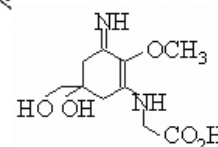
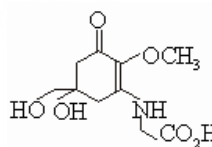
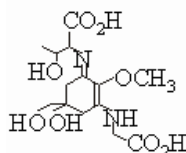
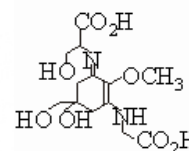
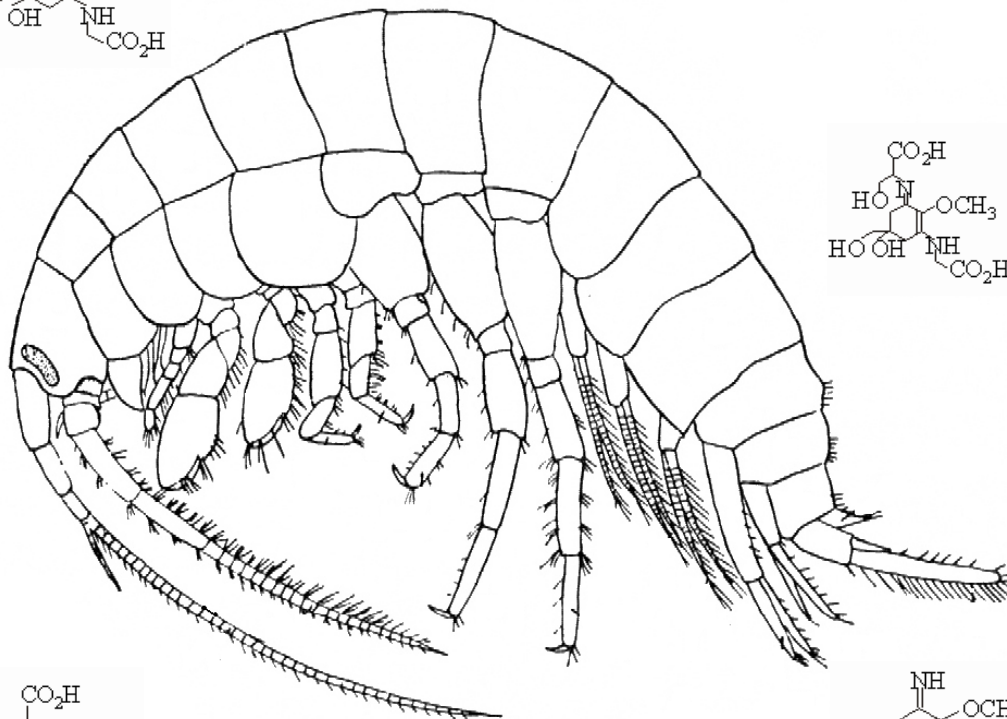
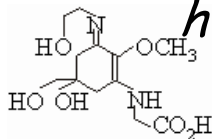


Tesis de grado:

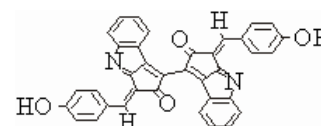
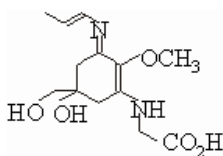
*"Bioacumulación de compuestos potencialmente protectores de la radiación ultravioleta (RUV) en crustáceos herbívoros del mesolitoral"*



**Alumno:** *Cristian Fernando Menchi*

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

**Profesor Asesor:** *Dr. Gustavo Pagnoni*



Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco  
Sede Puerto Madryn-Año 2001

# Índice

<b>Agradecimientos</b>	3
<b>Resumen</b>	4
<b>Introducción</b>	5
<b>Objetivo general / Hipótesis propuestas</b>	8
<b>Área de estudio</b>	9
<b>Materiales y métodos</b>	12
<i>-Experimentación</i>	12
<i>A - Bioacumulación de compuestos que absorben RUV</i>	13
<i>B - Efectos de la RUV en la supervivencia de los crustáceos</i>	14
<i>-Análisis y determinaciones</i>	16
<i>A - Espectros de absorción y análisis de picos</i>	16
<i>B - Determinación del peso</i>	16
<i>C - Determinación de la supervivencia a la RUV-B</i>	17
<i>D - Dosis letal 50 (LD<sub>50</sub>)</i>	17
<i>E - Tratamiento estadístico de los datos</i>	17
<b>Resultados</b>	18
<b>Discusión</b>	33
<b>Conclusiones</b>	38
<b>Bibliografía</b>	39

## Agradecimientos

Quiero agradecer a mi familia por haberme permitido cumplir este sueño, pese al gran esfuerzo que esto implicó para todos nosotros. A mi madre, luchadora infatigable que a pesar de los duros momentos que atravesamos, supo sacarnos adelante y lograr que hoy seamos la gran familia que somos.

En primer lugar quiero destacar el esfuerzo realizado por Walter Helbling y Virginia Villafañe para que pudiera realizar el presente trabajo, y en especial por haber confiado en mí, abriéndome no solo las puertas de la Estación de Fotobiología Playa Unión, sino también las de su hogar, haciéndome sentir parte de su Familia. Por sobre todas las cosas quiero agradecerles el tiempo que *pacientemente* dedicaron a mi formación académica y humana, preocupándose constantemente por mi bienestar.

A Gustavo Pagnoni y Luis Bala, con quienes me inicié en el mundo de la biología, y supieron interesarme por esta disciplina y en especial a Elena Gómez Símes quien estuvo siempre dispuesta a ayudarme en cuanto pudiese durante el desarrollo del presente trabajo.

A Ma. Luz Piriz y Graciela Casas quienes me ayudaron en la identificación de las macroalgas.

A Carolina Baarck y Ma. de los Ángeles Hernández, dos grandes amigas a quienes siento mis propias hermanas; con quienes compartí los buenos y malos momentos que me tocó enfrentar al encarar la vida universitaria, y quienes supieron apoyarme en cada nuevo emprendimiento.

A Luciano Real, Federico Martorell, Gaspar Soria y Ma. Paula Riccardi, quienes supieron demostrarme el valor de la amistad, y en quienes aprendí a confiar plenamente. En especial a Luciano por la ayuda brindada en la recolección y procesamiento de las muestras.

A Elena Barbieri por todo el apoyo que me brinda en esta nueva etapa.

A Sol Bonaudo y Juan Sindacovich, por todos los GRANDES momentos compartidos y en especial a Florencia Díaz.

A Mariana Lanffiuti, Javier Klaich, Ana Cinti, Ignacio Real, Maximiliano Papa, Diego Digiacomo, Rodrigo Gonçalves, Diego Acuña y Javier Deviasé, y a **TODAS** las personas que hicieron de mi estadía en Puerto Madryn algo inolvidable.

A la familia Villafañe, por su calidez y el cariño con que me reciben en Playa Unión, haciéndome sentir realmente cómodo.

Este trabajo se realizó en el marco de los proyectos financiados por: Consejo Nacional de Ciencia y Técnica CONICET (proyecto PIP N° 0457/98), Fundación Antorchas (Proyecto N° A-13669/1-3), Agencia nacional de Promoción Científica y Tecnológica (proyecto PICT 97 N° 07-00000-02206) y a la Fundación Playa Unión.

## Resumen

En esta tesis se realizaron experiencias con dos especies de crustáceos herbívoros (*Ampithoe valida* -Ampithoidae- e *Idothea baltica* -Idotheidae-) a fin de evaluar la bioacumulación de compuestos que absorben radiación ultravioleta (RUV), y su posible función protectora cuando los organismos son expuestos a la RUV-B (280-315 nm). Se mantuvo a los especímenes en acuarios durante 10 días con dos dietas de macroalgas: Una con alta (*Polysiphonia* sp., Rodophyta) y otra con baja (*Enteromorpha* sp., Chlorophyta) concentración de compuestos que absorben RUV. Durante este lapso de tiempo no se observaron diferencias significativas ( $p = 0,482$  y  $p = 0,159$  para anfípodos e isópodos, respectivamente) en la concentración de compuestos que absorben RUV. Sin embargo, en las experiencias llevadas a cabo con poblaciones naturales que se encontraban asociadas a *Polysiphonia* sp., *Enteromorpha* sp. y *Codium* sp. (Chloropyta), se determinó que, en ambas especies de crustáceos, la concentración de compuestos que absorben RUV estaba directamente relacionada con su concentración en las macroalgas de las que se alimentaban. Cuando las poblaciones naturales de *A. valida* e *I. baltica* se expusieron a la RUV-B, la tasa de supervivencia de ambas especies disminuyó significativamente ( $p = 0,003$  y  $p = 0,010$  para anfípodos e isópodos respectivamente), en aquellas poblaciones en las que la concentración de compuestos que absorben RUV era baja. Sin embargo, cuando la concentración de compuestos que absorben RUV en los crustáceos era alta, solo se vio afectada significativamente ( $p = 0,012$ ) la supervivencia de *I. baltica*, mientras que no hubo una mortalidad significativa ( $p = 0,052$ ) en *A. valida*. En ambas especies de crustáceos se determinó un umbral de resistencia a la RUV-B, por debajo del cual no se observó mortalidad. Este umbral de radiación fue de  $12,6 \text{ KJ m}^{-2}$  y  $40 \text{ KJ m}^{-2}$  para *A. valida* (con baja concentración de compuestos que absorben RUV) e *I. baltica*, respectivamente. Los datos de supervivencia en función de la concentración de compuestos que absorben RUV, conjuntamente con su localización en distintos tejidos del cuerpo, permiten inferir que estos compuestos tendrían una función protectora efectiva, a nivel individual en *A. valida*, mientras que en *I. baltica* estaría destinado a proteger a su descendencia.

## Introducción

La radiación solar es uno de los factores abióticos más importantes que condiciona la vida de los organismos. El espectro de radiación electromagnética proveniente del Sol está compuesto por distintas bandas, que se clasifican según su longitud de onda. Al intervalo formado por longitudes de onda entre 100 y 400 nm ( $1 \text{ nm} = 10^{-9} \text{ m}$ ) se lo denomina radiación ultravioleta (RUV). Esta banda a su vez se divide en: Radiación ultravioleta C (RUV-C) que comprende el intervalo de longitudes de onda de entre 100 y 280 nm, radiación ultravioleta B (RUV-B), representada por el intervalo 280-315 nm, y radiación ultravioleta A (RUV-A) establecida en el intervalo 315-400 nm. De estas tres bandas solo la RUV-A y la RUV-B llegan a la superficie terrestre, mientras que la RUV-C es absorbida por el oxígeno en la estratósfera (Lubin & Holm-Hansen, 1995). La RUV que llega a la Tierra tiene gran importancia biológica dado que interviene en numerosos procesos y produce una serie de efectos negativos sobre los seres vivos (Young *et al.*, 1993; Weiler & Penhale, 1994). Asimismo, la RUV puede alterar procesos y/o estructuras vitales, quedando demostrado que a menor longitud de onda mayores son los daños producidos por unidad de energía (Young *et al.*, 1993). Uno de los procesos más afectado y estudiado es el de la fotosíntesis (Helbling *et al.*, 1992; Smith *et al.*, 1992; Cullen *et al.*, 1992), aunque también se ha realizado una extensa investigación referida a los efectos de la RUV sobre la movilidad (Häder *et al.*, 1997; Newman *et al.*, 1999), supervivencia (Karanas *et al.*, 1979; Cywinska *et al.*, 2000), reproducción (Yabe *et al.*, 1998; Day *et al.*, 1999), material genético (Karentz & Lutze 1990; Buma *et al.*, 1996), y formación de radicales libres (Puntarulo & Malanga, 1995; Shick *et al.*, 1996). Existen numerosos estudios referidos a los efectos de la RUV sobre la fotosíntesis del fitoplancton (Helbling *et al.*, 1992; Smith *et al.*, 1992; Cullen *et al.*, 1992; Behrenfeld *et al.*, 1993; Neale, 1997; Villafañe *et al.*, 1999) dada la importancia ecológica de los productores primarios para los ecosistemas acuáticos. Sin embargo, son comparativamente pocos los estudios dirigidos a evaluar el impacto de la RUV en consumidores primarios (Zagarese *et al.*, 1991; 1994; Schulze *et al.*, 1995; Carroll & Shick, 1996; Tartarotti *et al.*, 1999; Browman *et al.*, 2000), los cuales son una importante fuente de energía para los niveles tróficos superiores.

La protección contra la exposición a la RUV ha sido un rasgo importante en la evolución de los organismos eucariotas y en los subsecuentes procesos de especiación y

selección natural (Karentz *et al.*, 1991). Los organismos terrestres que viven directa y constantemente expuestos, como las plantas superiores, han desarrollado mecanismos que incluyen adaptaciones morfológicas (Caldwell *et al.*, 1995), síntesis de pigmentos, tales como antocianinas y carotenoides (Juhl *et al.*, 1996), y otros compuestos protectores como los flavonoides (Fischbach *et al.*, 1999). Por su parte, los organismos acuáticos han desarrollado algunas estrategias básicas para minimizar los efectos de la RUV, como la migración vertical (Hessen, 1994), y la síntesis y/o bioacumulación de compuestos fotoprotectores tales como carotenoides y Mycosporine Like Amino Acids (MAAs<sup>1</sup>) (Adams *et al.*, 1994; Shick *et al.*, 1996; Helbling *et al.*, 1996). Una vez que el daño se ha producido, también existen mecanismos capaces de reducir las consecuencias, tales como la fotorreparación (Sancar & Sancar, 1988; Mitchell, 1995; Zagarese *et al.*, 1997; 2000), o la reparación en fase oscura (Cywinska *et al.*, 2000). De estas estrategias, la síntesis de compuestos protectores, por parte de algunas macroalgas, el fitoplancton y las cianobacterias, juega un rol especialmente importante ya que pueden ser transferidos y bioacumulados en la cadena trófica y así potencialmente proteger a organismos de niveles tróficos superiores (Karentz *et al.*, 1991; Carroll & Shick, 1996; Shick *et al.*, 1996; McClintock & Karentz, 1997).

En la naturaleza, los organismos mesolitorales que viven adheridos a un sustrato o forman parte del ecosistema bentónico (a excepción de los organismos cavadores), pueden estar expuestos a altos niveles de radiación, los cuales varían, entre otros factores, en función de la estación del año, la nubosidad, los períodos de marea y la transparencia del agua. Estos organismos, a diferencia de aquellos de ecosistemas pelágicos, no pueden migrar en la columna de agua, por lo que podrían estar expuestos a prolongados períodos de exposición a la radiación solar. Los crustáceos herbívoros bentónicos *Ampithoe valida* Smith (Ampithoidae) e *Idothea baltica* Palla (Idotheidae), son importantes en la dieta de peces, especialmente de pejerreyes (e.g., *Odontesthes smitti*, y *O. nigricans* - Goztonyi *et al.*, 1995), y constituyen un ítem importante en los ingresos de pescadores artesanales del litoral marino en la provincia del Chubut. Estos crustáceos normalmente se encuentran dentro de las pozas de marea asociados a las macroalgas de las que se

---

<sup>1</sup> *Micosporinas* es el nombre generalmente dado a los compuestos que absorben RUV, formados por un anillo ciclohexano, y un sustituyente nitrogenado de un aminoácido o de un aminoalcohol. Estos compuestos solamente se encontraron en organismos acuáticos y no se han identificado hasta el momento en plantas terrestres. Tienen su máximo de absorción entre los 310 y 360 nm.

alimentan. Dependiendo de las características de estas pozas, principalmente su profundidad, diámetro y ubicación en el intermareal, domina en ellas una u otra división de macroalgas (Díaz, 2000). Así, en las pozas menos profundas las especies dominantes son representantes de la división Chlorophyta, mientras que, en pozas profundas, dominan las especies de la división Rodophyta. Estas diferencias en el tipo de alimentación de los crustáceos, pueden tener importantes consecuencias en cuanto a la adaptación / aclimatación a diversos ambientes lumínicos. Numerosos estudios han demostrado la presencia de compuestos que absorben RUV en la mayoría de las rodofíceas (Karentz *et al.*, 1991; Karsten *et al.*, 1998a; Sinha *et al.*, 1998), mientras que en las clorofíceas, cuando los poseen, se hallan en concentraciones muy bajas (Karentz *et al.*, 1991; Karsten *et al.*, 1998a). Es evidente, entonces, que los individuos que se alimentan de algas rojas podrían estar potencialmente mejor aclimatados frente a la RUV, ya que pueden ingerir y bioacumular, a través de su dieta, compuestos que absorben RUV.

