestas: el descenso del Y al mediodía ($\Delta(Y_{8h} - Y_{13h})$) disminuyó en las dos especies de dinoflagelados, *Heterocapsa triquetra* y *P. micans*, de manera más pronunciada en la última especie, mientras que las diatomeas *Chaetoceros gracilis* y *Thalassiosira fluviatilis* esta disminución fue menor, y en diferente grado de acuerdo a los tratamientos de radiación.

Asimismo, este estudio demuestra que la proporción de inhibición del PSII debida a la RUV fue diferente entre especies: *P. micans* presentó menor proporción de inhibición del PSII por RUV (Fig. 4.6 A) mientras que en *D. salina* e *I. galbana* la RUV produjo una mayor proporción de dicha inhibición que fue similar entre *D. salina* e *I. galbana* durante las horas de máxima inhibición (mediodía), pero mientras que en *D. salina* este efecto llegó a valores cercanos a cero en las horas de recuperación, en *I. galbana* sólo disminuyó a aproximadamente un 80 y 40% bajo temperatura *in situ* y aumentada respectivamente (Fig. 4.6 B-C). Lo anterior indica que *P. micans* muestra una mayor resistencia a la RUV y mejor

aclimatación a las condiciones de radiación, mientras que las otras dos especies son más sensibles a la RUV y responden con mecanismos de fotoprotección que no son lo suficientemente efectivos como para mejorar la respuesta fotoquímica (*D. salina*) o que el daño del PSII no puede ser contrarrestado por dichos mecanismos (*I. galbana*). De hecho, las respuestas observadas en este estudio reflejan el balance entre daño / inhibición y reparación / mecanismos de aclimatación en cada una de las especies. Algunos estudios han demostrado la mayor tolerancia a la RUV de especies de dinoflagelados (Demers et al., 1991; Marcoval et al., 2007) y la alta sensibilidad de *I. galbana* en comparación con especies de diatomeas, clorofitas y otros grupos de flagelados (Montero et al., 2002 a-b). En parte, la mayor resistencia a la radiación es debida a distintos mecanismos de aclimatación, los cuales varían entre taxones y/o especies: en dinoflagelados, la síntesis de compuestos que absorben en la RUV (principalmente MAAs) es uno de los mecanismos de fotoprotección más importante. En efecto, los dinoflagelados es uno de los grupos de fitoplancton donde se ha reportado mayor cantidad y diversidad de estos compuestos fotoprotectores (Llewellyn & Airs, 2010). En lo que respecta, Marcoval et al. (2007) reportan que las especies de dinoflagelados *H. triquetra* y *P. micans* expuestas a radiación natural logran un mejor rendimiento fotoquímico frente a la RUV que las diatomeas *T. fluviialis* y *C. gracilis*, debido a que el primer grupo sintetiza mayor cantidad de MAAs en comparación a las diatomeas. En este estudio, el dinoflagelado *P. micans* fue la única especie que sintetizó estos compuestos y la que mostró mayor tolerancia a la RUV y una mejor fotoaclimatación durante el experimento, por lo que se considera que es una estrategia de fotoprotección muy eficaz. El bajo impacto de la RUV sobre el PSII de esta especie, podría deberse en parte a la protección de estos compuestos, que permitirían a los dinoflagelados con fototaxis (e.g., *P. micans*, *Gonyaulax poliedra*) permanecer en la superficie en ambientes con altos niveles de RUV, sin necesidad de migrar a capas más profundas de la columna de agua (Vernet et al., 1989).

Sin embargo, no se puede descartar la contribución de otros mecanismos de protección tales como el ciclo de las xantófilas. De hecho, se ha demostrado que el ciclo de las xantófilas fue un mecanismo de fotoprotección efectivo en la diatomea *Thalassiosira weissflogii* expuesta durante varios días a RUV-B (Zudaire et al., 2001) y en especies del género *Dunaliella* (Casper-Lindley y Björkman, 1998; Buma et al., 2009; van de Poll et al.,

2010). Los resultados de este trabajo muestran que este mecanismo (medido a partir del indicador de disipación de calor, NPQ) fue activado de manera continua y sostenida (todos los días con un máximo al mediodía) sólo en *D. salina*. En *P. micans* este mecanismo sólo se activó el primer día, mientras que en *I. galbana* no se observó un patrón regular a lo largo del experimento, y sólo se observó en los tratamientos de mayor estrés. El mecanismo de disipación de energía probablemente cumplió un rol efectivo para *D. salina* en disminuir el estrés durante las horas de mayor incidencia solar, y bajo los tratamientos con RUV, lo que contribuyó a la reducción de la inhibición debido a la RUV a lo largo del experimento. Por otro lado, en *I. galbana*, el balance entre el daño al PSII y la fotoprotección / recuperación fue negativo, es decir, el mecanismo de disipación de calor no fue lo suficientemente efectivo como para prevenir el daño del PSII, especialmente en los tratamientos con mayor estrés.

Tal como fuera observado en estudios de corto plazo (ver Capítulo 3 de esta tesis; Sobrino & Neale, 2007; Villafañe et al., 2013) y en general, el aumento de la temperatura tuvo un efecto positivo sobre la actividad fotoquímica, ya que la respuesta al estrés causado por PAR y/o RUV fue mejor en las células expuestas a temperatura aumentada que a temperatura *in situ*. Esto se explica por el aumento de la actividad metabólica y subsecuente incremento de las tasas de reparación de los componentes del PSII bajo condiciones de temperatura aumentada (Bouchard et al., 2005b), lo que resulta en un balance reparación / daño más positivo. Un análisis más detallado de los efectos de la temperatura, demuestra que existen respuestas especie-específicas: mientras que el aumento de la temperatura no tuvo un efecto significativo en la recuperación de las células de *P. micans*, tuvo un efecto positivo en la recuperación de las células de *D. salina* y de *I. galbana* expuestas al espectro total (RUV+PAR) y a PAR (Figs. 4.3 y 4.4). Además, en este trabajo la interacción de la RUV y la temperatura también muestra una respuesta especie-específica. Sólo *I. galbana* mostró un efecto combinado de estos factores, donde la temperatura contrarrestó en parte los efectos negativos de la RUV (Tabla 4.2). Estos resultados indicarían que los efectos positivos de la temperatura son más evidentes en las células donde se ha producido una mayor proporción de daño i.e., donde los procesos de reparación inducidos por ésta son de fundamental importancia y en menor medida en aquellas que desarrollan estrategias de fotoprotección efectivas.

Por otro lado, es posible que el grado de eficacia de las estrategias de fotoprotección en cada especie esté relacionado con la activación del mecanismo de migración vertical (Barcelo & Calkins, 1978; Leech et al., 2005). Por ello, la migración vertical se evaluó como un mecanismo de evasión, que se activaría en caso de ser necesario, mientras que cuando los mecanismos de fotoprotección fueran lo suficientemente efectivos (fotoaclimatación), la evasión de la radiación por desplazamiento a profundidad no sería tan evidente. La distribución de las células de *D. salina* expuestas previamente a radiación solar indica que estas células no evadieron la radiación de una manera tan pronunciada como aquellas células que no fueron expuestas previamente a radiación solar. El mecanismo de fotoprotección a corto plazo (NPQ), activado de manera constante en las exposiciones prolongadas, puede haber conferido protección a las células en las capas más superficiales, por lo que la estrategia de migración vertical no se hizo tan evidente. Al respecto, Richter et al. (2007) observaron que células de *D. salina* sin fotoaclimatación previa y expuestas a radiación solar, migran a capas más profundas en las horas de máxima irradiancia. Lo anterior indica que, aunque las células de esta especie no son resistentes a la radiación solar y aplican mecanismos de evasión, pueden experimentar un proceso de fotoaclimatación cuando son expuestas durante lapsos de mediano plazo, lo que les permite ser más resistentes a la radiación solar, y no evadir de manera tan pronunciada a ésta. Por otro lado, *I. galbana* migró hacia capas más profundas como mecanismo de evasión a la radiación tanto en las células con aclimatación previa como en aquellas que no fueron expuestas con anterioridad. Este resultado apoya la observación previa de que en general, *I. galbana* no presentó una fotoaclimatación efectiva durante el período de exposición a radiación solar, por lo que aplicó la estrategia de evasión.

En síntesis, del análisis interespecífico realizado se concluye que bajo las condiciones experimentales de este estudio, *P. micans* fue la especie más resistente a la RUV y con más capacidad de fotoaclimatación, mientras que *I. galbana* fue la más sensible. En un contexto de aumento de la temperatura superficial costera, las especies menos resistentes serían beneficiadas y en parte contrarrestarían el efecto negativo de la radiación, mientras que aquellas con capacidad de síntesis de compuestos fotoprotectores no serían tan influenciadas por los cambios de temperatura. En períodos de alta irradiancia y estratificación de la columna de agua, la migración vertical de las especies flageladas

podría representar un mecanismo importante de fotoprotección. Es necesario realizar estudios de mediano plazo que consideren la interacción de la radiación, la temperatura y la mezcla de la columna de agua para comprender de manera más completa las potenciales respuestas de especies del fitoplancton en un escenario de cambio global.

CAPÍTULO 5. Efectos de la RUV a mediano plazo sobre comunidades fitoplanctónicas de la costa Patagónica

Parte de este Capítulo es una traducción al español del trabajo publicado como:

Halac, S.R., V.E. Villafañe, R.J. Gonçalves & E.W. Helbling. 2011. Long term UVR effects upon phytoplankton natural communities of Patagonian coastal waters. En: Atazadeh, I. (ed.). *Remote sensing of biomass: Principles and applications. Book 2*. Intech Open Access Publishers, pp.229-248. [<http://www.intechweb.org>].

5.1 INTRODUCCIÓN

Desde el descubrimiento del “agujero” de ozono sobre el continente Antártico y el consecuente incremento de la radiación ultravioleta B (RUV-B, 280-315 nm), se han realizado numerosos estudios para evaluar el impacto de esta fracción del espectro solar sobre los organismos acuáticos. La radiación ultravioleta (RUV, 280-400 nm) no sólo actúa como un agente de estrés sobre los organismos y ecosistemas en niveles superiores a los normales, sino también dentro de rangos “normales” (ver revisión de Helbling & Zagarese, 2003 y referencias ahí citadas). Varios trabajos acerca del impacto de la RUV sobre especies y comunidades fitoplanctónicas han reportado efectos negativos sobre blancos celulares (e.g., fotosistema II, ADN, proteínas), los cuales afectan los procesos de fotosíntesis y de crecimiento (Vernet 2000; Villafañe et al., 2003). En particular, se ha observado que la RUV puede afectar de manera significativa los parámetros de Fotosíntesis vs Irradiancia (curvas P vs. I) (Furgal & Smith, 1997; Montecino et al., 2001; Villafañe et al., 2004b) por lo que los cálculos de producción primaria a través de sensores remotos podrían sobreestimarla.

Por otro lado, algunos estudios han reportado efectos positivos de la RUV, tales como el aumento de la incorporación de carbono bajo exposición a la RUV-A (315-400 nm) (Nilawati et al., 1997; Barbieri et al., 2002; Helbling et al., 2003). Más aún, las exposiciones a la RUV-A pueden inducir la reparación enzimática del daño producido por la RUV en el ADN, la cual es dependiente de la luz (i.e., fotorreparación, Buma et al., 2003). Además, la RUV puede causar algunos efectos indirectos tales como la ruptura de la materia orgánica disuelta (DOM) por medio de fotólisis o fotodegradación (Osburn & Morris, 2003), lo que puede resultar beneficioso para los organismos al aumentar la disponibilidad de nutrientes, o perjudicial, por el aumento de la transparencia del agua y, por lo tanto, la mayor exposición de las células a la radiación (Cooke et al., 2006). La interacción de la RUV con otros factores e.g., disponibilidad de nutrientes, mezcla vertical, cambios en temperatura, concentraciones sobresaturadas de oxígeno o valores altos de pH, pueden condicionar los efectos observados (Forster & Schubert, 2001; Neale et al., 2003; Beardall et al., 2009 y referencias ahí citadas), en comparación a aquellos observados considerando sólo la RUV. Lo anterior se explica a partir de las interacciones sinérgicas o antagónicas entre la RUV y los factores mencionados (Dunne, 2010). La evaluación de los

efectos combinados de la radiación y de la temperatura es de fundamental importancia debido a que estas dos variables serían las más afectadas en un escenario de cambio global (Häder et al., 2011). Al respecto, varios estudios han demostrado que el aumento de la temperatura bajo exposiciones a la RUV, produce un efecto beneficioso sobre el rendimiento fotosintético de algunas especies de diatomeas, debido al aumento de las tasas de reparación (Sobrino & Neale, 2007). Sin embargo, en un trabajo realizado con cianobacterias, Fiorda Giordanino et al. (2011) encontraron una importante variabilidad inter-específica (con algunas especies que se beneficiaron por el aumento de la temperatura y otras que no presentaron efectos) y estas variaciones se encontraban relacionadas en parte a las diferencias morfológicas entre especies.

A pesar de estos efectos negativos, existen varios mecanismos que permiten al fitoplancton protegerse de la RUV a lo largo de períodos largos de tiempo (días a semanas): a nivel individual, la estrategia más común es la síntesis de compuestos que absorben en RUV, los denominados aminoácidos tipo micosporina (MAAs). Debido a que la máxima absorción de estos compuestos se encuentra entre 310 y 360 nm, tienen el potencial de disminuir la energía de las porciones más dañinas del espectro solar (Banaszak 2003; Korbee et al., 2006). Más aún, los pigmentos carotenoides pueden ser fotoprotectores, disipando el exceso de energía como calor i.e., vía *non-photochemical quenching* (Müller et al., 2001). Otra estrategia de protección común en organismos móviles, es evadir la RUV por migración vertical (Richter et al., 2007). A su vez, algunos organismos tienen la capacidad de reparar el daño producido por la RUV, ya sea sobre la molécula de ADN (Buma et al., 2003) o sobre componentes del fotosistema, en especial sobre la proteína D1 (Anderson & Barber, 1996; Halac et al., 2009). En resumen, el impacto neto de la RUV es el resultado del balance entre la sensibilidad a nivel de especie y comunidad, y la capacidad de aclimatación.

5.1.1 Evaluación de los efectos de la RUV a mediano plazo sobre el fitoplancton

Existen numerosos estudios del efecto a corto plazo de la RUV sobre el fitoplancton (i.e., experimentos de una duración menor a un día, ver Villafañe et al., 2003 y referencias ahí citadas). Sin embargo, no se han realizado tantos trabajos acerca de la respuesta de comunidades fitoplanctónicas en lapsos de tiempo más largos (i.e., días- semanas). Los

estudios de mediano y largo plazo son de fundamental importancia ya que reflejan el resultado no sólo de efectos particulares de la RUV, sino también la potencial fotoaclimatación de los organismos; por ésto, la evaluación del impacto de la RUV a corto plazo, frecuentemente sobreestima estos efectos. Una de las formas de estudiar los efectos de la RUV en períodos de tiempo largos es utilizando “sistemas cerrados” como modelos (denominados *mesocosmos* o *microcosmos*, de acuerdo al tamaño de muestra), en donde un volumen de agua es aislado e incubado bajo condiciones similares a aquellas encontradas en los ambientes naturales (Wängberg et al., 1996). Estos dispositivos facilitan el manejo de condiciones controladas en la incubación de comunidades planctónicas al mismo tiempo que permiten la manipulación de las intensidades de la RUV (i.e., cuando se utilizan fuentes artificiales de RUV) y de la composición espectral (cubriendo los contenedores con diferentes filtros y materiales). Sin embargo, algunas de las limitaciones de estos dispositivos incluyen la imposibilidad de reproducir por completo todas las condiciones naturales e.g., la circulación y mezcla de la columna de agua se encuentran restringidas y los organismos de mayor tamaño, excluidos. Más aún, en estos experimentos la biomasa del fitoplancton tiende a aumentar rápidamente, por lo que a menudo se reproducen las condiciones de *bloom* o floraciones (Belzile et al., 2006 y referencias ahí citadas).

Diversos estudios acerca de los efectos de la RUV a largo plazo sobre comunidades fitoplanctónicas han demostrado que existe una gran variedad de respuestas. Algunos experimentos de exposición natural en mesocosmos mostraron que los efectos de la RUV sobre la concentración de clor *a* fueron muy bajos (Halac et al., 1997; Wängberg et al., 1999; Whitehead et al., 2000). Por otro lado, Forster & Schubert (2001) estudiaron las comunidades fitoplanctónicas del Estuario Darss-Zingst (Mar Báltico) y observaron mayor concentración de clor *a* en muestras de fitoplancton que no recibieron RUV; Keller et al. (1997) reportaron la misma respuesta en comunidades de la Bahía Narragansett. El impacto de la RUV a nivel de comunidades se traduce frecuentemente en cambios de la composición taxonómica hacia especies más tolerantes, o cambios en la distribución de tamaños. Por ejemplo, algunos estudios observaron que el fitoplancton de menor tamaño fue favorecido por la exposición a la RUV-B (Wängberg et al., 1999; 2008). De manera similar, Mousseau et al. (2000) reportaron un cambio desde diatomeas a flagelados desnudos pequeños, que ocurrió de manera más rápida bajo condiciones de RUV-B

aumentada en comparación a niveles naturales de esta radiación. Las variaciones de la estructura de la comunidad producidas por la RUV pueden resultar en un impacto importante para todo el sistema acuático, ya sea alterando la estructura de la red trófica, debido a diferencias en la sensibilidad específica a la RUV, o afectando la distribución del carbono y los ciclos de nutrientes en el ecosistema (Mostajir et al., 1999; Sommaruga, 2003).

5.1.2 ¿Por qué estudiar los efectos de la RUV sobre las comunidades fitoplanctónicas de la Patagonia?

Los efectos de la RUV a nivel ecológico han sido documentados de manera más exhaustiva en la región Antártica desde el descubrimiento del “agujero” de ozono. Estudios posteriores indicaron que la disminución del ozono se ha expandido hacia latitudes medias (Atkinson et al., 1989), siendo las del hemisferio Sur las más afectadas (Seckmeyer & McKenzie, 1992). Sin embargo, la mayoría de los estudios acerca de los efectos de la RUV sobre el fitoplancton se han realizado en áreas polares, mientras que se han evaluado mucho menos las áreas templadas, entre ellas, la Patagonia (ver la revisión de Gonçalves et al., 2010). La Región Patagónica está ubicada en el extremo sur de Sudamérica, e incluye parte de Argentina y Chile (Fig. 5.1). Cabe destacar que esta región posee características únicas en relación a la RUV: 1.-el área se encuentra ocasionalmente bajo la influencia de masas de aire con menor concentración de O₃ provenientes del vórtice polar Antártico, por lo que experimenta períodos de aumento de los niveles de RUV-B (Villafañe et al., 2001; Helbling et al., 2005); 2.- su gran variabilidad en la nubosidad, desde alta cobertura en los Andes y áreas subpolares, a cielos relativamente despejados en la costa atlántica crean un amplio rango de ambientes en cuanto a la climatología de la RUV; 3.-tiene una alta variabilidad en la naturaleza y características ópticas de los cuerpos de agua (e.g., las surgencias desde aguas profundas en el Pacífico y las aguas con escasa profundidad y muy productivas del Atlántico); 4.- hay vientos de alta velocidad y frecuencia, especialmente durante primavera y verano (Villafañe et al., 2004a; Helbling et al., 2005), lo que condiciona la profundidad de la capa de mezcla superficial (CMS) y por lo tanto las condiciones lumínicas a las que se encuentran expuestos los organismos. Más aún, la evaluación del impacto de la RUV sobre el fitoplancton en la Región Patagónica es esencial ya que estos organismos son

responsables de una gran proporción de la productividad primaria en el Mar Argentino (Lutz et al., 2010) y constituyen la base de una rica red trófica que incluye peces (e.g., merluza, anchoa) (Skewgar et al., 2007) y especies de invertebrados (e.g., langostinos y mejillones) de una gran valor comercial (Caille et al., 1997).

Considerando estos aspectos, en la próxima sección se presenta un caso de estudio y se hace una revisión del conocimiento actual acerca de los efectos de la RUV sobre comunidades, especialmente de la Patagonia, enfocando en aquellos observados en una escala temporal de días a semanas.

5.2 CASO DE ESTUDIO: EFECTOS DE LA RUV SOBRE EL FITOPLANCTON DE BAHÍA ENGAÑO, PATAGONIA, ARGENTINA

El sitio de estudio (Bahía Engaño, Chubut, Argentina) se encuentra ubicado en la costa norte de la Patagonia (Fig. 5.1). En esta área, se han realizado varios estudios sobre los efectos de la RUV sobre las comunidades fitoplanctónicas, en su mayoría destinados a determinar respuestas a corto plazo y en particular relativos a la inhibición de la incorporación de carbono y a la fotoinhibición (e.g., ver Barbieri et al., 2002; Villafañe et al., 2004a,b; Villafañe et al., 2008; Helbling et al., 2010); por otro lado, hay escasos estudios realizados para determinar los efectos de la RUV a largo plazo, algunos de ellos enfocados en la combinación de la RUV con el agregado de nutrientes (Helbling et al., 2005; Marcoval et al., 2008). Los resultados presentados en este trabajo tienen el objetivo de explicar aspectos de la sensibilidad de la RUV y de la fotoaclimatación del fitoplancton de la Patagonia, que se manifiestan en períodos de tiempo más largos, enfocando especialmente en propiedades de la comunidad tales como crecimiento global, abundancia, composición taxonómica y distribución de tamaños.

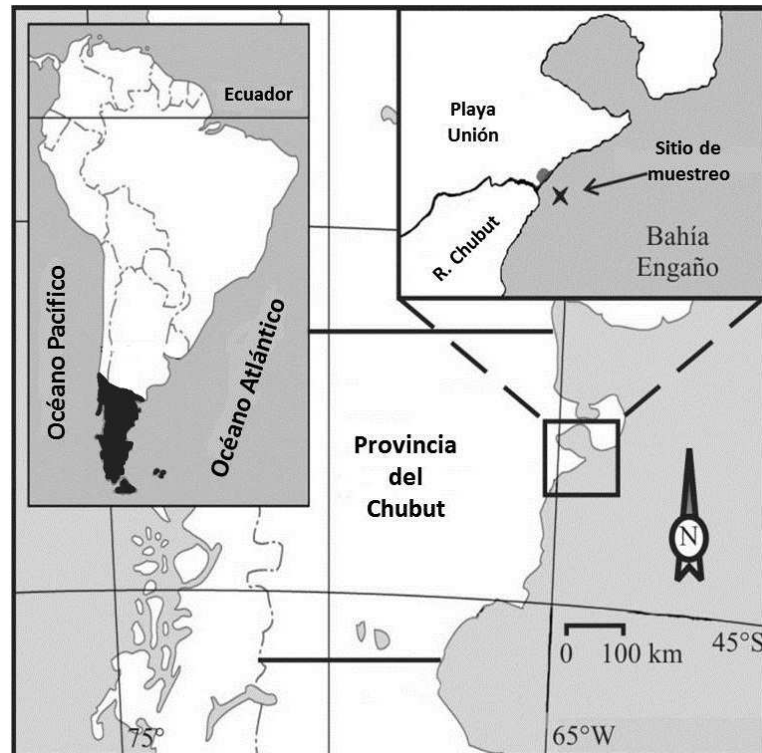


Figura 5.1. Ubicación del sitio de estudio donde se muestra la Patagonia (área sombreada) y la posición relativa de la Provincia del Chubut. La zona de muestreo y localidad donde se realizaron los experimentos de microcosmos (Playa Unión, 43° S, 65° O) se señalan en el recuadro superior derecho.

Los experimentos fueron llevados a cabo con muestras naturales de fitoplancton colectadas en el área las cuales fueron incubadas bajo radiación solar durante el verano austral de 2010. Las incubaciones se realizaron en 2 microcosmos (denominados MI y MII) durante los períodos del 5-11 de Febrero (MI) y del 15-21 de Febrero (MII). El arreglo experimental consistió en la exposición de muestras naturales de fitoplancton en bolsas transparentes a la RUV de 25 L de capacidad (microcosmos) bajo tres condiciones de radiación diferentes: (a) PAB, 280-700 nm (muestras que recibieron PAR + RUV-A + RUV-B); (b) PA, 320-700 nm (muestras que recibieron PAR+RUV-A) y (c) P, 400-700 nm (muestras que recibieron sólo PAR). Los microcosmos de cada tratamiento de radiación, fueron colocados por duplicado en un tanque (3 m de diámetro x 1 m de profundidad), con circulación de agua como control de temperatura y expuestos a radiación solar durante 7 días. Diariamente, se colectaron muestras de cada bolsa (primeras horas de la mañana) para realizar análisis de *clor a* y MAAs, mientras que las muestras para el estudio de la composición taxonómica y distribución de tamaños fueron tomadas día de por medio.

