

IMPACTO DE LA RADIACIÓN
ULTRAVIOLETA EN LA FOTOSÍNTESIS
DEL FITOPLANCTON: IMPORTANCIA
DE LA CAPA SUPERFICIAL DE MEZCLA

Elena Susana Barbieri

Director: E. Walter Helbling (Ph. D).

Seminario para acceder a la Licenciatura en Ciencias Biológicas.
Universidad Nacional de la Patagonia "San Juan Bosco"
Facultad de Ciencias Naturales Sede Puerto Madryn.

2001

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	3
RESUMEN	4
INTRODUCCIÓN	5
ÁREA DE ESTUDIO	9
MATERIALES Y MÉTODOS	12
RECOLECCIÓN DE MUESTRAS	12
EXPERIMENTACIÓN	13
A. EFECTO EN LA INCORPORACIÓN DE CARBONO	13
B. EFECTO EN LA PRODUCCIÓN DE OXÍGENO	17
C. EFECTO EN EL FOTOSISTEMA II	17
D. EFECTO DE LA MEZCLA VERTICAL	19
ANÁLISIS Y DETERMINACIONES	20
A. MEDICIONES DE RADIACIÓN	20
B. CLOROFILA-A	21
C. COMPUESTOS QUE ABSORBEN RUV	22
D. COMPOSICIÓN TAXONÓMICA	22
E. INCORPORACIÓN DE CARBONO	22
F. ANÁLISIS DE DATOS	24
RESULTADOS	25
A. RADIACIÓN SOLAR Y OZONO	25
B. VARIACIONES ESTACIONALES	28
C. EFECTO EN LA INCORPORACIÓN DE CARBONO	32
D. EFECTO EN LA PRODUCCIÓN DE OXÍGENO Y EN EL FOTOSISTEMA II	32
E. EFECTO DE LA MEZCLA VERTICAL	35
DISCUSIÓN	48
CONCLUSIONES	51
REFERENCIAS	52

AGRADECIMIENTOS

A mi papi, con todo mi amor...

En primer lugar quiero agradecer a quienes confiaron en mí desde el primer día, quienes me han acompañado en los últimos años más importantes en mi formación y más difíciles de mi vida, Walter y Virginia, gracias!!, por enseñarme, no solo a hacer ciencia, sino a conducirme en la vida, a ser cada día un poquito más sólida y a saber tomar las mejores decisiones, pensando más allá del hoy.

Si bien no me alcanzaría este espacio para hacerlo, quiero agradecer a mi familia todo lo que han hecho para que hoy llegue a culminar este ciclo, le agradezco por estar siempre presente en mí, por su solidez...por ser mi familia, gracias!!...

A Américo por estar siempre a mi lado, por todos los momentos, desde el primer año hasta hoy, juntos... y a su familia por alentarme siempre. A la familia Villafañe por todo su apoyo y cariño.

A todos mis amigos, por todos esos momentos que quedarán en nuestra memoria por siempre.

Quiero agradecer a los miembros del jurado y en especial a Susana por su asesoramiento y seguimiento durante los últimos años dentro de la Universidad. A mi querido profesor José Santamarina, gracias por realizar todos esos viajes para compartir conmigo sus clases. Deseo agradecer especialmente a Livio Sala, a Leonardo Taibo y a Isabel Albarracín, por toda su colaboración.

Este trabajo se desarrolló en el marco de los proyectos financiados por la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (Proyectos PICT97 N° 01-00046-00955 y 07-00000-02206), Fundación Antorchas (Proyecto N° A-13622/1-100), The Third World Academy of Sciences (Proyecto N° 98-036 RG/BIO/LA) y la Fundación Playa Unión.

..y a todas esas personas que me han acompañado en este largo camino, a todas ellas... Gracias!!.

RESUMEN

En el período comprendido entre los años 1999 y 2000, se realizaron experimentos con el objeto de determinar los efectos de la radiación ultravioleta (RUV, 280-400 nm) en la fotosíntesis del fitoplancton marino de latitudes medias. Se trabajó con poblaciones naturales de la zona de Bahía Engaño (43°S; 65°W) y con cultivos monoespecíficos. Los experimentos realizados se refirieron específicamente a determinar: a) Efectos en la incorporación de carbono y en la producción de oxígeno, b) Efectos en el transporte electrónico del fotosistema II y, c) Efecto de la mezcla vertical debida a la RUV. Los resultados obtenidos indican que existe una inhibición significativa en la fotosíntesis de poblaciones naturales de fitoplancton, siendo las muestras dominadas por microplancton aquellas con mayores porcentajes de inhibición, en comparación con aquellas dominadas por nanoplancton, lo cual indica que las especies microplanctónicas son más sensibles a la RUV. Asimismo, se determinó que la respuesta a la RUV depende de la especie fitoplanctónica considerada. Por otra parte, se demostró que la inhibición causada por la RUV al fotosistema II puede revertirse en minutos, si se retira el estrés de radiación. En cuanto a las consecuencias de la mezcla vertical, se ha demostrado que aquellas especies aclimatadas a la baja radiación (muestras de invierno), son más sensibles a cambios de radiación en la columna de agua que las aclimatadas a mayores niveles de radiación (muestras de verano). Asimismo, se encontró que las especies que conforman la comunidad fitoplanctónica de Bahía Engaño, tienen la capacidad de utilizar parte de la energía correspondiente a la RUV-A (315-400 nm) para realizar fotosíntesis.

INTRODUCCIÓN

La productividad primaria en ambientes acuáticos depende básicamente del proceso de fotosíntesis realizado por los organismos autótrofos. Estos productores primarios son los encargados de ingresar energía química al sistema transformando la energía lumínica proveniente del Sol. El proceso se basa en la incorporación del CO₂ presente en el medio y su transformación, mediante reacciones de óxido-reducción, a materia orgánica (hidratos de carbono), la cual queda disponible para ser utilizada por organismos de niveles tróficos superiores. El fitoplancton es responsable de aproximadamente el 50% del total del carbono fijado por los productores primarios del planeta – aproximadamente 45-50 Gt C por año (Longhurst *et al.*, 1995).

La producción de materia orgánica no puede ser posible sin la presencia de la radiación solar en la superficie del planeta. El espectro de energía solar se divide en distintas bandas de acuerdo a su longitud de onda: a) *Radiación visible*, o PAR (Photosynthetically Available Radiation), entre 400 y 700 nanómetros (nm), constituyendo el 40 % de la energía que llega a la Tierra, b) *Infrarrojo cercano* - entre 700 a 4000 nm, correspondiendo el 51% de la radiación que llega a la Tierra y, c) *Radiación ultravioleta* (RUV), correspondiendo a longitudes de onda menores a 400 nm. En esta última banda, a su vez, se diferencian varias divisiones, pero la mayoría son absorbidas o reflejadas por la atmósfera, llegando a la superficie terrestre solo la RUV-A (315-400 nm) y la RUV-B (280-315 nm), constituyendo así el 9% restante (Lubin & Holm-Hansen, 1995).

El comportamiento de la radiación es altamente afectado por la naturaleza del medio que atraviesa (Kirk, 1994). Por tal motivo, se han realizado muchos estudios sobre los factores que condicionan la cantidad y calidad de radiación que llega a la superficie de la Tierra. Estos factores intervienen en forma diferencial en la reflexión y refracción de la radiación solar, y pueden clasificarse en: atmosféricos (aerosoles, nubes, concentración de ozono), geográficos (latitud y altitud), y estacionales (época del año)

(Madronich, 1993). En cuanto a la cantidad de radiación, en los últimos años se ha detectado un aumento de RUV, especialmente RUV-B, que afecta principalmente la superficie Antártica. Este hecho está relacionado con la disminución en la concentración de ozono estratosférico (Farman *et al.*, 1985) - el así llamado “agujero de ozono” (Gribbin, 1988). Este hecho es quizás uno de los cambios climáticos de origen antrópico de mayor importancia en los últimos tiempos. Una de las causas más importantes de la disminución de ozono es la emisión de compuestos clorofluorcarbonados - CFCs (Molina & Rowland, 1974). Estos gases, generados por la actividad industrial, son muy estables, no tóxicos y muy volátiles, por lo cual no pueden ser eliminados de la atmósfera por los procesos normales de limpieza (e. g., lluvia). Una vez que llegan a la estratósfera, intervienen en la ruptura de las moléculas de ozono, ya que se descomponen si se los somete a la RUV, pudiendo así participar en la reacción. El aumento de RUV producido por disminución de ozono puede detectarse hasta los 38°S (Tocho *et al.*, 1996; Orce & Helbling, 1997). Sin embargo, es importante considerar que la RUV que se recibe en latitudes bajas es mayor que en las altas (aproximadamente 2 a 3 veces), debido a que los rayos solares deben recorrer una menor distancia al atravesar la atmósfera terrestre, la concentración de ozono es menor, y que el ángulo cenital es menor (Madronich, 1993).