## Objetivo general / hipótesis propuestas:

El presente trabajo tiene como objetivo determinar la potencial transferencia y bioacumulación (a través de la dieta) de compuestos que absorben RUV, desde macroalgas a crustáceos herbívoros mesolitorales, como así también, evaluar la posible protección que estos compuestos le brindan a los crustáceos.

**H<sub>01</sub>** "Existe un proceso de bioacumulación de compuestos que absorben RUV en *Idothea baltica* y *Ampithoe valida*."

**H<sub>02</sub>** "Los compuestos que absorben RUV bioacumulados por los crustáceos cumplen una función protectora, contribuyendo a aumentar su tasa de supervivencia al ser expuestos a la RUV-B"



## Área de estudio

Existe una gran variación en cuanto a las características geomorfológicas de la costa norpatagónica (Figura 1), pero en general son playas de pendiente suave en las que el mesolitoral medio y superior quedan descubiertos por períodos de hasta 12 horas. Algunas de estas playas están compuestas por sustrato rocoso de superficie irregular, en el que queda retenida el agua al retirarse la marea, formando las denominadas “pozas de marea” (Lobban & Harrison, 1994). Para este estudio se seleccionaron tres sitios de colección de organismos (Figura 2) en función de las especies de macroalgas existentes, presencia de crustáceos herbívoros y accesibilidad a las mismas:

Playa “Barrancas Blancas” (43° 19' S–65° 03' W, Rawson, Chubut): Está ubicada en la margen sur de la desembocadura del río Chubut, es una zona expuesta, de sustrato duro, y su uniformidad se ve interrumpida por pequeñas depresiones (de hasta unos 20 cm de profundidad) que se extienden irregularmente formando encharcados, en los cuales las poblaciones de *Enteromorpha* sp. (Chlorophyta) ocupan casi la totalidad de la superficie disponible.

Playa “Punta Cuevas” (65° 42' S–47° W, Puerto Madryn, Chubut): Es una playa de sustrato duro, que posee una plataforma de abrasión interrumpida por pozas de marea cuyos diámetros oscilan desde unos pocos centímetros hasta dos metros, con profundidades que no superan los 80 cm. Durante los meses de verano, *Polysiphonia* sp. (Rodophyta) es la macroalga más abundante.

Playa “Punta Este” (64° 57' S–42° 47' W, Puerto Madryn, Chubut): La plataforma de abrasión de esta playa posee una superficie muy irregular de sustrato duro y pendiente abrupta, donde existen pozas de marea similares a las observadas en playa Punta Cuevas. En la zona de muestreo, la plataforma de abrasión tiene un desnivel de aproximadamente 3 metros de profundidad entre el mesolitoral medio e inferior. En este último piso litoral, durante el período de muestreo, se acumuló una gran cantidad de *Codium* sp. (Chlorophyta).

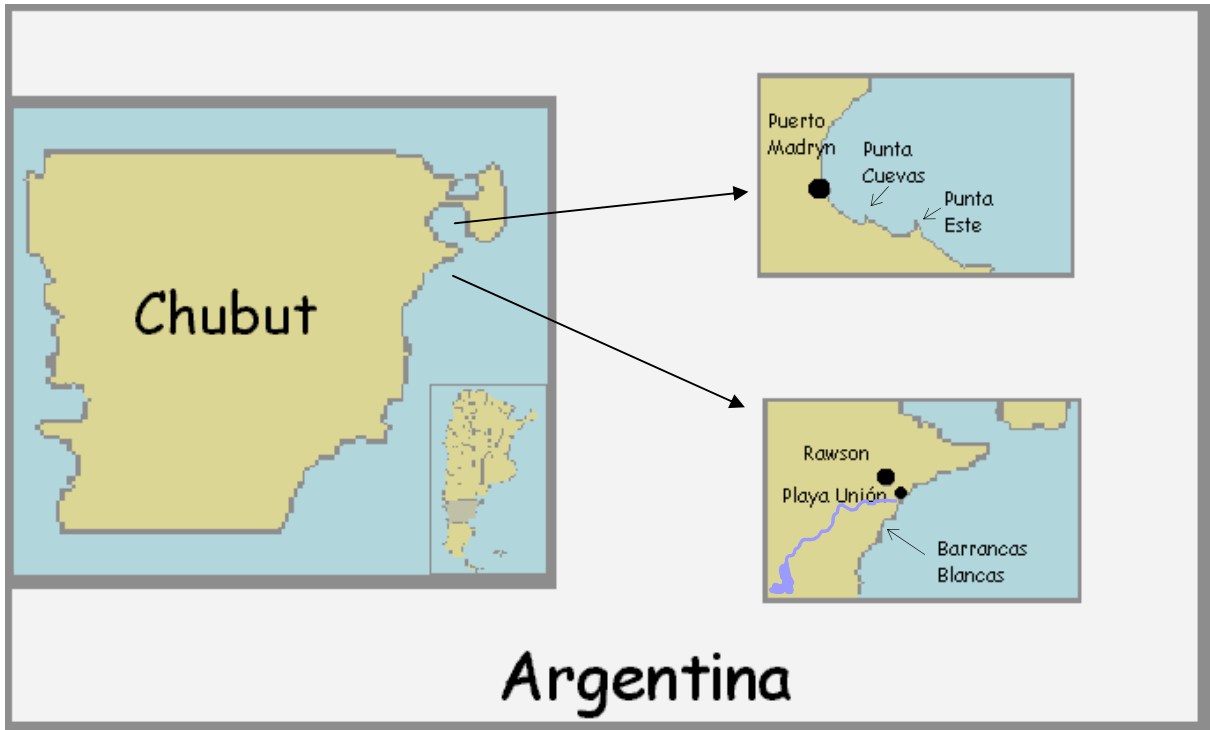


Figura 1: Mapa del área de estudio y ubicación relativa en la provincia del Chubut y dentro de la Argentina.

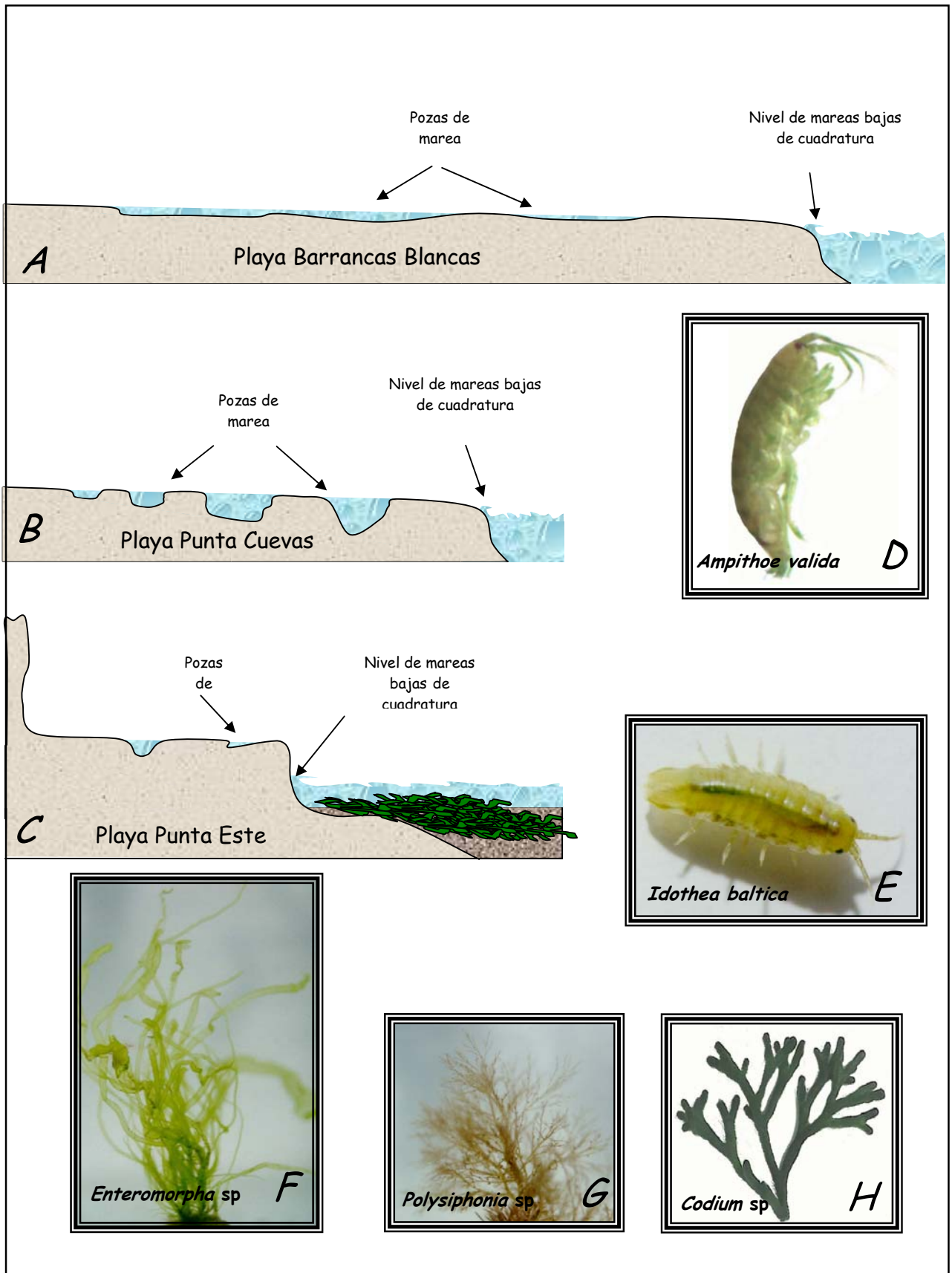


Figura 2: Representación esquemática de un corte longitudinal de la plataforma de abrasión ubicada en el mesolitoral de los sitios de estudio: A- Playa Barrancas Blancas, B- Playa Punta Cuevas y C- Playa Punta Este; D-H - Fotografías de las especies de crustáceos y macroalgas utilizados en los experimentos

## Materiales y Métodos

En el presente trabajo se utilizaron las especies de crustáceos<sup>2</sup> *Amphitoe valida* (Anfípoda) e *Idothea baltica* (Isópoda) y las macroalgas *Codium* sp. y *Enteromorpha* sp. (Chloropyta), y *Polysiphonia* sp. (Rodophyta) como dieta de los invertebrados.

Los ejemplares de anfípodos (*A. valida*) e isópodos (*I. baltica*) se colectaron de diferentes lugares, donde se estaban alimentando de distintas macroalgas según se detalla a continuación: A) de *Polysiphonia* sp. de la playa Punta Cuevas; B) de *Enteromorpha* sp. de la playa Barrancas Blancas. Además se trabajó con ejemplares de isópodos que se recolectaron de *Codium* sp. de playa Punta Este. Los ejemplares de crustáceos a utilizar se capturaron antes de cada experimento, recolectando las macroalgas de las que se alimentaban. Inmediatamente se los trasladó en recipientes con agua desde la zona de muestreo hasta el laboratorio de la Estación de Fotobiología Playa Unión (EFPU), donde se separaron manualmente. En el caso particular de algunos anfípodos de pequeño tamaño se utilizó una manguera de 0,5 cm de diámetro con la que se succionaron los individuos para posteriormente depositarlos en los acuarios con agua marina.

Las muestras de macroalgas que se colectaron de estas zonas de muestreo se colocaron en bolsas plásticas hasta llegar al laboratorio, donde posteriormente se analizaron.

### *Experimentación:*

Los experimentos se diseñaron para: A) Determinar la potencial bioacumulación de compuestos que absorben RUV en *A. valida* e *I. baltica* y, B) Evaluar el efecto de la RUV-B en la supervivencia de estas dos especies.

---

<sup>2</sup> Las especies de crustáceos, fueron determinadas mediante el uso de claves específicas (Lincoln, 1979).

## A) Bioacumulación de compuestos que absorben RUV

La bioacumulación de compuestos que absorben RUV en los dos crustáceos estudiados se evaluó de dos formas diferentes: 1) Manteniendo los individuos en el laboratorio con diferentes dietas de macroalgas durante 7-10 días, y 2) Determinando la concentración de estos compuestos en distintos grupos de individuos en su medio natural, donde se estaban alimentando de diferentes tipos de macroalgas.

1) Experimentación en laboratorio: Estos experimentos se realizaron en Mayo y Agosto de 1999 con individuos de *I. baltica* colectados de *Polysiphonia* sp., y en Mayo de 2000 con *A. valida* colectados de *Enteromorpha* sp. Para esta experimentación, se colectaron individuos y se los dividió en 2 grupos iguales, colocándolos en acuarios independientes con un aireador conectado permanentemente. A cada grupo se le suministró una dieta compuesta por una única especie de macroalga: Un grupo fue alimentado diariamente con 1 g de *Polysiphonia* sp., y el otro grupo con 1 g de *Enteromorpha* sp. Todos los días se tomó una muestra de 3 individuos de cada acuario para medir la concentración de compuestos que absorben RUV tal y como se describe en la sección “Análisis y determinaciones”.

2) Muestreos en el medio natural: De cada una de las playas (Tabla 1), se colectó manualmente un grupo de anfípodos e isópodos, junto con muestras de las macroalgas de las que se alimentaban. Para estas distintas muestras, se determinó la concentración de compuestos que absorben RUV como se describe más adelante.

**Tabla 1:** Zonas de muestreo, fechas y especies colectadas para realizar los experimentos de bioacumulación y supervivencia.

Fecha de muestreo	Playa Crustáceo	Barrancas Blancas <i>Enteromorpha</i> sp.	Punta Cuevas <i>Polysiphonia</i> sp.	Punta Este <i>Codium</i> sp.
Febrero de 2000	<i>A. valida</i>	X	X	
	<i>I. baltica</i>	X	X	
Junio de 2000	<i>A. valida</i>	X		
	<i>I. baltica</i>			
Febrero de 2001	<i>A. valida</i>	X		
	<i>I. baltica</i>			X

Por otro lado, y a fin de obtener información acerca de la acumulación diferencial en distintas partes del cuerpo de *I. baltica*, se determinó la concentración de compuestos que absorben RUV en los tejidos / partes del cuerpo que se detallan a continuación:

- a) Contenido del marsupio (huevos y embriones en distintos estadios de maduración)
- b) Tubo digestivo y ciegos
- c) Gónadas
- d) Exoesqueleto junto con los demás tejidos y tegumentos

Para esto se utilizaron 40 individuos recién colectados (muertos por congelación): 20 machos y 20 hembras, los cuales se diseccionaron bajo lupa. A cada grupo se le midió la concentración de compuestos que absorben RUV (ver sección Análisis y determinaciones).

### ***B) Efectos de la RUV en la supervivencia de los crustáceos***

Para estos experimentos se capturaron ejemplares de anfípodos e isópodos (juveniles y adultos) y se los dividió por especie, colocándolos en acuarios independientes y con aireación permanente. Los individuos permanecieron en los acuarios durante un período entre 2 y 7 días a fin de aclimatarlos a las condiciones de laboratorio. Durante este tiempo se tomaron muestras diarias de 3 individuos de cada acuario para determinar la concentración de compuestos que absorben RUV.