Las condiciones de irradiancia durante los experimentos (Fig. 5.2) presentaron un patrón característico del área durante la estación de verano, con valores relativamente altos al mediodía y bajos durante las primeras horas de la mañana y las últimas de la tarde; asimismo, la presencia de nubosidad resultó en una alta variabilidad de la irradiancia diurna (Helbling et al., 2005). Los valores máximos de PAR fueron similares a lo largo del experimento ($\sim 440\text{-}460 \text{ W m}^{-2}$; Fig. 5.2 A) así como para RUV-A ($\sim 60 \text{ W m}^{-2}$; Fig. 5.2 B) y RUV-B ($\sim 2 \text{ W m}^{-2}$; Fig. 5.2 C), a excepción del segundo día del MII donde tanto la PAR como la RUV fueron muy bajos (e. g., ~ 100 , 17 y $0,6 \text{ W m}^{-2}$ para PAR, RUV-A y RUV-B, respectivamente; Figs. 5.2 A-C). Los valores altos de irradiancia en combinación con períodos diurnos largos, resultan en dosis altas de radiación (Helbling et al., 2005) las cuales son similares a aquellas registradas en ambientes tropicales (Gao et al., 2007). Debido a que las muestras de fitoplancton fueron expuestas a altas dosis de irradiancia bajo una capa delgada de agua, los resultados representan el “peor escenario” i.e., como si las células estuvieran en la superficie del agua, sin posibilidades de moverse hacia capas más profundas, donde pudieran recibir niveles de radiación más bajos.

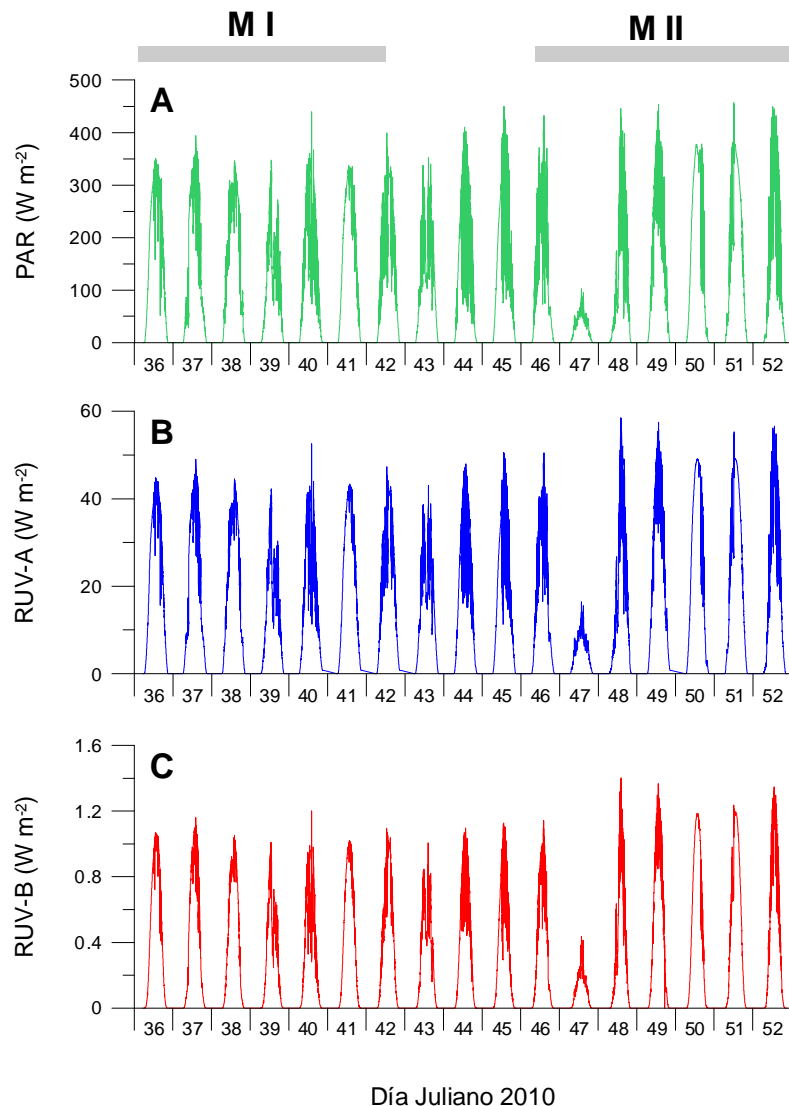


Figura 5.2. Radiación solar incidente en la localidad de estudio durante los experimentos llevados a cabo en los períodos: 5-11 de Febrero (Días Julianos 36-42), (MI); y 15-21 de Febrero (Días Julianos 46-52), (MII). La irradiancia (en $W m^{-2}$) se muestra para: A) PAR, 400-700 nm B) RUV-A, 315-400 nm y C) RUV-B, 280-315 nm. La radiación solar fue continuamente monitoreada usando un radiómetro de banda ancha (ELDONET, Real Computers, Möhrendorf, Alemania, Häder et al., 2007) instalado de forma permanente en el techo de la Estación de Fotobiología Playa Unión.

La temporada en la que se realizó el muestreo (verano), es considerada en el área una época de *post bloom* (Villafañe et al., 2008) por lo que, al principio de cada experimento, y con el fin de evitar restricciones en el crecimiento del fitoplancton debido a la disponibilidad de nutrientes se agregó, a cada bolsa de incubación, una solución de nutrientes en una concentración similar a la del medio f/2 (Guillard & Rhyter, 1962). En ambos experimentos, las comunidades fitoplanctónicas mostraron un incremento en la

concentración de clor *a* (Fig. 5.3 A), de la abundancia celular (Fig. 5.3 B) y del carbono autotrófico (Fig. 5.3 C). Algunas de las respuestas observadas fueron: (1) durante los dos experimentos las variables usadas para calcular el crecimiento mostraron un aumento exponencial típico de condiciones de *bloom*, y por lo tanto una respuesta fisiológica óptima; (2) el incremento observado fue similar en ambos experimentos, aunque se registraron diferencias para algunas variables; (3) en general, no se encontraron efectos debidos a la RUV (a excepción de algunos casos) durante ninguno de los experimentos o variables medidas.

La Tabla 5.1 resume los resultados acerca del aumento de las poblaciones naturales de fitoplancton, calculado a partir de las tasas de crecimiento (μ) durante ambos experimentos. El crecimiento rápido observado durante las exposiciones, probablemente se debió al agregado de nutrientes y a la baja turbulencia dentro de las bolsas de incubación, tal como fue observado en otros estudios de largo plazo con comunidades fitoplanctónicas del área (Helbling et al., 2005; Marcoval et al., 2008). Como se mencionó anteriormente, un resultado común de las incubaciones a largo plazo es la ausencia de efectos de la RUV sobre el crecimiento y la biomasa, lo que se observó también en este estudio (i.e., diferencias no significativas entre tratamientos de radiación, Tabla 5.1 y Fig. 5.3).

Tabla 5.1. Tasas de crecimiento (μ ; d^{-1}) durante los experimentos MI y MII, determinadas a partir de mediciones de clor *a*, concentración celular y estimaciones de carbono autotrófico.

	Clor <i>a</i>		Concentración celular		Carbono autotrófico	
	PAB	P	PAB	P	PAB	P
Microcosmos I	0,76±0,01	0,76±0,06	0,88±0,09	0,79±0,04	0,84±0,14	0,75±0,15
Microcosmos II	0,94±0,02	0,90±0,03	0,73±0,08	0,73±0,11	0,70±0,07	0,76±0,03

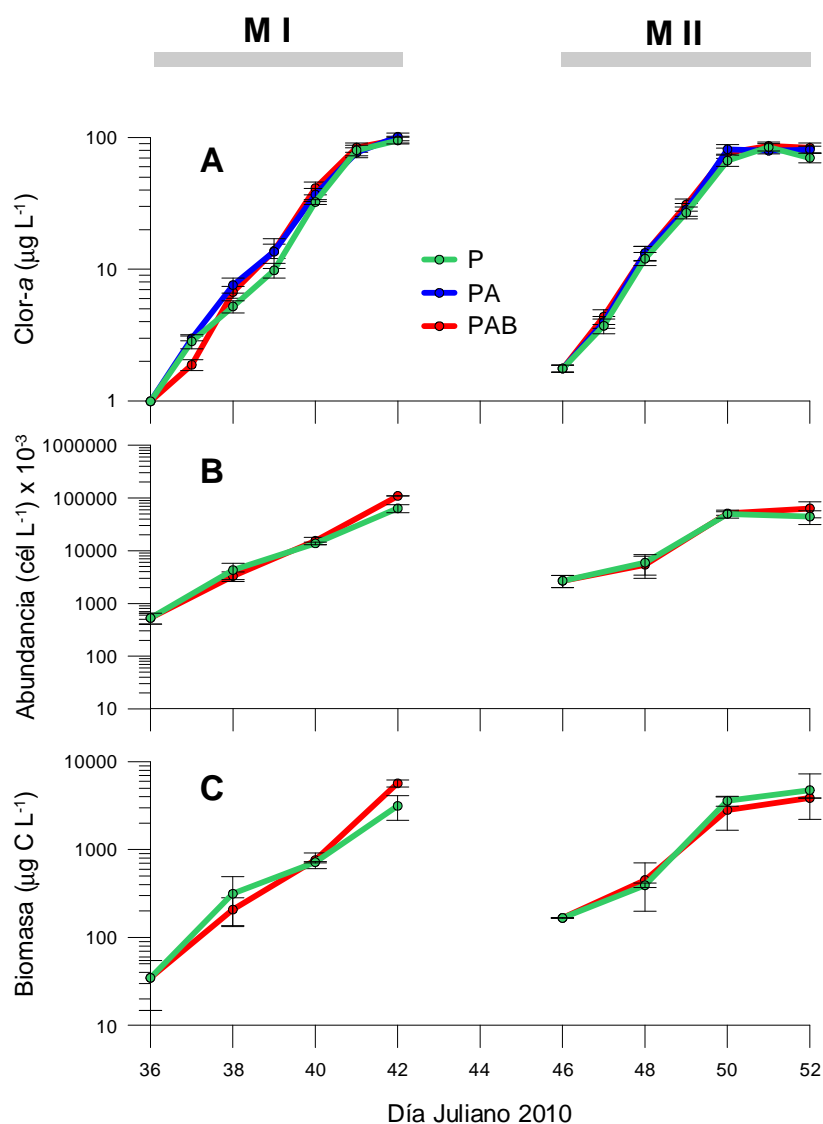


Figura 5.3. Crecimiento de las comunidades fitoplanctónicas durante los experimentos MI y MII en base a: A) contenido de clorofila *a* (clor *a*; medido por técnicas fluorométricas y espectrofotométricas, Holm-Hansen & Riemann, 1978; Porra, 2002); B) concentración celular (cuantificada por microscopía óptica; Villafañe & Reid, 1995; y C) contenido de carbono autótrofo (considerando los biovolúmenes de acuerdo a Hillebrand et al., 1999 y la posterior transformación a contenido de carbono según Strathmann, 1967). Los tratamientos de radiación se muestran con diferentes colores. Las líneas verticales en los símbolos indican la mitad del rango de las medias (*half mean range*). Nótese las escalas diferentes para cada variable presentada.

Dentro de los estudios que reportan ausencia de efectos de la RUV sobre el crecimiento en comunidades de la Patagonia, se puede mencionar al de Roy et al. (2006) que trabajó con comunidades fitoplanctónicas del Canal de Beagle (Tierra del Fuego) y observaron cambios menores en la biomasa debido a la RUV-B (tanto bajo niveles

normales como aumentados), aún cuando el incremento de la RUV-B fue muy acentuado (i.e., simulando una disminución de O₃ del 60%). Sin embargo, Hernando et al. (2006) encontraron un efecto significativo de la RUV en el crecimiento de las comunidades fitoplanctónicas solo cuando las muestras fueron expuestas a la radiación solar en profundidades fijas, en contraste con las condiciones de simulación de mezcla dentro de los mesocosmos descrita por Roy et al. (2006). Asimismo, Helbling et al. (2005) y Marcoval et al. (2008) concluyeron que existe una variabilidad en la inhibición del crecimiento debido a la RUV en las comunidades naturales de la costa de Chubut, bajo diferentes condiciones de disponibilidad de nutrientes, siendo más sensibles a la RUV las muestras con baja concentración en comparación a aquellas con adición de los mismos. En base a lo anterior, se considera que la RUV por sí sola no es un factor inhibitorio del crecimiento de las comunidades fitoplanctónicas de la Patagonia, pero puede causar importantes efectos cuando se combina con otros factores de estrés (e.g., disponibilidad de nutrientes, condiciones de mezcla).

Otro de los resultados observados en relación al crecimiento, en un primer análisis, fueron las respuestas similares entre los experimentos, no sólo debidas a condiciones de irradiancia similares (Fig. 5.2), sino a las comunidades utilizadas en ambos experimentos (i.e., composición taxonómica inicial similar). En efecto, al inicio de todos los experimentos, las comunidades fueron dominadas en abundancia por los flagelados (e.g., clorófitas y criptófitas), y en menor medida por diatomeas (*Thalassiosira* spp., *Nitzschia longissima*); por otro lado, la abundancia de dinoflagelados (e.g., *Prorocentrum micans*, especies atecadas no identificadas) fue muy baja. Lo anterior coincide con trabajos previos desarrollados en la zona, que demuestran la dominancia de flagelados durante el verano (Villafañe et al., 2004a; Villafañe et al., 2008). Sin embargo, es evidente que existieron algunas diferencias entre las tasas de crecimiento calculadas a partir de diferentes variables, así como al comparar los distintos experimentos. Por ejemplo, durante MI, la μ basada en la concentración de clor *a* fue menor que aquellas provenientes de la abundancia celular y el carbono autotrófico, mientras que en MII ocurrió lo opuesto. El incremento más lento (durante MI) o más rápido (durante MII) de la clor *a* en relación a las otras dos variables, sugiere una fotoaclimatación diferencial de las comunidades a medida que fueron progresando los experimentos. Lo anterior puede deberse a razones diferentes: por un lado,

mientras la comunidad crecía, el autosombreado podría hacerse más importante, por lo que la concentración de clor *a* por célula aumentaría para continuar con la captura eficiente de fotones y, por ende el mantenimiento del crecimiento exponencial. Lo anterior puede lograrse por medio de cambios en el tamaño celular, ya que las células más pequeñas (con mayor proporción área/ volumen) necesitan menos concentración de clor *a* por célula en comparación a las células grandes (Falkowski, 1981). Por otro lado, un aumento en el tamaño celular, con células más grandes hacia el final de la fase exponencial de crecimiento, tiene como consecuencia una menor proporción área / volumen y por lo tanto el requerimiento de mayores concentraciones de clor *a* por célula. En efecto, los resultados de este trabajo, muestran ambas situaciones, ya que la proporción C/clor *a* (un indicador de aclimatación a la luz) aumentó en MI y disminuyó en MII, mientras que lo inverso ocurrió con la concentración de clor *a* por célula hacia el final de la fase exponencial (Tabla 5.2). En los siguientes párrafos se discuten cómo los cambios en tamaño celular y composición taxonómica podrían haber contribuido a los patrones observados y a la variabilidad entre los experimentos.

Tabla 5.2. Promedio (y la mitad del rango de las medias) del cociente entre carbono y clor *a* (en $\mu\text{g C. } \mu\text{g clor } a^{-1}$) y de la concentración de clor *a* por célula (en pg) al principio (T_0) y al final (T_f) de los experimentos.

	C / clor <i>a</i>		Concentración de clor <i>a</i> por célula	
	PAB	P	PAB	P
MI - T_0	35 ± 5	35 ± 5	1,87 ± 0,45	1,87 ± 0,45
MI - T_f	58,8 ± 3,1	33,2	0,88 ± 0,33	1,48
<hr/>				
MII - T_0	94,6 ± 0,9	94,6 ± 0,9	0,65±0,18	0,65 ± 0,18
MII - T_f	37 ± 13	53,8 ±15,7	1,49±0,07	1,33 ± 0,02

Con el fin de estudiar los cambios en el tamaño celular en cada tratamiento, se registraron imágenes digitales de cada muestra y se analizó la distribución de tamaños (área) de las células desde el principio al final de la fase exponencial de crecimiento. El

espectro de tamaños de los datos indica que en ambos experimentos la mayoría de las comunidades fitoplanctónicas (> 60%) fueron dominadas por células pequeñas con un área < 100 μm^2 (Figs. 5.4 A y C). Se observó un aumento en la frecuencia acumulada de tamaños en el rango de 65-395 μm^2 en todos los tratamientos de radiación de MI (Fig. 5.4 B) donde el cambio fue más pronunciado en el tratamiento P. En cambio, durante MII (Fig. 5.4 D) la respuesta fue ligeramente distinta: las muestras bajo el tratamiento P no experimentaron cambios de tamaño, pero sí aquellas bajo PAB, que aumentaron sus áreas dentro del rango de 85-395 μm^2 . Aunque otros autores han reportado que las células pequeñas dominan las comunidades fitoplanctónicas después de exposiciones a la RUV (Mostajir et al., 1999) en el presente trabajo, la distribución de tamaños final podría haber sido fuertemente afectada por las condiciones iniciales en cada microcosmos. Asimismo, no se pueden omitir los efectos de depredadores (i.e., microplancton heterotrófico). De manera similar a lo concluido acerca de la falta de efectos de la RUV sobre el crecimiento, se puede especular que la RUV por sí sola no ocasiona efectos evidentes en la distribución de tamaños, sino que la composición taxonómica inicial es uno de los factores determinantes en el potencial efecto del PAR y de la RUV sobre la estructura de la comunidad planctónica. Asimismo, las determinaciones por microscopía óptica indican que ocurrieron cambios de tamaño celular a lo largo de los experimentos. Por ejemplo, la biomasa correspondiente a la fracción de nanoplancton (células < 20 μm de diámetro) aumentó más rápidamente que la de microplancton (> 20 μm) en MI (Fig. 5.5 A), mientras que en MII ocurrió lo contrario (Fig. 5.5 B). Además, se observó una reducción de la biomasa del microplancton desde el T_0 hacia el final de los experimentos (Fig. 5.5 C) como era de esperarse a partir del cambio hacia células más pequeñas en MI (Fig. 5.4 B). Sin embargo, esta disminución fue más marcada en MI que en MII, lo que resulta en una mayor contribución del microplancton a la biomasa total en MII que en MI (Fig. 5.5 C).

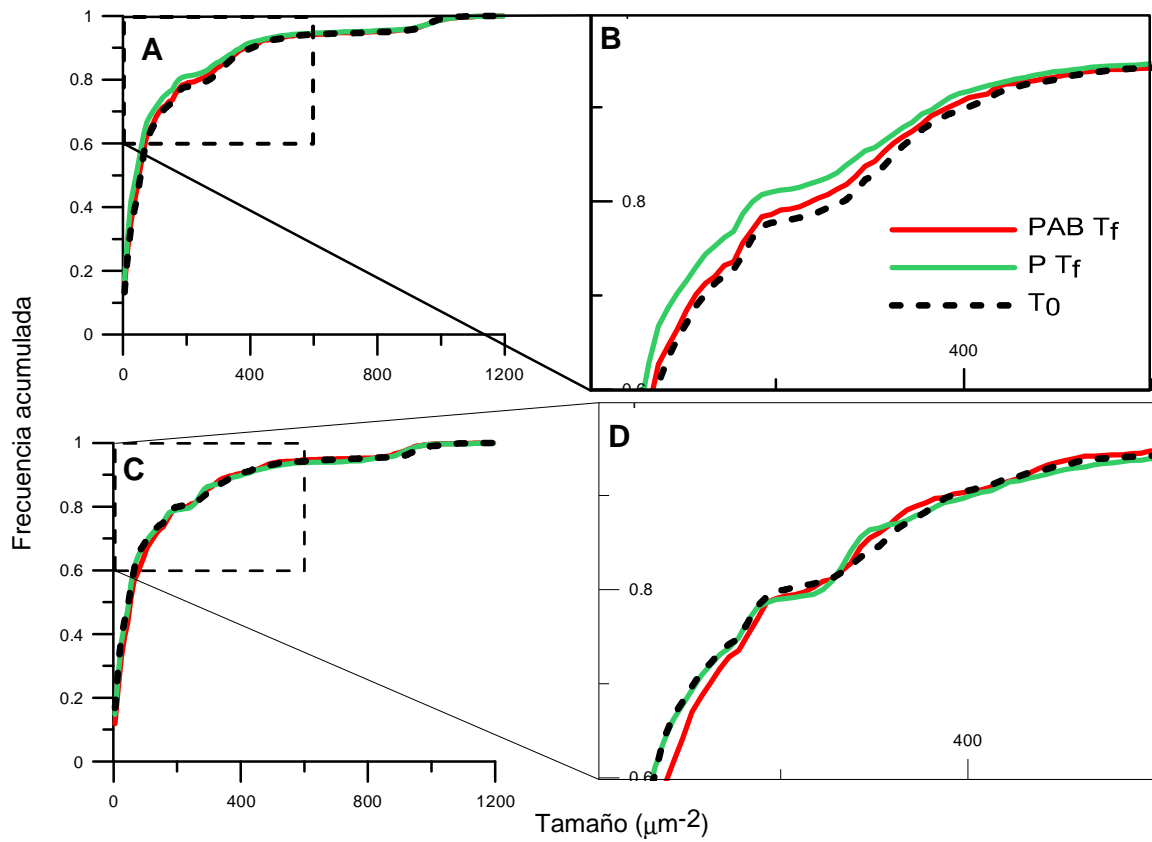


Figura 5.4. Frecuencia acumulada de tamaños (en μm^2) al principio (T_0) y al final de la fase exponencial de crecimiento para MI (A) y MII (C). En (B) y (D) se muestra una vista detallada de los rangos de tamaño donde se observaron diferencias. Los tratamientos de radiación se muestran en diferentes colores: P, verde y PAB, rojo. La distribución de tamaños fue evaluada en muestras fijadas con formalina a partir de fotografías tomadas en un microscopio invertido; las imágenes fueron analizadas usando el software Image J (Abramoff et al., 2004).

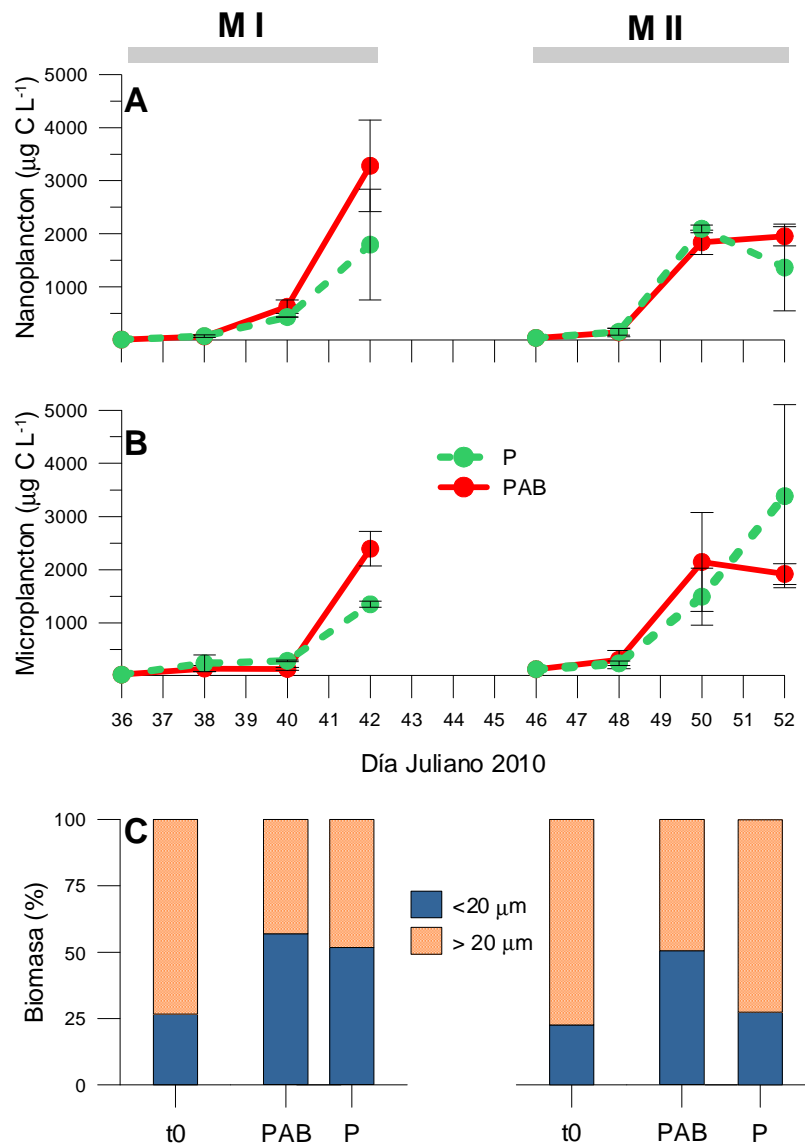


Figura 5.5. Carbono autotrófico (en $\mu\text{g C L}^{-1}$) de las clases de tamaño del fitoplancton: A) nanoplancton ($< 20 \mu\text{m}$) y, B) microplancton ($\geq 20 \mu\text{m}$). C) contribución relativa del nanoplancton y microplancton (%) al carbono autotrófico total al principio (T_0) y al final de los experimentos MI y MII. Los tratamientos de radiación y las clases de tamaño se muestran con diferentes colores: verde, P y rojo, PAB; microplancton (naranja) y nanoplancton (azul). Las líneas verticales en los símbolos indican la mitad del rango de las medias (*half mean range*).

Aunque los cambios en la distribución de tamaños y biomasa ocurren a nivel específico, están normalmente asociados a cambios en la composición taxonómica de las comunidades hacia grupos más resistentes o mejor aclimatados. De hecho, los efectos de la RUV más evidentes (en comparación a muestras en las que se excluye la RUV) durante períodos de tiempos largos, son los cambios taxonómicos producidos en la comunidad, los

cuales actúan como mecanismos de fotoaclimatación. Numerosos autores han reportado dicho efecto en experimentos de largo plazo (ver revisión de Villafañe et al., 2003), pero en particular para el área de la Patagonia, Hernando et al. (2006) trabajando con comunidades fitoplanctónicas del Canal de Beagle observaron cambios desde aquellas co-dominadas por fitoflagelados y diatomeas al comienzo de los experimentos hacia un aumento progresivo de euglenofitas, especialmente bajo condiciones estáticas de la columna de agua. Con el objetivo de investigar estos cambios, en la Fig. 5.6 se muestra la contribución de los tres grupos taxonómicos principales, diatomeas (centrales y pennadas), flagelados y dinoflagelados.