Muchos estudios han demostrado que la RUV puede causar diversos efectos negativos en los organismos (Häder *et al.*, 1995; Caldwell *et al.*, 1995). En particular, se considera que la RUV-B es más perjudicial por ser más energética, y como un ejemplo se puede citar uno de los primeros trabajos en donde se determinó que la RUV-B reduce procesos químicos y enzimáticos en la fotosíntesis del fitoplancton (Steeman Nielsen, 1964). El hecho de que la RUV-B sea comparativamente más perjudicial que otras longitudes de onda, se encuentra relacionado con su característica dual, como onda y como si estuviera compuesta por pequeños corpúsculos, llamados “quanta”. La energía de cada quantum es inversamente proporcional a su longitud de onda; por lo tanto, un quantum de RUV-B es mucho más energético que uno de mayor longitud de onda (Zaratti, 1997).

La mayor cantidad de estudios relacionados a los efectos de la RUV sobre distintos organismos se han llevado a cabo en Antártida, debido a que es

la zona más afectada por la disminución de ozono estratosférico. Estos estudios han demostrado que la productividad primaria acuática puede disminuir en un 6-12% debido a este efecto (Smith *et al.*, 1992; Holm-Hansen *et al.*, 1993). Sin embargo, se ha determinado que aún los niveles normales de RUV (tanto de RUV-B como RUV-A) pueden causar efectos negativos sobre diversos organismos. Por ejemplo, y para organismos fitoplanctónicos de distintos lugares del planeta, se ha encontrado que la RUV puede inhibir la tasa fotosintética (Helbling *et al.*, 1992a; 2001a; b; Smith *et al.*, 1992; Neale *et al.*, 1998a; Villafañe *et al.*, 1999; Vernet, 2000), disminuir la movilidad (Häder & Worrest, 1997), dañar el material genético (Buma *et al.*, 1995; 1997; Helbling *et al.*, 2001a; b), e inhibir el crecimiento (Wangberg *et al.*, 1996). Sin embargo, hay que considerar que existen procesos que relacionan fuertemente la RUV-B y la RUV-A, tales como el balance entre el daño / reparación del ADN (Sancar & Sancar, 1988).

En los ambientes acuáticos, una vez que la radiación atraviesa la atmósfera terrestre, ingresa en la columna de agua y se atenúa con la profundidad, de acuerdo a la concentración de partículas en suspensión y del material disuelto (Kirk, 1994). Sin embargo, uno de los factores más importantes que condicionan la cantidad de radiación que reciben los organismos fitoplanctónicos es la capa superficial de mezcla - CSM (Helbling *et al.*, 1994; Neale *et al.*, 1998a). La CSM se define como la zona donde existen condiciones homogéneas de temperatura y salinidad (y por consiguiente de densidad), siendo su profundidad aquella donde se encuentra el máximo gradiente de densidad (Denman & Gargett, 1983). La profundidad de la CSM depende de la acción del viento en superficie, recibiendo las CSMs más profundas menor irradiancia media a comparación de las menos profundas - suponiendo que la irradiancia en superficie sea igual en ambos casos (Helbling *et al.*, 1994). Los procesos de mezcla son los responsables de las grandes fluctuaciones diarias en irradiancia a las cuales están expuestas los organismos fitoplanctónicos (Marra, 1978 a; b; Denman & Gargett, 1983; Helbling *et al.*, 1994; Neale *et al.*, 1998a). La inhibición de la fotosíntesis dentro de la CSM puede ser mayor o menor, dependiendo de las características de los procesos de mezcla vertical (i. e., velocidad de mezcla) y de su profundidad (Helbling *et al.*, 1994). Se han realizado estudios en Antártida tendientes a determinar el efecto conjunto de la disminución de

ozono y la profundidad de la CSM (Neale *et al.*, 1998a), los cuales han demostrado que los cambios rápidos en la CSM son más importantes para inhibir la fotosíntesis del fitoplancton que los cambios en la concentración de ozono estratosférico. En consecuencia, la inhibición en la productividad primaria integrada en la columna de agua puede ser mayor o menor, dependiendo de la combinación de ambos factores.

Aunque los procesos de disminución de ozono estratosférico pueden afectar la zona Patagónica, hasta el momento existen muy pocos estudios realizados con el objeto de evaluar los efectos de la RUV (normal y aumentada) sobre diversos organismos acuáticos (ver revisión de Villafañe *et al.*, 2001). En los sistemas acuáticos Patagónicos se han realizado algunos trabajos en relación al tema de los efectos causados por la RUV en el fitoplancton (Hernando & San Román, 1999; Helbling *et al.*, 2001a; c) y solo en especies zooplanctónicas han sido tratados conjuntamente los efectos de la mezcla vertical y de la radiación (Zagarese *et al.*, 1998). En la zona propuesta de estudio - Bahía Engaño, Chubut (43°S - 65°W), se han realizado una serie de trabajos con el objeto de evaluar la dinámica general, tanto en el estuario (Perillo *et al.*, 1989; Helbling, 1990; Villafañe, 1990; Villafañe *et al.*, 1991; Helbling *et al.*, 1992b; Santinelli & Estéves, 1993) como así también en el curso inferior del río Chubut (Helbling, 1990; Villafañe, 1990; Villafañe *et al.*, 1991; Helbling *et al.*, 1992b). Asimismo, se han realizado estudios acerca de la calidad del agua (Sastre *et al.*, 1994b; 1998), y descripciones de las especies fitoplanctónicas presentes (Ferrario & Sastre, 1993; Sastre *et al.*, 1994 a; Otaño & Santinelli, 1997). Sin embargo, no existen, a excepción de un trabajo llevado a cabo en el área de Bahía Bustamante (Helbling *et al.*, 2001a), estudios sobre las respuestas del fitoplancton a la RUV en la costa chubutense. Esto es extraño, ya que el área de Bahía Engaño presenta características especialmente interesantes: es afectada durante algunos días del mes de Octubre por la disminución en la concentración de ozono, con un consecuente aumento en la cantidad de RUV-B (Helbling *et al.*, 2000), y se caracteriza por tener CSMs variables a lo largo del año, siendo más profundas durante la primavera, debido a los fuertes vientos que soplan en superficie.

Este trabajo tiene como objetivo general *Evaluar el efecto de la RUV en la fotosíntesis del fitoplancton en la capa de mezcla superficial (CSM).*

Las hipótesis planteadas son las siguientes:

➤ Ho1: Las respuestas a la RUV de las poblaciones naturales fitoplanctónicas dependen de la composición por tamaño celular en la muestra.

➤ Ho2: La inhibición de la fotosíntesis es función de la especie considerada y de la historia lumínica a la cual las células han estado expuestas.

➤ Ho3: La mezcla vertical contribuye a disminuir la inhibición fotosintética.

ÁREA DE ESTUDIO

Los datos obtenidos corresponden al estudio desarrollado en la zona de Bahía Engaño, Chubut - 43°S, 65°W - (Figura 1), durante el período comprendido entre los años 1999 y 2000.

Las experiencias, como así también los análisis de muestras, se llevaron a cabo en la Estación de Fotobiología Playa Unión -EFPU (Figura 2).