Finalizado el período de aclimatación se colectaron individuos al azar, se los colocó en tubos de cuarzo de 50 ml (6–8 individuos por tubo) con agua de mar filtrada y se los expuso a condiciones de iluminación artificial bajo dos tratamientos de radiación (Figura 3):

- A- Muestras expuestas a la RUV + PAR, (280–700 nm) en tubos de cuarzo (material transparente a la RUV)
- B- Muestras expuestas a la RUV-A + PAR (315–700 nm), tubos de cuarzo envueltos en un filtro de Mylar-D (material que absorbe la RUV-B).

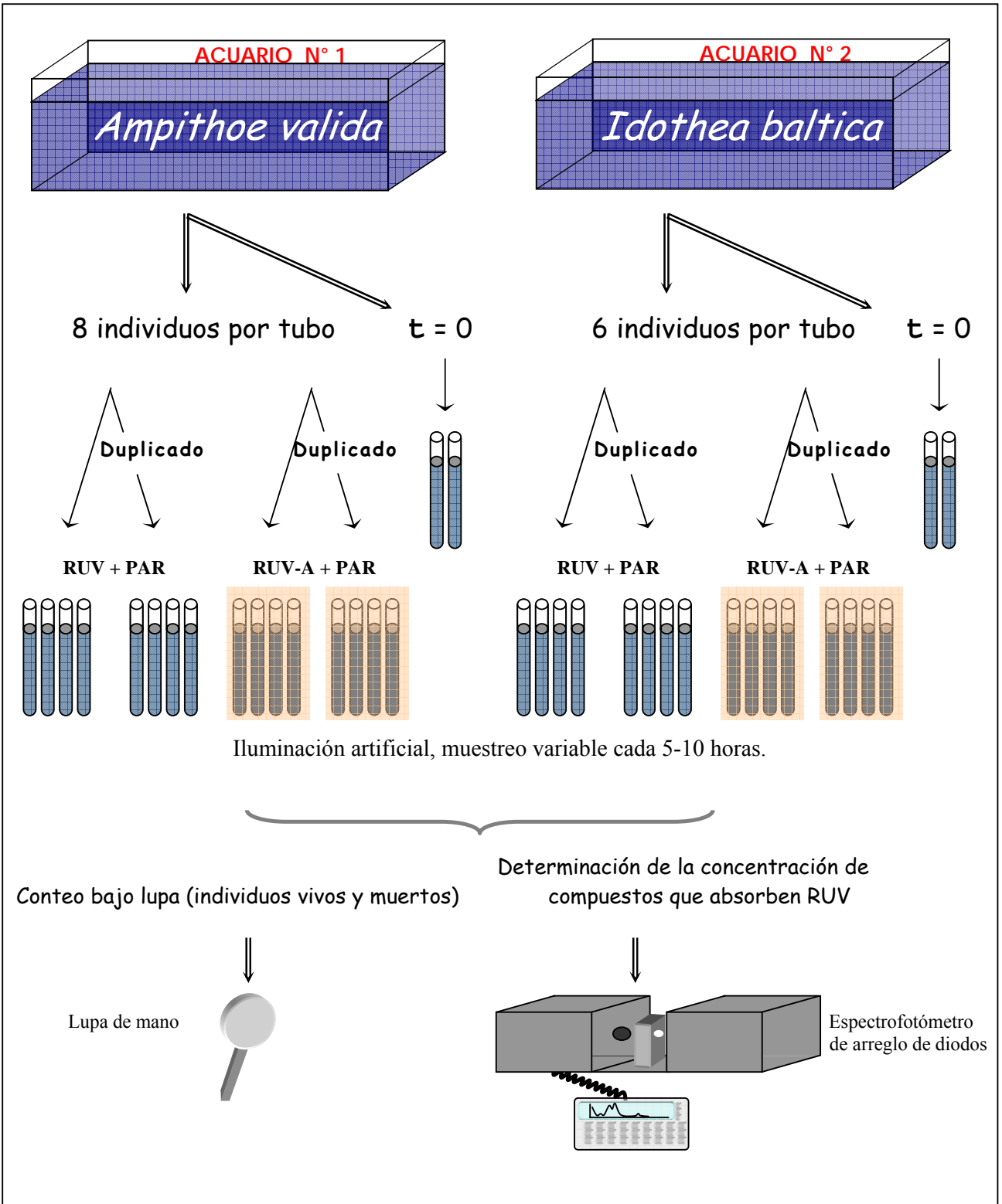


Figura 3: Representación esquemática de la metodología aplicada en los experimentos de supervivencia de los crustáceos, irradiados con radiación artificial.

Todos los tubos conteniendo los individuos se colocaron en un soporte giratorio dentro de una cámara de incubación Sanyo (modelo MLR 350) provista de 10 tubos de luz día (radiación PAR 66 W m<sup>-2</sup>) y 5 tubos Q-Panel UVA-340 (radiación ultravioleta RUV-A 15,3 W m<sup>-2</sup> y RUV-B 0,7 W m<sup>-2</sup>), y control de temperatura (15° C). Luego de distintos intervalos de tiempo, que variaron entre 5 y 10 h, se retiraron 2 tubos de cada tratamiento lumínico y por especie, en los cuales se determinó el número de individuos vivos y muertos. Asimismo, se determinó la concentración de compuestos que absorben RUV antes de comenzar el experimento (t = 0), y a cada intervalo de tiempo de muestreo.

Este experimento se realizó cuatro veces con *A. valida*, utilizando individuos colectados de poblaciones naturales estaban asociadas a *Polysiphonia* sp. (1 experimento) y *Enteromorpha* sp. (3 experimentos). Con *I. baltica*, este tipo de experimento se realizó dos veces, utilizando individuos de una población natural que se alimentaba de *Polysiphonia* sp. y otra que se alimentaba de *Codium* sp.

## *Análisis y determinaciones*

**A - Espectros de absorción y análisis de picos:** Para determinar la presencia de compuestos que absorben RUV, se siguió la técnica descrita en Helbling *et al.* (1996). Las muestras, de peso conocido, se colocaron dentro de un tubo de ensayo, se maceraron con una varilla de vidrio y se extrajeron con 7 ml de metanol absoluto durante 2 horas a 4° C en la oscuridad. Luego de este período, se centrifugaron durante 15 minutos a 1500 g en una centrifuga Rolco (modelo CP-2036). Con el sobrenadante se realizó un barrido, cada 1 nm, en un intervalo de longitudes de onda entre 250 y 750 nm, utilizando un espectrofotómetro Hewlett-Packard (modelo HP-8453E). Para cada espectro se determinaron los máximos de absorbancia a distintas longitudes de onda; la altura de estos picos se obtuvo realizando un análisis de picos con el programa Origin. La altura del pico a 334 nm se consideró como estimadora de la concentración de los compuestos que absorben RUV (Dunlap *et al.*, 1995).

**B - Determinación del peso:** Las muestras (crustáceos y macroalgas) se colocaron sobre un papel absorbente durante 30 minutos y posteriormente se determinó el peso (con una apreciación de 0,0001g) utilizando una balanza Mettler (modelo AK 160).



**C - Determinación de la supervivencia a la RUV-B:** Utilizando una lupa de mano, se contabilizó el número de individuos vivos y muertos en cada tubo. Se consideró como individuos muertos todos aquellos que no realizaban ningún tipo de movimiento al colocarlos fuera del agua. Con los datos de individuos vivos y número total de individuos se calculó la supervivencia (%) para cada muestra / tratamiento. La supervivencia de las muestras expuestas a RUV + PAR fue normalizada en base a las muestras control expuestas a RUV-A + PAR; posteriormente se construyó una curva de supervivencia en función a la dosis de RUV-B recibida.

**D - Dosis letal 50 (LD<sub>50</sub>):** La dosis necesaria para causar la mortalidad del 50% de los individuos (LD<sub>50</sub>) se calculó con las funciones de ajuste de los gráficos de supervivencia en función de la dosis de RUV-B.

**E - Tratamiento estadístico de los datos:** Para establecer diferencias significativas entre los distintos tratamientos, se utilizó la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis (Zar, 1984), considerando significativas la diferencia entre dos valores medios cuando  $p < 0,05$ . Este análisis se realizó con el programa estadístico SPSS. Las curvas de ajuste e intervalos de confianza se calcularon con el programa Origin.

## Resultados

Los espectros de absorción de las macroalgas utilizadas en este estudio (Figura 4) muestran la presencia de compuestos fotosintéticos y de compuestos que absorben RUV. La cantidad de picos y el tipo de pigmentos fotosintéticos fue variable entre las especies estudiadas: En *Enteromorpha* sp. y *Codium* sp. se observaron tres máximos de absorbancia en la región del espectro de radiación visible (PAR, 400 - 700 nm), mientras que en *Polysiphonia* sp. se observaron solo dos (Figura 4A). En cuanto a los compuestos que absorben RUV, todas las especies tuvieron un máximo en el rango 330 - 340 nm. La identificación de los máximos en el PAR, a través de un análisis de picos (Figura 4B), permitió establecer que corresponden a clorofila-a ( $\lambda_{\text{máx}} = 440\text{nm}$  y  $\lambda_{\text{máx}} = 665\text{nm}$ ) y carotenoides ( $\lambda_{\text{máx}} = 470\text{nm}$ ). Aunque la clorofila-a estaba presente en las tres algas en estudio, su concentración por peso varió significativamente entre ellas ( $p = 0,002$ ). Sin embargo, no se pudo establecer un pico claro de carotenoides en *Polysiphonia* sp. En cuanto a los compuestos que absorben RUV ( $\lambda_{\text{máx}} = 334\text{nm}$ ), la concentración fue muy baja en *Codium* sp. (Figura 4B), mientras que en las otras dos especies, su concentración fue significativamente diferente ( $p = 0,004$ ); la más alta concentración se determinó en *Polysiphonia* sp.

En la Figura 5 se muestran espectros de absorbancia representativos de las dos especies de crustáceos estudiadas, después de haberse alimentado de *Polysiphonia* sp. y *Enteromorpha* sp. En ambas especies de crustáceos, la mayor absorción se encontró en la banda correspondiente a la RUV. El análisis de picos (Figura 5B) indicó que este máximo se encontraba a 334 nm, siendo la concentración de estos compuestos mayor en *A. valida* que en *I. baltica* (6,95 y 2,69 D.O. por gramo de peso fresco, respectivamente) en aquellos individuos con dieta de *Polysiphonia* sp. Por otro lado, en los individuos que se alimentaban de *Enteromorpha* sp. la concentración de compuestos que absorben RUV, fue mayor en los isópodos que en los anfípodos (1,02 y 0,37 D.O. por gramo de peso fresco, respectivamente) En ambas especies, también se observaron máximos de absorbancia dentro de la banda de PAR correspondientes a la clorofila y carotenoides, siendo su concentración mayor en *I. baltica* que en *A. valida*.

La concentración de compuestos que absorben RUV en los crustáceos fue función de la concentración de éstos en las macroalgas de las cuales se alimentaban (Figura 6). En *I. baltica* (Figura 6A) esta relación fue lineal, siendo los individuos alimentados con *Codium* sp. los que tenían la concentración más baja, y los alimentados con *Polysiphonia* sp. los que tenían la concentración más alta. En *A. valida* (Figura 6B) en cambio, la relación entre la concentración de compuestos que absorben RUV en el crustáceo y su dieta varió en forma exponencial, siendo menor cuando los individuos se alimentaban con *Enteromorpha* sp., y mayor cuando se alimentaban con *Polysiphonia* sp. No se encontraron individuos de *A. valida* alimentándose de *Codium* sp. - especie caracterizada por su bajo contenido en compuestos que absorben RUV - por lo cual se colectaron de *Enteromorpha* sp. en dos épocas distintas del año, cuando su concentración difería significativamente ( $p = 0,006$ ). En el mes de Junio de 2000, la concentración de compuestos que absorben RUV en esta alga fue de 1,06 D. O./g, mientras que en Febrero (promedio años 2000 y 2001) fue de 1,90 D. O./g.

A fin de evaluar la potencial función protectora de los compuestos que absorben RUV en las dos especies de crustáceos, se expusieron individuos con alta y baja concentración de estos compuestos a dosis crecientes de RUV-B. Los experimentos realizados con individuos de *I. baltica*, con alta concentración de compuestos que absorben RUV (Figura 7), mostraron que en aquellos individuos expuestos a RUV + PAR ésta concentración variaba significativamente ( $p = 0,043$ ) con dosis crecientes de RUV-B, mientras que no varió ( $p = 0,439$ ) en las muestras solo expuestas a RUV-A y PAR (Figura 7A). La concentración promedio de estos compuestos (i.e., todas las muestras de cada tratamiento), estimada por la densidad óptica, fue de 3,51 ( $\pm 0,43$ ) y 2,58 ( $\pm 1,03$ ) D. O. por gramo de peso fresco para las muestras expuestas a RUV-A + PAR y RUV + PAR, respectivamente. Asimismo, la supervivencia de *I. baltica* se vio afectada al recibir diferentes dosis de radiación (Figura 7B). Sin embargo, la supervivencia fue constante (i.e., 100%) en los dos tratamientos durante las 10 primeras horas del experimento; a partir de entonces la supervivencia disminuyó en ambos tratamientos lumínicos. Este tiempo se corresponde con una dosis de RUV-B de 25 KJ m<sup>-2</sup>, pudiéndose considerar este valor como el umbral mínimo de resistencia a la RUV-B, ya que no hubo muestras entre las 10 y 21 horas de experimentación.