En general, no se observaron efectos de la RUV sobre las diatomeas en ninguno de los dos experimentos (Fig. 5.6 A), mientras que en los flagelados (Fig. 5.6 B) y dinoflagelados (Fig. 5.6 C) se observaron diferencias significativas entre los tratamientos de radiación. Por ejemplo, el carbono autotrófico en flagelados fue afectado de manera negativa por la RUV, resultando en valores significativamente más bajos en muestras que recibieron RUV (tratamiento PAB) en comparación a aquellas que fueron expuestas sólo a PAR (tratamiento P). Por el contrario, en dinoflagelados, el carbono autotrófico fue mayor en las muestras que recibieron RUV. Estudios previos (Hernando & San Román, 1999; Hernando et al., 2005) encontraron resultados similares en relación a la sensibilidad de los flagelados. En el caso de los dinoflagelados, su respuesta parece estar más relacionada al tamaño, tal como lo demostraron Helbling et al. (2008), que observaron que las especies más grandes (e.g., *Prorocentrum micans*, diámetro medio de 50 μm) son menos sensibles que aquellos de menor tamaño (*Gymnodinium chlorophorum*, 5 μm y *Heterocapsa triquetra*, 20 μm).

Sin embargo, en este trabajo se observó un aumento progresivo de la biomasa de las diatomeas (centrales y pennadas) (Fig. 5.6 A), siendo las centrales las que contribuyeron a la mayor proporción de la comunidad al final de los experimentos, en comparación a los flagelados (Fig. 5.6 B) y dinoflagelados (Fig. 5.6 C). Este incremento diferencial del carbono autotrófico causó un cambio en la composición taxonómica, que pasó de una comunidad dominada por los flagelados a una dominada por las diatomeas (Fig. 5.7). Cabe destacar que al principio de los experimentos, la contribución de las diatomeas a la abundancia y biomasa totales fue muy pequeña (Figs. 5.6 y 5.7), y estuvieron representadas

principalmente por *Thalassiosira* spp., *Nitzchia longissima*, *Skeletonema costatum*, *Asterionellopsis glacialis* y especies no identificadas de diatomeas pennadas, entre otras. Sin embargo, hacia el final de los experimentos, las diatomeas centrales contribuyeron al 75% y 66% del total de carbono autotrófico (MI y MII, respectivamente). Al final de MI, en ambos tratamientos de radiación, las comunidades fueron dominadas casi por completo por *Thalassiosira* spp., de un tamaño de 10-20 μm (Fig. 5.8). En cambio, en MII ocurrió una co-dominancia de *Thalassiosira* spp. de 10-20 μm y especímenes de mayor tamaño ($>20 \mu\text{m}$).

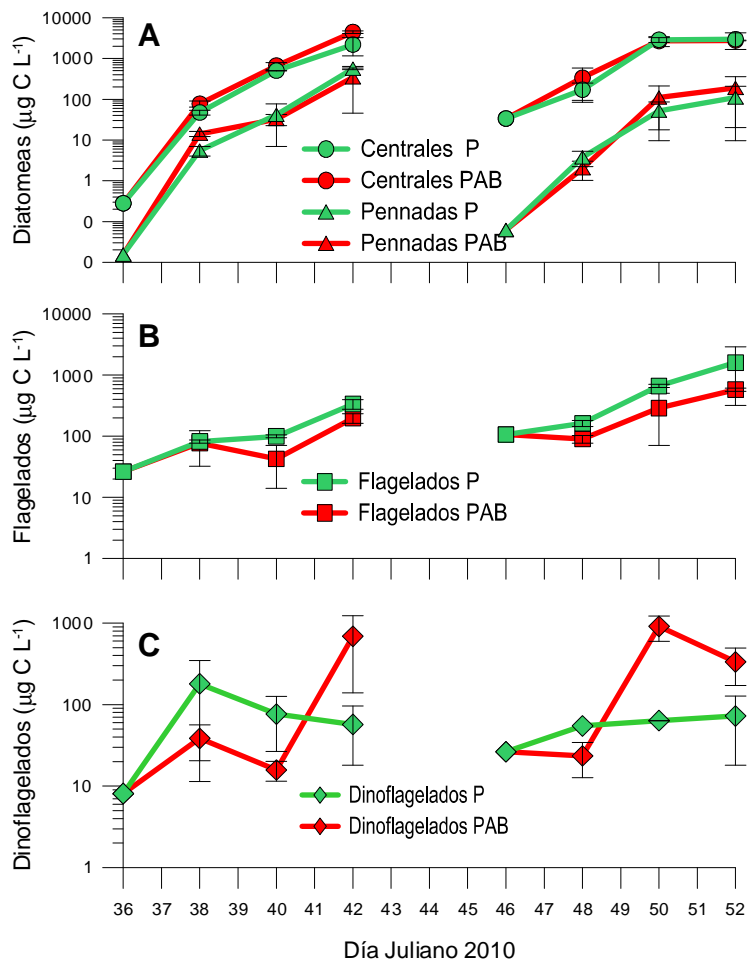


Figura 5.6. Carbono autotrófico (en $\mu\text{g C L}^{-1}$) de: A) diatomeas, B) flagelados y, C) dinoflagelados durante los experimentos MI y MII. Los tratamientos de radiación se muestran con diferentes colores: verde, P y rojo, PAB; las líneas diferentes en el panel A indican la contribución de diatomeas centrales (líneas continuas) y diatomeas pennadas (líneas discontinuas). Las líneas verticales en los símbolos indican la mitad del rango de las medias (*half mean range*).

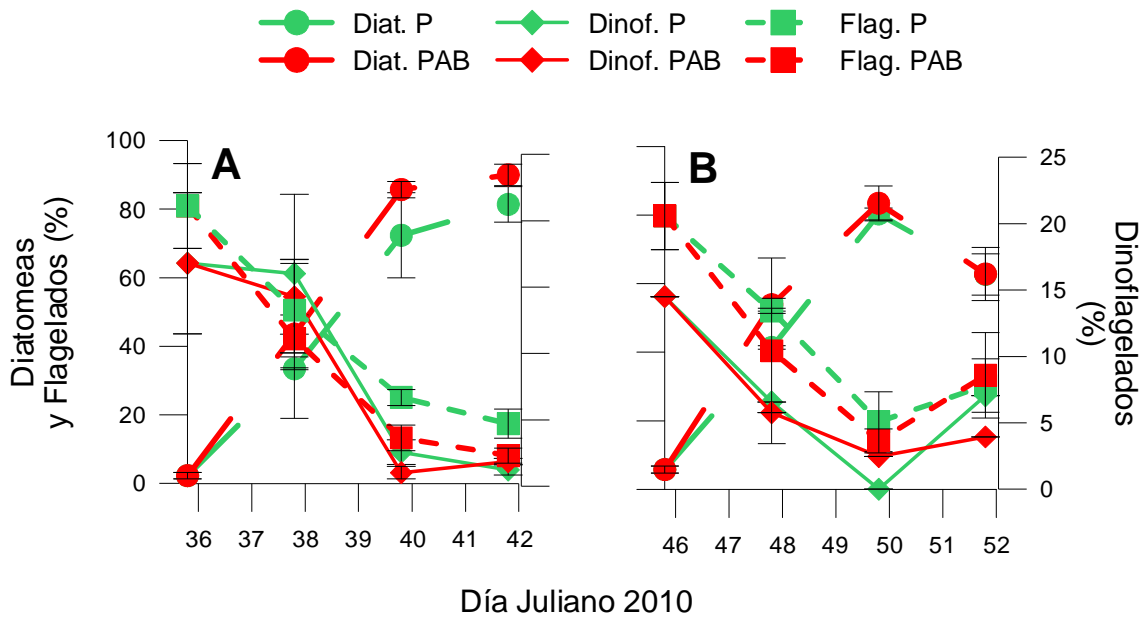


Figura 5.7. Carbono autotrófico de diatomeas, flagelados y dinoflagelados durante los experimentos MI y MII. Los tratamientos de radiación se muestran en colores diferentes: verde, P y en rojo, PAB; los grupos taxonómicos se identifican según la leyenda. Las líneas verticales en los símbolos indican la mitad del rango de las medias (*half mean range*).

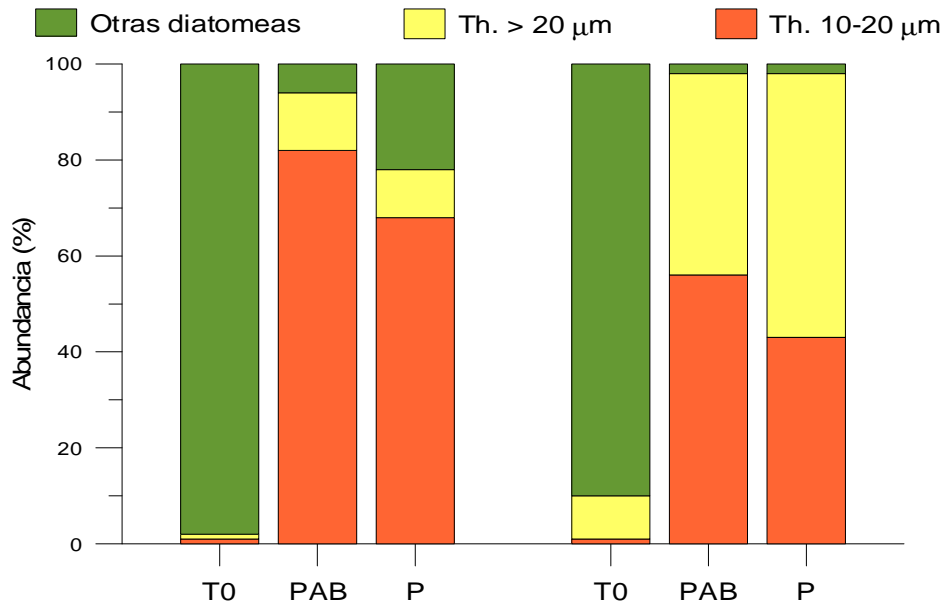


Figura 5.8. Contribución relativa de diatomeas al total del carbono autotrófico al principio (T₀) y al final de los experimentos. Se muestran las clases de tamaño de *Thlassiosira* (Th.) en diferentes colores: > 20 μm (amarillo), 10-20 μm (naranja); las otras diatomeas se muestran en verde.

En base a los resultados descriptos, se pueden obtener conclusiones a partir de: (1) los cambios en el tamaño celular (y en consecuencia aquellos en la biomasa, concentración de clor *a* por célula, etc.) y (2) el cambio en composición taxonómica hacia una comunidad dominada por diatomeas centrales. Aunque los cambios mencionados representan mecanismos de aclimatación, existen otros alternativos para hacer frente a la RUV e irradiancias altas. Uno de estos mecanismos es, como se mencionó previamente, la síntesis de compuestos que absorben en la RUV (principalmente aminoácidos tipo micosporina, MAAs). En general, se han detectado concentraciones muy bajas de estos compuestos en las comunidades fitoplanctónicas de la Patagonia (Barbieri et al., 2002; Villafañe et al., 2004a, c; Marcoval et al., 2008) pero algunas especies e.g., el dinoflagelado *Prorocentrum micans* posee la capacidad de sintetizar grandes cantidades de estos compuestos después de una exposición prolongada a la radiación solar (Marcoval et al., 2007; Helbling et al., 2008). Asimismo, se ha demostrado que algunas diatomeas pueden producir estos compuestos (Lagunas et al., datos no publicados). Se sabe que la producción de MAAs es más efectiva en células grandes que en especies pequeñas, donde su síntesis es muy costosa y desventajosa en términos osmóticos (García-Pichel, 1994). Además, algunos autores demostraron que las diatomeas centrales tienen la capacidad de producir cantidades significativas de estos compuestos después de períodos de exposición a RUV, mientras que lo anterior no se observó en diatomeas pennadas (Helbling et al., 1996). En este caso, no se notan cambios significativos en la concentración de MAAs durante MI (datos no mostrados), probablemente debido a la dominancia de diatomeas pequeñas durante el experimento (Fig. 5.8). Por el contrario, durante MII ocurrió un incremento significativo de los compuestos que absorben en RUV en relación a la concentración de clor *a* (Fig. 5.9). Este aumento no mostró diferencias entre los tratamientos de radiación (Fig. 5.9 B), sugiriendo que todas las longitudes de onda del espectro solar promueven la síntesis de estos compuestos, lo que fue observado anteriormente en diatomeas antárticas (Helbling et al., 1996). Una posible explicación es que la radiación natural incluye tanto PAR como RUV, por lo que cualquiera de estas dos fracciones del espectro solar pueden desencadenar la síntesis de MAAs, y de esta manera *Thalassiosira* spp., obtendría protección contra la RUV natural (Helbling et al., 1996). Probablemente, la presencia de MAAs en MII refleja

la mayor proporción de especímenes de *Thalassiosira* grandes durante el experimento (Fig. 5.8) y también de dinoflagelados, aunque en menor proporción (Fig. 5.6 C).

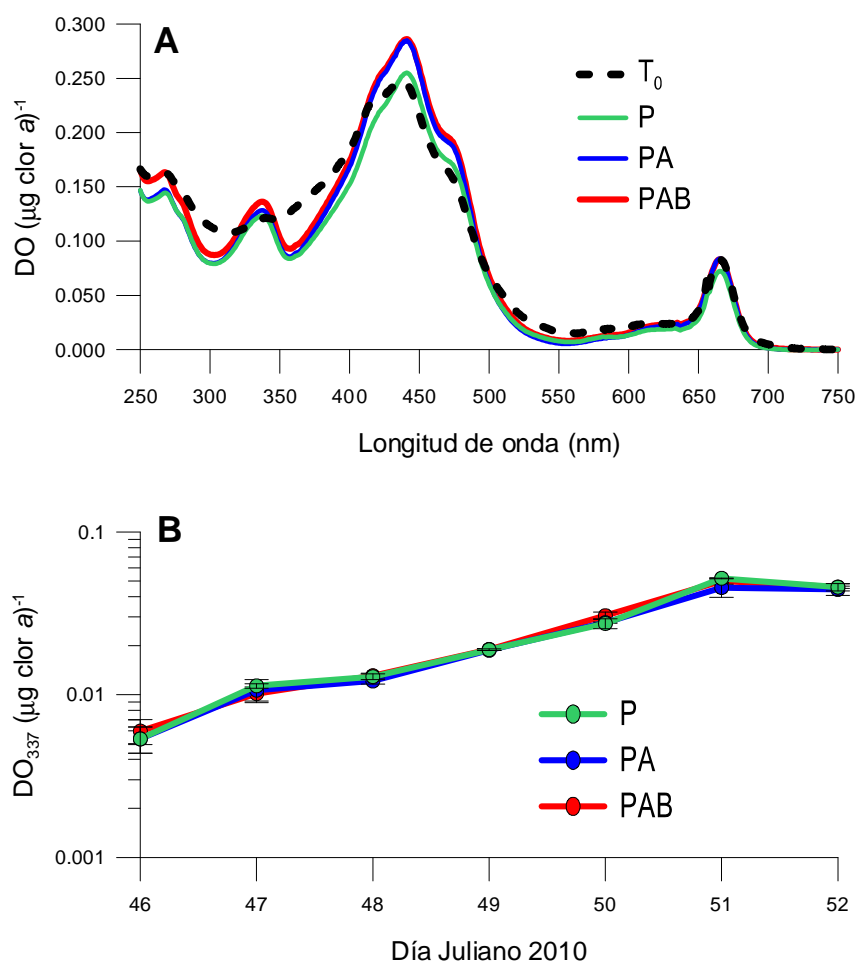


Figura 5.9. A) espectro de absorción al inicio (T_0) y al final del experimento MII; B) compuestos que absorben en la RUV (MAAs) en relación al contenido de clor a (OD_{337} por μg clor a^{-1}) durante el experimento. Los MAAs fueron estimados como se describe en Dunlap et al. (1995). usando la altura del pico a 337 nm. Los tratamientos de radiación se muestran en diferentes colores: P (verde), PA (azul) y PAB (rojo); T_0 se muestra en líneas punteadas.

La eficiencia fotoquímica efectiva del PSII (*yield*, Y) durante los dos experimentos de exposición de mediano plazo se muestra en la Fig. 5.10. Las mediciones se realizaron tres veces por día: mañana, mediodía y tarde. El patrón general durante todos los días de exposición y en los dos períodos de experimentación fue de disminución del Y al mediodía y una recuperación parcial a la tarde y a la mañana del día siguiente. En todos los experimentos, la recuperación del Y no fue completa, es decir, en ningún caso, después del

período de recuperación (tarde-noche), se logró alcanzar los valores de Y del primer día (Y_{10}). Por lo tanto, el Y de la mañana (Y_{7h}) disminuyó a lo largo del tiempo en los dos experimentos (Fig. 5.10). Estos resultados ponen en evidencia que, aunque las comunidades fitoplanctónicas de la Patagonia se encuentran aclimatadas a los altos niveles de radiación del verano, presentan una disminución en su eficiencia fotoquímica a lo largo de exposiciones a mediano plazo. Más aún, el grado de esta disminución puede variar de acuerdo al espectro de radiación recibido, tal como se observó en la respuesta fotoquímica de la comunidad del MI, que presentó una disminución del Y_{7h} significativamente mayor en presencia de RUV ($p \leq 0,05$; Fig. 5.10). Por otro lado, las comunidades de MII presentaron una reducción del Y_{7h} menor que en MI, y sin diferencias significativas entre los tratamientos de radiación (Fig. 5.10). Lo anterior denota una respuesta diferencial entre las comunidades de MI y MII, probablemente relacionada a una composición taxonómica y estrategias de aclimatación distintas. Los cambios en la estructura de la comunidad probablemente influyeron en la capacidad de aclimatación: la comunidad fitoplanctónica de MII presentó una mayor proporción de células grandes que en MI, lo que probablemente posibilitó la síntesis de compuestos que absorben en la RUV (MAAs; García- Pichel, 1994) y por lo tanto, una mejor respuesta fotoquímica bajo RUV (Neale et al., 1998b; Banaszak et al., 2003b). De esta forma los cambios en la estructura de la comunidad permitirían llegar a estados fisiológicos óptimos para la respuesta a factores de estrés.

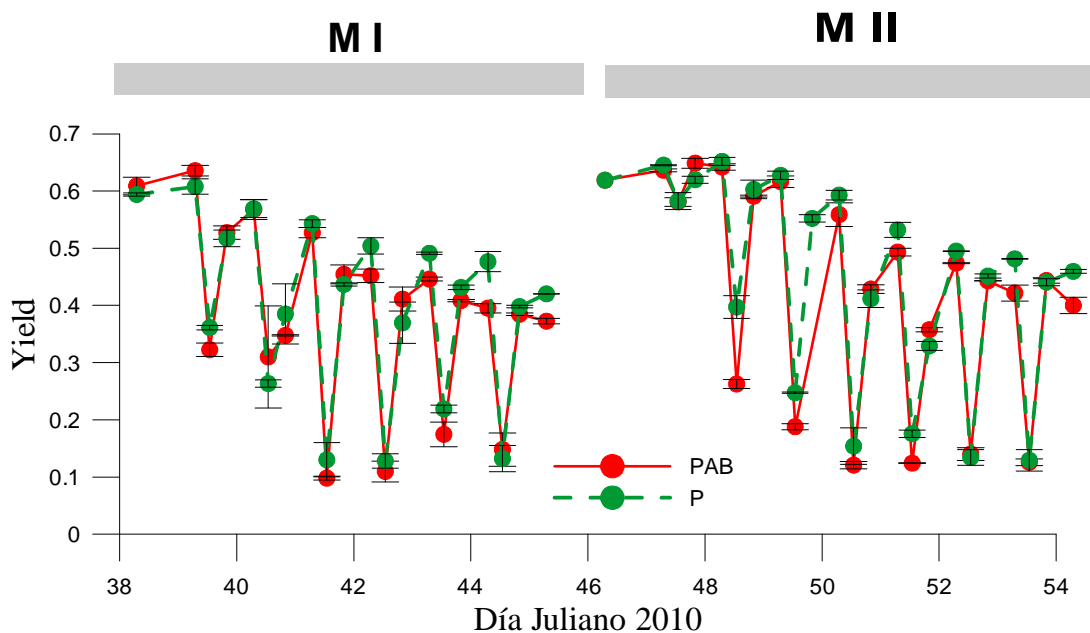


Figura 5.10. Eficiencia fotoquímica efectiva (*yield*) de muestras naturales de fitoplancton expuestas en microcosmos durante dos experimentos realizados en el verano de 2010: MI (4 al 13 de Febrero) y MII (15 al 22 de Febrero). Las mediciones se realizaron a tres horas del día: 7, 13 y 20 h, hora local, con un fluorómetro de pulsos de amplitud modulada (Water-ED PAM, Walz, Alemania) y la eficiencia fotoquímica efectiva del PSII ($\Delta F/F_m'$ o Y) se calculó usando las ecuaciones de Genty et al. (1989). Los tratamientos de radiación a los que fueron expuestas las muestras, se muestran con diferentes líneas y colores: continuas y rojo, PAR+RUV-A+RUV-B (PAB); discontinuas y verde, PAR (P). Las líneas verticales en los símbolos indican la mitad del rango de las medias (*half mean range*).

5.3 IMPLICANCIAS ECOLÓGICAS

Este estudio indica que, en las condiciones experimentales, los efectos de la RUV son más evidentes en la composición taxonómica de la comunidad que en el crecimiento algal y la biomasa. Como se mencionó anteriormente, el estado inicial de la comunidad estudiada fue fundamental, no sólo condicionando la respuesta a la combinación de factores, sino también demostrando la complejidad de la extrapolación de efectos. En efecto, los resultados que se muestran sugieren que no es posible generalizar los efectos de la radiación solar sobre diversas comunidades fitoplanctónicas: otros factores, tales como la historia lumínica previa, los gradientes de temperatura y la disponibilidad de nutrientes, en parte relacionados a la turbulencia del agua y/o a la profundidad de la CMS, son muy importantes para comprender las respuestas observadas. Por ejemplo, aunque ambos microcosmos mostraron un crecimiento sostenido durante varios días, la distribución final del carbono autotrófico fue muy diferente para cada caso. Lo anterior tiene importantes

consecuencias en la disponibilidad de energía en la red trófica, ya que tanto la distribución de especies y tamaños, son los factores principales que influyen en la probabilidad de que una célula de fitoplancton sea ingerida por un depredador. El funcionamiento y la respuesta a la RUV y a otros factores, de comunidades con diferentes fuentes de carbono, será diferente. Aunque es complejo evaluar estos escenarios a partir de estimaciones de la clor *a* por sensores remotos, los estudios de campo complementarios pueden ayudar a validar dichas estimaciones, que han probado ser útiles para comparaciones a nivel regional y global.

CAPÍTULO 6. Respuesta de comunidades planctónicas del Caribe Mexicano a la exposición a radiación ultravioleta y al incremento de temperatura

Parte de este Capítulo es una traducción al español del trabajo aceptado para su publicación como:

Halac SR, Guendulain-García SD, Villafañe VE, Helbling EW, Banaszak AT (2013) Responses of tropical plankton communities from the Mexican Caribbean to solar ultraviolet radiation exposure and increased temperature. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. En prensa.

6.1 INTRODUCCIÓN

El cambio global es un proceso complejo que involucra alteraciones de múltiples variables físicas tales como temperatura, pH y radiación ultravioleta-B (RUV-B, 280-315 nm) (Houghton et al., 2011). Dichas variables son afectadas por factores antrópicos, dentro de los cuales se incluye a la combustión de combustibles fósiles, los cuales generan gases invernadero y lo que resulta en el aumento de la temperatura superficial oceánica (IPCC, 2007; Stott & Kettleborough, 2002) y en la acidificación de los sistemas acuáticos (Doney et al., 2008 y referencias allí citadas). Además, la emisión de sustancias que disminuyen la concentración de ozono, tales como compuestos clorofluorcarbonados (CFCs) e hidrofluorcarbonados (HCFCs) da como resultado el aumento de los niveles de RUV-B (Staehelin et al., 2001 y referencias allí citadas).

Se ha observado que la temperatura superficial oceánica ha aumentado en diversas regiones del mundo (Levitus et al., 2000; Roemmich et al., 2009), incluso las áreas tropicales (Díaz & Graham, 1996; Johnson & Xie, 2010). De hecho, las predicciones realizadas por el Panel Intergubernamental de Cambio Climático (IPCC, 2007) indican que la temperatura superficial oceánica podría aumentar aproximadamente 3°C hacia finales de siglo debido al calentamiento global. En lapsos de tiempo corto, se han detectado, en áreas tropicales, aumentos de temperatura como pulsos de corta duración (aproximadamente 10 días) que han superado los 3°C sobre el promedio mensual del verano (Banaszak et al., 2003a). Algunos estudios han demostrado que el aumento de la temperatura oceánica es benéfico para el fitoplancton, ya que promueve el incremento de la actividad fotosintética, en comparación a muestras expuestas a temperaturas control (Sobrino & Neale, 2007; Lassen et al., 2010; Capítulo 3 de esta Tesis). Sin embargo, algunos autores observan una reducción de la biomasa fitoplanctónica asociada al calentamiento global, debido principalmente a la disminución de diatomeas grandes (Lewandowska & Sommer, 2010). Como ha sido demostrado en diversos estudios la condición de temperatura aumentada beneficia el crecimiento de las especies pequeñas (Daufresne et al., 2009; Winder et al., 2009) aunque la biomasa fitoplanctónica total sea reducida debido a la disminución de especies grandes.