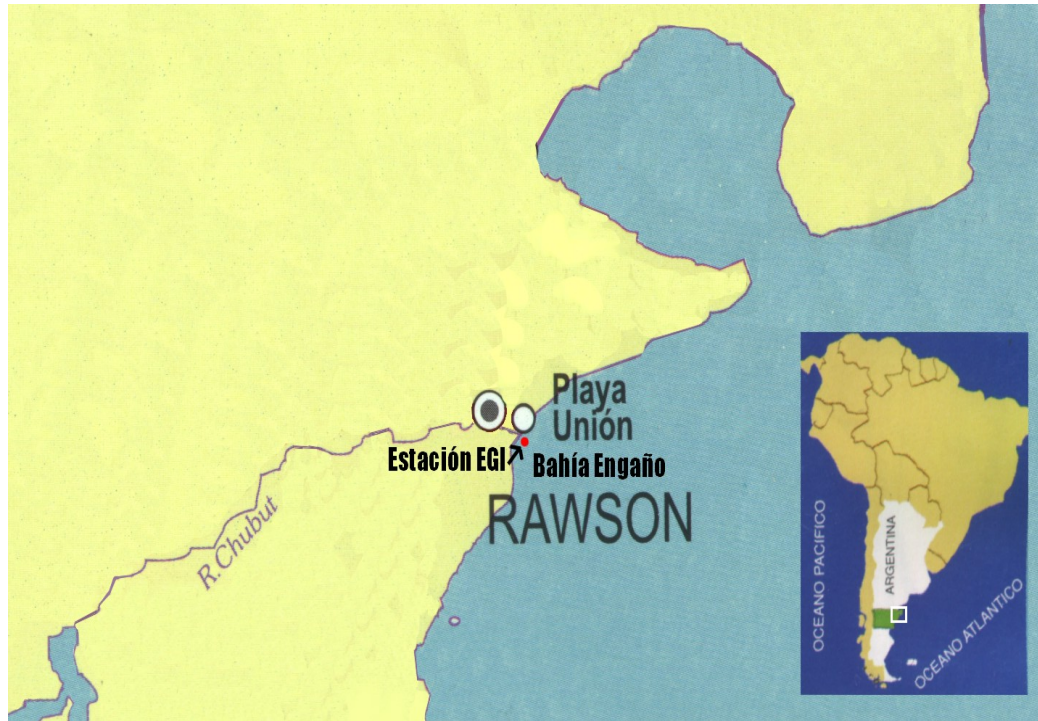


Figura 1: Área de estudio: Bahía Engaño, Chubut. (43°S, 65°W). Las muestras se recolectaron en la estación de muestreo “EGI”.



Figura 2: Estación de Fotobiología Playa Unión (EFPU), Playa Unión – Rawson – Chubut.

MATERIALES Y MÉTODOS

En este trabajo se han realizado distintos experimentos con el fin de determinar el efecto de la RUV en el proceso fotosintético del fitoplancton. Los experimentos realizados fueron los siguientes: **a)** *Efecto en la incorporación de carbono*, el cual se realizó con poblaciones naturales de la zona de estudio, **b)** *Efecto en la producción de oxígeno*: Este experimento se realizó solo con cultivos monoespecíficos (Tabla 1), **c)** *Efecto en el transporte electrónico del fotosistema II* (solo con cultivos monoespecíficos) y, **d)** *Efecto de la mezcla vertical*: Este experimento se llevó a cabo con poblaciones naturales.

RECOLECCIÓN DE MUESTRAS

A. **Poblaciones naturales**: Se hicieron muestreos quincenales en una estación donde desde el año 1999 se está realizando una serie de tiempo (Figura 1, Barbieri *et al.*, 2000). Las muestras se tomaron desde la costa en la estación denominada **EGI**, utilizando recipientes de policarbonato (5 litros de capacidad) lavados previamente con ácido clorhídrico 1N. Al momento de tomar la muestra (en marea alta), se midió la temperatura superficial, conductividad, turbidez y pH utilizando una sonda multicanal (Horiba). Una vez obtenida la muestra, se la trasladó inmediatamente al laboratorio de la EFPU (distante a 5 minutos de la estación de muestreo) en condiciones de oscuridad, para ser utilizada en la experimentación que se detalla más adelante.

B. **Cultivos monoespecíficos**: Para los experimentos de producción de oxígeno y efectos en el transporte electrónico se utilizaron cultivos existentes en el cepario de la Estación de Fotobiología Playa Unión. Las especies utilizadas en las experiencias fueron:

CLASE	ESPECIE
Bacillariophyceae	<i>Phaeodactylum tricornutum</i> Bohlin
Chlorophyceae	<i>Dunaliella primolecta</i> Butcher
	<i>Dunaliella tertiolecta</i> Butcher
	<i>Dunaliella salina</i> (Dunal) Teodoresco
Dinophyceae	<i>Gyrodinium dorsum</i> Kofoid
	<i>Prorocentrum micans</i> Ehrenberg
	<i>Prorocentrum minimum</i> (Pavillard) Schiller
Prasinophyceae	<i>Tetraselmis maculata</i> Butcher
	<i>Tetraselmis suecica</i> (Kyllin) Butcher
Prymnesiophyceae	<i>Pavlova lutheri</i> (Droop) Green
Otros	Flagelado "A" (no identificado)

Tabla 1: Especies de fitoplancton utilizadas en la experimentación.

Las especies de las clases Bacillariophyceae, Chlorophyceae, Dinophyceae, Prasinophyceae y Prymnesiophyceae se utilizaron en los experimentos de producción de oxígeno, mientras que los Flagelados "A" se utilizaron en el experimento de transporte electrónico en el fotosistema II.

EXPERIMENTACIÓN

A. Efecto en la incorporación de carbono

Las muestras fueron fraccionadas en tubos de cuarzo de 50 ml, realizándose 3 tratamientos de radiación con el uso de distintos filtros y materiales (Figura 3): 6 tubos de cuarzo sin pre-filtros, los cuales reciben

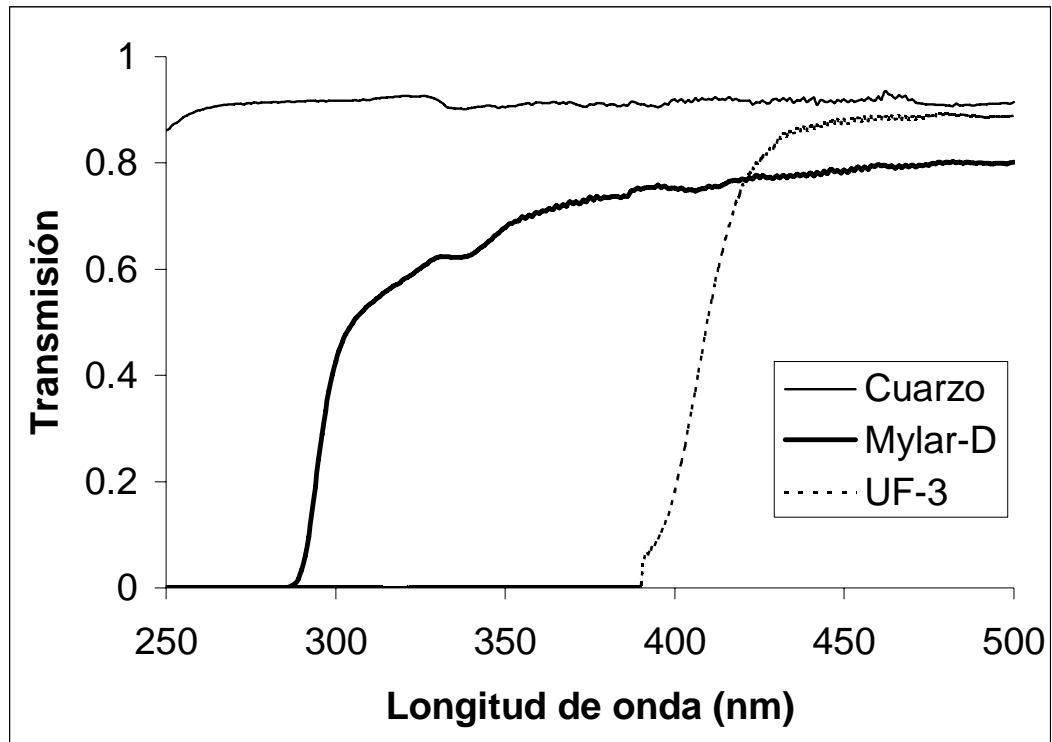


Figura 3: Espectro de transmisión de los filtros / materiales utilizados en los experimentos.

radiación PAR+RUV (280-700 nm), 6 tubos recubiertos con Mylar-D, que reciben radiación PAR+RUV-A (315-700 nm), y 6 tubos recubiertos con Plexiglas UF-3, los cuales reciben solo radiación PAR (400-700 nm). Las muestras se inocularon con 5 μ Ci de carbono marcado (ver sección de Análisis y Determinaciones) y se incubaron a una temperatura de 15 °C en una cámara Sanyo (modelo MLR 350) provista de iluminación artificial. Esta iluminación fue provista por 10 tubos para PAR y 5 tubos para RUV (Q-Panel modelo UVA 340, Figura 4), de tal forma que las muestras recibieron irradiancias de:

BANDA	IRRADIANCIA
PAR	66 W·m ⁻²
RUV-A	15,3 W·m ⁻²
RUV-B	0,7 W·m ⁻²

Tabla 2: Irradiancias dentro de la cámara de incubación.