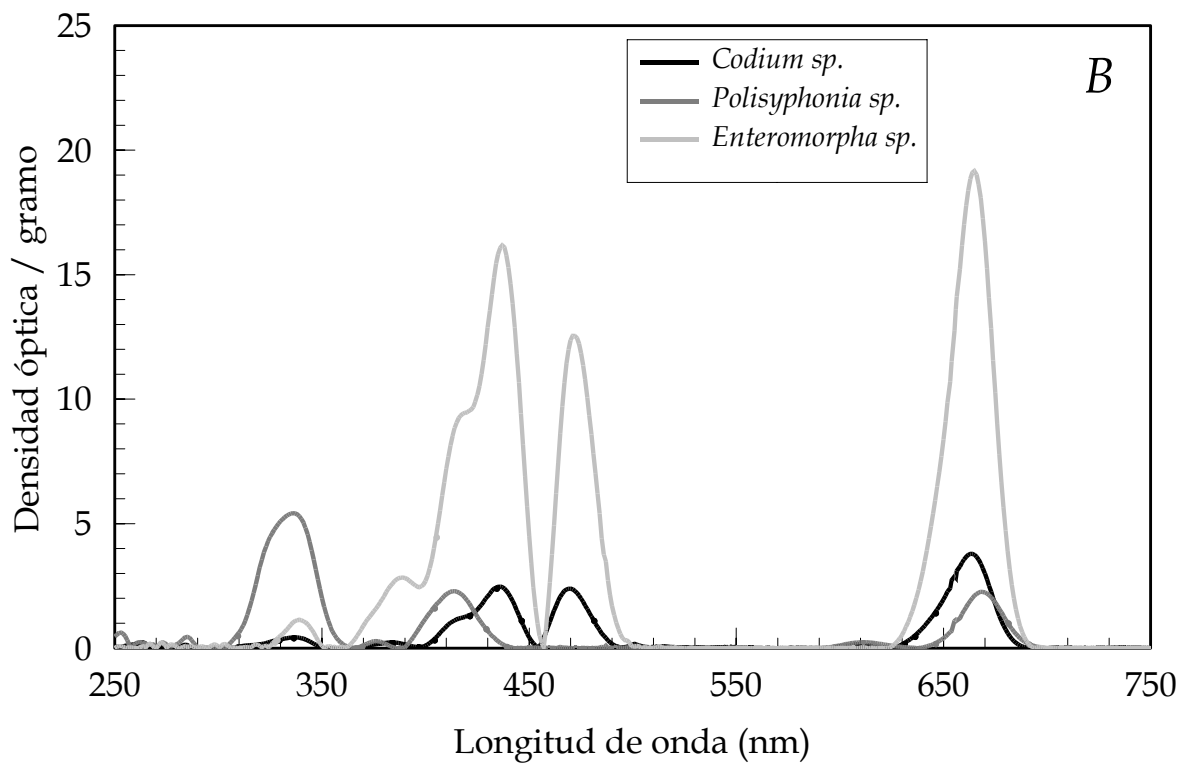
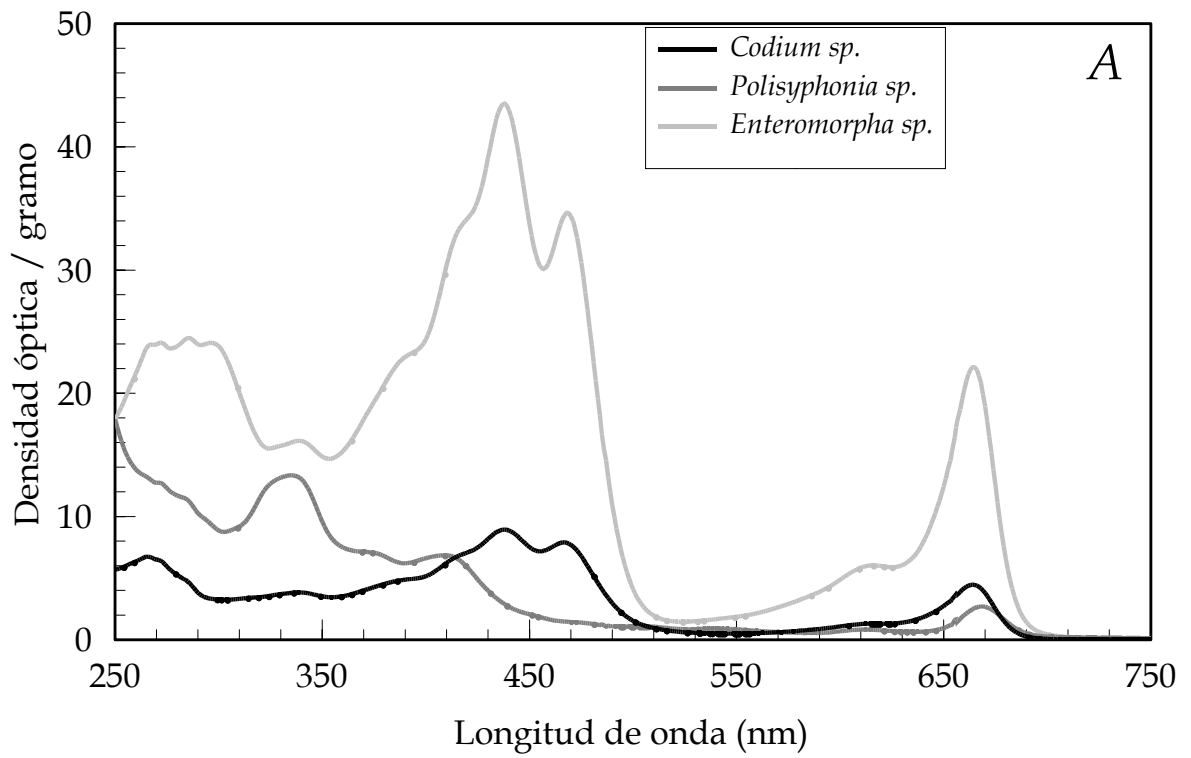


Figura 4: Absorción específica (densidad óptica por gramo) en función de la longitud de onda para *Codium sp.* (colectada en febrero de 2001), *Polysiphonia sp.* y *Enteromorpha sp.* (colectadas en febrero de 2000) A- Espectro de absorción de extracto metanólico. B- Análisis de picos.

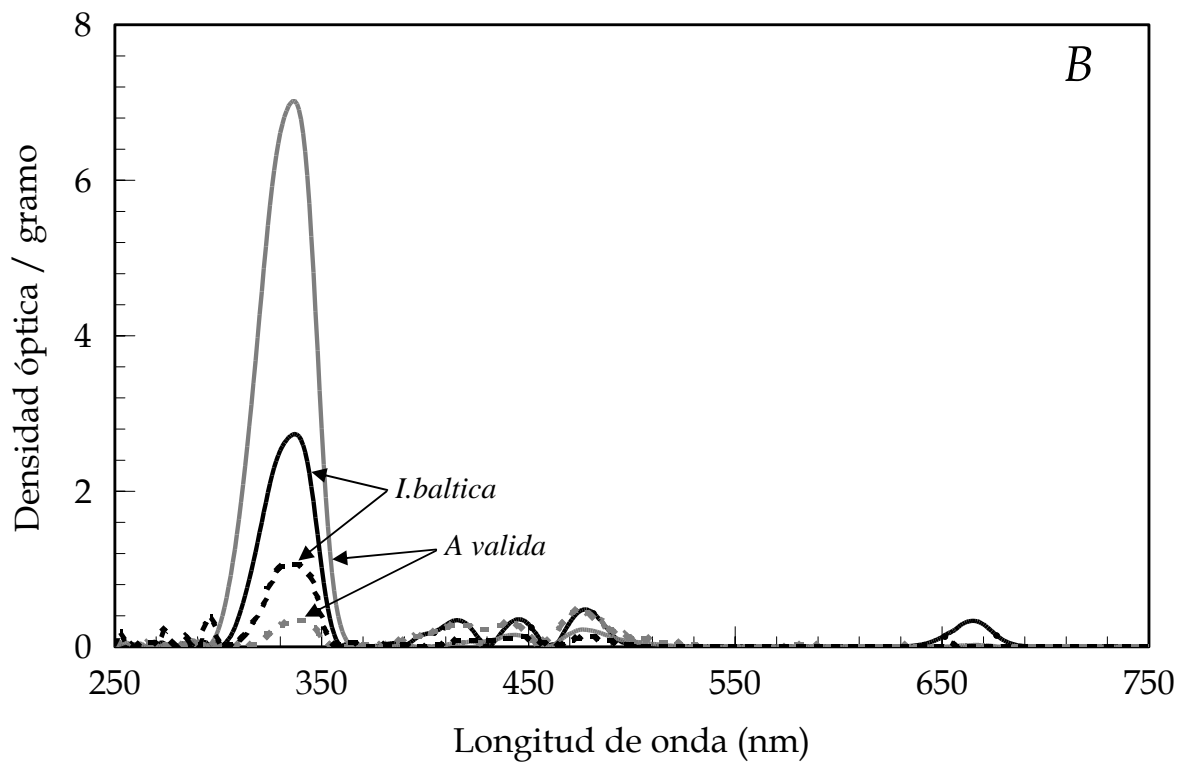
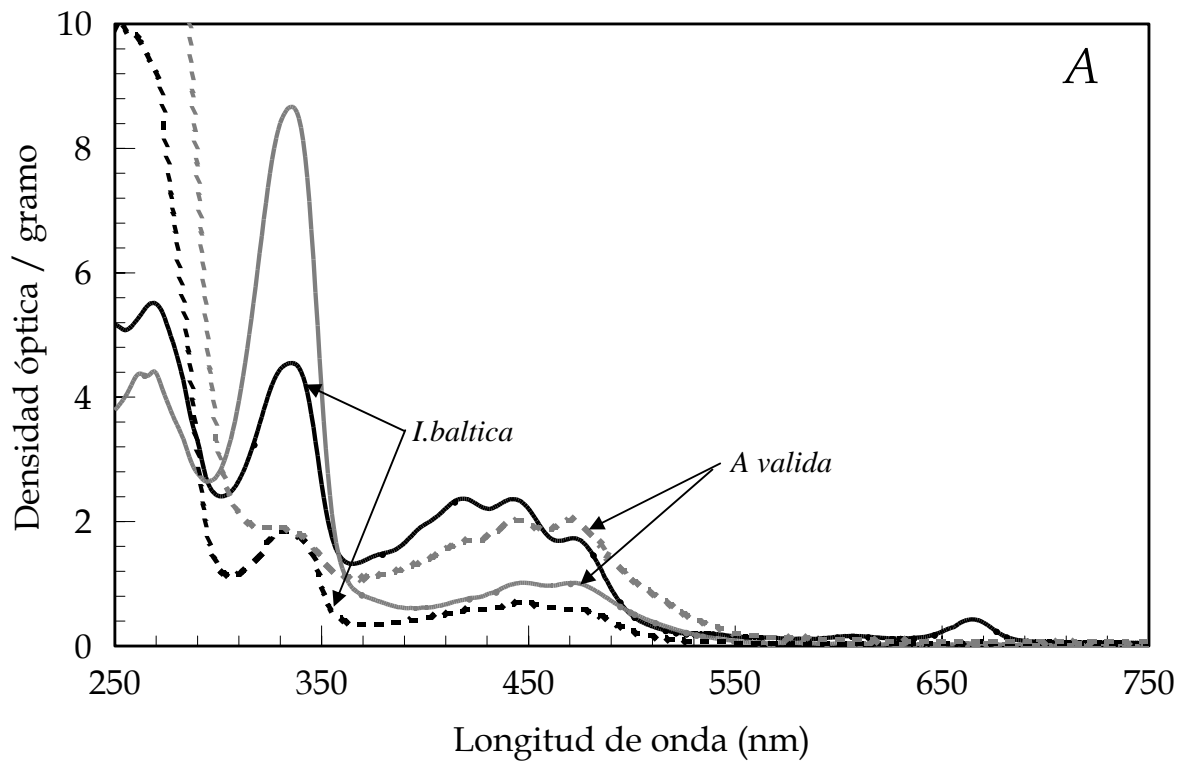


Figura 5: Absorción específica (densidad óptica por gramo) en función de la longitud de onda para *I. baltica* y *A. valida* colectados en febrero de 2000 de *Polysiphonia* sp. (trazo continuo) y en febrero de 2000 de *Enteromorpha* sp. (trazo discontinuo) A- Espectro de absorción de extracto metanólico. B- Análisis de picos.

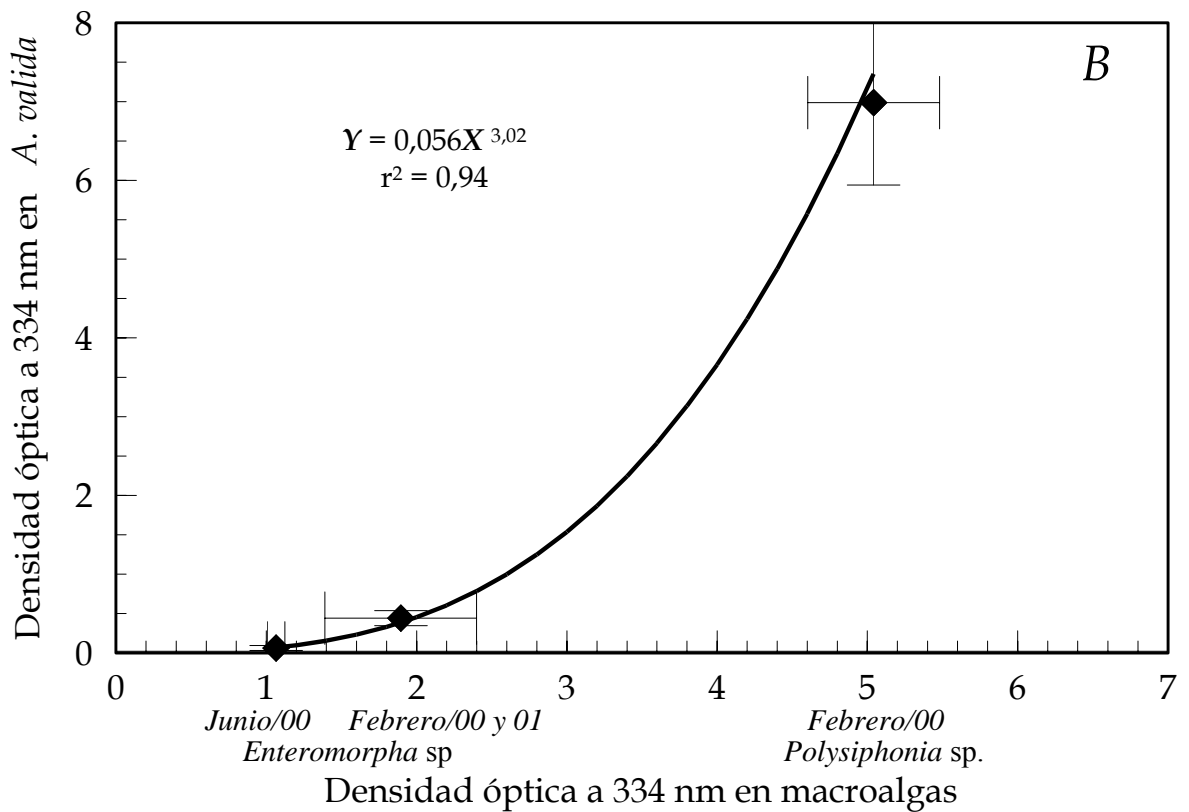
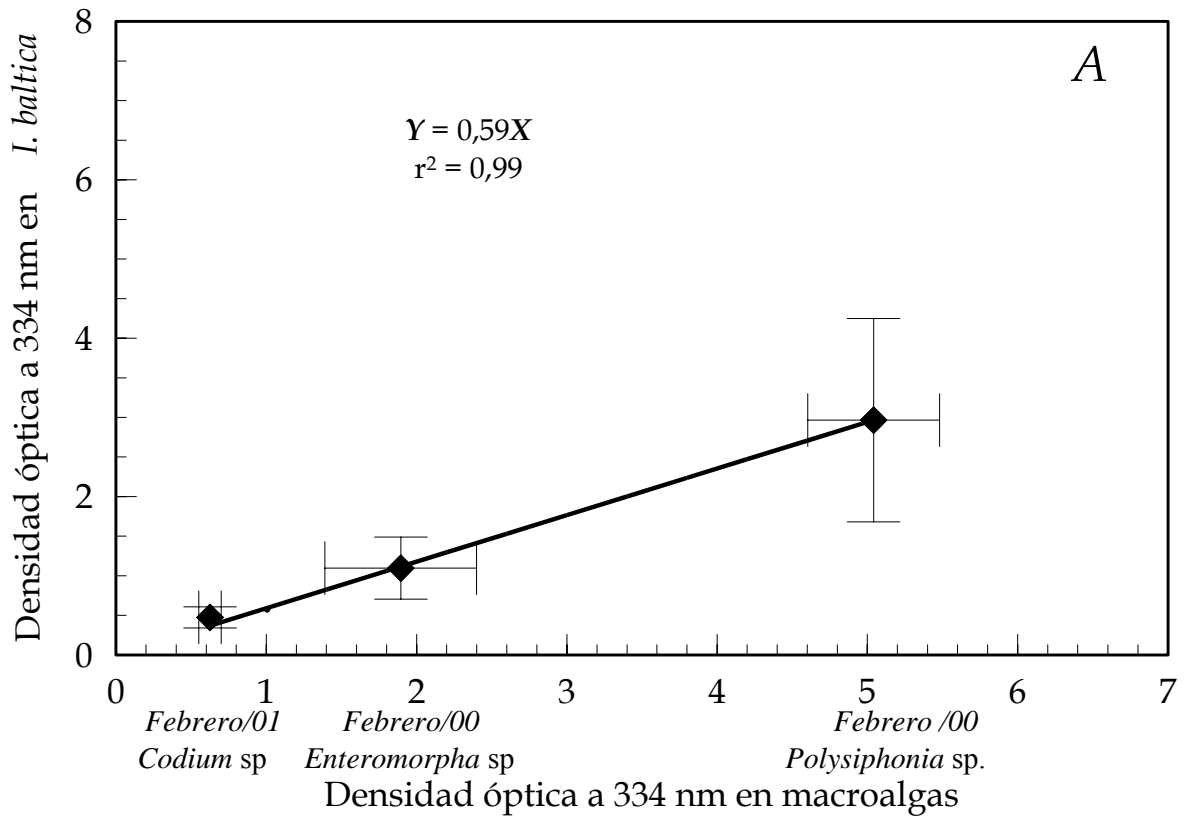


Figura 6: Relación entre la densidad óptica a 334 nm por gramo en los crustáceos y las algas de las que se alimentaban. A- *I. baltica*; B- *A. valida*. Las líneas verticales y horizontales indican las desviaciones estándar.