El aumento de los niveles de RUV-B en las regiones polares y en algunas regiones templadas ha estimulado la investigación sobre el impacto de la RUV sobre comunidades

fitoplanctónicas naturales. Dichos efectos incluyen la disminución de la densidad celular y de las tasas de crecimiento (Nilawati et al., 1997; Marcoval et al., 2008). Sin embargo, otros estudios realizados en alta montaña no encontraron tales efectos (Halac et al., 1997), probablemente debido a la historia lumínica previa de exposición a altas intensidades de RUV. Las regiones tropicales reciben intensidades más altas de radiación ultravioleta (RUV, 280-400 nm) que las latitudes medias y altas, debido principalmente a que su capa de ozono es naturalmente más delgada y a que el paso de la radiación a través de la atmósfera es más directo (Madronich, 1993). Por lo tanto, el fitoplancton está probablemente adaptado a niveles de radiación naturalmente altos, lo que podría explicar en parte la sensibilidad más baja a la RUV de las especies tropicales en comparación a las especies polares (Helbling et al., 1992a). Debido al incremento de la temperatura superficial oceánica, y de los efectos potencialmente negativos de la exposición a la RUV natural, algunos estudios han destacado la importancia de evaluar el impacto combinado de la RUV y la temperatura sobre los organismos, debido a que el incremento de la temperatura podría alterar las respuestas a la RUV, y esto afectar la predicción de las respuestas de sistemas acuáticos a futuros escenarios de cambio climático (Williamson et al., 2002; MacFadyen et al., 2004). A pesar de que se conoce que la combinación de la RUV con la temperatura aumentada afecta la fisiología del fitoplancton (Davison, 1991; Sobrino & Neale, 2007, Capítulo 3 de esta Tesis) y a la composición taxonómica (Rae & Vincent, 1998; Xenopoulos et al., 2003) hay pocos estudios que evalúen el impacto de ambos factores sobre comunidades naturales, en comparación a aquellos que consideran cada variable por separado. Algunos estudios han reportado efectos positivos de la combinación de la RUV con la temperatura sobre el crecimiento de las comunidades fitoplanctónicas, demostrando que bajo exposición a radiación solar, las tasas de crecimiento son mayores a temperatura más altas (Rae & Vincent, 1998; Doyle et al., 2005). Sin embargo, dichas respuestas son muy variables de acuerdo al tamaño de las especies y a los grupos taxonómicos involucrados. De esta manera, la estructura de la comunidad es altamente afectada por la interacción RUV-temperatura (Thyssen et al., 2011; Lionard et al., 2012).

Dado que la tolerancia a la RUV y a la temperatura es especie-específica, la estructura de la comunidad podría cambiar debido a la sensibilidad diferencial hacia estas

variables. Más aún, algunas especies tropicales tales como corales ya están viviendo en el límite superior de su tolerancia a la temperatura (Banaszak & Lesser, 2009) por lo tanto, cualquier incremento en la temperatura oceánica superficial podría afectar otras especies tropicales negativamente. Por tal motivo este estudio se diseñó para evaluar la respuesta de comunidades tropicales de plancton a los efectos combinados de la temperatura aumentada y la RUV sobre el crecimiento, biomasa y composición taxonómica. Nuestra hipótesis de trabajo es que en los sistemas tropicales acuáticos, el incremento de la temperatura (como se esperaría en un escenario de cambio global) aumentaría la inhibición debida a la RUV sobre el crecimiento. La estrategia experimental consistió en exponer comunidades planctónicas naturales a la radiación solar (con y sin RUV) durante 16 días bajo tratamientos de temperatura *in situ* y aumentada.

6.2 MATERIALES Y MÉTODOS

6.2.1 Recolección y manipulación de muestras

Este trabajo fue llevado a cabo en la localidad de Puerto Morelos (20° 51' N; 86° 55' O) situada en el Caribe Mexicano. Las muestras naturales de superficie fueron colectadas de una laguna arrecifal desde el final del muelle de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Parque Natural Arrecifal Puerto Morelos, usando recipientes lavados con HCl 1N. Las muestras fueron colocadas en bidones de 80 L y transportadas inmediatamente al laboratorio en condiciones de luz tenue. Para excluir los especímenes grandes de zooplancton, toda la muestra fue filtrada a través de una malla de 100 µm de poro (Nitex®). Se realizaron pruebas piloto de incubación de las muestras naturales que demostraron ausencia de crecimiento del fitoplancton, probablemente debido a las bajas concentraciones de nutrientes (Rodríguez-Martínez et al., 2010); por este motivo, se agregaron nutrientes a las muestras al principio del experimento con el fin de inducir el crecimiento del fitoplancton. Los macronutrientes (NO_3^- , PO_4^{3-} and SiO_3^{2-}) en una concentración similar al medio f/2 (Guillard & Rhyter, 1962) se agregaron a toda la muestra al 0,1%, se mezclaron bien y se dispusieron en 8 bolsas (microcosmos) transparentes a la RUV (20 L).

6.2.2 Experimento de exposición

El experimento fue llevado a cabo en el período del 14 al 29 de Julio del 2010 (Días Julianos 195-210). Un juego de microcosmos duplicado sin cubrir recibió PAR + RUV-A + RUV-B; 280-700 nm (tratamiento PAB), mientras que otro se cubrió con filtro Ultraphan (UV Opak, Digefra, Germany) por lo cual recibieron solo PAR (tratamiento P; 400-700 nm). El *set* de 4 microcosmos (2 PAB y 2P) fue colocado dentro de cada uno de los dos tanques de agua de 1,6 m de diámetro x 45 cm de alto. Uno de los tanques fue mantenido a 28°C (temperatura *in situ*) y el otro a 31°C (temperatura aumentada). La temperatura fue mantenida por un sistema de circulación con agua proveniente de dos fuentes. Para mantener el microcosmos a la temperatura control, se bombeó agua subterránea a 25°C de una profundidad de 90 m, y se la almacenó en tanques previo a su distribución, donde por acción de la radiación solar se calentó a 28°C. Para mantener el otro microcosmos a 31°C, se bombeó agua de la laguna arrecifal a 28°C de 4 m de profundidad y, previo a su distribución, se la almacenó en tanques donde por radiación solar se calentó a 31°C. La temperatura en ambos microcosmos fue monitoreada continuamente por un sistema de registro de datos y varias veces durante el día con termómetros digitales de mano. Para minimizar el gradiente de luz, los microcosmos fueron dispuestos en un plano horizontal, de manera tal que el área de las muestras expuestas fue de ~50 cm x 25 cm con una profundidad de 15 cm. Además, las muestras fueron agitadas manualmente cada una hora durante el día para evitar la sedimentación de las células. El intercambio de gas entre las muestras y el exterior fue promovido por la inyección de aire usando una jeringa conectada a un tubo de plástico, el cual fue insertado en el centro de cada microcosmos. Dicho sistema además fue usado para la colección de muestras.

6.2.3 Identificación / cuantificación de especies y estimación de biomasa

Al inicio del experimento y luego día por medio se colectaron 50 mL de muestra de cada microcosmos, y se las fijaron con formalina neutralizada (concentración final 0,4%, v:v). Posteriormente, se sedimentaron 20 mL de cada muestra en una probeta durante 24 h (LeGresley & McDermott, 2010) y luego se descartó cuidadosamente el sobrenadante hasta lograr aproximadamente un 5% del volumen sedimentado. La muestra concentrada fue homogeneizada y colocada en una cámara Fuchs-Rosenthal (Marienfeld, Alemania) para la

identificación y la cuantificación de las células. Se agregó una gota de Rosa de Bengala a cada muestra para distinguir mejor la materia orgánica del detrito (Villafañe & Reid, 1995). Las muestras se observaron en un microscopio óptico (Zeiss modelo D-7082, Alemania) por duplicado para cada tratamiento y usando un aumento de 200x para las células del microplancton (>20 µm) y de 400x para las del pico-nanoplancton (<20 µm). Para considerar a una muestra como representativa, se contaron al menos 100 células de las especies más frecuentes. El biovolumen de cada especie planctónica fue estimado por asimilación de su forma a figuras geométricas, de acuerdo a Hillebrand et al. (1999) y por medición de las principales dimensiones celulares de al menos 10 células por especie. En los casos en los que se encontraron diferencias de tamaño dentro de la misma especie, se dividió a los individuos de esa especie por clase de tamaños, para determinar su volumen de una manera más precisa. A partir de los biovolúmenes se estimó la biomasa (como carbono autotrófico) por medio de las ecuaciones de Menden-Deuer & Lessard (2000).

6.2.4 Mediciones de radiación solar y temperatura

La intensidad de PAR fue medida durante períodos de 1 min, cada 5 min, a lo largo del experimento. Para ello se utilizó un sensor de radiación de respuesta cosenoidal (LI-192, Li-Cor, USA), el cual se encontraba instalado en un techo a 4 m de altura y conectado a un sistema de registro de datos (LI-1400, Li-Cor). Por su parte, la RUV se estimó a partir de los datos de PAR con el programa STAR (Ruggaber et al., 1994). La temperatura del agua en el centro de los tanques se registró con sistemas de registro de datos (HOBO, USA) con una frecuencia de medición de un dato cada 15 min.

6.2.5 Análisis de datos y estadística

El crecimiento de los principales grupos taxonómicos se determinó a partir de mediciones de abundancia celular y estimaciones de carbono autotrófico. Las tasas de crecimiento se calcularon a partir de la siguiente ecuación:

$$\mu = \ln(N_2 - N_1) / (t_2 - t_1) \quad (1)$$

siendo $(N_2 - N_1)$ la abundancia celular o el contenido de carbono durante la fase exponencial de crecimiento y $(t_2 - t_1)$ la duración de la fase.

La riqueza específica se calculó como el número de especies distintas representadas en las muestras de tal manera que:

$$S = sp_1 + sp_2 + sp_3 + \dots + sp_n \quad (2)$$

El índice de diversidad se calculó de acuerdo a Shannon-Weaver (Shannon, 1948):

$$H' = -\sum p_i (\ln p_i) \quad (3)$$

siendo p_i la abundancia relativa de especies i ; y $p_i = N_i / N_{tot}$, e indica la relación entre el número de individuos correspondiente a la especie i y el número total de individuos. La disminución o el aumento de la riqueza de especies y los índices de diversidad se calcularon por ajuste a una función lineal.

Se realizaron duplicados de cada tratamiento de radiación y temperatura y los resultados se expresaron como la media y la mitad del rango de las medias (*half mean range*). Con el fin de determinar las diferencias entre los tratamientos, se consideró un nivel de significancia (α) de 0,05 para todas las comparaciones (Zar, 1999). Se aplicó un ANOVA de una vía para establecer si existían diferencias significativas en la biomasa o en la abundancia celular diaria, en las tasas de crecimiento y en los cambios de diversidad de la comunidad entre los tratamientos de radiación y temperatura, mientras que se usó un ANOVA para mediciones repetidas con el objeto de evaluar el aumento de la biomasa y/o abundancia celular en función del tiempo. Asimismo, se utilizó un ANOVA de dos vías con el fin de determinar las interacciones entre ambos factores, radiación y temperatura.

6.3 RESULTADOS

6.3.1 Condiciones ambientales

En general, las intensidades de PAR (Fig. 6.1 A) y RUV (Fig. 6.1 B) fueron bastante similares a lo largo del experimento con los valores máximos variando entre 416 a 496 $W m^{-2}$ en el rango de PAR y desde 54 a 64 $W m^{-2}$ en el rango de la RUV, con excepción del 26 de Julio (Día Juliano 207) cuando, debido a nubosidad y lluvia, las máximas irradiancias disminuyeron a 275 y 35 $W m^{-2}$, respectivamente. La temperatura dentro de los tanques de agua durante los experimentos fue homogénea (datos no

mostrados). Las fluctuaciones de temperatura máximas durante cada día de exposición fue de aproximadamente $\pm 1,3^{\circ}\text{C}$ con la excepción del 16 de Julio (Día Juliano 197) cuando la variación dentro de los tanques de temperatura *in situ* fue de $\pm 1,8^{\circ}\text{C}$. Durante el experimento, las máximas variaciones de temperatura fueron <17 y $<13\%$ en el tanque de temperatura *in situ* y aumentada, respectivamente.

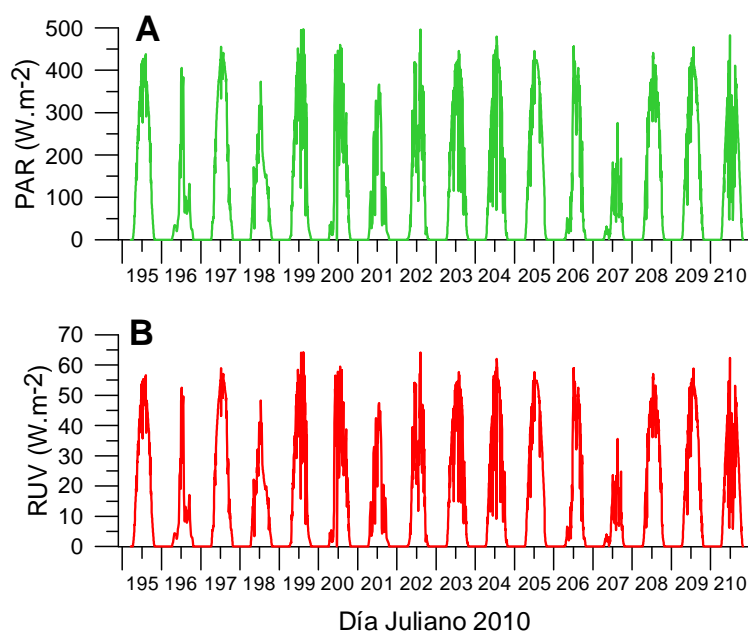


Figura 6.1. Irradiancia de PAR (A) y RUV (B) (en Watts m⁻²) durante el período experimental - días Julianos 195 al 210 (14 al 29 de Julio 2010).

6.3.2 Crecimiento de las comunidades planctónicas

La comunidad planctónica inicial estuvo caracterizada por cuatro grupos principales: diatomeas (principalmente pennadas), dinoflagelados, flagelados (incluyendo clorofitas, criptofitas y flagelados autótrofos no identificados) y plancton heterotrófico (principalmente dinoflagelados y flagelados incoloros). Se encontraron pocas especies de cianobacterias que no fueron consideradas en los cálculos de biomasa total y abundancia celular. La abundancia de dicho grupo fue muy variable, debido principalmente a su concentración escasa y a su distribución en “parches”, causada por la formación de colonias. El crecimiento de los cuatro grupos, estimado a partir de los cálculos de biomasa, se muestra en la Fig. 6.2 y en las Tablas 6.1 y 6.2. En general, el incremento de la biomasa

no fue significativamente diferente entre los tratamientos de radiación (Fig. 6.2) con la excepción de los dinoflagelados y el plancton heterotrófico. En ambos grupos, se observaron diferencias significativas entre los tratamientos PAB y P bajo 28°C, con una biomasa significativamente mayor en P que en PAB, durante los últimos días de exposición (Fig. 6.2 C, G; Tablas 6.1 y 6.2; $p \leq 0,05$). En relación a los efectos de la temperatura, los grupos más afectados fueron las diatomeas y el plancton heterotrófico. Hacia el final del experimento, la biomasa de las diatomeas y del plancton heterotrófico fue significativamente más alto en el microcosmos control que en aquel expuesto a temperatura aumentada (Fig. 6.2 A-B y G-H; Tablas 6.1 y 6.2; $p \leq 0,05$).

Los efectos de la radiación y de la temperatura sobre la abundancia celular fueron bastante similares a aquellos sobre la biomasa; tanto las diatomeas, los dinoflagelados y flagelados no mostraron cambios en la abundancia celular debido a la RUV durante el experimento y solamente el plancton heterotrófico mostró abundancias celulares más altas en el tratamiento P durante la última parte del experimento (Tablas 6.3 y 6.4; $p \leq 0,05$). Los efectos de la temperatura en ambos tratamientos de radiación se observaron en la abundancia de diatomeas de la misma manera que para la biomasa, con valores más altos en el microcosmos control en comparación al de temperatura aumentada, y en dinoflagelados bajo PAB (Tablas 6.3 y 6.4; $p \leq 0,01$). Las interacciones entre RUV y temperatura no fueron significativas para ninguno de los grupos (Tablas 6.2, 6.4).

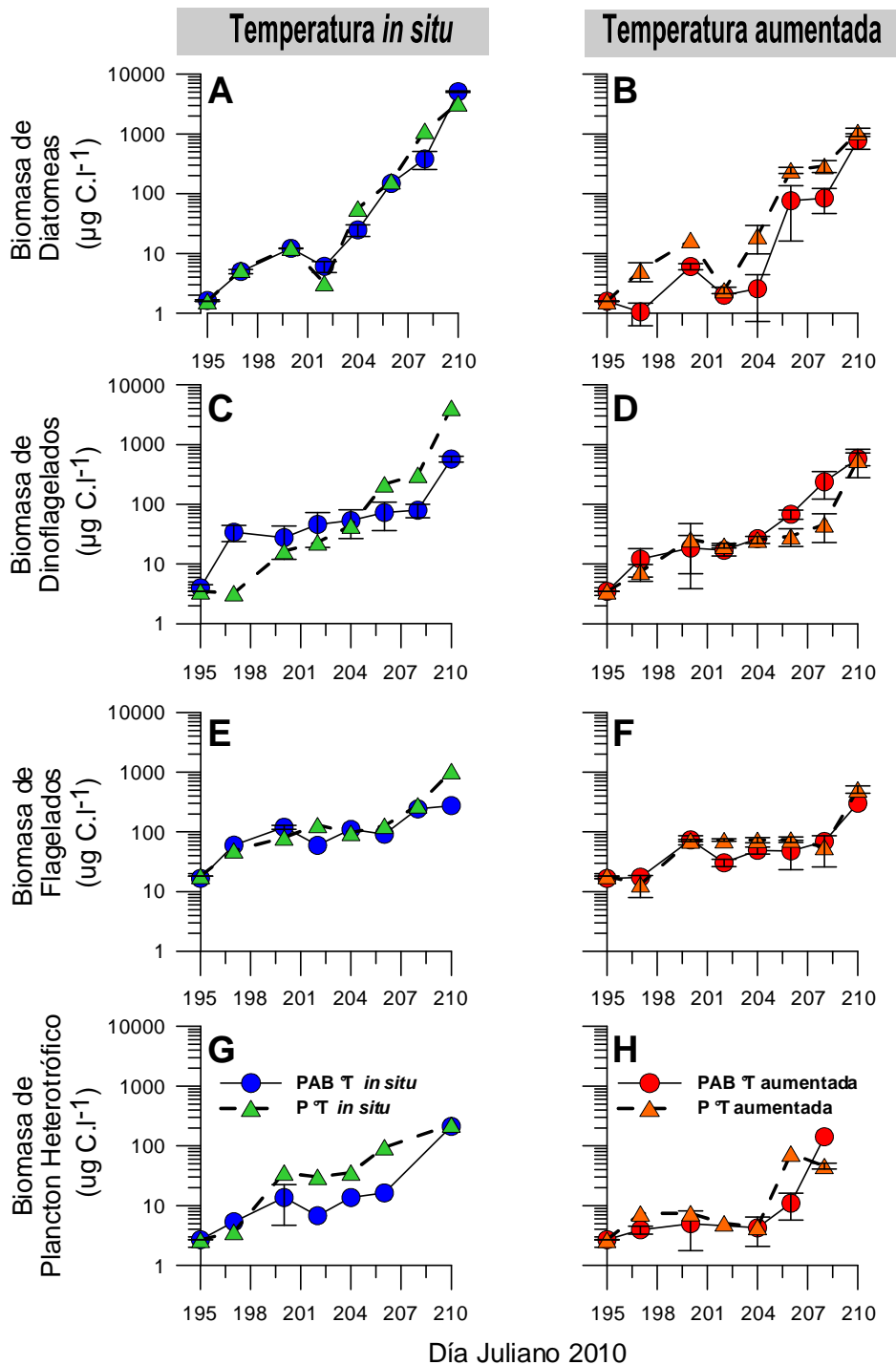


Figura 6.2. Biomasa (en $\mu\text{g C L}^{-1}$) de diatomeas (A, B), dinoflagelados autotróficos (C, D), flagelados autotróficos (E, F) y plancton heterotrófico (G, H) en muestras naturales de agua de mar expuestas a radiación solar. Las muestras fueron expuestas a dos temperaturas: *in situ* (28 °C; A, C, E, G) y aumentada (31 °C; B, D, F, H) y a dos tratamientos de radiación: PAB (círculos) y P (triángulos). Las líneas verticales sobre los símbolos indican la mitad del rango de las medias (*half mean range*).

Tabla 6.1. Tasas de crecimiento (μ) para diatomeas, dinoflagelados, flagelados y plancton heterotrófico expuesto a temperatura *in situ* (28°C) y aumentada (31°C) y determinadas por biomasa. Los tratamientos de radiación fueron: PAB = PAR + RUV; P = PAR. Los valores presentados son la media de duplicados y la mitad del rango de las medias (*half mean range*).

	Diatomeas		Dinoflagelados		Flagelados		Plancton Heterotrófico	
	PAB	P	PAB	P	PAB	P	PAB	P
28°C	0,47±0,04	0,49±0,04	0,24±0,01	0,41±0,07	0,16±0,01	0,22±0,04	0,22±0,04	0,33±0,03
31°C	0,40±0,01	0,43±0,02	0,21±0,06	0,31±0,04	0,18±0,05	0,20±0,02	0,24±0,03	0,19±0,01

Tabla 6.2. Resultados estadísticos de ANOVAs de una y dos vías para establecer diferencias significativas en las tasas de crecimiento de diatomeas, dinoflagelados, flagelados y plancton heterotrófico basadas en la biomasa entre los tratamientos de radiación, los de temperatura, y la combinación de radiación * temperatura durante las exposiciones a la radiación solar natural. Los tratamientos de radiación fueron: PAB = PAR + RUV; P = PAR. Los tratamientos de temperatura fueron: temperatura *in situ* (28°C) y aumentada (31°C).

	Efecto de la radiación	Efecto de la temperatura	Efecto de radiación * temperatura
Diatomeas	28 °C $p > 0.05$	PAB $p \leq 0.01$	$p > 0.05$
Dinoflagelados	$p \leq 0.05$	$p > 0.05$	$p > 0.05$
Flagelados	$p > 0.05$	$p > 0.05$	$p > 0.05$
Plancton Het.	$p \leq 0.05$	$p > 0.05$	$p > 0.05$
	.		
Diatomeas	31 °C $p > 0.05$	P $p \leq 0.01$	
Dinoflagelados	$p > 0.05$	$p > 0.05$	
Flagelados	$p > 0.05$	$p > 0.05$	
Plancton Het.	$p > 0.05$	$p \leq 0.05$	

Tabla 6.3. Tasas de crecimiento (μ) para diatomeas, dinoflagelados, flagelados y plancton heterotrófico expuesto a temperatura *in situ* (28°C) y aumentada (31°C) y determinadas a partir de la abundancia celular. Los tratamientos de radiación fueron: PAB = PAR + RUV; P = PAR. Los valores presentados son la media de duplicados y la mitad del rango de las medias (*half mean range*).

	Diatomeas		Dinoflagelados		Flagelados		Plancton Heterotrófico	
	PAB	P	PAB	P	PAB	P	PAB	P
28°C	0,43±0,02	0,41±0,04	0,23±0,01	0,27±0,05	0,24±0,02	0,24±0,01	0,20±0,04	0,36±0,04
31°C	0,29±0,02	0,36±0,06	0,23±0,03	0,28±0,06	0,15±0,02	0,23±0,03	0,23±0,01	0,21±0,02

Tabla 6.4. Resultados estadísticos de ANOVAs de una y dos vías para establecer diferencias significativas en las tasas de crecimiento de diatomeas, dinoflagelados, flagelados y plancton heterotrófico basadas en abundancia celular entre los tratamientos de radiación, los de temperatura, y la combinación de radiación * temperatura durante las exposiciones de radiación solar natural. Los tratamientos de radiación fueron: PAB = PAR + RUV; P = PAR. Los tratamientos de temperatura fueron: temperatura *in situ* (28°C) y aumentada (31°C).