Las muestras se colocaron en una gradilla giratoria (1 rpm) para asegurarse de que todos los tubos recibieran la misma irradiancia. Las muestras se incubaron durante un período de 4 horas, retirándose un tubo de cada tratamiento a distintos tiempos (0,5; 1; 1,5; 2; 3 y 4 horas). Las muestras se filtraron inmediatamente para luego determinar el carbono incorporado, tal como se describe más adelante (sección de Análisis y Determinaciones).

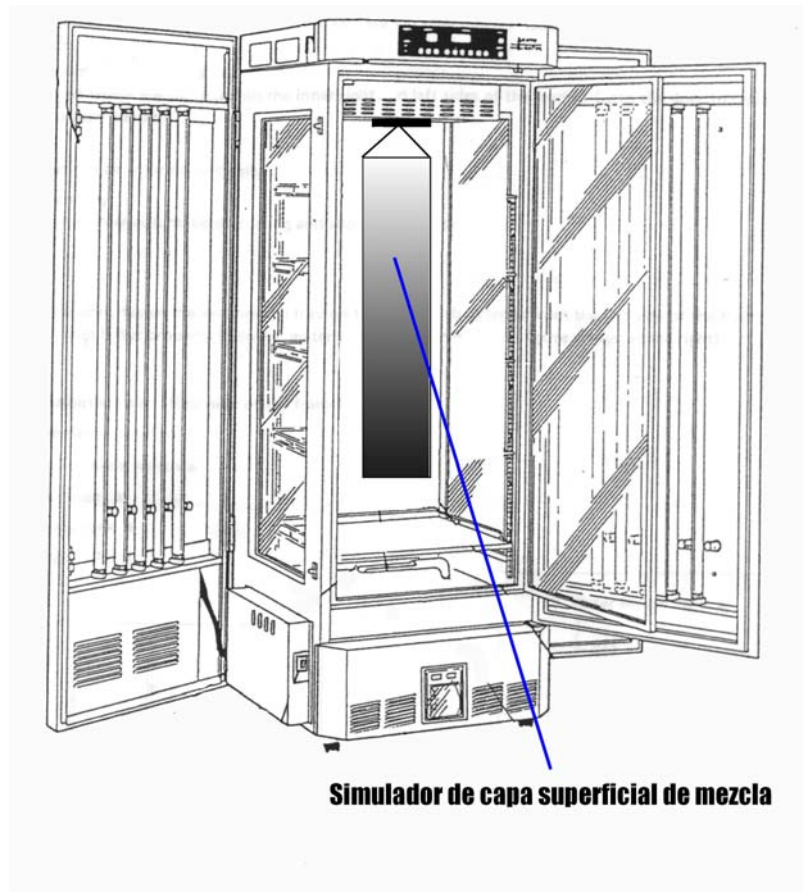
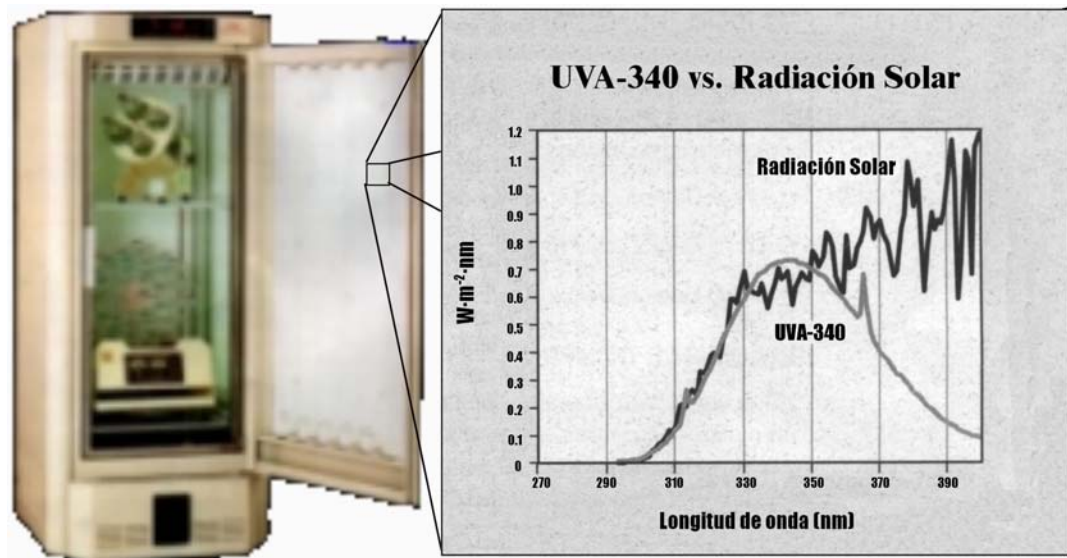


Figura 4: A) Foto de la cámara de incubación Sanyo MLR-350 y espectro de irradiancia de los tubos Q-Panel UVA-340; para comparación se superpone el espectro de radiación solar. B) Esquema de la cámara mostrando el sistema para simular la capa superficial de mezcla.

B. Efecto en la producción de oxígeno

Los cultivos monoespecíficos (Tabla 1) - en fase de crecimiento exponencial, se colocaron en un oxímetro (OxyM5, Real Time Computers Inc.), el cual posee cinco tubos de cuarzo de 25 ml cada uno (Figura 5). El oxímetro se colocó dentro de la cámara de incubación y se implementaron los 3 tratamientos de radiación descritos anteriormente (PAR+RUV; PAR+RUV-A; y solo PAR). Dado que este instrumento tiene 5 tubos de cuarzo, sólo los tratamientos que recibieron RUV o RUV-A se hicieron por duplicado. Para la medición de oxígeno se utilizaron microelectrodos YSI (Yellow Spring Instruments Co., modelo 5331). La evolución de oxígeno (cantidad de oxígeno liberado) se midió continuamente, y la información se almacenó automáticamente cada minuto en una computadora lap-top.

C. Efecto en el transporte electrónico del fotosistema II

Este experimento se llevó a cabo para: **a)** Determinar si existe una recuperación en el rendimiento fotosintético luego de haber expuesto al fitoplancton a un estrés de radiación, **b)** Estimar el período necesario para revertir el daño causado por la radiación incidente y, **c)** Determinar si el daño causado era reversible.

Estas experiencias se realizaron con un cultivo del Flagelado "A" utilizando un fluorómetro PAM – Pulse Amplitude Modulated (Walz GMBH, modelo PAM 2000). El cultivo se colocó en 6 tubos de cuarzo de 50 ml y se implementaron los 3 tratamientos de radiación descritos anteriormente. Los tubos se colocaron en la cámara de incubación durante 2 horas al 100 % de radiación; finalizado este período, se colocó una muestra de cada tratamiento al 25% de radiación (i.e., utilizando dos mallas de densidad neutra, las cuales reducen la cantidad de radiación sin modificar su composición espectral) hasta completar el período de incubación (5 horas). El rendimiento fotosintético se calculó a partir de los valores de fluorescencia *in vivo* (10 mediciones en cada tubo cada 10 minutos) de acuerdo a las fórmulas de Genty *et al.*, (1989) y Weis & Berry (1987).

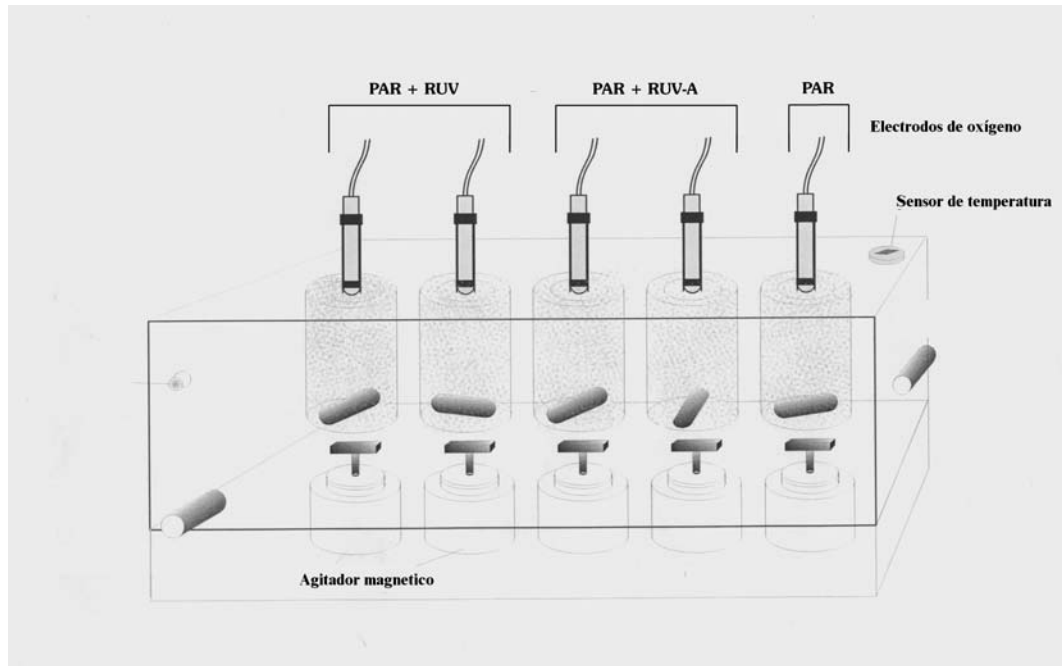


Figura 5: Esquema del oxímetro OxyM5 utilizado para experimentos con cultivos monoespecíficos.