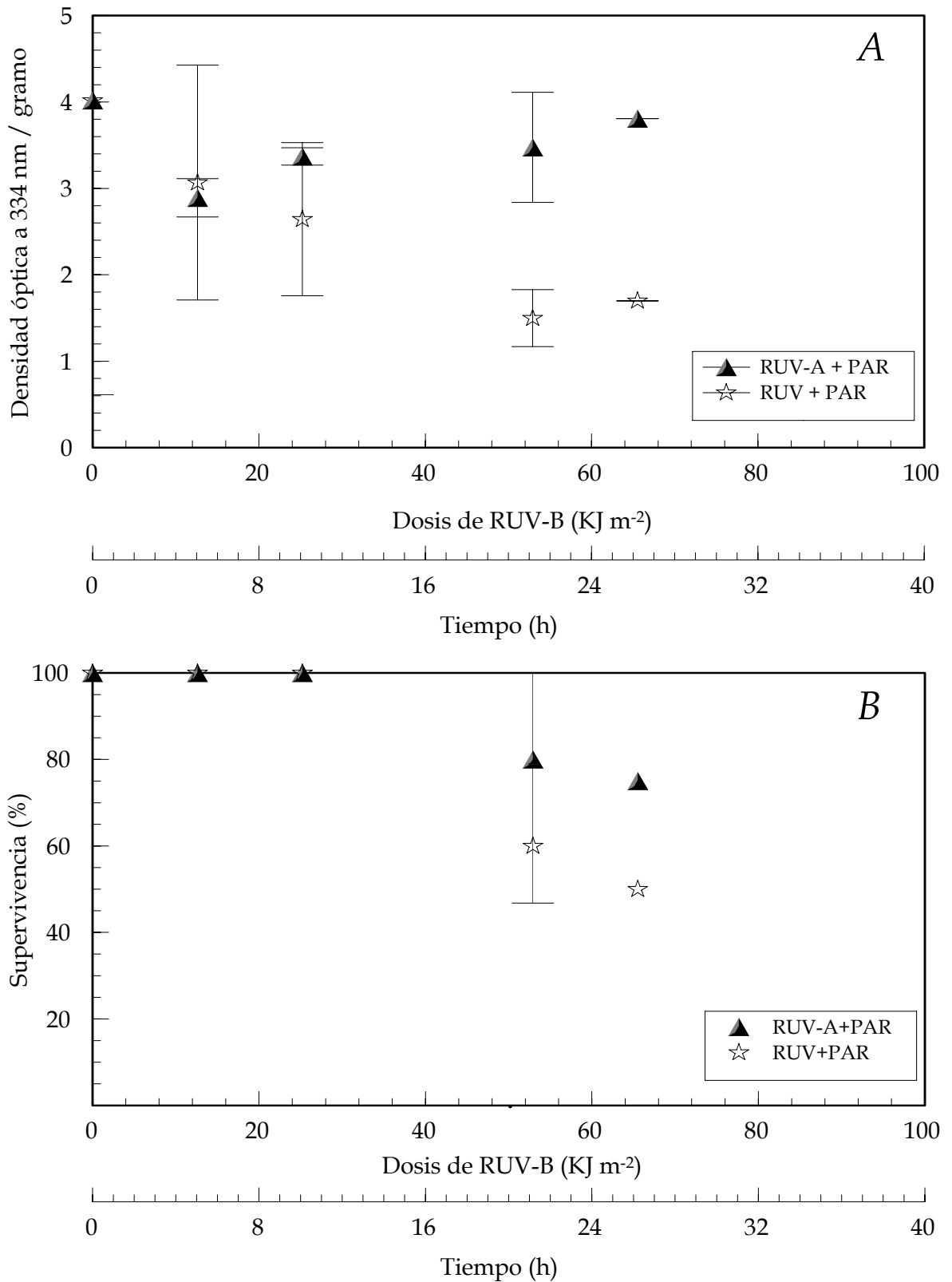


Figura 7: Individuos de *I. baltica* con alta concentración de compuestos que absorben RUV (colectados en Febrero de 2000), incubados durante 26 h bajo dos tratamientos lumínicos: RUV + PAR (☆) y RUV-A + PAR (▲). A- Variación de los valores medios de la densidad óptica (334 nm) por gramo en los isópodos durante el desarrollo del experimento. B- Porcentaje medio de supervivencia en función de la RUV-B recibida. Las líneas verticales indican la desviación estándar.

Los experimentos realizados con isópodos que estaban alimentándose con *Codium* sp. (i.e., baja concentración de compuestos que absorben RUV) indican que esta concentración no varió significativamente ( $p = 0,093$ ) a lo largo del experimento en los dos tratamientos de radiación, ni tampoco hubo diferencias significativas ( $p = 0,708$ ) entre ellos - (Figura 8A). La concentración promedio general (i.e., todas las muestras de ambos tratamientos) fue de  $0,439 (\pm 0,086)$  D. O. por gramo de peso fresco. La supervivencia de *I. baltica* en este experimento disminuyó con dosis crecientes de RUV-B (Figura 8B) llegando al final del experimento a aproximadamente el 50 % (valores normalizados). Asimismo se determinó un umbral para *I. baltica* de  $40 \text{ KJ m}^{-2}$ , por debajo de la cual la supervivencia fue del 100 %.

Los valores normalizados de supervivencia en función de la dosis de RUV-B, (ver sección Análisis y determinaciones), para los isópodos con alta y baja concentración de compuestos que absorben RUV, respectivamente, se ajustaron con polinomios de segundo grado y no existieron diferencias significativas ( $p = 0,13$ ) entre ambas series de datos (ajustes no mostrados). Debido a esto se realizó un único ajuste utilizando todos los datos (i.e., isópodos con altas y bajas concentraciones de compuestos que absorben RUV), el cual se muestra en la Figura 9. Basándose en este ajuste polinomial se calculó la dosis letal 50 ( $LD_{50}$ ), resultando ser de  $97 \text{ KJ} \cdot \text{m}^{-2}$ , y un umbral de  $40 \text{ KJ m}^{-2}$ .

En cuanto a los experimentos realizados con anfípodos alimentados con *Polysiphonia* sp. (i.e., con alta concentración de compuestos que absorben RUV), se encontró que esta concentración no variaba a lo largo del experimento en ninguno de los tratamientos lumínicos implementados ( $p = 0,579$ ), ni tampoco entre tratamientos para una misma dosis (Figura 10A). La concentración promedio general fue de  $6,99 (\pm 0,86)$  D. O. por gramo de peso fresco. En estos experimentos la supervivencia se mantuvo constante (i.e., 100 %) en el tratamiento que recibió RUV-A + PAR, mientras que disminuyó levemente, aunque no significativamente ( $p = 0,052$ ), en el tratamiento que recibió RUV + PAR (Figura 10B).

Este mismo tipo de experimento se realizó con anfípodos alimentados con *Enteromorpha* sp., los cuales tenían una concentración baja de compuestos que absorben RUV (Figura 11). La concentración de compuestos que absorben RUV no varió a lo largo del experimento en ninguno de los dos tratamientos lumínicos implementados (Figura 11A), y no existieron diferencias significativas ( $p = 0,711$ ) para las muestras expuestas y no



expuestas a RUV-B; la concentración promedio de éstos compuestos fue de 0,17 ( $\pm 0,044$ ) D. O. por gramo de peso fresco. La supervivencia de los anfípodos (Figura 11B), no varió con el tratamiento que recibió RUV-A + PAR en las primeras 14 horas de experimentación, pero disminuyó hasta un 86,7% a las 40 horas. Por su parte, los individuos que recibieron RUV-B tuvieron una disminución significativa de la supervivencia ( $p = 0,003$ ), la cual se observó con dosis superiores a 12,6 KJ m<sup>-2</sup> (5 horas) llegando al 36,9 % al final del experimento (valores normalizados). La LD<sub>50</sub> calculada a partir de los valores normalizados, ajuste polinomial de segundo grado (Figura 12), fue de 82,5 KJ m<sup>-2</sup>.

En cuanto a la distribución de los compuestos que absorben RUV en las distintas partes del cuerpo de *I. baltica* (Figura 13), se determinó que dependía del tipo de tejidos y del sexo de los individuos. Estos compuestos se encontraron principalmente en los huevos y embriones contenidos en el marsupio de las hembras y en su exoesqueleto (Figura 13A), pero solo en el exoesqueleto de los machos (Figura 13B). En el tubo digestivo de individuos de ambos sexos, la concentración de compuestos que absorben RUV fue muy baja. Es de destacar que en todos los espectros de absorción se encontraron los tres picos en la banda del visible, correspondientes a la clorofila y los carotenoides.

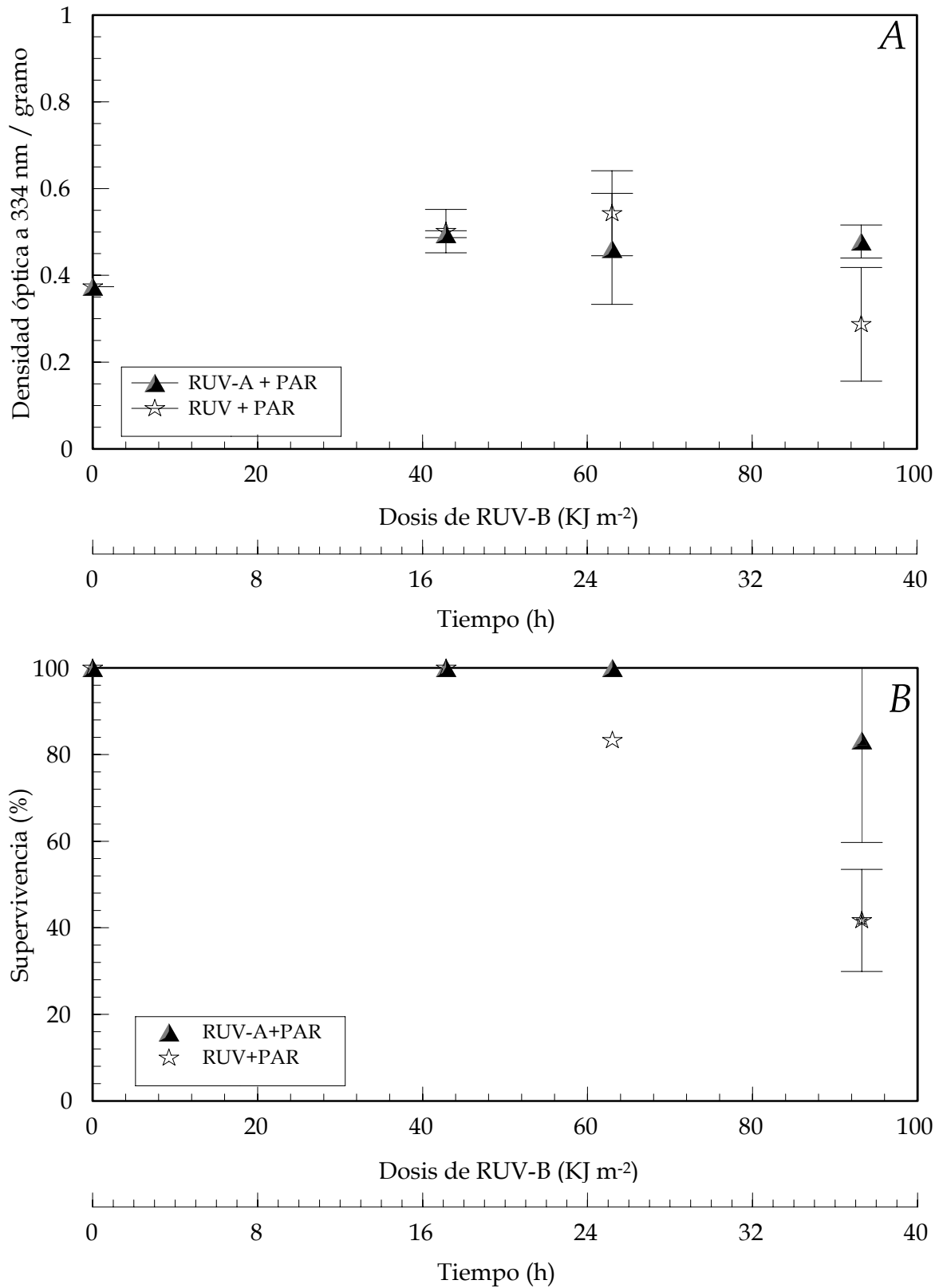


Figura 8: Individuos de *I. baltica* con baja concentración de compuestos que absorben RUV (colectados en Febrero de 2000), incubados durante 37 h bajo dos tratamientos lumínicos: RUV + PAR (☆) y RUV-A + PAR (▲). A- Variación de los valores medios de la densidad óptica (334 nm) por gramo en los isópodos durante el desarrollo del experimento. B- Porcentaje medio de supervivencia en función de la RUV-B recibida. Las líneas verticales indican la desviación estándar.

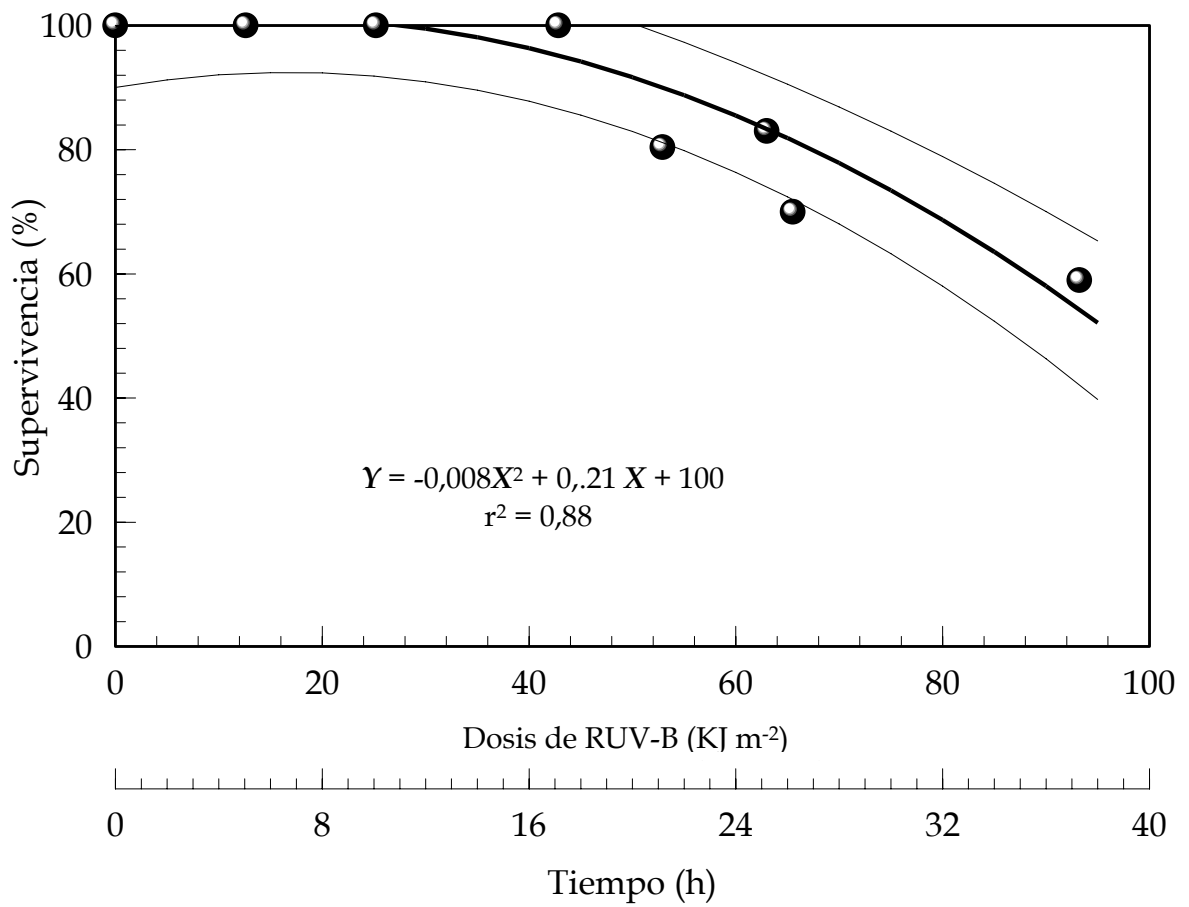


Figura 9: Supervivencia de *I. baltica* (valores normalizados) en función de la dosis de RUV-B recibida y tiempo de exposición a la radiación. Las curvas representan un ajuste polinomial de segundo grado y el 95% intervalo de confianza. Datos de supervivencia con baja y alta concentración de compuestos que absorben RUV.