	Efecto de la radiación	Efecto de la temperatura	Efecto de radiación * temperatura
Diatomeas	28 °C $p > 0.05$	PAB $p \leq 0.01$	$p > 0.05$
Dinoflagelados	$p > 0.05$	$p > 0.05$	
Flagelados	$p > 0.05$	P $p \leq 0.01$	
Plancton Het.	$p \leq 0.05$	$p > 0.05$	
Diatomeas	31 °C $p > 0.05$	P $p \leq 0.01$	$p > 0.05$
Dinoflagelados	$p > 0.05$	$p > 0.05$	
Flagelados	$p > 0.05$	$p > 0.05$	
Plancton Het.	$p \leq 0.05$	$p \leq 0.05$	

6.3.3 Composición de la comunidad planctónica

Contribución de los principales grupos taxonómicos. Los cambios en la composición taxonómica basados en la biomasa y abundancia bajo los tratamientos de temperatura *in situ* y aumentada se muestran en las Figs. 6.3 y 6.4, respectivamente. La contribución relativa de los grupos principales a la biomasa total durante el experimento fue variable, dependiendo de los tratamientos de radiación y temperatura. Sin embargo, se observó un patrón general de aumento de la abundancia de diatomeas, con una consecuente disminución de los flagelados. La contribución de las diatomeas a la biomasa fue muy baja al principio, aproximadamente un 7%, pero aumentó al 65% (P) y al 80% (PAB) en el tratamiento de temperatura *in situ* y ~ 50% (P y PAB) en el de temperatura aumentada, hacia el final del experimento (Fig. 6.3 A-B). Los dinoflagelados fueron menos abundantes que los otros dos grupos, y en general, su contribución a la biomasa de la comunidad no superó al 30%, siendo más alta al final del experimento en el tratamiento P a 28°C (48%; Fig. 6.3 A). Por su parte, los flagelados fueron dominantes al principio del experimento contribuyendo en ca. 70% a la biomasa total (Fig. 6.3), pero disminuyendo a ca. 15% en el tratamiento P y al 5% en el PAB bajo 28°C, mientras que bajo 31°C decayeron al 20% en los tratamientos P y PAB (Fig. 6.3 A-B).

El aporte de cada grupo a la abundancia celular siguió un patrón similar al de la biomasa. La contribución de las diatomeas al total de la abundancia celular fue ca. 10% al inicio, y se incrementó al 55 y al 80% en los tratamientos P y PAB, respectivamente, bajo 28°C, y a 38 y 42% en los tratamientos P y PAB, respectivamente, bajo 31°C, hacia el final del experimento (Fig. 6.4 A-B). La contribución de los dinoflagelados a la abundancia total fue bastante baja durante el experimento (ca. 10%) alcanzando los valores más altos (ca. 18%) bajo el tratamiento P a 28°C (Fig. 6.4 A). Por su lado, los flagelados representaron el 80% de la abundancia total al comienzo del experimento, mientras que aportaron ~20 y 50% bajo 28°C y 31°C, respectivamente, después de la exposición. La contribución del plancton heterotrófico a la comunidad fue inicialmente baja (10%) y, en general, disminuyó durante la exposición (Figs. 6.3 y 6.4).

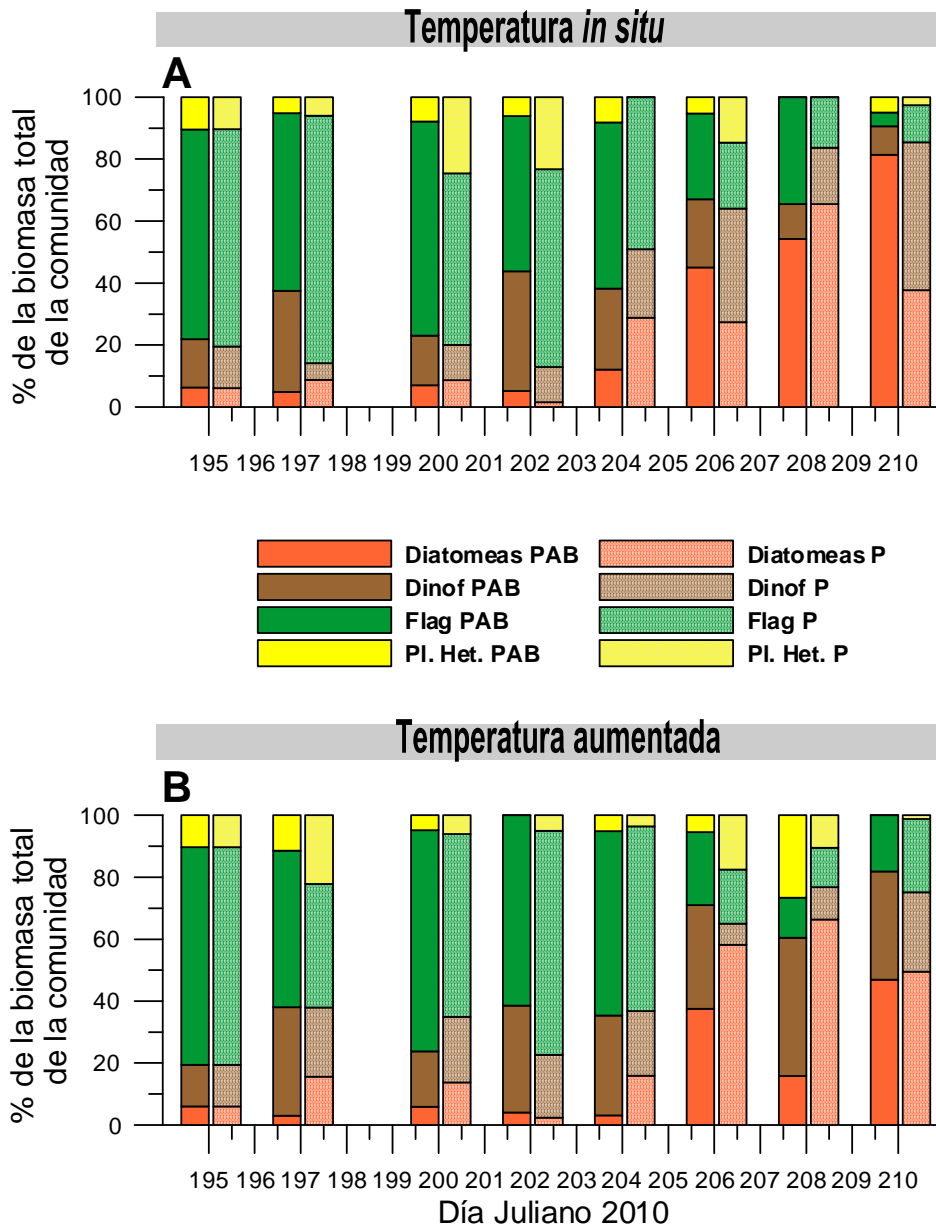


Figura 6.3. Contribución a la biomasa total (en porcentaje) de diatomeas, dinoflagelados, flagelados y plancton heterotrófico en microcosmos expuestos a temperatura *in situ* (28 °C; A) y aumentada (31 °C; B). Los porcentajes son la media de duplicados para cada tratamiento de radiación, los que se muestran uno al lado del otro: PAB en el lado izquierdo y P en el lado derecho de cada par.

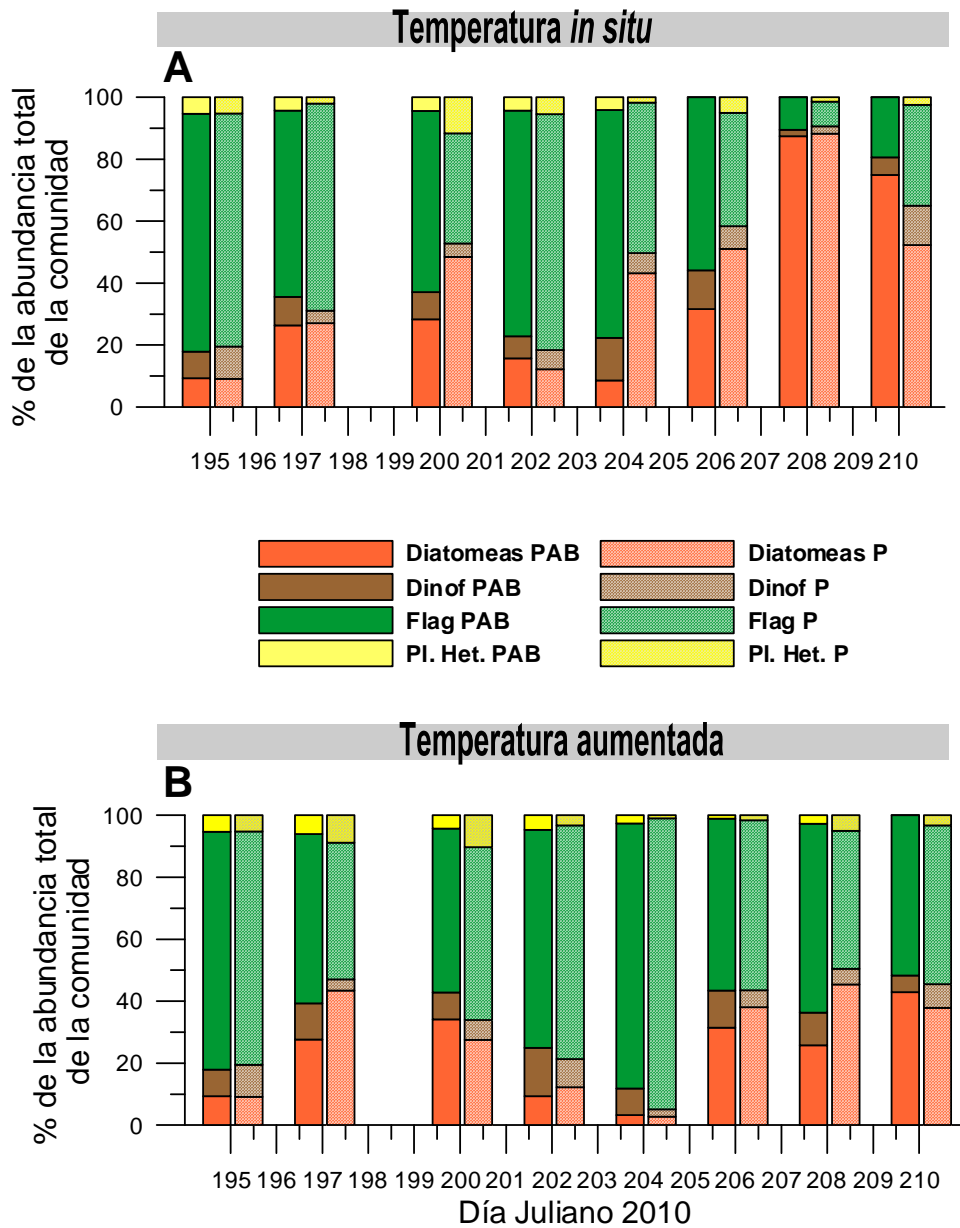


Figura 6.4. Contribución a la abundancia celular (en porcentaje) de diatomeas, dinoflagelados, flagelados y plancton heterotrófico en microcosmos expuestos a temperatura *in situ* (28 °C; A) y aumentada (31 °C; B). Los porcentajes son la media de duplicados para cada tratamiento de radiación, los que se muestran uno al lado del otro: PAB en el lado izquierdo y P en el lado derecho de cada par.

Diversidad de la comunidad planctónica. En general, la riqueza específica de la comunidad planctónica fue, al inicio, similar entre los tratamientos de radiación (Fig. 6.5 A-B). Sin embargo, en el microcosmos expuesto a PAR bajo 28°C, la riqueza específica

aumentó hacia el final del experimento, mientras que en el tratamiento de PAB la riqueza específica no cambió (Fig. 6.5A, diferencias significativas entre pendientes, $p \leq 0,01$). Por otro lado, a 31°C, ambos microcosmos mostraron una riqueza específica similar durante el experimento (Fig. 6.5 B), En resumen, el resultado más relevante fue la mayor riqueza específica en ausencia de RUV a 28°C (Fig. 6.5 A-B).

La diversidad de la comunidad, estimada por el índice de diversidad de Shannon-Weaver, disminuyó en ambos tratamientos de radiación durante la última parte del experimento (28°C; Fig. 6.5 C), mientras que a 31°C aumentó al final de la exposición (Fig. 6.5 D). Se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos de temperatura sólo durante la parte final del experimento en el tratamiento PAB, siendo la diversidad significativamente más alta a 31°C.

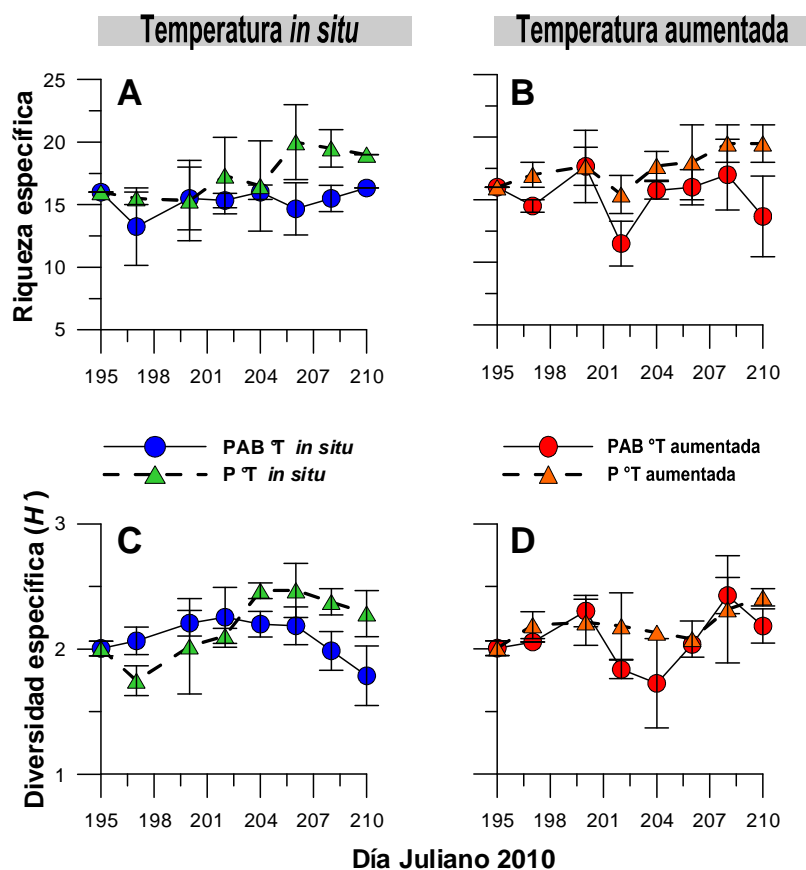


Figura 6.5. Riqueza específica (A-B) e índice de Diversidad de Shannon-Weaver (C-D) de la comunidad planctónica durante el experimento (14 al 29 de Julio 2010). Las muestras fueron expuestas a temperatura *in situ* (28 °C; A, C) y aumentada (31 °C; B, D) y a dos tratamientos de radiación: PAB (círculos) y P (triángulos). Las líneas verticales sobre los símbolos indican la mitad del rango de las medias (*half mean range*).

Riqueza y composición específica dentro de los principales grupos taxonómicos. En general, el número de especies de diatomeas aumentó al final del experimento en todos los tratamientos (Fig. 6.6 A-B). Este incremento fue significativamente más alto en el tratamiento P que en el PAB a 31°C ($p \leq 0,05$). Asimismo, se encontraron diferencias significativas en el tratamiento PAB entre temperaturas, siendo la riqueza específica más alta a 28°C (Fig. 6.6 A-B; $p \leq 0,05$). La especie más abundante al principio del experimento fue *Cylindrotheca closterium* (Ehrenberg) Reimann & J. C. Lewin, mientras que *Navicula directa* (W. Smith) Ralfs, *Navicula transitans* var. *derasa* (Grunow) Cleve, *Navicula transitans* var. [*derasa*] f. *delicatula* Heimdal (de aquí en más *Navicula* spp.) y *Leptocylindrus* sp., dominaron después del Día Juliano 204 (Fig. 6.6 C-D). En cambio, *Amphora* sp. fue frecuente en los últimos días del experimento. Es importante destacar que tanto *Leptocylindrus* sp. como *Amphora* sp. estuvieron ausentes en el tratamiento PAB bajo 31°C (Fig. 6.6 C-D). En relación al menor crecimiento de las diatomeas a temperatura aumentada (Fig. 6.2 A-D), *C. closterium*, la especie más abundante en este grupo, tuvo una contribución significativamente menor a 31°C (Fig. 6.6 C-D).

Los dinoflagelados no mostraron diferencias significativas en la riqueza específica entre los tratamientos de radiación y temperatura (Fig. 6.7 A-B), y tuvieron una tendencia de incremento en la contribución de especies de mayor tamaño. Al principio del experimento, las especies más abundantes fueron especies atecadas de un tamaño $< 20 \mu\text{m}$, sin embargo, a medida que éste fue avanzando, se incrementó el número de especies $\geq 20 \mu\text{m}$ (e.g., *Prorocentrum mexicanum* Osorio-Tafall; Fig. 6.7 C-D). En cambio, los flagelados tuvieron un leve descenso en el número de especies, sin diferencias significativas ni entre los tratamientos de radiación ni los de temperatura (Fig. 6.8 A-B). Se observó una dominancia pronunciada de clorofitas $< 10 \mu\text{m}$ en el tratamiento de temperatura aumentada, en ambos tratamientos de radiación a lo largo del experimento, mientras que la mayor abundancia de criptofitas se encontró cuando se excluyó la RUV (Fig. 6.8 C-D). El plancton heterotrófico mostró un incremento en la abundancia de especies pequeñas ($< 10 \mu\text{m}$) durante el experimento, las cuales no estuvieron presentes en el tratamiento PAB bajo 28°C (datos no mostrados).

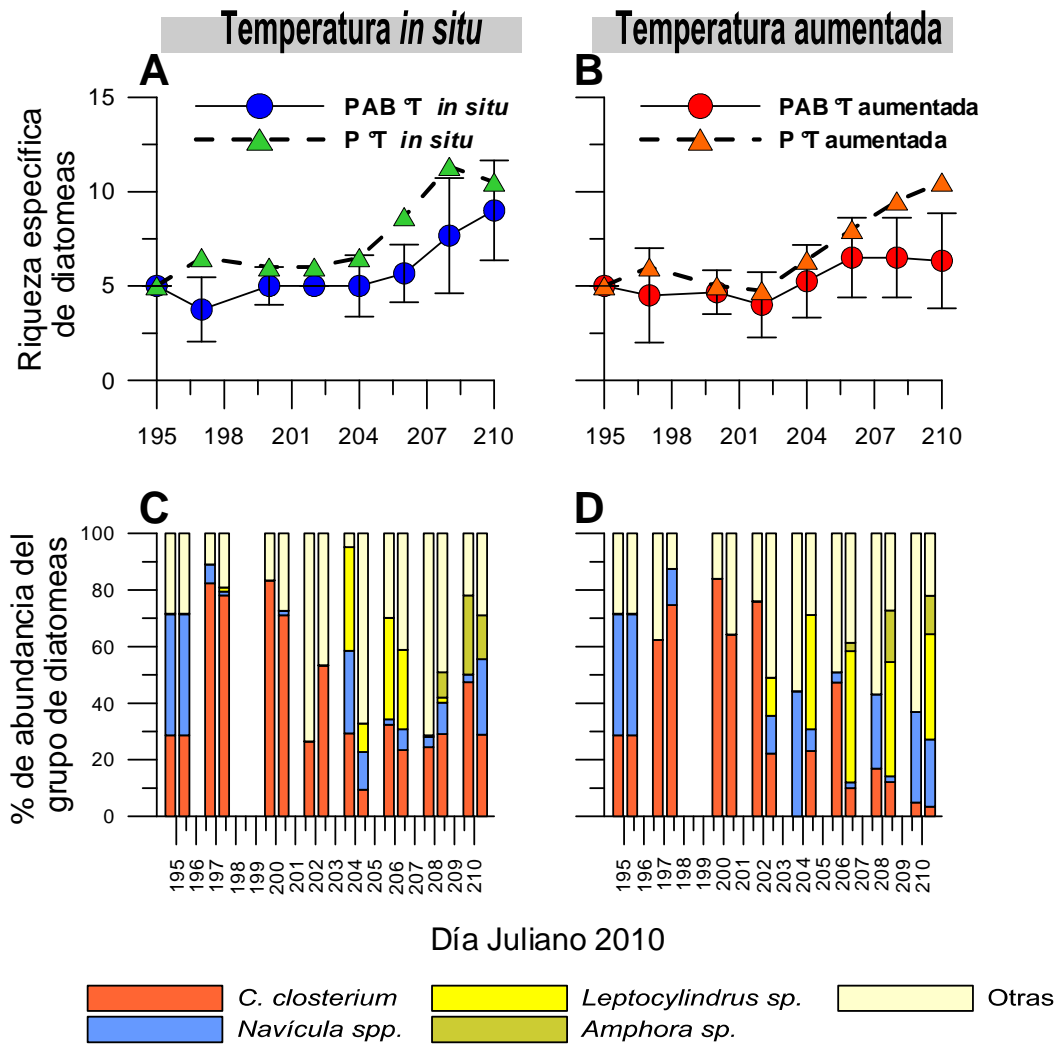


Figura 6.6. Riqueza específica de diatomeas (A-B) y porcentaje de la contribución de las diatomeas más frecuentes en la abundancia celular (C-D) durante el experimento (14 al 29 de Julio 2010) con muestras de agua de mar expuestas a temperatura *in situ* (28 °C; A, C) y aumentada (31 °C; B, D). Los porcentajes son la media de duplicados para cada tratamiento de radiación y fueron calculados en base a la abundancia total de cada grupo. Los diferentes tratamientos de radiación se muestran uno al lado del otro: primero PAB y segundo P y los patrones diferentes indican especies distintas.

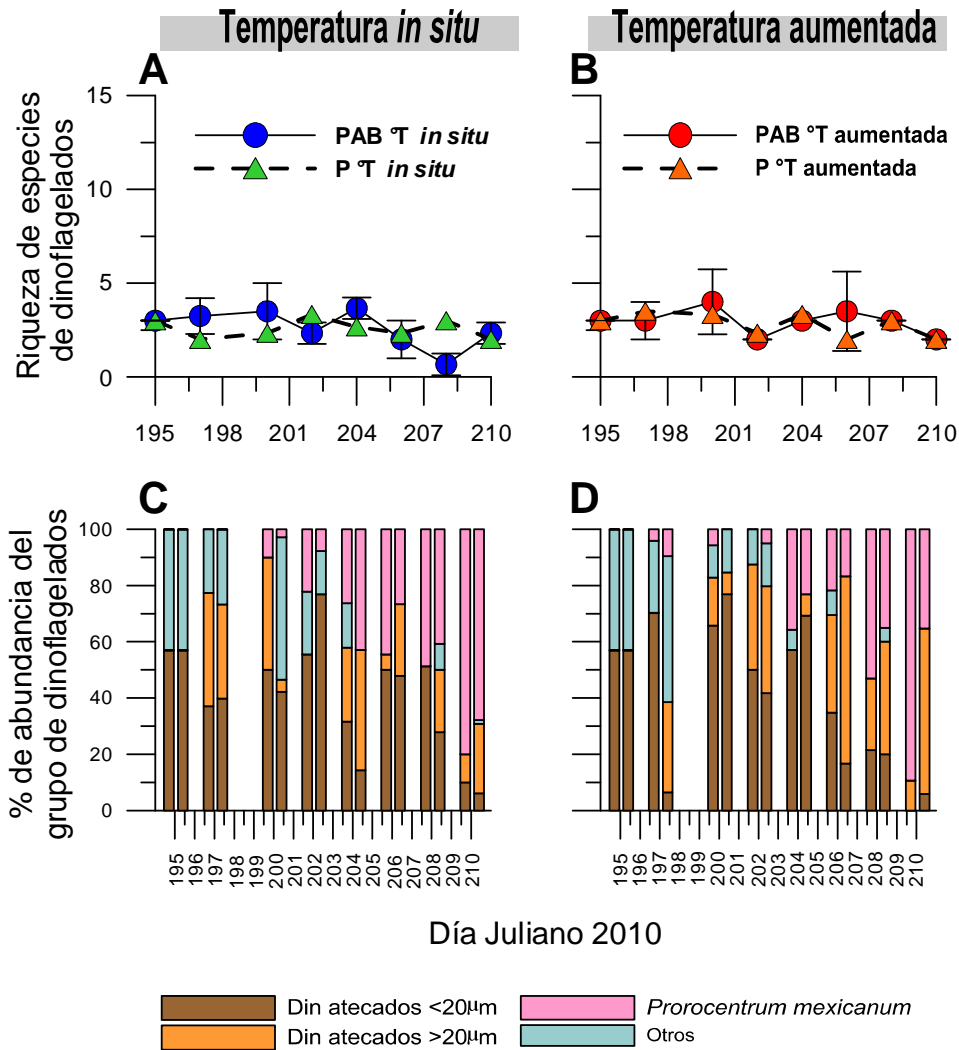


Figura 6.7. Riqueza específica de dinoflagelados (A-B) y porcentaje de la contribución de los dinoflagelados más frecuentes en la abundancia celular (C-D) durante el experimento (14 al 29 de Julio 2010) con muestras de agua de mar expuestas a temperatura *in situ* (28 °C; A, C) y aumentada (31 °C; B, D). Los porcentajes son la media de duplicados para cada tratamiento de radiación y fueron calculados en base a la abundancia total de cada grupo. Los diferentes tratamientos de radiación se muestran uno al lado del otro: primero PAB y segundo P y los patrones diferentes indican especies distintas.