D. Efecto de la mezcla vertical

Las muestras (poblaciones naturales) se colocaron en tubos de cuarzo bajo los 3 tratamientos de radiación descritos anteriormente. Se las inoculó con 5 μCi de carbono marcado (ver Análisis y Determinaciones) y se las incubó dentro de la cámara bajo distintas atenuaciones de radiación. Estas atenuaciones se lograron por medio de mallas de densidad neutra, y corresponden a distintas profundidades dentro de una capa de mezcla de 9,4 m. Estas profundidades se eligieron en función al campo lumínico de la columna de agua en estudio (ver Figura 9). Para determinar los efectos de mezcla vertical en la fotosíntesis del fitoplancton se utilizaron dos sistemas: uno fijo y otro móvil, tal como se detalla a continuación:

- Sistema fijo: Consta de 5 niveles de radiación: 100%, 50%, 25%, 12% y 6% de la radiación total proporcionada por la cámara (ver Tabla 2). Estas atenuaciones se lograron colocando alrededor del soporte giratorio una serie de mallas de densidad neutra (cada una reduce el 50% de la radiación), de tal forma que es posible simular la atenuación exponencial de la radiación en la columna de agua. Es importante recalcar que en este caso se está simulando solo la cantidad de radiación (i.e., la atenuación) y no su calidad, tal como ocurre en la columna de agua. Para cada porcentaje de radiación mencionado anteriormente, se colocaron 6 tubos con muestras (duplicados para cada uno de los 3 tratamientos). En este sistema los tubos permanecieron en el mismo nivel de radiación (i.e., fijos) durante todo el período de incubación (5 horas).

- Sistema móvil: Posee las mismas características estructurales que el sistema fijo (con los 5 niveles de atenuación de la radiación), pero en este caso los 6 tubos (duplicados para cada tratamiento de radiación), permanecieron media hora en cada nivel de irradiancia. Se comenzó con un porcentaje de radiación similar al que llega a la superficie de la columna de agua -100 % de la radiación incidente, y se fue variando hasta llegar al equivalente del 6. Una vez alcanzado este nivel, los tubos permanecieron 1 hora en este estrato, al fin del cual, se comenzó el camino inverso hasta alcanzar nuevamente el 100% de radiación. Estos experimentos se realizaron en distintas épocas del año

(invierno, primavera y verano). Las incubaciones fueron simultáneas para los dos sistemas (fijo y móvil), de manera que la irradiancia media recibida por todas las muestras (i. e., aquella de la CSM que se estaba simulando) era la misma en cada grupo de experimentos. La irradiancia media en esta CSM simulada se calculó de acuerdo a Helbling *et al.* (1994):

$$I_{m(\lambda)} = I_{o(\lambda)} [1 - \exp(-k_{d(\lambda)} Z)] / K_{d(\lambda)} Z$$

Donde: λ es la longitud de onda, I_o la irradiancia en superficie, K_d el coeficiente de atenuación y Z la profundidad de la capa de mezcla.

Una vez finalizada la incubación, las muestras se filtraron inmediatamente y se determinó la cantidad de carbono incorporado en los distintos tratamientos de radiación (ver más adelante en Análisis y Determinaciones).

ANÁLISIS Y DETERMINACIONES

Los análisis y determinaciones realizados en estos experimentos se detallan a continuación:

A. Mediciones de radiación

Los niveles de radiación artificial utilizados en los experimentos son ecológicamente relevantes, es decir que son similares a los que se reciben en la naturaleza. Esto ha sido comprobado a partir de mediciones de radiación en superficie y en la columna de agua. Los datos de radiación solar se obtuvieron con un radiómetro (Real Time Computers Inc.), que integra la red ELDONET -European Light Dosimeter Network- (Marangoni *et al.*, 2001). Dicha red posee 46 instrumentos instalados en varios puntos del planeta, siendo el de la EFPU y el de Nueva Zelanda los únicos en el Hemisferio Sur. Este radiómetro está instalado en forma permanente en la Estación de

Fotobiología Playa Unión desde el año 1998, y colecta datos de radiación - RUV-B (280-315 nm), RUV-A (315-400 nm.) y PAR (400-700 nm.) - y temperatura cada minuto (Helbling *et al.*, 2000).

Asimismo, se realizaron perfiles de radiación solar en función de la profundidad en la zona de estudio, con el objeto de caracterizar la columna de agua de donde fueron extraídas las muestras que se utilizaron luego en los experimentos. Para realizar estos perfiles se utilizó un radiómetro sumergible ELDONET (Real Time Computers Inc.), el cual posee los 3 canales de medición de radiación mencionados anteriormente (PAR, RUV-A y RUV-B), y sensores de temperatura y profundidad. Este equipo también se utilizó para determinar los niveles de irradiancia dentro de la cámara con iluminación artificial. Además, se obtuvo información más detallada de estos niveles de radiación artificial utilizando mini sensores (Grobel GMBH) para RUV-B, RUV-A y PAR.

Los datos de concentración de ozono se obtuvieron de National Atmospheric Space Administration (NASA, <http://jwocky.gsfc.nasa.gov/>), los cuales se colectaron con el espectrómetro TOMS (Total Ozone Mapping Spectrometer).

B. Clorofila-a

La concentración de clorofila-a (clor-a) puede ser considerada como una estimadora de la biomasa fitoplanctónica siempre que la relación carbono / clorofila varíe poco (Banse, 1977). En el caso de muestras de poblaciones naturales, se filtraron dos porciones: 100 ml de la muestra inicial (clor-a total), y 100 ml de la muestra prefiltrada con una malla Nitex de 20 μm de tamaño de poro, mediante la cual se midió la clor-a en la fracción correspondiente al pico-nanoplancton (<20 μm). Estas muestras se filtraron utilizando una bomba de vacío (10mm Hg), en filtros de fibra de vidrio Whatman GF/F de 25 mm de diámetro. El filtro, reteniendo la muestra, se colocó en un tubo de policarbonato y se le agregó 7 ml de metanol absoluto, para extraer los pigmentos fotosintéticos (Holm-Hansen & Riemann, 1978). Después del período de extracción (2 horas a 4 °C), las muestras se centrifugaron a 200 rpm y se midió la fluorescencia del sobrenadante utilizando un fluorómetro

Turner Designs (modelo TD 700), antes y después de la acidificación con HCl (1N); la concentración de clor-a en la muestra se calculó a partir de estos valores de fluorescencia (Holm-Hansen *et al.*, 1965). El fluorómetro fue calibrado utilizando clor-a pura de *Anacystis nidulans* (Cat. Sigma # C 6144). La concentración de clor-a en los cultivos se determinó de igual forma, pero sin prefiltrado por malla Nitex; el volumen filtrado varió entre 10 y 50 ml, de acuerdo a la concentración del cultivo.

C. Compuestos que absorben en la región del ultravioleta

La presencia de estos compuestos se determinó por métodos espectrofotométricos (Helbling *et al.*, 1996). Para tal fin, se filtraron 1-3 litros de muestra (para poblaciones naturales), o una cantidad variable en el caso de cultivos monoespecíficos. La extracción de compuestos que absorben RUV se hizo con metanol absoluto. Después de 2 horas de extracción a 4°C, se realizó un barrido entre 250 y 750 nm utilizando un espectrofotómetro Hewlett-Packard (modelo HP 8453E).