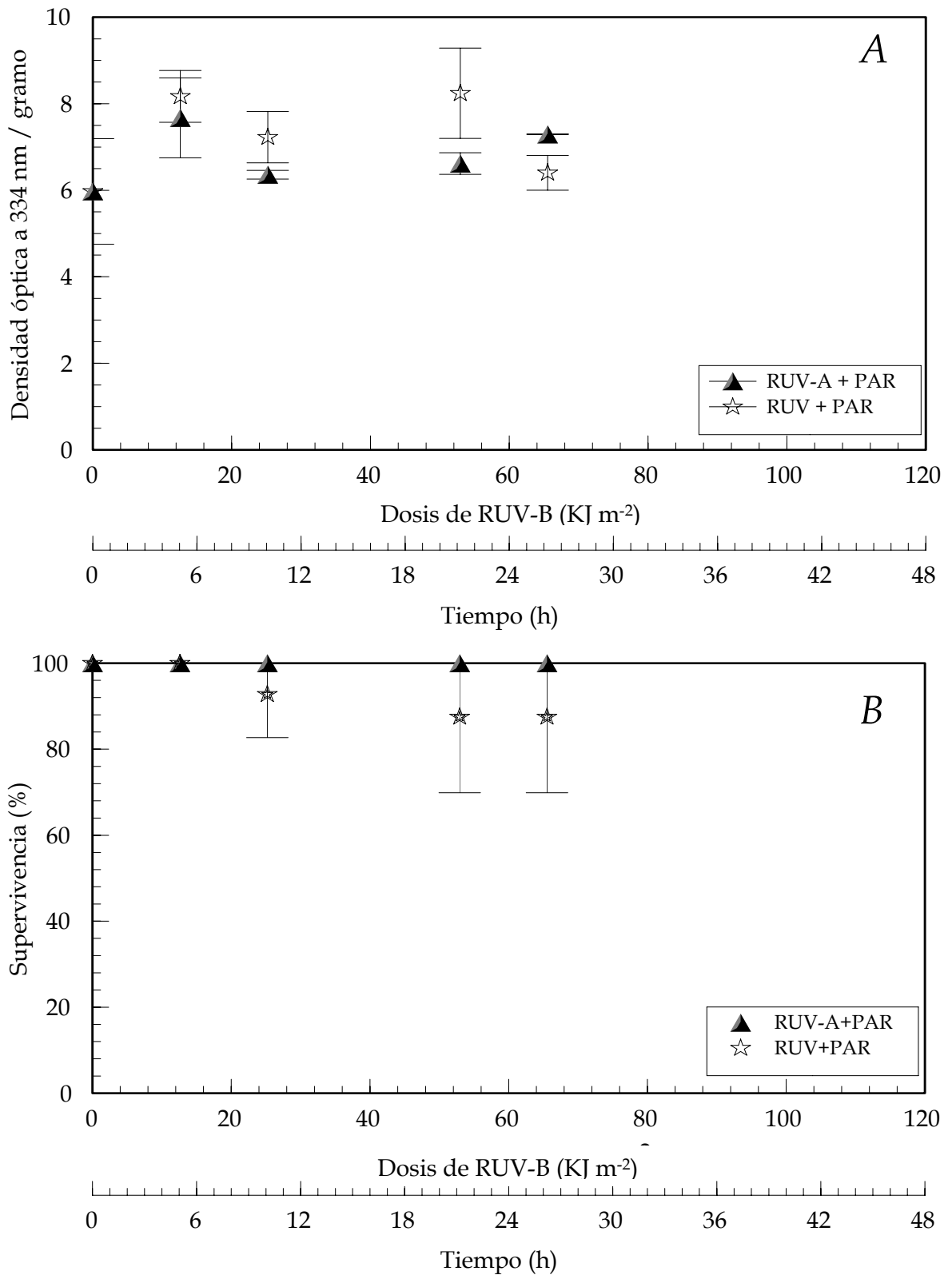


Figura 10: Individuos de *A. valida* con alta concentración de compuestos que absorben RUV (colectados en Febrero de 2000), incubados durante 26 h bajo dos tratamientos lumínicos: RUV + PAR (☆) y RUV-A + PAR (▲). A- Variación de los valores medios de la densidad óptica (334 nm) por gramo en los anfibios durante el desarrollo del experimento. B- Porcentaje medio de supervivencia en función de la RUV-B recibida. Las líneas verticales indican la desviación estándar.

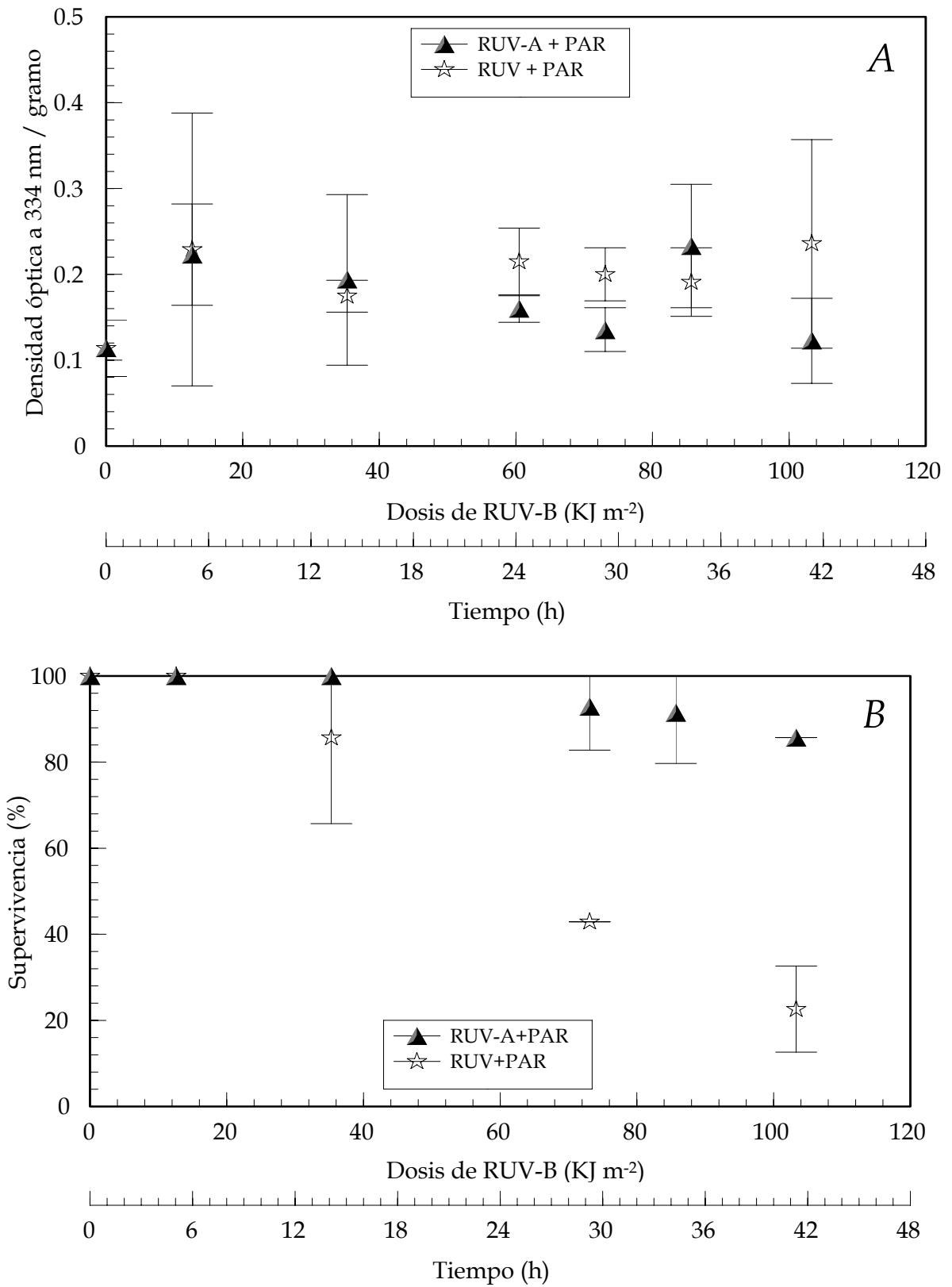


Figura 11: Individuos de *A. valida* con baja concentración de compuestos que absorben RUV (colectados en Febrero de 2000), incubados durante 26 h bajo dos tratamientos lumínicos: RUV + PAR (☆) y RUV-A + PAR (▲). A- Variación de los valores medios de la densidad óptica (334 nm) por gramo en los anfípodos durante el desarrollo del experimento. B- Porcentaje medio de supervivencia en función de la RUV-B recibida. Las líneas verticales indican la desviación estándar.

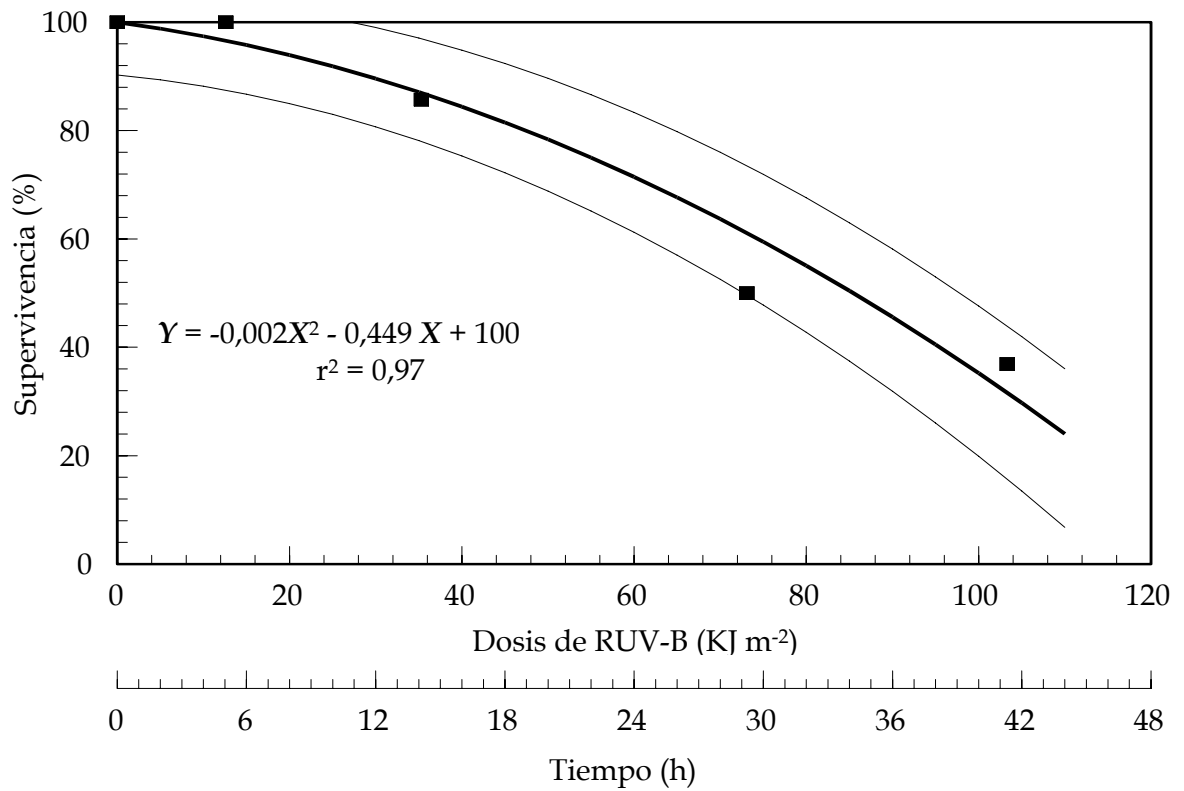


Figura 12: Supervivencia de *A. valida* (valores normalizados) en función de la dosis de RUV-B recibida y tiempo de exposición a la radiación. Las curvas representan un ajuste polinomial de segundo grado y el 95% intervalo de confianza. Datos de supervivencia con baja concentración de compuestos que absorben RUV.