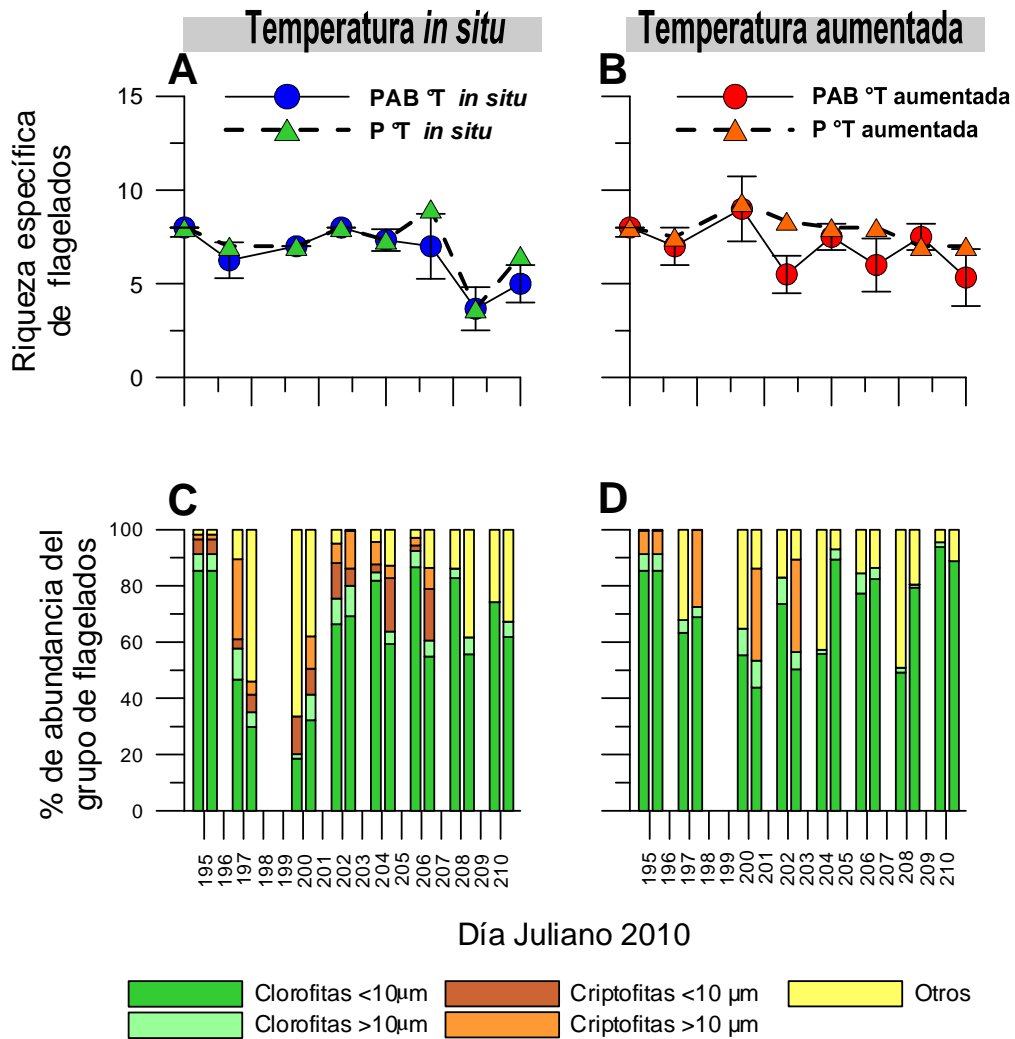


Figura 6.8. Riqueza específica de flagelados (A-B) y porcentaje de la contribución de los flagelados más frecuentes en la abundancia celular (C-D) durante el experimento (14 al 29 de Julio 2010) con muestras de agua de mar expuestas a temperatura *in situ* (28 °C; A, C) y aumentada (31 °C; B, D). Los porcentajes son la media de duplicados para cada tratamiento de radiación y fueron calculados en base a la abundancia total de cada grupo. Los diferentes tratamientos de radiación se muestran uno al lado del otro: primero PAB y segundo P y los patrones diferentes indican especies distintas.

6.4 DISCUSIÓN

Esta investigación enfocó en los efectos combinados de la RUV y la temperatura sobre los cambios en la estructura y crecimiento de comunidades planctónicas del trópico, estudiados por medio de experimentos en microcosmos. Durante la mayor parte del experimento, las intensidades de radiación natural alcanzaron niveles altos (Fig. 6.1 A-B) que, normalmente, son consideradas estresantes para el fitoplancton. Uno de los resultados de este trabajo fue

el efecto diferencial de estas variables sobre los cuatro principales grupos presentes en las comunidades planctónicas. En síntesis, la RUV no afectó el incremento en abundancia celular de ningún grupo durante la exposición, con excepción del plancton heterotrófico, mientras que la biomasa fue afectada negativamente en los grupos de dinoflagelados y plancton heterotrófico. En cuanto al efecto de la temperatura aumentada, el grupo de las diatomeas fue el más afectado, con un impacto negativo en el crecimiento, determinado tanto por biomasa como abundancia celular (Fig. 6.2; Tablas 6.1-6.4). Más aún, los resultados mostraron diferencias significativas en la contribución de las diatomeas a la biomasa y abundancia celular entre temperaturas de incubación, con valores menores a 31°C (Figs. 6.3 y 6.4).

Este estudio determinó que los efectos combinados de la RUV-temperatura sobre el crecimiento no fueron significativos en ninguno de los grupos (Tabla 6.1-6.4) pero sí sobre la estructura de la comunidad. Lo anterior coincide con otros estudios previos que mostraron que la RUV afecta más la estructura de la red trófica que a la biomasa, debido a diferencias en la sensibilidad entre organismos planctónicos (Belzile et al., 2006). Por ejemplo, aunque las diatomeas aumentaron su riqueza específica a lo largo del experimento, tanto la RUV como la temperatura produjeron efectos negativos sobre la misma (Fig. 6.6 A-B). Se ha propuesto que las especies que viven cerca de su límite de tolerancia a la temperatura podrían ser influidas desfavorablemente con el aumento de ésta (Beardall & Raven, 2004). El estudio de la composición taxonómica mostró que una de las especies dominantes de la comunidad planctónica, la diatomea pennada *Cylindrotheca closterium*, fue afectada de manera adversa por la temperatura, mientras que los efectos combinados de la RUV-temperatura fueron particularmente negativos en especímenes grandes como *Leptocylindrus* sp. y *Amphora* sp., los que contribuyeron a una proporción importante a la biomasa de diatomeas durante la última parte del experimento a 28°C (Fig. 6.6 C-D). Lo anterior probablemente está relacionado con la disminución de la biomasa debido al efecto del aumento de la temperatura. De manera similar, estudios previos llevados a cabo con comunidades fitoplanctónicas en mesocosmos, reportaron menor biomasa de fitoplancton debido al calentamiento, especialmente en diatomeas grandes (Wohlers et al., 2009; Lewandowska & Sommer, 2010). Sin embargo, esta respuesta negativa no es general, ya que otros estudios realizados con fitoplancton marino mostraron que las diatomeas grandes

son beneficiadas por el aumento de la temperatura (Thyssen et al., 2011; Lionard et al., 2012). En este estudio la mayor parte de los dinoflagelados cambiaron de especies pequeñas $<20\mu\text{m}$ (dinoflagelados atecados) a especies $\geq 20\mu\text{m}$ (*Prorocentrum mexicanum* y dinoflagelados atecados) (Fig. 7.7 C-D). Aunque estos cambios en la estructura de la comunidad no fueron provocados aparentemente por la RUV o por la temperatura, pueden ser parte de un proceso de fotoaclimatación que promueva, en células grandes (e.g. dinoflagelados $\geq 20\mu\text{m}$), la síntesis de compuestos que absorben en la RUV (MAAs). Algunos estudios relacionados con la presencia de MAAs en microalgas, han reportado que se encuentran en concentraciones altas en numerosas especies de dinoflagelados, incluyendo especies de *Prorocentrum* Ehrenberg (Jeffrey et al., 1999; Marcoval et al., 2007; Llewelyn & Aird, 2010). Por ésto, los cambios estructurales observados podrían ser consecuencia de una tolerancia más alta de las especies de dinoflagelados $\geq 20\mu\text{m}$ en comparación a aquellas $<20\mu\text{m}$. Sin embargo, el grupo de dinoflagelados presentó una biomasa menor en el tratamiento PAB (Fig. 6.2 C) por lo que probablemente, esta estrategia de fotoprotección, no fue lo suficientemente efectiva para prevenir la disminución del crecimiento provocado por la RUV. De manera similar, Lesser (1996) observó inhibición de la fotosíntesis en cultivos de *P. micans* Ehrenberg a pesar de la presencia y acumulación de MAAs. En cambio, los resultados mostraron que la temperatura benefició a los flagelados pequeños ($\leq 10\mu\text{m}$) y en particular favoreció el aumento de clorofitas pequeñas (Fig. 6.8). De manera similar, varios autores han encontrado un incremento significativo en la proporción de especies pequeñas (Daufresne et al., 2009; Winder et al., 2009), lo que concuerda con la Regla de Tamaño-Temperatura. Dicha regla establece que los individuos que crecen a temperaturas bajas alcanzan tamaños más grandes que aquellos en condiciones de temperaturas más altas (Forster et al., 2012).

En general, se asume que los procesos del metabolismo celular regulados por la temperatura (tales como división celular, reparación del ADN, producción de pigmentos fotoprotectores, respuestas al estrés oxidativo, etc.) podrían actuar más rápido que el daño inducido por la RUV, al acelerar procesos bioquímicos (Baulch et al., 2005; Doyle et al., 2005). Sin embargo, estas conclusiones están basadas en estudios sobre comunidades fitoplanctónicas de latitudes medias, y por lo tanto consideran rangos de temperatura menores. Tanto como se sabe, no se han realizado estudios sobre el efecto combinado de la

RUV y la temperatura en la composición de las comunidades planctónicas tropicales; sin embargo, algunos trabajos se enfocaron en la actividad fotosintética del fitoplancton tropical. Por ejemplo, Banaszak et al. (2003a) evaluaron los efectos del estrés de radiación y de temperatura en el estado fisiológico de los dinoflagelados endosimbiontes de corales, y sugirieron que los rangos de tolerancia celular pueden ser excedidos cuando la temperatura superficial oceánica aumenta, ya que dichos simbiontes viven cerca de su rango de termotolerancia máxima. Los resultados de este trabajo indican que algunas especies de diatomeas pueden ser sensibles a la temperatura y disminuir su crecimiento bajo temperaturas superficiales oceánicas aumentadas, mientras que los especímenes de flagelados pequeños serían beneficiados. Por ésto, este estudio resalta la importancia de que las respuestas a la combinación de RUV y temperatura observadas son específicas de cada especie y tamaño, y muy complejas.

Los datos sugieren que, bajo un escenario de cambio climático, ocurrirán cambios en los diferentes grupos taxonómicos. Las diatomeas serán afectadas en su crecimiento, composición taxonómica y riqueza específica. Aunque las diatomeas no representan la mayor proporción de biomasa de las comunidades tropicales, pueden hacer floraciones bajo condiciones de alta concentración de nutrientes. Por lo tanto, es importante considerar la ocurrencia de floraciones de diatomeas en las áreas costeras debido a enriquecimiento de nutrientes por actividades antrópicas. Nuestros experimentos simularon un escenario de *input* de nutrientes, por lo que las respuestas observadas podrían ser similares a aquellas que ocurrirían en un área costera con enriquecimiento de nutrientes y afectadas por eventos de incremento de temperatura. Aunque el área de estudio es naturalmente oligotrófica, por ejemplo, el rango de variación de las concentraciones de NH_4^+ es de 1,2 y 3,4 μM , las de DIN varían desde 2,8 a 5,1 μM y las de PO_4^{-3} entre 1,0 y 2,7 μM (Duarte et al., 1995; Carruthers et al., 2005), las concentraciones de estos nutrientes pueden aumentar en zonas costeras por descarga de nutrientes desde sistemas de agua dulce, los cuales se encuentran afectados por el impacto de actividades antrópicas, tales como el desarrollo turístico (Rodríguez-Martínez et al., 2010; van Tussenbroek, 2011). De acuerdo a nuestros resultados, la potencial eutrofización de las áreas costeras favorecería a las diatomeas. Sin embargo, asociada con un aumento de la temperatura oceánica y los niveles altos de RUV, se produciría un efecto antagónico sobre algunas especies de este grupo. Más aún, el grupo

dominante, los flagelados, serían afectados en su composición taxonómica y distribución de tamaños, y esto tendría un impacto potencial en la red trófica. Aunque no hubo efectos interactivos entre la temperatura y la RUV sobre el aumento de la biomasa, estas dos variables de estrés tuvieron un impacto importante en la distribución de la biomasa. Varios autores han reportado efectos similares, determinando que los cambios en la estructura de las comunidades fitoplanctónicas causados por la RUV pueden afectar a los niveles tróficos superiores (e.g., microzooplancton, nauplii de copépodos, etc.) (Keller et al., 1997; Mostajir et al., 1999). Aunque en este estudio se observó una disminución en la biomasa del plancton heterotrófico (flagelados y dinoflagelados) debido a la exposición a la RUV, ésto está probablemente relacionado a los efectos negativos directos de la RUV. En resumen, la combinación de la eutrofización con los factores aquí estudiados podría tener consecuencias importantes sobre la estructura de las comunidades planctónicas, promoviendo cambios en la composición de especies. En relación a lo anterior, Marcoval et al. (2008) encontraron respuestas diferentes a distintos tratamientos de nutrientes en comunidades fitoplanctónicas expuestas a radiación solar durante una semana; en estas comunidades, la composición taxonómica fue afectada en mayor proporción por los tratamientos de nutrientes, que por la exposición a la RUV.

En los párrafos anteriores se consideraron las respuestas particulares de los principales grupos del plancton, que están ciertamente relacionadas con la estructura de la comunidad. El estudio de la comunidad en su totalidad, demostró que la temperatura y la RUV no producen cambios en la biomasa total (datos no mostrados), pero sí en la estructura. Por ejemplo, la estructura de la comunidad fue afectada por la RUV tanto en su riqueza específica, como en su diversidad (estimada por el índice de diversidad de Shannon-Weaver, Fig. 6.5). La RUV podría tener un efecto de exclusión de especies, favoreciendo a las especies más tolerantes en el proceso de competencia y excluyendo a aquellas que son sensibles a la RUV; lo anterior se vio reflejado en riquezas específicas e índices de diversidad más bajos en las comunidades expuestas a la RUV en comparación a aquellas no expuestas a la RUV (Fig. 6.5). Estos resultados son congruentes con los de Xenopoulos & Frost (2009) que reportaron índices de diversidad de Shannon-Weaver más altos en comunidades de fitoplancton protegidas de la RUV. Sin embargo, nuestros resultados mostraron que no hubo correlación entre la diversidad específica y los índices de

diversidad en las comunidades expuestas a la RUV. Aunque la riqueza específica se mantuvo constante durante el experimento (e.g., tratamiento PAB bajo 28°C), el índice de diversidad disminuyó a lo largo del tiempo, lo que probablemente se debió a la distribución o abundancia relativa de las especies. Por lo tanto, las comunidades planctónicas expuestas a la RUV fueron dominadas por pocas especies aunque el número de taxones permaneció sin cambios. Esto sugiere que ocurrieron mecanismos compensatorios, donde las especies sensibles fueron reemplazadas por otras más tolerantes al factor de estrés (Roy et al., 2006). Algunos autores han sugerido que el incremento de la diversidad específica tiene un impacto positivo en la eficiencia fotosintética, la cual aumenta debido a un uso más eficiente de la radiación, y lo anterior sería el resultado de la complementariedad de nichos (Duarte et al., 2006; Tilman et al., 2001). Este trabajo mostró que las exposiciones prolongadas a la RUV llevan a una disminución de la diversidad específica de las comunidades tropicales, aunque no evaluó la respuesta fotosintética. Sería de esperar que en un escenario de cambio climático, las células atrapadas en las capas superficiales debido al calentamiento, disminuyeran su productividad.

En resumen, los resultados de este trabajo muestran que aunque las comunidades de plancton tropical están en general bien adaptados a temperaturas y niveles de RUV altos, las diatomeas fueron afectadas negativamente por el aumento de la temperatura. Asimismo, nuestros resultados indican que bajo condiciones de radiación alta y prolongada, ocurrirían cambios en la estructura de la comunidad en términos de diversidad específica, composición taxonómica y distribución de tamaños. Es necesario realizar más investigaciones para evaluar el impacto de estos cambios en la productividad del fitoplancton tropical así como en otros componentes de la red trófica.

CAPÍTULO 7. Conclusiones Generales

7.1 PRUEBA DE HIPÓTESIS PLANTEADAS

Este trabajo propuso como objetivo principal evaluar el efecto combinado de la RUV y de la temperatura sobre la fotosíntesis y el crecimiento de especies fitoplanctónicas, y el impacto de estas variables en la estructura de las comunidades fitoplanctónicas presentes en las regiones Patagónica y del Caribe. Para ello se llevaron a cabo experimentos con cultivos monoespecíficos y con comunidades naturales de las áreas de estudio. Estos experimentos consistieron en exposiciones a la radiación solar durante lapsos de tiempo cortos (horas) y largos (días). En algunos casos, para el estudio con mayor detalle de algunos procesos y/o mecanismos se realizaron exposiciones a luz artificial. En particular, para cada objetivo específico se formuló una hipótesis de estudio. A continuación, se presentan las conclusiones basadas en los resultados que se obtuvieron al probar las hipótesis planteadas:

Hipótesis 1. *El aumento de la temperatura disminuye los efectos negativos de la RUV a corto plazo sobre la eficiencia fotoquímica (yield) del fotosistema II (PSII).* Esta hipótesis **no se rechaza.**

- Entre las diatomeas de estudio, *Chaetoceros gracilis* mostró ser más tolerante a la RUV que *Thalassiosira weissflogii*.
- Ambas especies mostraron mayor inhibición del PSII debido a la RUV a la temperatura *in situ* (18°C) que a la temperatura aumentada (23°C), y un efecto antagónico entre la RUV y la temperatura para todos los tratamientos en *T. weissflogii*, y sólo para algunos casos en *C. gracilis*.
- Por lo tanto, un potencial aumento de la temperatura superficial oceánica, en relación con el cambio global, podría contrarrestar el impacto negativo de la RUV en especial en la especie más sensible.

Hipótesis 2. *El aumento de la temperatura disminuye los efectos negativos de la RUV a mediano plazo sobre el yield, en especial en las especies menos tolerantes a la RUV. Las especies que tienen mecanismos de fotoprotección, se aclimatan mejor a la radiación y son más tolerantes a la RUV.* Esta hipótesis **no se rechaza.**

- La especie más resistente a RUV, y que se aclimató mejor a la exposición a radiación prolongada fue el dinoflagelado *Prorocentrum micans*, mientras que la

primnesiofita *Isochrysis galbana* fue la más sensible a la RUV. Por su lado, la clorofita *Dunaliella salina* mostró una sensibilidad intermedia a la RUV.

- El efecto positivo del aumento de la temperatura fue muy evidente en *I. galbana* que presentó diferencias significativas entre los tratamientos de temperatura: los valores del *yield* de la mañana (Y_{8h}) fueron más altos a temperatura aumentada que a temperatura *in situ*, en especial en presencia de RUV. En esta especie la temperatura contrarrestó en parte el efecto inhibitorio de la RUV. En *D. salina*, el efecto benéfico de la temperatura se observó durante algunos días, mientras que *P. micans* el aumento de temperatura no influyó en su respuesta.
- *P. micans*, la especie más tolerante a la RUV, fue la única que sintetizó y presentó concentraciones altas de MAAs.
- En un contexto de aumento de la temperatura superficial oceánica, las especies menos resistentes a la RUV podrían ser beneficiadas y contrarrestar en parte el efecto negativo de la radiación, mientras que las especies con capacidad de síntesis de compuestos fotoprotectores no serían tan influenciadas por los cambios de temperatura.

Hipótesis 3. *La RUV produce cambios en la composición taxonómica y en la distribución de tamaños de las comunidades planctónicas de la Región Patagónica, hacia especies más resistentes y de mayor tamaño.* Esta hipótesis **se rechaza**.

- En las comunidades planctónicas de la Patagonia, la RUV no ocasiona por sí sola efectos evidentes en la composición taxonómica ni en la distribución de tamaños, sino que la composición inicial es uno de los factores determinantes en el potencial efecto del PAR y de la RUV sobre la estructura de la comunidad planctónica.

Hipótesis 4. *La interacción de la temperatura con la RUV afecta el crecimiento de algunas especies, lo que resulta en un cambio en la estructura de las comunidades planctónicas del Caribe, hacia especies de menor tamaño.* Esta hipótesis **no se rechaza**.

- Los efectos combinados de la RUV-temperatura fueron particularmente negativos en especímenes grandes de diatomeas como *Leptocylindrus* sp. y *Amphora* sp., los que contribuyeron a una proporción importante de la biomasa de diatomeas durante

la última parte del experimento a temperatura *in situ*. Más aún, la riqueza específica de las diatomeas disminuyó debido a la interacción RUV-temperatura. En cambio, la temperatura benefició a los flagelados pequeños ($\leq 10 \mu\text{m}$) y en particular favoreció el aumento de clorofitas pequeñas.

- Cabe esperar que, bajo un escenario de cambio climático, ocurrirán cambios en la estructura de la comunidad planctónica en términos de diversidad, composición taxonómica y distribución de tamaños, siendo las diatomeas el grupo más afectado.

7.2 PERSPECTIVAS DE LÍNEAS FUTURAS DE INVESTIGACIÓN

A modo de cierre, se plantean algunas líneas futuras de investigación que se desprenden de los resultados obtenidos en esta tesis:

- La respuesta fotosintética a la RUV y temperatura es especie-específica y se ve afectada no sólo por la irradiancia y la temperatura superficial oceánica características de la época del año y de la localización geográfica (i.e., latitud y altitud), sino también por otras condiciones ambientales como la intensidad de mezcla de la columna de agua. Lo anterior condiciona la profundidad de la capa de mezcla superficial (CMS), lo que a su vez influye en la cantidad y calidad de radiación que reciben las células. Por lo tanto, es necesario realizar estudios que consideren la interacción de la radiación, la temperatura y la mezcla de la columna de agua para comprender de manera más completa las potenciales respuestas de especies del fitoplancton en un escenario de cambio global.
- Uno de los principales efectos combinados de la RUV y de la temperatura son los cambios en la estructura de las comunidades planctónicas. Lo anterior tiene importantes consecuencias en la disponibilidad de energía en la red trófica, ya que tanto la distribución de especies y tamaños, son los factores principales que influyen en la probabilidad de depredación. El funcionamiento de comunidades de consumidores con diferentes fuentes de carbono, así como su respuesta a la RUV y a la temperatura, será diferente. A partir de lo anterior, queda por evaluar el impacto de los cambios en la estructura de la comunidad planctónica en otros componentes de la red trófica. Para ello es necesario realizar más investigaciones que se enfoquen no sólo en los efectos directos de los cambios en la estructura de las comunidades

de los productores sobre la de los consumidores, sino en los indirectos, i.e., variación de la respuesta de los consumidores a variables de estrés como la RUV y la temperatura.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abramoff MD, Magelhaes PJ, Ram SJ (2004) Image processing with ImageJ. *Biophotonics International*, 11, 36-42.
- Ahlgren G (1987) Temperature functions in biology and their application to algal growth constants. *Oikos*, 49:177-190
- Andersen RA, Kawachi M (2005) Traditional microalgae isolation techniques. En: Andersen R (ed) *Algal culture techniques*, Phycological Society of America, pp. 83-100.
- Andersson B, Barber J (1996) Mechanisms of photodamage and protein degradation during photoinhibition of photosystem II. En Baker N (ed) *Photosynthesis and the environment*, Kluwer Academic Publishers, Boston, pp. 101-121.
- Andrade M., Forno R., Palenque E.R. & Zaratti F. (1998) Estudio preliminar del efecto de altura sobre la radiación solar ultravioleta B. *Rev Bol Fis*, 4: 14.
- Atkinson RJ, Matthews WA, Newman PA, Plumb RA (1989). Evidence of the mid-latitude impact of Antarctic ozone depletion. *Nature*, 340: 290-294.
- Banaszak AT, Neale PJ (2001) Ultraviolet radiation sensitivity of photosynthesis in phytoplankton from an estuarine environment. *Limnol Oceanogr*, 46: 592-603.
- Banaszak AT, Ayala-Schiaffino BN, Rodríguez-Román A, Enríquez S, Iglesias-Prieto R (2003a) Response of *Millepora alcicornis* (Milleporina: Milleporidae) to two bleaching events at Puerto Morelos reef, Mexican Caribbean. *Rev Biol Trop*, 51: 57-66.
- Banaszak AT (2003b) Photoprotective physiological and biochemical responses of aquatic organisms. En: Helbling EW, Zagarese HE (eds) *UV effects in aquatic organisms and ecosystems*, Comprehensive Series in Photochemical and Photobiological Sciences, The Royal Society of Chemistry, Cambridge, pp 329-356.
- Banaszak AT, Lesser MP (2009) Effects of solar ultraviolet radiation on coral reef organisms *Photochem Photobiol Sci*, 8:1276-1294.
- Barbieri ES, Villafañe VE, Helbling EW (2002) Experimental assessment of UV effects on temperate marine phytoplankton when exposed to variable radiation regimes. *Limnol Oceanogr*, 47: 1648-1655.
- Barcelo JA, Calkins J (1978) Positioning of aquatic microorganisms in response to visible light and simulated solar UV-B irradiation. *Photochem Photobiol*, 29: 75-83.
- Baulch HM, Schindler DW, Turner MA, Findlay DL, Paterson MJ, Vinebrooke RD (2005) Effects of warming on benthic communities in a boreal lake: implications of climate change. *Limnol Oceanogr*, 50: 1377-1392.
- Beardall J, Raven JA (2004) The potential effects of global climate change on microalgal photosynthesis, growth and ecology. *Phycologia*, 43: 26-40.