D. Composición taxonómica

Para determinar la composición taxonómica de la comunidad fitoplanctónica utilizada para la experimentación, se tomaron muestras, las cuales fueron colocadas en recipientes oscuros de 250 ml, y fijadas con formaldehído al 20% (concentración final en la muestra de 0,4%). Las muestras se colocaron en columnas de sedimentación (de distintos volúmenes - 10, 25 o 50 ml, dependiendo de la concentración de clor-a), y se les agregó una gota de Rosa de Bengala para distinguir las células vivas al momento de recolección. Luego de un período de sedimentación de 24 horas, fueron analizadas empleando un microscopio invertido Leica -modelo DM IL (Utermöhl, 1958; Villafañe & Reid, 1995).

E. Incorporación de carbono

La técnica de carbono marcado (Steeman Nielsen, 1952) se utiliza para medir la incorporación de carbono y así estimar la tasa fotosintética (Holm-Hansen & Helbling, 1995). Las muestras, fueron inoculadas con 5 μCi (185 MBq) de carbono marcado en forma de $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$. Una vez culminado el periodo de incubación, se las filtró utilizando una bomba de vacío (10mm Hg), en filtros de fibra de vidrio Whatman GF/F de 25 mm de diámetro. La muestra, retenida en el filtro, se colocó en un vial de 7 ml y se la expuso a vapores de HCl concentrado durante 12 horas, para eliminar todo resto de carbono inorgánico no incorporado por las células. Una vez culminado este periodo, los filtros se secaron en una estufa de cultivo a 40 °C. Posteriormente, se les agregó 2 ml de líquido de centelleo (Wallac, Optiphase III) y se midió su actividad en un contador de centelleo líquido.

Luego de obtenidos los valores de cuentas por minuto, la cantidad de carbono incorporado (en $\mu\text{gC}\cdot\text{l}^{-1}$) se calculó según la fórmula:

$$\mu\text{gC}\cdot\text{l}^{-1} = ((\text{CPM}) / 0,95) * 1,06 * (26400 / (5 * 2200000))$$

Donde: *CPM*: es el valor medio de la lectura de cuentas por minuto en los duplicados de cada tratamiento; 0,95: es la eficiencia de conteo; 1,06: es el factor de discriminación isotópica- tasa de asimilación de C^{14} comparada con la tasa de asimilación de C^{12} , aproximadamente del 6%. Por esta razón el valor medido debe ser multiplicado por 1,06; 26400: carbono inorgánico total disuelto por litro; (5*2200000): es la cantidad de microCuries (μCi) agregados, por la cantidad de desintegraciones por minuto (2200000) de cada μCi .

El porcentaje de inhibición de la fotosíntesis en cada tratamiento de radiación se calculó de la siguiente manera:

$$\text{Inh (\%)} = [(F_x - F_{\text{PAR}}) / F_{\text{PAR}} * 100]$$

Donde: F_x : es la cantidad de carbono incorporado en el tratamiento de radiación RUV+PAR o RUV-A+PAR; F_{PAR} : es la cantidad de carbono fijado en el tratamiento que recibió solo PAR.

ANÁLISIS DE DATOS

Se realizaron distintos test no paramétricos y contrastes *a posteriori*, tales como Nemenyi (Zar, 1984). Asimismo, se realizaron regresiones y ajustes en forma iterativa, calculando el grado del ajuste (R^2) y la probabilidad (p). También, se calcularon las medias y los desvíos estándar de los datos obtenidos para cada experimento, comprobando la desviación de la muestra.

Para las comparaciones entre los distintos tratamientos de radiación, en los experimentos de incorporación de carbono, evolución de oxígeno y rendimiento fotosintético, se utilizó el análisis de comparación de medias de Kruskal-Wallis, utilizando el programa estadístico SPSS. Los ajustes, lineales y no lineales, se realizaron utilizando los programas SPSS y Origin.

RESULTADOS

A. Radiación solar y ozono

En el polo sur se ha desarrollado uno de los cambios climáticos más importantes de los últimos tiempos - el “agujero” de ozono. Este fenómeno se define así debido a que las concentraciones de ozono estratosférico en el periodo de invierno - primavera alcanzan, sobre el continente Antártico, valores inferiores a 200 Unidades Dobson (U.D.). En la Figura 6A se puede observar la distribución de la concentración de ozono sobre el continente Antártico y su influencia sobre la zona austral de América del Sur. La disminución de ozono estratosférico provoca un aumento en la cantidad de RUV que llega a la superficie de la Tierra, tal como se observa en la (Figura 6B), para la banda de RUV-B. En la zona de estudio (43°S) se observa una variación estacional de la concentración de ozono (Figura 7A), con bajos niveles de ozono durante los meses de Marzo-Abril y altos durante Agosto- Octubre. Las altas concentraciones relativas de ozono, a principios de la primavera, indican un balance positivo entre los procesos de producción / destrucción de este gas debido al aumento de radiación solar en latitudes medias. La idea de que una disminución en la concentración de ozono indefectiblemente provoca un aumento en la cantidad de RUV-B que llega a la Tierra, no es del todo correcta, y para el área de Bahía Engaño no se encontró una relación significativa entre ambas variables (Spearman $-0,01$; $p > 0,8$) (Figura 7B). Esto es debido a que al tomar toda la banda correspondiente a la RUV-B queda enmascarado su aumento relativo en función de la concentración de ozono. Este aumento relativo de energía es mayor a menor longitud de onda y se observa en detalle cuando se grafica la relación entre dos longitudes de onda específicas (Figura 7C), una afectada (305 nm) y otra no afectada por el ozono (340 nm). Esta relación ha sido utilizada como señal para seguir y detectar la disminución de ozono (Stamnes *et al.*, 1991). Cabe destacar que la relación 305/340 es mínima en invierno y máxima en verano debido a la atenuación diferencial de la energía en la atmósfera en función del ángulo cenital (Madronich 1993).

En relación a la cantidad de radiación recibida en la zona de Playa Unión durante el período de estudio (1999-2000), se calcularon las dosis diarias para PAR, RUV-A y RUV-B (Figura 8). Tanto para PAR, como para RUV-A y RUV-B, se observa una marcada variabilidad estacional, debido a las diferencias de ángulo cenital entre verano e invierno. Así, durante el verano las dosis diarias medias, fueron de 11875, 1561 y 33 $\text{KJ}\cdot\text{m}^{-2}$ para PAR (Figura 8A), RUV-A (Figura 8B) y RUV-B (Figura 8C), respectivamente. Las dosis mínimas, registradas durante los meses de invierno fueron de 2887, 361 y 7 KJ m^{-2} para PAR, RUV-A y RUV-B, respectivamente. Por otra parte se ha observado una gran variabilidad diaria, debida a la presencia de nubes.

Asimismo, se determinó el campo lumínico en la columna de agua en donde las poblaciones fitoplanctónicas se desarrollan. Se ha observado una atenuación diferencial de la energía, siendo la RUV-B la más atenuada y PAR la de mayor penetración (Figura 9). Los coeficientes de atenuación (K_d) para RUV-B, RUV-A y PAR fueron de 1, 0,9 y 0,3 m^{-1} , respectivamente.

B. Variaciones estacionales de las poblaciones fitoplanctónicas

Existe una marcada diferencia en la concentración de clor-a a lo largo del año (Figura 10A). Durante 1999 se registraron altos valores de clor-a durante Agosto-Octubre, con valores de hasta 98 $\mu\text{g clor-a}\cdot\text{l}^{-1}$. En junio del año 2000 se registró un máximo de clor-a de 124 $\mu\text{g clor-a}\cdot\text{l}^{-1}$, y luego la concentración se mantuvo relativamente alta (más de 20 $\mu\text{g clor-a}\cdot\text{l}^{-1}$) hasta el mes de Octubre. Cada vez que se registraron valores altos de clor-a en la columna de agua, la población fitoplanctónica estuvo dominada por células microplanctónicas (> a 20 μm), y principalmente de la especie *Odontella aurita*, una diatomea característica de la zona de Bahía Engaño. En cambio, cuando la biomasa fitoplanctónica era relativamente baja, la comunidad

fitoplanctónica estuvo dominada por células pequeñas (i.e., nanoplancton, <20 μm), principalmente fitoflagelados. Esto puede observarse claramente en la Figura 10B, donde se grafica la concentración de clor-a en función del porcentaje de células nanoplanctónicas. En esta gráfica se puede observar una disminución de la concentración de clor-a a medida que aumenta la proporción de nanoplancton (ajuste realizado con un polinomio de tercer grado). Si bien la concentración de clor-a fue muy variable a lo largo del año, como así también la composición taxonómica, no se observó la presencia de compuestos que absorben radiación ultravioleta -i.e. mycosporine like aminoacids, MAAs (Figura 10C).