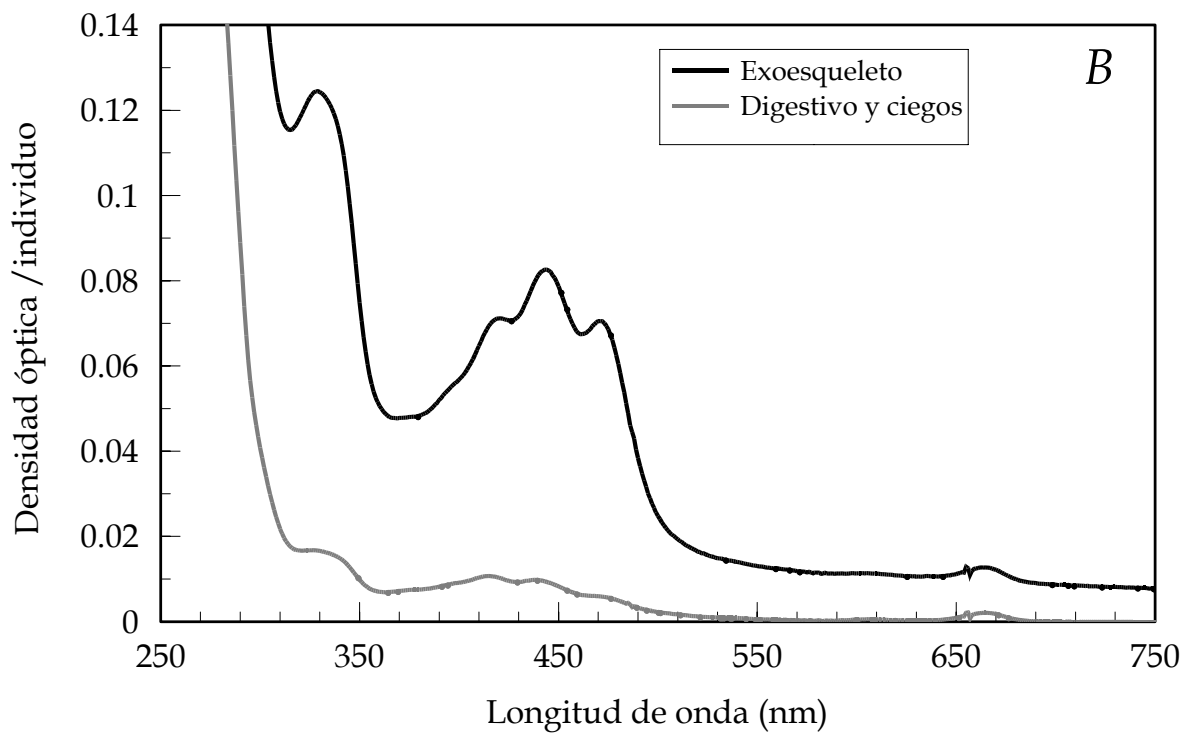
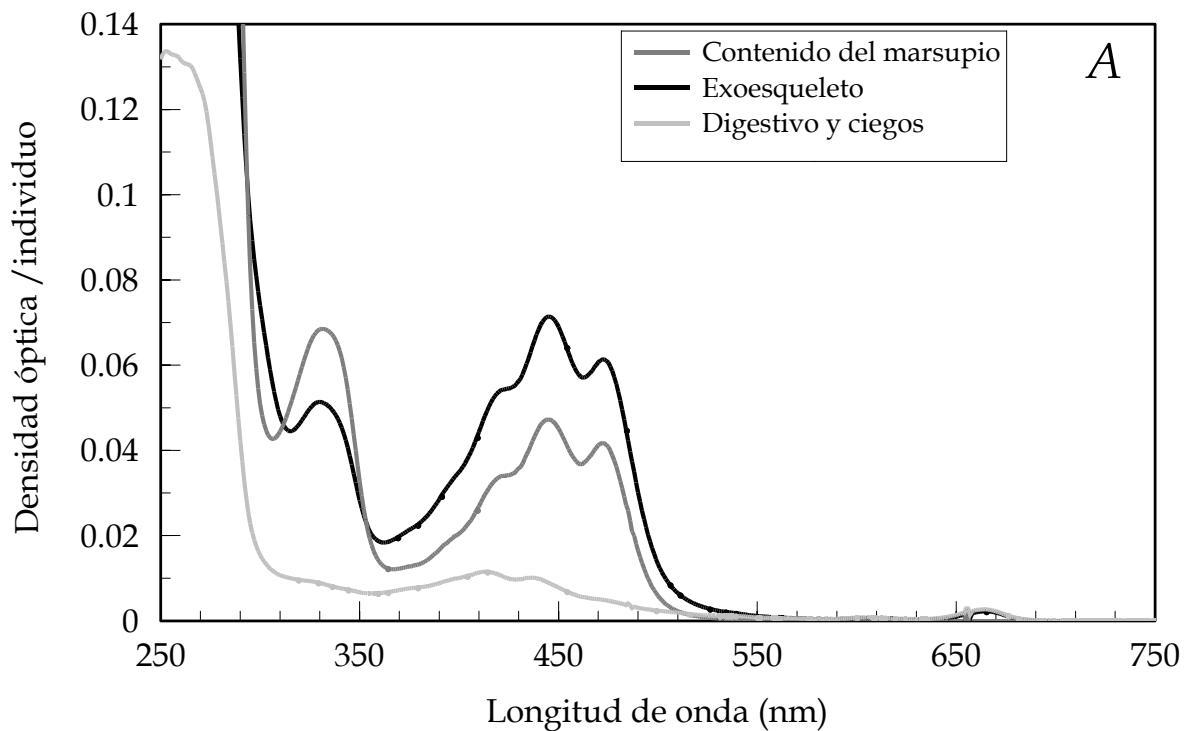


Figura 13: Variación de la densidad óptica en función de la longitud de onda en los distintos órganos de *I. baltica*. A- Hembras B- Machos

## Discusión

Se han realizado numerosos trabajos a fin de establecer la función de los compuestos que absorben RUV, típicamente Mycosporine Like Amino Acids (MAAs). Estos estudios han enfocado en su función en distintos niveles tróficos, tales como cianobacterias (García-Pichel *et al.*, 1993; Shina *et al.*, 1999), fitoplancton (Carreto *et al.*, 1990; Helbling *et al.*, 1996; Neale, 1997), macroalgas (Dring, 1990; Karentz *et al.*, 1991; Karsten *et al.*, 1998b), zooplancton (Zagarese *et al.*, 1998; Tartarotti *et al.*, 2000; Helbling *et al.*, 2001) y diversos invertebrados (Karentz *et al.*, 1991; Adams *et al.*, 1994; Carefoot *et al.*, 1998; Shick *et al.*, 1999). La mayoría de estos trabajos, han inferido una función protectora de los MAAs frente a la RUV; sin embargo, en otros trabajos, no se ha podido establecer una clara relación entre la presencia de estos compuestos y un mejor rendimiento ante la RUV (e.g., Franklin *et al.*, 1999).

Los MAAs tienen máximos de absorbancia en el intervalo de longitudes de onda 310 - 360 nm (Karentz *et al.*, 1991), razón por la cual se podría suponer que en los crustáceos estudiados, se trata de alguno de estos compuestos, posiblemente Porphyra-334 o Shinorine, ya que para ambos la máxima absorbancia (i.e., 334 nm) coincide con los picos observados (Figura 5); eventualmente, podría ser también mycosporine-glycine:valine dada la proximidad de su máximo de absorbancia (335 nm). Sin embargo, Porphyra-334 y Shinorine son cuantitativamente los MAAs más abundantes en distintos organismos (Karentz *et al.*, 1991; McClintock & Karentz, 1997).

Existen relativamente pocos trabajos que hayan establecido relaciones entre niveles tróficos en lo referente a la transferencia y bioacumulación de MAAs (Carroll & Shick, 1996; Carefoot *et al.*, 1998). En este tipo de investigaciones es necesario determinar la cantidad de compuestos que absorben RUV en el organismo productor, que para el caso particular de esta tesis se trata de macroalgas. En las tres especies de macroalgas estudiadas (Figura 4) se observa la presencia de compuestos que absorben RUV; sin embargo, la concentración y probablemente el tipo de estos compuestos depende de las condiciones de radiación solar en las que se desarrollan -i.e. latitud geográfica, ubicación en el piso litoral y profundidad, entre otros factores (Karsten *et al.*, 1998a; b). Es importante destacar que existen variaciones no solo entre los distintos taxones, siendo, en general, las algas rojas las que tienen mayor concentración de estos compuestos y las



verdes las de menor concentración (Karentz *et al.*, 1991; Karsten *et al.*, 1998a); asimismo, se han determinado estas variaciones entre especies dentro de un mismo género (Karentz *et al.*, 1991; Karsten *et al.*, 1998a). Es de esperar, entonces, que la concentración de compuestos que absorben RUV en niveles tróficos de consumidores, dependa fundamentalmente de su dieta. De hecho, y en los crustáceos aquí estudiados, la mayor concentración de compuestos que absorben RUV se observó en aquellos organismos que se alimentaban de *Polysiphonia* sp., mientras que los que tenían dietas compuestas por *Codium* sp. o *Enteromorpha* sp., presentaron niveles significativamente inferiores (Figuras 4 - 6). Este tipo de respuesta fue observada también otros invertebrados, tal como en erizos de mar (Carroll & Shick 1996) y corales (Shick *et al.*, 1999). Sin embargo, en el presente estudio se ha determinado que la tasa de bioacumulación de estos compuestos difiere entre los organismos. Por ejemplo, en *A. valida* la concentración aumentó exponencialmente conforme aumentaba el contenido en el alga dieta, llegando incluso a ser mayor que en el alga *Polysiphonia* sp. (Figura 6B). Sin embargo, en *I. baltica* la concentración de estos compuestos se encontraba en equilibrio con la dieta algal, variando en forma lineal y manteniéndose siempre por debajo de la concentración que tenía el alga.

Hasta el momento no se han establecido las condiciones para lograr una mayor tasa de bioacumulación de MAAs en invertebrados; sin embargo algunos trabajos (Conde *et al.*, 2000; Helbling *et al.*, 2001) han determinado como éstos pueden ser degradados por la RUV. En el caso particular de *I. baltica*, la concentración de compuestos que absorben RUV disminuyó significativamente por efecto de la RUV-B, evidenciándolo la importancia de la UV-B en la degradación de estos compuestos (Figura 7A). Se ha demostrado, asimismo, que grandes cantidades de MAAs pueden ser sintetizados por diatomeas Antárticas en aproximadamente 7 días, evidenciando una alta tasa de síntesis de estos compuestos (Helbling *et al.*, 1996). Sin embargo su pérdida es muy lenta, con un período de semi-degradación de 21 días. Por otra parte, al comparar la concentración de compuestos que absorben RUV en *A. valida* e *I. baltica* colectados de las mismas pozas de marea y alimentados con la misma macroalga (*Polysiphonia* sp.), es posible ver que en la primer especie, la concentración de estos compuestos es mucho mayor (Figura 5). En cuanto a la velocidad de bioacumulación en estas especies, en experiencias a mediano plazo (i.e., 10 días), no se observaron variaciones significativas en la concentración de

compuestos que absorben RUV cuando los individuos se alimentaban con dietas ricas en MAAs (datos no presentados). Esto concuerda con lo observado en otros grupos taxonómicos donde se encontraron cambios significativos en la concentración de compuestos que absorben RUV sólo en períodos de bioacumulación mayores de 30 días (Carroll & Shick 1996, Shick *et al.*, 1999). Resulta importante resaltar las diferentes estrategias de dos grupos tróficos (productores versus consumidores): mientras que las diatomeas tenían una alta velocidad de síntesis y baja pérdida de MAAs (Helbling *et al.*, 1996), sucedió lo opuesto con los crustáceos aquí estudiados.

Es interesante, asimismo, el hecho de que la dos especies de crustáceos tuvieran relativamente altas concentraciones de compuestos que absorben RUV (Figura 5) y que esta concentración dependiera del alga dieta (Figura 6). Sin embargo, la sola presencia de estos compuesto no es suficiente para asumir una función protectora. En los párrafos siguientes se discutirá el potencial rol protector de estos compuestos en estas dos especies y la importancia que ésto puede tener en la ecología, distribución y estrategia de supervivencia de ambas.

En el caso de *I. baltica*, la supervivencia fue afectada por su exposición a la RUV-B (Figura 9); sin embargo, la tasa de supervivencia era la misma tanto para individuos con alta como con baja concentración de compuestos que absorben RUV (Figuras 7 y 8) sugiriendo una baja efectividad de estos compuestos en conferir protección ante la RUV-B. Sin embargo, esta especie mostró un umbral de resistencia a la RUV-B de aproximadamente de 40 KJ m<sup>-2</sup> (Figura 9), por debajo del cual la RUV-B no causaba mortalidad de individuos. Este umbral de radiación es comparable con la dosis diaria máxima (50 KJ m<sup>-2</sup>) observada en estas latitudes (Helbling *et al.*, 2000), lo cual sugiere una efectiva aclimatación de esta especie a la radiación solar que normalmente recibe. Este umbral de resistencia podría deberse a un efectivo mecanismo de reparación, tal como el observado en el crustáceo *Daphnia magna* (Cywinska *et al.*, 2000), donde la tasa de supervivencia ante la RUV-B se incrementaba en un 95% debido a la fotorreparación. Otros trabajos también destacan la importancia este tipo de mecanismos de reparación (Sancar & Sancar, 1988; Mitchell, 1995; Zagarese *et al.*, 1997; 2000). Asimismo, se han encontrado umbrales similares en organismos autótrofos de diferentes lugares del mundo (Helbling *et al.*, 1992, Helbling & Villafañe, 2001).

En vista de la efectiva aclimatación de *I. baltica* a su ambiente lumínico natural,

surge la pregunta sobre la importancia de bioacumular compuestos que absorben RUV, tal como se observa en este trabajo (Figuras 5, 6). Gran parte de la respuesta a esta pregunta surge de la determinación de la concentración de estos compuestos en distintas partes del cuerpo (Figura 13). Una de las formas de poder evidenciar la acumulación diferencial en distintas partes / tejidos resulta de comparar la relación proporcional de dos compuestos que ingresen a través de la dieta, además de su concentración total en cada tejido. En este caso, al comparar la altura del pico de compuestos que absorben RUV ( $\lambda_{\text{máx}} = 334 \text{ nm}$ ), con el de clorofila ( $\lambda_{\text{máx}} = 440 \text{ nm}$ ), se obtuvo una relación de 1 para el exoesqueleto y el tubo digestivo. Sin embargo, esta relación entre máximos de absorbancia fue de aproximadamente 3 para el contenido del marsupio (i.e., huevos y embriones en distintos estadios de maduración). Esto implicaría que existe una substancial transferencia de compuestos que absorben RUV a los embriones, lo cual sería especialmente importante para la supervivencia de los mismos y posterior reclutamiento. Es de destacar, además, que estos individuos una vez que abandonan el marsupio quedan sujetos al exterior de este por un tiempo indeterminado, durante el cual se nutren exclusivamente del vitelo remanente (Gómez Simes com. pers.) y no poseen ningún tipo de pigmentación (Gómez Simes, 1974), razón por la cual una relativa alta concentración de compuestos que absorben RUV podría servir de efectiva protección frente a la radiación solar. La biotransferencia de compuestos que absorben RUV a estadios iniciales, es un mecanismo estudiado en otros organismos marinos (Adams *et al.*, 1994; Carroll & Shick 1996; Carefoot *et al.*, 1998), en los cuales se ha determinado que la tasa de supervivencia de las crías que recibían estos compuestos se incrementaba significativamente al compararla con aquellas que no los recibieron.

En la otra especie de crustáceos estudiada, *A. valida*, la concentración de compuestos que absorben RUV parece ser una efectiva defensa para protegerse de los efectos negativos de la RUV (Figuras 10 y 11). En esta especie, no hubo mortalidad por RUV-B cuando la concentración de estos compuestos fue alta (Figura 10); sin embargo, la supervivencia disminuyó significativamente cuando los individuos tenían una dieta pobre en MAAs (Figuras 11 y 12). Asimismo, el umbral de resistencia de esta especie, con baja concentración de compuestos que absorben RUV, fue relativamente bajo ( $<15 \text{ KJ} \cdot \text{m}^{-2}$ ) sugiriendo una gran sensibilidad de esta especie a la RUV-B aún después de pocas horas de exposición a la radiación solar. Este valor umbral es menor que las dosis diarias

medias de primavera y otoño (Helbling *et al.*, 2000), justificando así la necesidad de contar con un mecanismo efectivo de bioacumulación de compuestos que absorben RUV, debido quizás a la ausencia o baja efectividad de un mecanismo de fotoreparación alternativo.

La Patagonia se encuentra, esporádicamente y durante la primavera austral, bajo la influencia de eventos de disminución de ozono estratosférico, recibiendo en consecuencia niveles relativamente mayores de RUV-B (Orce & Helbling 1997; Villafañe *et al.*, 2001). En el caso de un incremento relativo en la cantidad de RUV-B que llega a la Tierra, existe una gama de respuestas que dependen de la sensibilidad de los individuos estudiados, siendo las poblaciones de *A. valida* que se alimentan de *Enteromorpha* sp. las más sensibles y vulnerables a la RUV-B, seguidas por *I. baltica*; finalmente, las poblaciones de *A. valida* que se alimentan de *Polysiphonia* sp., serían las más resistentes. Sin embargo, hay que tener en cuenta que un aumento relativo de RUV-B podría disminuir el umbral de tolerancia de *I. baltica*, al alterarse el equilibrio daño - reparación. Por otro lado, *A. valida* puede secretar un material aglutinante con el cual genera un tubo con las macroalgas que lo rodean (Alonso de Pina, 1997). Dentro de este tubo, no sólo estaría a salvo de algunos posibles predadores, sino que también podría resguardarse, parcialmente, de la RUV.

Este estudio, inédito para estas especies de crustáceos, demuestra que, al momento de evaluar el efecto y el impacto de la RUV (normal o aumentada durante eventos de disminución de ozono), es necesario considerar una serie de factores que afectan la capacidad de aclimatación a la radiación solar de los organismos. De estos factores, uno de los más importantes es la dieta alimenticia, la cual podría favorecer directamente a la supervivencia, o a un mejor reclutamiento de las especies. Las consecuencias de una favorable adaptación a la RUV por parte de los organismos son variadas, pero la biodiversidad del ecosistema es quizá una de las más trascendentes.