- Beardall J, Sobrino C, Stojkovic S (2009) Interactions between the impacts of ultraviolet radiation, elevated CO₂, and nutrient limitation on marine primary producers. *Photochem Photobiol Sci*, 8: 1257-1265.
- Behrenfeld MJ, O'Malley RT, Siegel DA, McClain CR, Sarmiento JL, Feldman GC, Milligan AJ, Falkowski PG, Letelier RM, Boss ES (2006) Climate-driven trends in contemporary ocean productivity. *Nature*, 444: 752-755.
- Belzile C, Demers S, Ferreyra G, Schloss I, Nozais C, Lacoste K, Mostajir B, Roy S, Gosselin M, Pelletier E, Giancesella S, Vernet M (2006) UV effects on marine planktonic food webs: a synthesis of results from mesocosm studies. *Photochem Photobiol*, 82: 850-856.
- Berges JA, Varela DE, Harrison PJ (2002) Effects of temperature on growth rate, cell composition and nitrogen metabolism in the marine diatom *Thalassiosira pseudonana* (Bacillariophyceae). *Mar Ecol Prog Ser*, 225: 139-146.
- Blumthaler M, Ambach W, Rehwald W (1992) Solar UV-A and UV-B radiation fluxes at two alpine stations at different altitudes. *Theor Appl Climatol*, 46, 39-44.
- Boelen P, de Boer MK, Kraay GW, Veldhuis MJW, Buma AGJ (2000) UVBR-induced DNA damage in natural marine picoplankton assemblages in the tropical Atlantic Ocean. *Mar Ecol Progr Ser*, 193: 1-9.
- Bojkov RD, Fioletov VE, Díaz SB (1995) The relationship between solar UV irradiance and total ozone from observations over southern Argentina. *Geophys Res Lett*, 22: 1249-1252.
- Bothwell ML, Sherbot D, Roberge AC, Daley RJ (1993) Influence of natural ultraviolet radiation on lotic periphytic diatom community growth, biomass accrual, and species composition: Short-term versus long-term effects. *J Phycol*, 29: 24-35.
- Bothwell ML, Sherbot DMJ, Pollock CM (1994) Ecosystem response to solar ultraviolet-B radiation: Influence of trophic-level interactions. *Science*, 265: 97-100.
- Bouchard JN, Roy S, Ferreyra G, Campbell D, Curtosi A (2005a) Ultraviolet-B effects on photosystem II efficiency of natural phytoplankton communities from Antarctica. *Polar Biol*, 28: 607-618.
- Bouchard JN, Campbell DA, Roy S (2005b) Effects of UV-B radiation on the D1 protein repair cycle of natural phytoplankton communities from three latitudes (Canada, Brazil, and Argentina). *J Phycol*, 41: 273-286.
- Bouchard JN, Roy S, Campbell DA (2006) UVB effects on the photosystem II-D1 protein of phytoplankton and natural phytoplankton communities. *Photochem Photobiol*, 82: 936-951.
- Britt A (1995) Repair of DNA damage induced by ultraviolet radiation. *Plant Physiol*, 108: 891-896.
- Buma AGJ, Engelen AH, Gieskes WWC (1997) Wavelength-dependent induction of thymine dimers and growth rate reduction in the marine diatom *Cyclotella* sp. exposed to ultraviolet radiation. *Mar Ecol Prog Ser*, 153: 91-97.

- Buma AGJ, Helbling EW, de Boer MK, Villafañe VE (2001) DNA damage patterns in temperate South-Atlantic picophytoplankton assemblages exposed to solar ultraviolet radiation. *J Photochem Photobiol B: Biol*, 62: 9-18.
- Buma AGJ, Boelen P, Jeffrey WH (2003) UVR- induced DNA damage in aquatic organisms. En: Helbling EW, Zagarese HE (eds) UV effects in aquatic organisms and ecosystems, Comprehensive Series in Photochemical and Photobiological Sciences, The Royal Society of Chemistry, Cambridge, pp 291-327.
- Buma AGJ, Visser RJW, Van De Poll WH, Villafañe VE, Janknegt PJ, Helbling EW (2009) Wavelength-dependent xanthophyll cycle activity in marine microalgae exposed to natural ultraviolet radiation. *Eur J Phycol*, 44: 515-524.
- Buskey EJ, Peterson JO, Ambler JW (1996) The swarming behavior of the copepod *Dioithona oculata*: in situ and laboratory studies. *Limnol. Oceanogr.*, 41: 513-521.
- Cabrera S, López M, Tartarotti B (1997) Phytoplankton and zooplankton response to ultraviolet radiation in a high-altitude Andean lake: short - versus long-term effects. *J Plankton Res*, 19: 1565-1582.
- Caille G, González R, Gostonyi A, Ciocco N (1997) Especies capturadas por las flotas de pesca costera en Patagonia. Informes Técnicos del Plan de Manejo Integrado de la Zona Costera Patagónica 27: 1-21.
- Caldeira K, Wickett ME (2005) Ocean model predictions of chemistry changes from carbon dioxide emissions to the atmosphere and ocean. *J Geophys Res Oceans*, 110: C09S4.
- Carruthers TJB, van Tussenbroek BI, Dennison WC (2005) Influence of submarine springs and wastewater on nutrient dynamics of Caribbean seagrass meadows. *Estuar Coast Shelf Sci*, 64: 191-199.
- Carvalho AP, Monteiro CM, Malcata FX (2009) Simultaneous effect of irradiance and temperature on biochemical composition of the microalga *Pavlova lutheri*. *J Appl Phycol*, 21:543-552.
- Casper-Lindley C, Björkman O (1998) Fluorescence quenching in four unicellular algae with different light-harvesting and xanthophyll-cycle pigments. *Photosynth Res*, 56: 277-289.
- Cayabyab NM, Enríquez S (2007) Leaf photoacclimatory responses of the tropical seagrass *Thalassia testudinum* under mesocosm conditions: a mechanistic scaling-up study. *New Phytol*, 176: 108-123.
- Comiso, J.C., Parkinson, C.L., Gersten, R. and Stock, L (2008) Accelerated decline in the Arctic sea ice cover. *Geophys Rev. Let.*, 35, L01703, doi: 10. 1029/ 2007 GL 031972.
- Cooke SL, Williamson CE, Hargreaves BR, Morris DP (2006) Beneficial and detrimental interactive effects of dissolved organic matter and ultraviolet radiation on zooplankton in a transparent lake. *Hydrobiologia*, 568: 15-28.
- Coronado C, Candela J, Iglesias-Prieto R, Sheinbaum J, López M, Ocampo-Torres FJ (2007) On the circulation in the Puerto Morelos fringing reef lagoon. *Coral Reefs*, 26: 149-163.

- Daufresne M, Lengfellner K, Sommer U (2009) Global warming benefits the small in aquatic ecosystems. *Proc Natl Acad Sci USA*, 106: 12788-12793.
- Davison, IR (1991) Environmental effects on algal photosynthesis: temperature. *J Phycol*, 27: 2-8.
- Davidson A, Belbin L (2002) Exposure of natural Antarctic marine microbial assemblages to ambient UV radiation: effects on the marine microbial community. *Aquat Microb Ecol*, 27:159–174.
- de Mora SJ, Demers S, Vernet M (2000) The effects of UV radiation in the marine environment. Cambridge Environ Chem Ser, 10, Cambridge University Press, Cambridge, 324 pgs.
- Demers S, Roy S, Gagnon R, Viguanit C (1991) Rapid light- induced changes in cell fluorescence and in xanthophyll-cycle pigments of *Alexandrium excavatum* (Dinophyceae) and *Thalassiosira pseudonana* (Bacillariophyceae): A photo-protection mechanism. *Mar Ecol Progr Ser*, 76: 185-193.
- Díaz HF, Graham NE (1996) Recent changes in tropical freezing heights and the role of sea surface temperature. *Nature*, 383: 152–155.
- Díaz HG, Avaria S, Villafale VE, Helbling EW (1997) Aclimatación y sensibilidad de especies fitoplanctónicas antárticas a la radiación ultravioleta solar. *Rev Biol Mar Oceanogr*, 32: 157-175.
- Díaz SB, Booth CR, Smolskaia I (1994) Effects of ozone depletion on irradiances and biological doses over Ushuaia. *Arch Hydrobiol Beih*, 43: 115-122.
- Doney SC, Fabry VJ, Feely RA, Kleypas JA (2008) Ocean acidification: The other CO₂ problem. *Annu Rev Mar Sci*, 1:169–92.
- Doyle S, Saros JE, Williamson CE (2005) Interactive effects of temperature and nutrient limitation on the response of alpine phytoplankton growth to UV radiation. *Limnol Oceanogr*, 50: 1362–1367.
- Duarte CM, Merino M, Gallegos M (1995) Evidence of iron deficiency in seagrasses growing above carbonate sediments. *Limnol Oceanogr*, 40: 1153-1158.
- Duarte P, Macedo MF, Cancela da Fonseca L (2006) The relationship between phytoplankton diversity and community function in a coastal lagoon. *Hydrobiologia*, 555: 3-18.
- Dunlap WC, Rae GA, Helbling EW, Villafañe VE, Holm-Hansen O (1995) UV-absorbing compounds in natural assemblages of Antarctic phytoplankton. *Antarct J US*, 30: 323-326.
- Dunne RP (2010) Synergy or antagonism-interactions between stressors on coral reefs, *Coral Reefs*, 29: 145-152.
- Engel A, Händel N, Wohlers J, Lunau M, Grossart HP, Sommer U, Riebesell U (2011) Effects of sea surface warming on the production and composition of dissolved organic matter during phytoplankton blooms: results from a mesocosm study. *J Plankton Res*, 33: 357-372.

- Enríquez S, Merino M, Iglesias-Prieto R (2002) Variations in the photosynthetic performance along the leaves of the tropical seagrass *Thalassia testudinum*. *Mar Biol*, 140: 891–900.
- Enríquez S, Pantoja-Reyes NI (2005) Form-function analysis of the effect of canopy morphology on leaf self-shading in the seagrass *Thalassia testudinum*. *Oecologia*, 145: 235–243.
- Fafandel M, Bihari N, Krajcar V, Muller WEG, Zahnc RK, Batela R (2001) Specific detection of cyclobutane pyrimidine dimers in phytoplankton DNA by a non-radioactive assay based on T-*endonuclease V* digestion. *The Sci Total Environ*, 277: 149-159.
- Falk S, Maxwell DP, Laudenbach DE, Hunter NPA (1996) En: Baker NR (ed), Photosynthesis and the environment, vol 5, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp. 367-385.
- Falkowski PG (1981) Light shade adaptation and assimilation numbers. *J Plankton Res*, 3: 203-216.
- Falkowski P, La Roche J (1991) Acclimation to spectral irradiance in algae. *J Phycol*, 27: 8-14.
- Falkowski P, Katz M, Knoll A, Quigg A, Raven J, Schofield O, Taylor F (2004) The evolution of modern phytoplankton. *Science*, 305: 354-360.
- Feely RA, Sabine CL, Hernandez-Ayon JM, Ianson D, Hales B (2008) Evidence for upwelling of corrosive “acidified” water onto the continental shelf. *Science*, 320: 1490-92.
- Figuerola FL, Salles S, Aguilera J, Jiménez C, Mercado J, Viñegla B, Flores-Moya A, Altamirano M (1997) Effects of solar radiation on photoinhibition and pigmentation in the red alga *Porphyra leucosticta*. *Mar Ecol Prog Ser*, 151: 81-90.
- Fiorda Giordanino MV, Strauch SM, Villafane VE, Helbling EW (2011) Influence of temperature and UVR on photosynthesis and morphology of four species of cyanobacteria. *J Photochem Photobiol B: Biol*, 103: 68-77.
- Forster J, Hirst AG, Esteban GF (2012) Achieving temperature-size changes in a unicellular organism. *ISME J*, 7: 28-36.
- Forster R, Schubert H (2001) The effects of ultraviolet radiation on the planktonic community of a shallow, eutrophic estuary: Results of mesocosm experiments. *Helgoland Mar Res*, 55: 23-34.
- Furgal JA, Smith REH (1997) Ultraviolet radiation and photosynthesis by Georgian Bay phytoplankton of varying nutrient and photoadaptive status. *Can J Fish Aquat Sci*, 54: 1659-1667.
- Gao K, Li G, Helbling EW, Villafañe VE (2007) Variability of UVR effects on photosynthesis of summer phytoplankton assemblages from a tropical coastal area of the South China Sea. *Photochem Photobiol*, 83: 802-809.
- Gao, K, P. Li, T. Watanabe & E.W. Helbling (2008) Combined effects of ultraviolet radiation and temperature on morphology, photosynthesis and DNA of the economic cyanobacterium *Arthrospira (Spirulina) platensis*. *J Phycol*, 44 (3): 777-786.

- Garcia-Pichel F (1994) A model for internal self-shading in planktonic organisms and its implications for the usefulness of ultraviolet sunscreens. *Limnol Oceanogr*, 39: 1704-1717.
- Gayoso AM (1999) Seasonal succession patterns of phytoplankton in the Bahía Blanca estuary (Argentina). *Bot Mar*, 42: 367-375.
- Genty B, Briantais J, Baker NR (1989) The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochim Biophys Acta*, 990: 87-92.
- Goldman JC, Carpenter EJ (1974) A kinetic approach to the effect of temperature on algal growth. *Limnol Oceanogr*, 19: 756-765.
- Gonçalves RJ, Souza MS, Aigo J, Modenutti B, Balseiro E, Villafañe VE, Cussac V, Helbling EW (2010) Responses of plankton and fish from temperate zones to UVR and temperature in a context of global change. *Ecol Austral*, 20: 129-153.
- Greer DH, Berry IA, Bjorkman O (1986) Photoinhibition of photosynthesis in intact bean leaves: role of light, temperature and requirement for chloroplast protein synthesis during recovery. *Planta*, 168: 253-260.
- Gröniger A, Sinha RP, Klisch M, Häder DP (2000) Photoprotective compounds in cyanobacteria, phytoplankton and macroalgae - a database. *J Photochem Photobiol B: Biol*, 58: 115-122.
- Grouneva I, Jakob T, Wilhelm C, Goss R (2008) A new multicomponent NPQ mechanism in the diatom *Cyclotella meneghiniana*. *Plant Cell Physiol*, 49: 1217-1225.
- Guillard RRL, Ryther JH (1962) Studies of marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Hustedt, and *Detonula confervacea* (Cleve) Gran. *Can J Microbiol*, 8: 229-239.
- Häder DP, Kumar HD, Smith RC, Worrest RC (2003) Aquatic ecosystems: effects of solar ultraviolet radiation and interactions with other climatic change factors. *Photochem Photobiol Sci*, 2: 39-50.
- Häder DP, Lebert M, Schuster M, del Ciampo L, Helbling EW, McKenzie R (2007) ELDONET - A decade of monitoring solar radiation on five continents. *Photochem Photobiol*, 83: 1348-1357.
- Häder DP, Helbling EW, Williamson CE, Worrest RC (2011) Effects of UV radiation on aquatic ecosystems and interactions with climate change. *Photochem Photobiol Sci* 10: 242-260.
- Halac SR, Felip M, Camarero L, Sommaruga-Wögrath S, Psenner R, Catalan J, Sommaruga R (1997) An *in situ* enclosure experiment to test the solar UVB impact on plankton in a high-altitude mountain lake. I. Lack of effect on phytoplankton species composition and growth. *J Plankton Res*, 19: 1671-1686.
- Halac SR, García-Mendoza E, Banaszak AT (2009) Ultraviolet radiation reduces the photoprotective capacity of the marine diatom *Phaeodactylum tricorutum* (Bacillariophyceae, Heterokontophyta). *Photochem Photobiol*, 85: 807-815.
- Hallegraeff GM (2010) Ocean climate change, phytoplankton community responses, and harmful algal blooms: A formidable predictive challenge. *J Phycol*, 46: 220-235.

- Hancke TB, Hancke LM, Olsen LM, Johnsen G, Glud RN (2008) Temperature effects on microalgal photosynthesis-light responses measured by O₂ production, pulse-amplitude-modulated fluorescence, and C assimilation. *J Phycol*, 44: 501-514.
- Hannach G, Sigleo AC (1998) Photoinduction of UV-absorbing compounds in six species of marine phytoplankton. *Mar Ecol Prog Ser*, 174: 207-222.
- Hancke K, Hancke TB, Olsen LM, Johnsen G, Glud RN (2008) Temperature effects on microalgal photosynthesis-light responses measured by O₂ production, pulse-amplitude-modulated fluorescence, and C assimilation. *J Phycol*, 44: 501-514.
- Hanelt D, Huppertz K, Nultsch W (1993) Daily course of photosynthesis and photoinhibition in marine macroalgae investigated in the laboratory and field. *Mar Ecol Prog Ser*, 97: 31-37.
- Hartmann DL, Wallace JM, Limpasuvan V, Thompson DWJ, Holton JR (2000) Can ozone depletion and global warming interact to produce rapid climate change? *Proc Natl Acad Sci USA*, 97: 1412-1417.
- Helbling EW, Villafañe VE, Ferrario M, Holm-Hansen O (1992a) Impact of natural ultraviolet radiation on rates of photosynthesis and on specific marine phytoplankton species. *Mar Ecol Prog Ser*, 80: 89-100.
- Helbling EW, Santamarina JM, Villafañe VE (1992b) Chubut river estuary (Argentina): Estuarine variability under different conditions of river discharge. *Rev Biol Mar Oceanogr*, 27: 73-90.
- Helbling EW, Chalker BE, Dunlap WC, Holm-Hansen O, Villafañe VE (1996) Photoacclimation of antarctic marine diatoms to solar ultraviolet radiation. *J Exp Mar Biol Ecol*, 204: 85-101.
- Helbling EW, Buma AGJ, de Boer MK, Villafañe VE (2001a) *In situ* impact of solar ultraviolet radiation on photosynthesis and DNA in temperate marine phytoplankton. *Mar Ecol Prog Ser*, 211: 43-49.
- Helbling EW, Villafañe VE, Buma AGJ, Andrade M, Zaratti F (2001b) DNA damage and photosynthetic inhibition induced by solar UVR in tropical phytoplankton (Lake Titicaca, Bolivia). *Eur J Phycol*, 36: 157-166.
- Helbling EW, Menchi CF, Villafañe VE (2002) Bioaccumulation and role of UV-absorbing compounds in two crustacean species from Patagonia, Argentina. *Photochem Photobiol Sci*, 1: 820-825.
- Helbling EW, Gao K, Gonçalves RJ, Wu H, Villafañe VE (2003) Utilization of solar ultraviolet radiation by phytoplankton assemblages from the Southern China Sea when exposed to fast mixing conditions. *Mar Ecol Prog Ser*, 259: 59-66.
- Helbling EW, Zagarese HE (2003) UV effects in aquatic organisms and ecosystems. Comprehensive Series in Photochemical and Photobiological Sciences, The Royal Society of Chemistry, Cambridge, 575 pgs.
- Helbling EW, Barbieri ES, Marcoval MA, Gonçalves RJ, Villafañe VE (2005) Impact of solar ultraviolet radiation on marine phytoplankton of Patagonia, Argentina. *Photochem Photobiol*, 81: 807-818.

Helbling EW, Villafane VE (2007) Phytoplankton and primary production. En: Safran P (ed), Fisheries & Aquaculture, Encyclopedia of Life Support Systems (EOLSS), Eolss Publishers, Oxford, UK [<http://www.eolss.net>]

Helbling EW, Buma AGJ, van de Poll W, Fernández Zenoff MV, Villafañe VE (2008) UVR-induced photosynthetic inhibition dominates over DNA damage in marine dinoflagellates exposed to fluctuating solar radiation regimes. *J Exp Mar Biol Ecol*, 365: 96-102.

Helbling EW, Pérez DE, Medina CD, Lagunas MG, Villafañe VE (2010) Phytoplankton distribution and photosynthesis dynamics in the Chubut River estuary (Patagonia, Argentina) throughout tidal cycles. *Limnol Oceanogr*, 55: 55-65.

Helbling EW, Buma AGJ, Boelen P, van der Strate HJ, Fiorda Giordanino MV, Villafañe VE (2011) Increase in Rubisco activity and gene expression due to elevated temperature partially counteracts ultraviolet radiation-induced photoinhibition in the marine diatom *Thalassiosira weissflogii*. *Limnol Oceanogr*, 56: 1330-1342.

Heraud P, Beardall J (2000) Changes in chlorophyll fluorescence during exposure of *Dunaliella tertiolecta* to UV radiation indicate a dynamic interaction between damage and repair processes. *Photosynth Res*, 63: 123-134.

Hernández Moresino RD, Helbling EW (2010) Combined effects of UVR and temperature on the survival of crab larvae (Zoea I) from Patagonia: The role of UV-absorbing compounds. *Mar Drugs*, 8: 1681-1698.

Hernández Moresino RD, Gonçalves RJ, Helbling EW (2011) Sublethal effects of ultraviolet radiation on crab larvae of *Cyrtograpsus altimanus*. *J Exp Mar Biol Ecol*, 407: 363-369.

Hernando MP, San Román N (1999) Preliminary data on chronic effects of ultraviolet radiation on the growth of some phytoplankton species of the Beagle Channel, Argentina. *Sci Mar*, 63: 81-88.

Hernando MP, Malanga G, Ferreyra GA (2005) Oxidative stress and antioxidant defenses generated by solar UV in a sub-Antarctic marine phytoflagellate. *Sci Mar*, 68: 287-295.

Hernando MP, Schloss I, Roy S, Ferreyra G (2006) Photoacclimation to long-term ultraviolet radiation exposure of natural sub-Antarctic phytoplankton communities: fixed surface incubations versus mixed mesocosms. *Photochem Photobiol*, 82: 923-935.

Hillebrand H, Dürselen CD, Kirschtel D, Pollinger U, Zohary T (1999) Biovolume calculation for pelagic and benthic microalgae. *J Phycol*, 35: 403-424.

Holm-Hansen O, Lorenzen CJ, Holmes RW, Strickland JDH (1965) Fluorometric determination of chlorophyll. *J Cons Int Explor Mer*, 30: 3-15.

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

Houghton JT, Ding Y, Griggs DJ, Noguier M, van der Linden PJ, Dai X, Maskell K, Johnson CA (2001) *Climate Change 2001*, Cambridge Univ. Press, New York.

Ibelings BW (1996) Changes in photosynthesis in response to combined irradiance and temperature stress in cyanobacterial surface waterblooms. *J Phycol*, 32: 549-557.

IPCC (2007) *Climate Change 2007: the physical science basis*. Contribution of working group I to the fourth assessment report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Cambridge Univ Press, New York.

Jeffrey WH, Pledger RJ, Aas P, Hager S, Coffin RB, Von Haven R, Mitchell DL (1996) Diel and depth profiles of DNA photodamage in bacterioplankton exposed to ambient solar ultraviolet radiation. *Mar Ecol Prog Ser*, 137: 283-291.

Jeffrey SW, Mactavish HS, Dunlap WC, Vesik M, Groenewoud K (1999) Occurrence of UVA and UVB-absorbing compounds in 152 species (306 strains) of marine microalgae. *Mar Ecol Prog Ser*, 189: 35-51.

Johnson NC, Xie SP (2010) Changes in the sea surface temperature threshold for tropical convection. *Nature Geosci*, 3: 842-845.

Jordan B R, He J, Chow W S, Anderson JM (1992) Changes in mRNA levels and polypeptide subunits of ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase in response to supplemental UV-B radiation. *Plant, Cell Environ*, 15: 91-98.

Kana M, Geider RJ, Critchley C (1997) Regulation of photosynthetic pigments in microalgae by multiple environmental factors: a dynamic balance hypothesis *New Phytol*, 137: 629-638.

Karentz D, Cleaver JE, Mitchell DL (1991) Cell survival characteristics and molecular responses of Antarctic phytoplankton to ultraviolet-B radiation. *J Phycol*, 27: 326-341.

Karentz D (1994) Ultraviolet tolerance mechanisms in Antarctic marine organisms. En: Weiler CS, Penhale PA (eds) *Ultraviolet radiation in Antarctica: Measurements and biological effects*, American Geophysical Union, Washington DC, pp 93-110.

Keller AA, Hargraves P, Jeon H, Klein-Macphee G, Klos E, Oviatt C, Zhang J (1997) Effects of ultraviolet-B enhancement on marine trophic levels in a stratified coastal system. *Mar Biol*, 130: 277-287.

Kirchhoff VWJH, Zamorano B F, Casiccia S CAR (1997) UV-B enhancements at Punta Arenas, Chile. *J Photochem Photobiol B: Biol*, 38: 174-177.

Klausches T, Bauer B, Aberle-Malzahn N, Sommer U, Gaedke U (2012) Climate change effects on phytoplankton depend on cell size and food web structure. *Mar Biol*, 159: 2455-2478.

Komenda J, Hassan HAG, Diner BA, Debus RJ, Barber J, Nixon PJ (2000) Degradation of the photosystem II D1 and D2 proteins in different strains of the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803 varying with respect to the type and level of psbA transcript. *Plant Mol Biol*, 42: 635-645.

Korbee N, Figueroa FL, Aguilera J (2006) Acumulación de aminoácidos tipo micosporina (MAAs): Biosíntesis, fotocontrol y funciones ecofisiológicas. *Rev Chil Hist Nat*, 79: 119-132.

Lassen MK, Nielsen KD, Richardson K, Garde K, Schlüter L (2010) The effects of temperature increases on a temperate phytoplankton community - A mesocosm climate change scenario. *J Exp Mar Biol Ecol*, 383: 79-88.