C. Efecto en la incorporación de carbono

La inhibición de la fotosíntesis en función de la dosis de radiación recibida por el fitoplancton (Figura 11) fue variable de acuerdo a la época del año en que se obtuvieron las muestras, básicamente debido a un cambio en la composición taxonómica de la población. Por ejemplo, las muestras obtenidas durante una floración fitoplanctónica ($\sim 58 \mu\text{g clor-a}\cdot\text{l}^{-1}$, ver Figura 10A) tuvieron una inhibición de la fotosíntesis del 33% debida a la RUV, y este valor se mantuvo relativamente constante aún al aumentar la dosis de radiación (Figura 11A). Sin embargo, las muestras obtenidas un mes más tarde ($\sim 13 \mu\text{g clor-a}\cdot\text{l}^{-1}$), tuvieron una inhibición que fue levemente en aumento a medida que se aumentaba la dosis (Figura 11B). El principal condicionante en la inhibición observada en estos experimentos fue el tamaño celular. Es así que cuando se grafica la inhibición fotosintética debida a la RUV en función al porcentaje de nanoplancton (Figura 12), se observa una relación inversa entre estas dos variables, siendo aquellas muestras con mayores porcentajes de nanoplancton las menos inhibidas por la RUV (i. e., las más resistentes).

D. Efectos en la producción de oxígeno y en el fotosistema II

Al medir la inhibición por RUV en la producción de O_2 en distintos cultivos monoespecíficos, se encontraron grandes diferencias en las

respuestas (Figuras 13 y 14). Así, la diatomea *Phaeodactylum tricornutum* es mucho más resistente que la prymnesiofita *Pavlova lutheri* y las especies de dinoflagelados estudiados (Figura 13). Asimismo, se encontraron diferencias significativas ($p < 0,01$) en la tasa de producción de oxígeno aún entre especies del mismo género, siendo *Dunaliella. salina* mucho más resistente a la RUV que *Dunaliella. primolecta* y *Dunaliella. tertiolecta*, mientras que *Tetraselmis. suecica* es más resistente que *Tetraselmis. maculata* (Figura 14). La Figura 15 resume la información obtenida de todas las especies estudiadas. Se ha determinado que la especie más resistente a la RUV-B es *Phaeodactylum. tricornutum* (7% de inhibición), mientras que la más sensible es la prymnesiofita *Pavlova. lutheri*, presentando valores tan altos de inhibición como de 51%. La inhibición debida a la RUV-A varió entre 2 y 29%, siendo ésta siempre menor que la debida a la RUV-B.

A fin de determinar si la inhibición producida por la RUV significaba un daño permanente o, si en cambio, el fitoplancton podía recuperarse una vez eliminado el estrés de radiación, se determinó el rendimiento fotosintético mediante el uso de fluorescencia PAM (Figura 16). Al tiempo inicial, justo antes de empezar el experimento, la eficiencia fotosintética fue alta ($\sim 0,6$). Sin embargo, la eficiencia fue fuertemente afectada al exponerse las células al 100% de la radiación dentro de la cámara de incubación. Después de 10 minutos, el rendimiento fotosintético llegó a valores menores a 0,2. Sin embargo, cuando el estrés de radiación se redujo al 25% después de las 2 primeras horas, la eficiencia fotosintética se recuperó casi instantáneamente (aunque no totalmente). Esta diferencia se observó en todos los tratamientos y fue significativamente diferente ($p < 0,0001$).

E. Efecto de la mezcla vertical

La influencia de la mezcla vertical en la inhibición por RUV se determinó para dos criterios diferentes. En primer lugar, se presentan resultados de experimentos realizados en distintas épocas del año, pero simulando una misma capa de mezcla de 9,4 m (Figuras 17 y 18). Posteriormente se muestran los resultados (Figuras 19, 20 y 21) para una muestra tomada en el mes de Diciembre, la cual fue expuesta a 3

condiciones de mezcla desde 9,4 a los 14 m, en creciente profundidad, significando una mezcla entre el 60% y el 91% de la zona eufótica (Z_{eu}).

En las secciones anteriores se describió el efecto de la radiación bajo condiciones máximas, es decir, como si las muestras se encontraran expuestas a la radiación incidente en superficie. Sin embargo, en la columna de agua, la radiación se atenúa exponencialmente (Figura 9), y se observa que el efecto inhibitorio de la RUV disminuye con la profundidad (Figura 17 A). Al calcular el porcentaje de inhibición por RUV, en muestras incubadas a una irradiancia constante, se observan valores significativos ($p < 0,01$) - 24% en superficie (Figura 17 B). Sin embargo, en profundidad la inhibición toma valores significativamente negativos (e. g., -41 % a 9,4 m de profundidad), siendo la incorporación de carbono mayor en las muestras que recibieron radiación PAR+RUV (Figura 17 B). En este caso, la exclusión de la RUV resultó perjudicial para las células, ya que éstas utilizan parte de la energía del espectro de RUV para realizar fotosíntesis. Asimismo, debido a la disminución de radiación con la profundidad, los valores de incorporación de carbono son mayores en superficie y disminuyen a medida que disminuye la radiación (es decir, simulando una mayor de profundidad); sin embargo, las muestras que estuvieron “moviéndose” y experimentando un cambio de irradiancia, presentaron valores de incorporación de carbono intermedios en comparación al sistema fijo (Figura 17A). En este último caso, las muestras que simulaban una mezcla hasta una profundidad de 9,4 m, recibieron una irradiancia media de 25,6; 5,9 y 0,27 $W \cdot m^{-2}$ para PAR, RUV-A y RUV-B, respectivamente. Las muestras expuestas a un campo de radiación variable tuvieron, en este caso particular, una pequeña inhibición por RUV del 3%.

Para poder comparar el efecto de la RUV entre ambos sistemas, es necesario calcular la productividad integrada en la CSM, en este caso de 9,4 m (Figura 18). Esto es importante, ya que no es posible comparar directamente las muestras en un campo variable de energía (i. e., sistema móvil, que recibe la irradiancia media de la CSM) con aquellas a una profundidad específica (i. e., sistema fijo). Al integrar los valores de carbono incorporado (Figura 18A) fijado a distintas profundidades en el sistema fijo, la irradiancia media recibida por todo el sistema es la misma que la recibida por las muestras en

movimiento (ver Materiales y Métodos). Las muestras de invierno realizaron mayor fotosíntesis en el sistema fijo que en el móvil, en cambio, las de verano tuvieron una mayor incorporación de carbono en el sistema móvil (Figura 18A). De la comparación de los sistemas fijo y móvil para los experimentos realizados en distintas épocas del año se observa hasta un 32 % de reducción de la incorporación de carbono para las muestras de invierno y un 25 % de aumento para las de verano y primavera (Figura 18B).

Los resultados anteriores relacionan muestras que provienen de condiciones lumínicas diferentes (i.e., diferentes épocas del año), pero sometidas a una misma porción de mezcla vertical de la Z_{eu} . En la Figura 19 se presentan los datos de una situación distinta, en la cual, a una misma población de fitoplancton (i. e., con igual historia lumínica) se le impusieron condiciones distintas de mezcla. Al igual que en el caso anterior, existió una disminución de la inhibición de RUV con la profundidad en el sistema fijo, siendo significativa en los primeros metros de la columna de agua. Por debajo de aproximadamente 6 metros, el fitoplancton utilizó la RUV para realizar fotosíntesis, y como resultado, los tratamientos a los cuales se les excluyó la RUV fijaron menos cantidad de carbono (Figuras 19 y 20). Para el sistema móvil, se encontró una inhibición positiva cuando la mezcla era hasta 9,4 m de profundidad - o 60% de la profundidad de la Z_{eu} (Figura 20A) con una irradiancia media de 25,6; 5,9 y 0,27 $W \cdot m^{-2}$ para PAR, RUV-A y RUV-B, respectivamente. Sin embargo, esta situación fue cambiando a medida que se profundizaba la CSM, llegando a valores negativos cuando la CSM era de 14 metros de profundidad - 91% de la Z_{eu} mezclada (Figura 20C). Es decir que, a medida que se mezcla mayor parte de la Z_{eu} , la cantidad de carbono que se incorpora varía entre los tratamientos de radiación, pero no por efecto de la RUV, sino porque las células, frente al déficit de PAR, utilizan parte de la RUV para realizar fotosíntesis, incorporando más carbono aquellas células que recibieron RUV que las que recibieron solo PAR.