## Conclusiones

Tanto *Amphitoe valida* como *Idothea baltica* pueden bioacumular compuestos que absorben RUV de acuerdo a la dieta suministrada. En *I. baltica* la tasa de bioacumulación respondió a una función lineal, mientras que en *A. valida* la relación fue exponencial.

En *I. baltica* y tanto en individuos con alto como con bajo contenido de compuestos que absorben RUV, la supervivencia disminuyó en función de la dosis de RUV-B recibida; los compuestos estaban principalmente concentrados en el contenido del marsupio, lo que sugiere una estrategia adaptativa a través de la protección de su descendencia. Por otra parte, en *A. valida* existen diferencias significativas en cuanto a la supervivencia de individuos con alta y baja concentración de compuestos que absorben RUV, lo cual indica que su bioacumulación está directamente relacionada con la supervivencia de los individuos .adultos.

## Bibliografía

- Adams N.L., A.K. Carroll, & J.M. Shick (1994) Mycosporine-like amino acid (MAA) enriched embryos of the green sea urchin show reduced UV-induced cytokinetic delay: evidence for MAAs as photoprotectants. *American Society of Zoologists (abstract)* 34: 123A
- Alonso de Pina G.M. (1997) Records of intertidal amphipods from the Southwest Atlantic, with the description of a new species of *Elasmopus*. *Journal of Crustacean Biology* 17: 745-757
- Behrenfeld M.J., J. Hardy, H. Gucinski, A. Hanneman, H. Lee, & A. Wones (1993) Effects of ultraviolet-B radiation on primary production along latitudinal transects in the South Pacific Ocean. *Marine Environmental Research*. 35: 349-363
- Browman H.I., C. Alonso Rodriguez, F. Béland, J.J. Cullen, R.F. Davis, J.H.M. Kouwenberg, P.S. Kuhn, B. McArthur, J. A. Runge, J.-F. St-Pierre, & R.D. Vetter (2000) Impact of ultraviolet radiation on marine crustacean zooplankton and ichthyoplankton: A synthesis of results from the estuary and Gulf of St. Lawrence, Canada. *Marine Ecology Progress Series* 199: 293-311
- Buma A.G.J., E.J. Van Hannen, M.J.W. Veldhuis, & W.W.C. Gieskes (1996) UV-B induces DNA damage and DNA synthesis delay in the marine diatom *Cyclotella* sp. *Scientia Marina* 60: 101-106
- Caldwell M.M., A.H. Teramura, M. Tevini, J.F. Bornman, L.O. Björn, & G. Kulandaivelu (1995) Effects of increased solar ultraviolet radiation on terrestrial plants. *Ambio* 24: 166-173
- Carefoot T.H., M. Harris, B.E. Taylor, D. Donovan, & D. Karentz (1998) Mycosporine-like amino acids: possible UV protection in eggs of the sea hare *Aplysia dactylomela*. *Marine Biology* 130: 389-396
- Carreto J.I., M.O. Carignan, G. Daleo, & S.G. De Marco (1990) Occurrence of mycosporine-like amino acids in the red-tide dinoflagellate *Alexandrium excavatum*: UV-photoprotective compounds? *Journal of Plankton Research* 12: 909-921
- Carroll A.K., & J.M. Shick (1996) Dietary accumulation of UV-absorbing mycosporine-like amino acids (MAAs) by the green sea urchin (*Strongylocentrotus droebachiensis*). *Marine Biology* 124: 561-569
- Conde F.R., M.S. Churio, & C.M. Previtali (2000) The photoprotector mechanism of mycosporine-like amino acids. Excited-state properties and photostability of porphyrin-334 in aqueous solution. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 56: 139-144
- Cullen J.J., P.J. Neale, & M.P. Lesser (1992) Biological weighting function for the inhibition of phytoplankton photosynthesis by ultraviolet radiation. *Science* 258: 646-650
- Cywinska A., D. Crump, & D. Lean (2000) Influence of UV on four freshwater invertebrates. *Photochemistry and Photobiology* 72: 652-659
- Day T.A., C.T. Ruhland, C.W. Grobe, & F. Xiong (1999) Growth and reproduction of Antarctic vascular plants in response to warming and UV radiation reductions in the field. *Oecologia* 119: 24-35
- Díaz P. (2000) Macroalgas bentónicas en el mesolitoral de tres playas en el Golfo Nuevo. *Tesis de grado*. Univ. Nac. de la Patagonia San Juan Bosco (sede Puerto Madryn) 50 pp.

- Dring M.J. (1990) Light harvesting and pigment composition in marine phytoplankton and macroalgae. En: *Light and life in the sea*. P.J. Herring, A.K. Campbell, M. Whitfield, and L. Maddock (eds) pp. 89-113. Cambridge University Press.
- Dunlap W.C., & Y. Yamamoto (1995) Small molecule antioxidants in marine organisms: antioxidant activity of mycosporine glycine. *Comparative Biochemistry Physiology* 112B: 105-114
- Fischbach R.J., B. Kossmann, H. Panten, R. Steinbrecher, W. Heller, H.K. Seidlitz, H. Sandermann, N. Hertkorn, & J.P. Schnitzler (1999) Seasonal accumulation of ultraviolet-B screening pigments in needles of *Norway spruce* (*Picea abies* (L.) Karst.). *Plant Cell and Environment* 22: 27-37
- Franklin L.A., I. Yakovleva, U. Karsten, & K. Luning (1999) Synthesis of mycosporine-like amino acids in *Chondrus crispus* (Florideophyceae) and the consequences for sensitivity to ultraviolet B radiation. *Journal of Phycology* 35: 682-693
- García-Pichel F., C.E. Wingard, & R.W. Castenholz (1993) Evidence regarding the UV sunscreen role of a Mycosporine - Like compound in the cyanobacterium *Gloeocapsa* sp. *Applied and Environmental Microbiology* 59: 170-176
- Gómez Simes E. (1974) Observaciones morfológicas y biológicas de *Idotea baltica* de Mar del Plata (Crustacea Isopoda). *Monografía de Oceanografía Biológica*. Universidad Nacional de la Plata. 42pp.
- Gosztanyi A.E., M.E Re., L. Kuba; I. Elias, A. Monsalve, & P. Barón (1995) Alimentación de *Odontesthes smitti* y *Odontesthes nigricans* (atherividae) en aguas del Golfo Nuevo y Península Valdes. V Congreso Latinoamericano de Ciencias del Mar - Mar del Plata - (Abstract).
- Häder D.P. (1997) *The effects of ozone depletion on aquatic ecosystems*. Austin. Texas.U.S.A: R.G. Landes Company. 275 pp.
- Helbling E.W, V.E. Villafañe, M. Ferrario, & O. Holm-Hansen (1992) Impact of ultraviolet radiation on rates of photosynthesis and on specific marine phytoplankton species. *Marine Ecology Progress Series* 80: 89-100
- Helbling E.W., B.E. Chalker, W.C. Dunlap, O. Holm-Hansen, & V.E. Villafañe (1996) Photoacclimation of Antarctic marine diatoms to solar ultraviolet radiation. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 204: 85-101
- Helbling E.W., R. Goncalves, E.S. Barbieri & V.E. Villafañe (2000) Radiación ultravioleta y ozono en Patagonia central. V Jornadas Nacionales de Ciencias del Mar. - Puerto Madryn (Abstract). 1: 74.
- Helbling E.W., F. Zaratti, L.O. Sala, E.R. Palenque, C.F. Menchi, & V.E. Villafañe (2001) Mycosporine like aminoacids protect the copepod *Bockella titicacae* (Harding) against high levels of solar UVR. *Journal of Plankton Research* (en revisión)
- Helbling E.W., & V.E. Villafañe. (2001) UVR effects on phytoplankton primary production: A comparison between Arctic and Antarctic marine ecosystems. *UV radiation and Arctic ecosystems*. Dag O. Hessen (ed) - Springer - Verlag (en prensa)
- Hessen D.O. (1994) *Daphnia* responses to UV-B light. *Archiv für Hydrobiologie. Beiheft See Ergebnisee der Limnologie*, 43: 185-195
- Juhl A.R., M.D. Ohman, & R. Goericke (1996) Astaxanthin in *Calanus pacificus*: Assessment of pigment-based measures of omnivory. *Limnology and Oceanography* 41: 1198-1207
- Karanas J.J., H. Van Dyke, & R.C. Worrest (1979) Mid-ultraviolet (UV-B) sensitivity of *Acacia clausi* Giesbrecht (Copepoda). *Limnology and Oceanography* 24: 1104-1116

- Karentz D., & L.H. Lutze (1990) Evaluation of biologically harmful ultraviolet radiation in Antarctica with a biological dosimeter designed for aquatic environments. *Limnology and Oceanography* 35: 549-561
- Karentz D., F.S. Mc Euen, M.C. Land, & W.C. Dunlap (1991) Survey of mycosporine-like amino acid compounds in Antarctic marine organisms: potential protection from ultraviolet exposure. *Marine Biology* 108: 157-166
- Karsten U., T. Sawall, D. Hanelt, K. Bischof, F.L. Figueroa, A. Flores-Moya, & C. Wiencke (1998 a) An inventory of UV-absorbing mycosporine like amino acids in macroalgae from polar to warm-temperate regions. *Botánica Marina* 41: 443-453
- Karsten U., J. Maier, & F. Garcia-Pichel (1998 b) Seasonality in UV-absorbing compounds of cyanobacterial mat communities from an intertidal mangrove flat. *Aquatic Microbial Ecology* 16: 37-44
- Lincoln R.J. (1979) *British Marine Amphipoda: Gammaridea*. British Museum (Natural History) London. 658 pp.
- Lobban C., & P. Harrison (1994) *Seaweed ecology and physiology*. Cambridge University Press. 366 pp.
- Lubin D., & O. Holm-Hansen (1995) Atmospheric ozone and the biological impact of solar ultraviolet radiation. *Encyclopedia of Environmental Biology* 1: 147-168
- McClintock J.B., & D. Karentz (1997) Mycosporine-like amino acids in 38 species of subtidal marine organisms from McMurdo Sound, Antarctica. *Antarctic Science* 9: 392-398
- Mitchell D.L. (1995) DNA damage and repair. *CRC Handbook of organic photochemistry and photobiology*. W.M. Horspool & P.S. Song (eds), Boca Raton: CRC Press. 1326-1331.
- Neale P.J. (1997) Algal photoinhibition and photosynthesis in the aquatic environment. *Photoinhibition*. D.J. Kyle, C.B. Osmond, & C.J. Arntzen (eds), Elsevier 39-65.
- Newman S.J., S. Nicol., D. Ritz, and H. Marchant (1999) Susceptibility of krill (*Euphausia superba* Dana) to ultraviolet radiation. *Polar Biology* 22: 50-55
- Orce V.L., & E.W. Helbling (1997) Latitudinal UVR-PAR measurements in Argentina: extent of the "ozone hole". *Global and Planetary Change* 15: 113-121
- Prézelin B.B., & Matlick H.A. (1980) Time-course of photoadaptation in the photosynthesis-irradiance relationship of a dinoflagellate exhibiting photosynthetic periodicity. *Marine Biology* 58: 85-96
- Puntarulo S., & G. Malanga (1995) Oxidative stress and antioxidant content in *Chlorella vulgaris* after exposure to ultraviolet-B radiation. *Physiologia Plantarum* 94: 672-679
- Sancar A., & G.B. Sancar (1988) DNA repair enzymes. *Annual Review of Biochemistry* 57: 29-67
- Schulze P.C., H.E. Zagarese, & C.E. Williamson (1995) Competition between crustacean zooplankton in continuous cultures. *Limnology and Oceanography* 40: 33-45
- Shick M., M.P. Lesser, & P.L. Jokiel (1996) Effects of ultraviolet radiation on corals and other coral reef organisms. *Global Change Biology* 2: 527-545
- Shick J.M., S. Romaine-Lioud, C. Ferrier Pages, & J.P. Gatuso (1999) Ultraviolet B radiation stimulate shikimate pathway-dependent accumulation of mycosporine-like amino acids in the coral *Stylophora pistillata* despite decreases in its population of symbiotic dinoflagellates. *Limnology and Oceanography* 44: 1667-1682
- Sinha R.P., M. Klisch, A. Groniger, & D.P. Häder (1998). Ultraviolet-absorbing / screening substances in cyanobacteria, phytoplankton and macroalgae. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 47: 83-94
- Smith R.C, B.B. Prézelin, K.S. Baker, R.R. Bidigare, N.P. Boucher, T.L. Coley, D. Karentz, S. MacIntyre, H.A. Matlick, D. Menzies, M. Ondrusek, Z. Man, & K.J. Waters (1992)



- Ozone depletion: Ultraviolet radiation and phytoplankton biology in Antarctic waters. *Science* 255: 952-959
- Tartarotti B., S. Cabrera, R. Psenner, & R. Sommaruga (1999) Survivorship of *Cyclops abyssorum taticus* (Cyclopoida, Copepoda) and *Boeckella gracilipes* (Calanoida, Copepoda) under ambient levels of solar UVB radiation in two high-mountain lakes. *Journal of Plankton Research* 21: 549-560
- Tartarotti B., W. Cravero, & H.E. Zagarese (2000) Biological weighting function for the mortality of *Boeckella gracilepsis* (Cyclopoida, Copepoda) derived from experiments with natural solar radiation. *Photochemistry and Photobiology* 72: 314-319
- Villafañe V.E., M. Andrade, V. Lairana, F. Zaratti, & E.W. Helbling (1999) Inhibition of phytoplankton photosynthesis by solar ultraviolet radiation: studies in Lake Titicaca, Bolivia. *Freshwater Biology* 42: 215-224
- Villafañe V.E., E.W. Helbling, & O. Zagarese (2001) Solar ultraviolet radiation and its impact on aquatic systems of Patagonia, South America. *Ambio* 30: 104-111
- Weiler C.S., & P.A. Penhale (1994) *Ultraviolet radiation in Antarctica: Measurements and biological effects*. Washington, D.C. American Geophysical Union. 257 pp.
- Yabe K., S. Onodera, M. Makino, M. Suzuki, & K. Kagoshima (1998) The effects of ultraviolet irradiation on larvae and early juveniles of the sea urchin. *Strongylocentrotus intermedius*. *Nippon Suisan Gakkaishi* 64: 606-609
- Young A.R., L.O. Björn, J. Moan, & W. Nultsch (1993) *Environmental UV photobiology*. New York Plenum Press. 479 pp.
- Zagarese H.E (1991) Planktivory by *Odontheistes bonariensis* (Atherinidae: Pisces) larvae and its effects on zooplankton community structure. *Journal of Plankton Research* 13: 549-560
- Zagarese E.H.; C.E. Williamson, & M.E.B. Joyner (1994) Modeling the impacts of UV-B radiation on ecological interactions in freshwater and marine ecosystems. *Stratospheric ozone depletion / UV-B radiation in the biosphere*. R. H. Biggs (ed), New York. Springer-Verlag, 315-328
- Zagarese H.E., M. Feldman, & C.E. Williamson.(1997) UV-B induced damage and photoreactivation in three species of *Boeckella* (Copepoda, Calanoida). *Journal of Plankton Research* 19: 357-367
- Zagarese E.H.; Tartarotti B.; Cravero W. & P. Gonzales (1998) UV damage in shallow lakes: the implications of water mixing. *Journal of Plankton Research* 20: 1423-1433
- Zagarese H.E, C.E. Williamson, S. Demers, & M. Vernet (2000) Impact of UV radiation of zooplankton and fish. *The effects of UV radiation in the marine environment*. S. de Mora, S. Demers & M. Vernet (eds). Cambridge University Press. 279-309 pp.
- Zar J.H. (1984) *Biostatistical analysis*. Prentice Hall Inc., New Jersey, USA. 2<sup>nd</sup> ed., 718 pp.