- Laurion I, Vincent W (1998) Cell size versus taxonomic composition as determinants of UV-sensitivity in natural phytoplankton communities. *Limnol Oceanogr*, 43: 1774-1779.
- Lavaud J, Strzepek R, Kroth P (2007) Photoprotection capacity differs among diatoms: possible consequences on the spatial distribution of diatoms related to fluctuations in the underwater light climate. *Limnol Oceanogr*, 52:1188-1194.
- Leech DM, Padeletti A, Williamson CE (2005) Zooplankton behavioral responses to solar UV radiation vary within and among lakes. *J Plankton Res*, 27: 461-471.
- LeGresley CM, McDermott G (2010) Counting chamber methods for quantitative phytoplankton analysis-haemocytometer, Palmer-Maloney cell and Sedgewick-Rafter cell. En: Karlson B, Cusack C, Bresnan E (eds) Microscopic and molecular methods for quantitative phytoplankton analysis, Intergovernmental Oceanographic Commission (IOC), Manuals and Guides, UNESCO, pp 25-30.
- Leibold MA, West CT (1993) Experimental methods for measuring the effect of light acclimation on vertical migration by *Daphnia* in the field. *Limnol. Oceanogr.*, 38: 638-643.
- Lesser MP (1996) Acclimation of phytoplankton to UV-B radiation: oxidative stress and photoinhibition of photosynthesis are not prevented by UV-absorbing compounds in the dinoflagellate *Prorocentrum micans*. *Mar Ecol Prog Ser*, 132: 287-297.
- Levitus S, Antonov JI, Boyer TP, Stephens C (2000) Warming of the world ocean. *Science*, 287: 2225-2229.
- Lewandowska A, Sommer U (2010) Climate change and the spring bloom: a mesocosm study on the influence of light and temperature on phytoplankton and mesozooplankton. *Mar Ecol Prog Ser*, 405: 101-111.
- Lewandowska AM, Breithaupt P, Hillebrand H, Hoppe HG, Jürgens K, Sommer U (2012) Responses of primary productivity to increased temperature and phytoplankton diversity. *J Sea Res*, 72: 87-93.
- Lionard M., Roy S., Tremblay-Létourneau M., Ferreyra GA (2012) Combined effects of increased UV-B and temperature on the pigment-determined marine phytoplankton community of the St. Lawrence Estuary. *Mar Ecol Prog Ser*, 445: 219-234.
- Litchman E, Neale PJ (2005) UV effects on photosynthesis, growth and acclimation of an estuarine diatom and cryptomonad. *Mar Ecol Prog Ser*, 300: 53-62.
- Llabrés M, Agustí S (2006) Picophytoplankton cell death induced by UV radiation: Evidence for oceanic Atlantic communities. *Limnol Oceanogr*, 51: 21-29.
- Llewellyn CA, Airs RL (2010) Distribution and abundance of MAAs in 33 species of microalgae across 13 classes. *Mar Drugs*, 8: 1273-1291.
- Lutz VA, Segura V, Dogliotti AI, Gagliardini DA, Bianchi AA, Balestrini CF (2010) Primary production in the Argentine Sea during spring estimated by field and satellite models. *J Plankton Res*, 32: 181-195.
- Lyons MM, Aas P, Pakulski JD, Van Waasbergen L, Mitchell DL, Miller RV, Jeffrey WH (1998). Ultraviolet radiation induced DNA damage in coral reef microbial communities. *Mar Biol*, 130: 537-543.

- MacFadyen EJ, Williamson CE, Grad G, Lowery M, Jeffrey WH, Mitchell DL (2004) Molecular response to climate change: temperature dependence of UVR-induced DNA damage and repair in the freshwater crustacean *Daphnia pulicaria*. *Global Change Biol*, 10: 408-416.
- MacIntyre HL, Geider RJ (2000) The effect of water motion on short-term rates of photosynthesis by marine phytoplankton. *Trends Plant Sci*, 5: 12-17.
- Madronich S (1993) The atmosphere and UV-B radiation at ground level. En: Young AR, Björn LO, Moan J, Nultsch W (eds) Environmental UV photobiology, Plenum Press, New York, pp. 1-39.
- Madronich S, McKenzie RL, Björn LO, Caldwell MM (1998) Changes in biologically active ultraviolet radiation reaching the Earth's surface. *J Photochem Photobiol B: Biol*, 46: 5-19.
- Manrique JM, Calvo AY, Halac SR, Villafañe VE, Jones LR, Helbling EW (2012) Effects of UV radiation on the taxonomic composition of natural bacterioplankton communities from Bahía Engaño (Patagonia, Argentina). *J Photochem Photobiol B: Biol*, 117: 171-178.
- Marcoval MA, Villafañe VE, Helbling EW (2007) Interactive effects of ultraviolet radiation and nutrient addition on growth and photosynthesis performance of four species of marine phytoplankton. *J Photochem Photobiol B: Biol*, 89: 78-87.
- Marcoval MA, Villafañe VE, Helbling EW (2008) Combined effects of solar ultraviolet radiation and nutrients addition on growth, biomass and taxonomic composition of coastal marine phytoplankton communities of Patagonia. *J Photochem Photobiol B: Biol*, 91: 157-166.
- Menden-Deuer S, Lessard EJ (2000) Carbon to volume relationships for dinoflagellates, diatoms, and of the protist plankton. *Limnol Oceanogr*, 45: 569-579.
- Merino M, Otero L (1991) Atlas ambiental costero, Puerto Morelos- Quintana Roo. Ferrandiz SA, México, DF, 80 p.
- Miller R, Wingard CE, Castenholz RW (1998) Effects of visible light and UV radiation on photosynthesis in a population of a hot spring cyanobacterium, a *Synechococcus* sp., subjected to high-temperature stress. *Appl Environ Microb*, 64: 3893-3899.
- Montagnes DJS, Franklin DJ (2001) Effect of temperature on diatom volume, growth rate, and carbon and nitrogen content: Reconsidering some paradigms. *Limnol Oceanogr*, 46: 2008-2018.
- Montecino V, Molina X, Martínez G, Olmedo MI, Retamal, L, Hannach G, Orellana MV (2001) Ecophysiological strategies in response to UV-B radiation stress in cultures of temperate microalgae isolated from the Pacific coast of South America. *Rev Chil Hist Nat*, 74: 293-311.
- Montero O, Sobrino C, Parés G, Lubián LM (2002a) Photoinhibition and recovery after selective short-term exposure to solar radiation of five chlorophyll *c*-containing marine microalgae. *Cienc Mar*, 28: 223-236.

- Montero O, Klisch M, Häder DP, Lubian LM (2002b) Comparative sensitivity of seven marine microalgae to cumulative exposure to ultraviolet-B radiation with daily increasing doses. *Bot Mar*, 45: 305-315.
- Mousseau L, Gosselin M, Levasseur M, Demers S, Fauchot J, Roy S, Villegas PZ, Mostajir B (2000) Effects of ultraviolet-B radiation on simultaneous carbon and nitrogen transport rates by estuarine phytoplankton during a week-long mesocosm study. *Mar Ecol Prog Ser*, 199: 69-81.
- Mostajir B, Demers S, de Mora S, Belzile C, Chanut JP, Gosselin M, Roy S, Villegas PZ, Fauchot J, Bouchard JN, Bird D, Monfort P, Levasseur M (1999) Experimental test of the effect of ultraviolet-B radiation in a planktonic community. *Limnol Oceanogr*, 44: 586-596.
- Müller P, Li XP, Niyogi KK (2001) Non-photochemical quenching. A response to excess light energy. *Plant Physiol*, 125: 1558-1566.
- Neale PJ, Cullen JJ, Davis RF (1998a) Inhibition of marine photosynthesis by ultraviolet radiation: Variable sensitivity of phytoplankton in the Weddell-Scotia Confluence during the austral spring. *Limnol Oceanogr*, 43: 433-448.
- Neale PJ, Banaszak AT, Jarriel CR (1998b) Ultraviolet sunscreens in *Gymnodinium sanguineum* (Dinophyceae): Mycosporine-like amino acids protect against inhibition of photosynthesis. *J Phycol* 34: 928-938.
- Neale PJ, Helbling EW, Zagarese HE (2003) Modulation of UVR exposure and effects by vertical mixing and advection. En: Helbling EW, Zagarese HE (eds), UV effects in aquatic organisms and ecosystems, Comprehensive Series in Photochemical and Photobiological Sciences, The Royal Society of Chemistry, Cambridge, pp. 107-134.
- Nilawati J, Greenburg BM, Smith REH (1997) Influence of ultraviolet radiation on growth and photosynthesis of two cold ocean diatoms. *J Phycol*, 33: 215-224.
- Olaizola M, La Roche J, Kolber Z, Falkowski PG (1994) Non-photochemical fluorescence quenching and the diadinoxanthin cycle in a marine diatom. *Photosynth Res*, 41: 357-370.
- Orce VL, Helbling EW (1997) Latitudinal UVR-PAR measurements in Argentina: Extent of the 'ozone hole'. *Global Plan Change*, 15: 113-121.
- Orr JC, Fabry VJ, Aumont O, Bopp L, Doney SC, et al. (2005) Anthropogenic ocean acidification over the twenty-first century and its impact on calcifying organisms. *Nature*, 437:681-86.
- Osburn CL, Morris DP (2003). Photochemistry of chromophoric dissolved organic matter in natural waters. En: Helbling EW, Zagarese H (eds), UV effects in aquatic organisms and ecosystems, Comprehensive Series in Photochemistry & Photobiology, The Royal Society of Chemistry, Cambridge, pp 185-217.
- Osmond CB (1994) What is photoinhibition? Some insights from comparisons of shade and sun plants. En: Baker NR, Bowyer JR (eds.) Photoinhibition of photosynthesis, from molecular mechanisms to the field, Bios Scientific, pp. 1-24.
- Peletier H, Gieskes WWC, Buma AGJ (1996) Ultraviolet-B radiation resistance of benthic diatoms isolated from tidal flats in the Dutch Wadden Sea. *Mar Ecol Prog Ser*, 135: 163-168.

- Pfeifer GP (1997) Formation and processing of UV photoproducts: effects of DNA sequence and chromatin environment. *Photochem Photobiol*, 65: 270–283.
- Präsil O, Adir N, Ohad I (1992) Dynamics of photosystem II: Mechanism of photoinhibition and recovery processes. En: Barber J (ed), *The Photosystems: Structure, function and molecular biology*, Elsevier Science Publishers, New York, pp. 295-348.
- Porra RJ (2002) The chequered history of the development and use of simultaneous equations for the accurate determination of chlorophylls *a* and *b*. *Photosynth Res*, 73: 149-156.
- Rae R, Vincent WF (1998) Effects of temperature and ultraviolet radiation on microbial food web structure: potential response to global change. *Freshwat Biol*, 40: 747-758.
- Rae R, Howard-Williams C, Hawes I, Vincent W (2000) En: Davison W, Howard-Williams C, Broady P (eds), *Antarctic ecosystems: Models for wider ecological understanding*, SCRA VII Proceedings, The Caxton Press, New Zealand, pp. 183-189.
- Richter PR, Häder DP, Gonçalves RJ, Marcoval MA, Villafañe VE, Helbling EW (2007a) Vertical migration and motility responses in three marine phytoplankton species exposed to solar radiation. *Photochem Photobiol*, 83: 810–817.
- Richter P, Helbling W, Streb C, Häder DP (2007b) PAR and UV effects on vertical migration and photosynthesis in *Euglena gracilis*. *Photochem Photobiol*, 83: 818-823.
- Riebesell U, Schulz KG, Bellerby RGJ, Botros M, Fritsche P, et al. (2007) Enhanced biological carbon consumption in a high CO₂ ocean. *Nature*, 450:545–48.
- Rodríguez-Martínez RE, Ruíz-Rentería F, van Tussenbroek B, Barba-Santos MG, Escalante-Mancera E, Jordán-Garza G, Jordán-Dahlgren E (2010) State and environmental tendencies of the Puerto Morelos CARICOMP site, Mexico. *Rev Biol Trop*, 58: 23-43.
- Rodríguez-Román A, Iglesias-Prieto R (2005) Regulation of photochemical activity in cultured symbiotic dinoflagellates under nitrate limitation and deprivation. *Mar Biol*, 146: 1063-1073.
- Rodríguez-Román A, Hernández-Pech X, Thomé PE, Enríquez S, Iglesias-Prieto R (2006) Photosynthesis and light utilization in the Caribbean coral *Montastraea faveolata* recovering from a bleaching event. *Limnol Oceanogr*, 51: 2702-2710.
- Roemmich D, Gilson J (2009) The 2004-2008 mean and annual cycle of temperature, salinity, and steric height in the global ocean from Argo Program. *Progr Oceanogr*, 82: 81-100.
- Roos JC, Vincent WF (1998) Temperature dependence of UV radiation effects on Antarctic cyanobacteria. *J Phycol*, 34: 118–125.
- Roy S (2000) Strategies for the minimization of UV-induced damage. En: de Mora S, Demers S, Vernet M (eds) *The effects of UV radiation in the marine environment*, Cambridge Environ Chem Ser, 10, Cambridge University Press, Cambridge, pp 177-205.
- Roy S, Mohovic B, Giancesella SMF, Schloss IR, Ferrario ME, Demers S (2006) Effects of enhanced UV-B on pigment-based phytoplankton biomass and composition of mesocosm-enclosed natural marine communities from three latitudes. *Photochem Photobiol*, 82: 909-922.

- Ruban AV, Lavaud J, Rousseau B, Guglielmi G, Horton P, Etienne AL (2004) The super-excess energy dissipation in diatom algae: comparative analysis with higher plants. *Photosynth Res*, 82: 165-175.
- Ruggaber A, Dlugi R, Nakajima T (1994) Modelling of radiation quantities and photolysis frequencies in the troposphere. *J Atmos Chem*, 18: 171-210.
- Sanders RW, Macaluso AL, Sardina TJ, Mitchell DL (2005) Photoreactivation in two freshwater ciliates: differential responses to variations in UV-B flux and temperature. *Limnol Oceanogr*, 40: 283-292
- Seckmeyer G, McKenzie RL (1992). Increased ultraviolet radiation in New Zealand (45 °S) relative to Germany (48 °N). *Nature*, 359: 135-137.
- Shannon CE (1948) A mathematical theory of communication. *Bell Syst Tech J*, 27: 379-423.
- Skewgar E, Boersma PD, Harris G, Caille G (2007) Sustainability: Anchovy fishery threat to Patagonian Ecosystem. *Science*, 315: 45.
- Shick JM, Dunlap WC (2002) Mycosporine-like amino acids and related gadusols: Biosynthesis, accumulation, and UV-protective functions in aquatic organisms. *Annu Rev Physiol*, 64: 223-262.
- Sobrino C, Neale PJ (2007) Short-term and long-term effects of temperature on photosynthesis in the diatom *Thalassiosira pseudonana* under UVR exposures. *J Phycol*, 43: 426-436.
- Sommaruga R (2003) UVR and its effects on species interactions. En: Helbling EW, Zagarese HE (eds) UV effects in aquatic organisms and ecosystems, Comprehensive Series in Photochemistry & Photobiology, The Royal Society of Chemistry, Cambridge, pp. 485-508.
- Staehelin J, Harris NRP, Appenzeller C, Ebenhard J (2001) Ozone trends: a review. *Rev Geophys*, 39: 231-290.
- Stott PA, Kettleborough JA (2002) Origins and estimates of uncertainty in predictions of twenty-first century temperature rise. *Nature*, 416: 723-726.
- Strathmann RR (1967) Estimating the organic carbon content of phytoplankton from cell volume or plasma volume. *Limnol Oceanogr*, 12: 411-418.
- Strecker AL, Cobb TP, Vinebrooke RD (2004) Effects of experimental greenhouse warming on phytoplankton and zooplankton communities in fishless alpine ponds. *Limnol Oceanogr*, 49: 1182-1190.
- Stridd A, Chow WS, Anderson JM (1994) UV-B damage and protection at the molecular level in plants. *Photosynth Res*, 39: 475-489.
- Sundbäck K, Nilsson C, Odmark S, Wulff A (1996) Does ambient UV-B radiation influence marine diatom-dominated microbial mats? A case study. *Aquat Microb Ecol*, 11: 151-159.

- Takahashi T, Sutherland SC, Feely RA, Wanninkhof R (2006) Decadal change of surface water pCO₂ in the North Pacific: a synthesis of 35 years of observations. *J Geophys Res*, 111:C07S05.
- Tartarotti B, Sommaruga R (2002) The effect of different methanol concentrations and temperatures on the extraction of mycosporine like amino acids (MAAs) in algae and zooplankton. *Arch Hydrobiol*, 154: 691-703.
- Thompson P (1999) The response of growth and biochemical composition to variations in daylength, temperature, and irradiance in the marine diatom *Thalassiosira pseudonana* (Bacillariophyceae). *J Phycol*, 35:1215–1223.
- Thyssen M, Ferreyra G, Moreau S, Schloss I, Denis M, Demers S (2011) The combined effect of ultraviolet B radiation and temperature increase on phytoplankton dynamics and cell cycle using pulse shape recording flow cytometry. *J Exp Mar Biol Ecol*, 406: 95-107.
- Tilman D, Reich PB, Knops J, Wedin D, Mielke T, Lehman C (2001) Diversity and productivity in a long-term grassland experiment. *Science*, 294: 843-845.
- van de Poll WH, van Leeuwe MA, Roggeveld J, Buma AGJ (2005) Nutrient limitation and high irradiance acclimation reduce PAR and UV-induced viability loss in the Antarctic diatom *Chaetoceros brevis* (Bacillariophyceae). *J Phycol* 4: 840-850.
- van de Poll WH, Buma AGJ, Visser RJW, Janknegt PJ, Villafañe VE, Helbling EW (2010) Xanthophyll cycle activity and photosynthesis of *Dunaliella tertiolecta* (Chlorophyceae) and *Thalassiosira weissflogii* (Bacillariophyceae) during fluctuating solar radiation. *Phycologia*, 49: 249-259.
- van Tussenbroek BI (2011) Dynamics of seagrasses and associated algae in coral reef lagoons. *Hidrobiológica*, 21: 293-310.
- Velicogna, I. (2009) Increasing rates of ice mass loss from the Greenland and Antarctic ice sheets revealed by GRACE. *Geophys Res Lett*, 36, L19503, doi:10.1029/2009GL040222.
- Vernet M, Neori A, Haxo FT (1989) Spectral properties and photosynthetic action in red-tide populations of *Prorocentrum micans* and *Gonyaulax polyedra*. *Mar Biol*, 103: 365-371.
- Vernet M (2000) Effects of UV radiation on the physiology and ecology of marine phytoplankton. En: de Mora S, Demers S, Vernet M (eds) *The effects of UV radiation in the marine environment*, Cambridge Environ Chem Ser, 10, Cambridge University Press, Cambridge, pp 237-278.
- Villafañe VE, Helbling EW, Santamarina J (1991) Phytoplankton blooms in the Chubut river estuary (Argentina): Influence of stratification and salinity. *Rev Biol Mar*, (Valparaíso) 26: 1-20.
- Villafañe VE, Helbling EW, Holm-Hansen O, Chalker BE (1995) Acclimatization of Antarctic natural phytoplankton assemblages when exposed to solar ultraviolet radiation. *J Plankton Res*, 17: 2295-2306.
- Villafañe VE, Reid FMH (1995) Métodos de microscopía para la cuantificación del fitoplancton. En: Alveal K, Ferrario ME, Oliveira EC, Sar E (eds) *Manual de métodos ficológicos*, Universidad de Concepción, Concepción, Chile, pp 169-185.

- Villafañe VE, Helbling EW, Zagarese HE (2001) Solar ultraviolet radiation and its impact on aquatic systems of Patagonia, South America. *Ambio*, 30: 112-117.
- Villafañe VE, Sundbäck K, Figueroa FL, Helbling EW (2003) Photosynthesis in the aquatic environment as affected by UVR. En: Helbling EW, Zagarese HE (eds) UV effects in aquatic organisms and ecosystems, Comprehensive Series in Photochemistry & Photobiology, The Royal Society of Chemistry, Cambridge, pp 357-397.
- Villafañe VE, Barbieri ES, Helbling EW (2004a) Annual patterns of ultraviolet radiation effects on temperate marine phytoplankton off Patagonia, Argentina. *J Plankton Res*, 26: 167-174.
- Villafañe VE, Marcoval MA, Helbling EW (2004b) Photosynthesis versus irradiance (P vs. E) characteristics of coastal phytoplankton assemblages of Patagonia (Argentina): Temporal variability and solar ultraviolet radiation effects. *Mar Ecol Prog Ser*, 284: 23-34.
- Villafañe VE, Buma AGJ, Boelen P, Helbling EW (2004c) Solar UVR-induced DNA damage and inhibition of photosynthesis in phytoplankton from Andean lakes of Argentina. *Arch Hydrobiol*, 284: 23-34.
- Villafañe VE, Janknegt PJ, de Graaff M, Visser RJW, van de Poll WH, Buma AGJ, Helbling EW (2008) UVR-induced photoinhibition of summer marine phytoplankton communities from Patagonia. *Mar Biol*, 154: 1021-1029.
- Villafañe VE, Banaszak AT, Guendulain-García SD, Strauch SM, Halac SR, Helbling EW (2013). Influence of seasonal variables associated with climate change on photochemical diurnal cycles of marine phytoplankton from Patagonia (Argentina). *Limnol Oceanogr*, 58: 203–214.
- Vincent WF, Neale PJ (2000) Mechanisms of UV damage in aquatic organisms. En: de Mora SJ, Demers S, Vernet M (eds) The effects of UV radiation on marine ecosystems, Cambridge Environ Chem Ser, 10, Cambridge Univ Press, pp. 149-176.
- Visser AW, Thygesen UH (2003) Random motility of plankton: diffusive and aggregative contributions. *J Plankton Res*, 25: 1157-1168.
- Wagner H, Jakob T, Wilhelm C (2006) Balancing the energy flow from captured light to biomass under fluctuating light conditions. *New Phytol*, 169: 95-108.
- Wängberg SÅ, Selmer JS, Gustavson K (1996) Effects of UV-B radiation on biomass and composition in marine phytoplankton communities. *Sci Mar*, 60: 81-88.
- Wängberg SÅ, Garde K, Gustavson K, Selmer JS (1999) Effects of UVB radiation on marine phytoplankton communities. *J Plankton Res*, 21: 147-166.
- Wängberg SÅ, Andreasson KIM, Gustavson K, Reinthaler T, Henriksen P (2008) UV-B effects on microplankton communities in Kongsfjord, Svalbard - A mesocosm experiment. *J Exp Mar Biol Ecol*, 365: 156-163.
- Whitehead RF, de Mora S, Demers S, Gosselin M, Monfort P, Mostajir B (2000) Interactions of ultraviolet-B radiation, mixing, and biological activity on photobleaching of natural chromophoric dissolved organic matter: A mesocosm study. *Limnol Oceanogr*, 45: 278-291.

- Williamson CE, Grad G, Gilroy S, De Lange HJ, Karapelou DM (2002) Temperature dependent UV responses in zooplankton: implications of climate change. *Limnol Oceanogr*, 47: 1844–1848.
- Williamson CE, Zagarese HE (2003) UVR effects on aquatic ecosystems: a changing climate perspective. En: Helbling EW, Zagarese HE (eds) UV effects in aquatic organisms and ecosystems. Comprehensive Series in Photochemical and Photobiological Sciences, The Royal Society of Chemistry, Cambridge, pp 547-567.
- Williamson CE, Salm C, Cooke SL, Saros JE (2010) How do UV radiation, temperature, and zooplankton influence the dynamics of alpine phytoplankton communities? *Hydrobiologia*, 648:73-81.
- Winder M, Reuter JE, Schladow SG (2009) Lake warming favours small-sized planktonic diatom species. *Proc Royal Soc B*, 276: 427-435.
- Winder M, Sommer U (2012) Phytoplankton response to a changing climate. *Hydrobiologia*, 698: 5-16.
- Wohlers J, Engel A, Zöllner E, Breithaupt P, Jürgens K, Hoppe H, Sommer U, Riebesell U (2009) Changes in biogenic carbon flow in response to sea surface warming. *Proc Natl Acad Sci USA*, 106: 7067-7072.
- Wrona FJ, Prowse TD, Reist JD, Beamish R, Gibson JJ, Hobbie J, Jeppesen E, King J (2006) Climate change effects on aquatic biota, ecosystem structure and function. *Ambio*, 35: 359-369.
- Xenopoulos MA, Frost PC (2003) UV radiation, phosphorus, and their combined effects on the taxonomic composition of phytoplankton in a boreal lake. *J Phycol*, 39: 291-302.
- Xenopoulos MA, Leavitt PR, Schindler DW (2009) Ecosystem-level regulation of boreal lake phytoplankton by ultraviolet radiation. *Can J Fish Aquat Sci*, 66: 2002-2010.
- Zar JH (1999) Biostatistical Analysis, Prentice Hall, Englewood Cliffs, NJ.
- Zhang J, Hu X, Henkow L, Jordan BR, Strid A (1994) The effects of ultraviolet-B radiation on the CF₀F₁-ATP-ase. *Biochim Biophys Acta*, 1185: 295-302.
- Zondervan I (2007) The effects of light, macronutrients, trace metals and CO₂ on the production of calcium carbonate and organic carbon in coccolithophores—a review. *Deep Sea Res II*, 54:521–37.
- Zudaire L, Roy S (2001) Photoprotection and long-term acclimation to UV radiation in the marine diatom *Thalassiosira weissflogii*. *J Photochem Photobiol B: Biol*, 62: 26-34.