Al comparar los valores integrados de inhibición para las tres condiciones de CSM (Figura 21), es posible ver que las muestras que estuvieron en una CSM de 9,4 m fueron inhibidas por la RUV, tanto en el sistema móvil como en el fijo, aunque la mayor inhibición es para el sistema

móvil ($p < 0,05$). En CSM más profundas (de 11,7 y 14 m), los porcentajes de inhibición por RUV son negativos para los 2 sistemas, siendo menos inhibidas aquellas muestras que se estuvieron moviendo dentro de la columna de agua, para una CSM de 11,7 m. Con una CSM de 14 m, las muestras en el sistema móvil pudieron utilizar en forma más efectiva la RUV.

DISCUSIÓN

Varios estudios han demostrado que no es posible extrapolar los resultados obtenidos acerca de los efectos de la RUV en la fotosíntesis del fitoplancton de distintas zonas geográficas, ya que las respuestas dependen, entre otras variables, de la comunidad estudiada – i.e., la composición taxonómica (Karentz *et al.*, 1991; Vernet *et al.*, 1994; Villafañe *et al.*, 1995; 2000; Helbling *et al.*, 1996), de la historia lumínica previa (Helbling *et al.*, 1992a; 1996), y del balance entre procesos de daño – aclimatación (Lesser *et al.*, 1994; Helbling *et al.*, 2001b).

Los estudios realizados con especies fitoplanctónicas Antárticas han demostrado que son más sensibles a la RUV que las especies tropicales (Villafañe *et al.*, 1999; Buma *et al.*, 2001; Helbling *et al.*, 2001b), aunque estas últimas reciben normalmente niveles de radiación más altos (Madronich, 1993) surgiendo así la hipótesis de una adaptación evolutiva a las altas irradiancias (Helbling *et al.*, 1992a). En la zona de estudio (43°S) la radiación incidente (Figura 8) tiene valores intermedios entre los observados en las zonas tropicales y en altas latitudes (Holm-Hansen *et al.*, 1993; Madronich, 1993), y se ha determinado que la fotosíntesis en superficie era significativamente inhibida por la RUV (Figuras 11, 13, 14, 16, 17 y 19).

En particular, en este estudio, se ha observado que el tamaño celular juega un rol especialmente importante, siendo las especies microplanctónicas (> 20µm) aquellas que se inhibieron más por RUV que las nanoplanctónicas < 20 µm (Figura 12), tal como fuera demostrado en otros estudios (Helbling *et al.*, 1992a; 1994; 2001a; c). Sin embargo, cuando se considera el daño en el material genético – ADN, se ha encontrado que las células microplanctónicas son más resistentes (Karentz *et al.*, 1991; Helbling *et al.*, 2001a), evidenciando así dos blancos distintos de acción de la RUV, con diferente capacidad de respuesta.

Varios estudios han demostrado que las células relativamente grandes – i.e., microplanctónicas, son más efectivas al momento de sintetizar

compuestos que absorben RUV, tales como “mycosporine like aminoacids” – MAAs (García Pichel, 1994; Helbling *et al.*, 1996), los cuales se consideran protectores en contra de niveles perjudiciales de RUV (Carreto *et al.*, 1990; Shick *et al.*, 1996; Neale *et al.*, 1998b). En las especies nanoplanctónicas, en cambio, su síntesis no es particularmente efectiva debido al tamaño celular y el costo energético involucrado (García Pichel, 1994). En el caso del fitoplancton de Bahía Engaño, no se determinaron cantidades significativas de compuestos que absorben RUV a lo largo del año (Figura 10C), incluso en las muestra dominadas por microplancton, lo cual puede explicar, en parte, la sensibilidad relativamente alta a la RUV del fitoplancton local. La baja concentración de estos compuestos en el fitoplancton de Bahía Engaño puede deberse a que su síntesis depende de la especie considerada y de las condiciones lumínicas en la cual se desarrollan – incluso la profundidad de la capa de mezcla (Vernet *et al.*, 1994; Helbling *et al.*, 1994; 1996; Villafañe *et al.*, 2000).

Una de las incógnitas que se plantea en este trabajo se refiere a cuales factores explican la relativa resistencia a la RUV de las especies nanoplanctónicas (Figura 12). Parte de esta respuesta ha sido postulada por Helbling *et al.* (2001c) al observar la velocidad de aclimatación a la RUV en periodos cortos de tiempo, de tal manera que las células nanoplanctónicas presentan mayor velocidad de inhibición / aclimatación que las microplanctónicas, debido a su mayor relación superficie / volumen. Por lo tanto, ante cambios bruscos en las condiciones de radiación en la columna de agua, como por ejemplo, los debidos a variaciones en las condiciones de nubosidad, las células relativamente pequeñas responderán más rápidamente que las más grandes. En este trabajo, esta velocidad de respuesta del nanoplancton se ejemplifica a través de las experiencias realizadas con flagelados para determinar el daño en el transporte electrónico en el fotosistema II (Figura 16), donde se demuestra que las células se inhiben / recuperan ante cambios de irradiancia en el orden de minutos. Si bien en este trabajo se demuestra una inhibición diferencial de la fotosíntesis en relación al tamaño celular, también se sabe que las respuestas dependen del grupo fitoplanctónico, con variaciones no sólo entre especies de distintas clases taxonómicas, sino también dentro del mismo género (Figuras 13-15; Vernet *et al.*, 1994; Laurion & Vincent, 1998; Villafañe *et al.*, 2000).

Existen asimismo, otros factores que pueden afectar las condiciones de radiación bajo las que se desarrollan los organismos. En particular, la capa superficial de mezcla condiciona el proceso de fotosíntesis del fitoplancton en la columna de agua, incluso el desarrollo de floraciones fitoplanctónicas (Sverdrup, 1953). Para nuestra zona, se han observado floraciones de fitoplancton en invierno, siendo éstas dominadas por organismos microplanctónicos (Figura 10; Villafañe *et al.*, 1991). Estas floraciones de invierno han sido también observadas en otras zonas costeras de nuestro país, tales como el estuario de Bahía Blanca (Gayoso, 1998). Varios estudios han demostrado la importancia de la capa de mezcla en distintos procesos. Por ejemplo, para que se inicie una floración de microplancton en Antártida es necesario que la profundidad de la CSM sea pequeña (Mitchell & Holm-Hansen, 1991) y que la relación entre esta profundidad y la de la Z_{eu} sea mayor que 0,55 (Helbling *et al.*, 1995). Es decir que en Antártida, cuando la profundidad de la CSM es mayor que el 55% de la profundidad de la Z_{eu} el fitoplancton se encuentra limitado por baja radiación. En la costa Patagónica se han obtenido resultados similares, donde la profundidad de la Z_{eu} era de aproximadamente 15 m (Figura 9; Helbling *et al.*, 2001a).

La profundidad de la capa de mezcla es, asimismo, sumamente importante al momento de determinar los efectos de la RUV en la fotosíntesis fitoplanctónica (Helbling *et al.*, 1994; Neale *et al.*, 1998a). En este trabajo se ha demostrado que cuando el 60% de la Z_{eu} se mezcla, la fotosíntesis del fitoplancton es afectada significativamente por la mezcla vertical, siendo muy importante la inhibición por RUV (Figuras 17-21). Sin embargo, cuando la mezcla de la Z_{eu} es del 91% la fotosíntesis se encuentra favorecida ya que el fitoplancton es capaz de utilizar la RUV como fuente de energía (Figuras 18-21).

Los datos obtenidos en este trabajo indican que existe un delicado balance entre la productividad de la zona y los procesos que condicionan esta productividad. Las **conclusiones** generales son las siguientes:

- Las poblaciones fitoplanctónicas de Bahía Engaño son afectadas en forma diferencial por la dosis de RUV recibida, dependiendo esta respuesta de la composición de tamaño celular de la comunidad y de la historia lumínica. La inhibición de la fotosíntesis por RUV es menor en las especies nanoplanctónicas que en las microplanctónicas.

- Las especies de invierno, aclimatadas a una baja radiación, son más sensibles a los cambios de irradiancia por efecto de la mezcla vertical, que las especies de verano, aclimatadas a más alta radiación.

- Existen diferencias en cuanto a la sensibilidad a la RUV entre grupos fitoplanctónicos presentándose, asimismo, diferencias entre especies pertenecientes a un mismo género.

- El transporte electrónico en el fotosistema II es fuertemente afectado por la RUV; sin embargo, las células fitoplanctónicas tienen la capacidad de recuperar su eficiencia fotosintética, luego de retirado el estrés de radiación, en períodos de tiempo relativamente cortos (minutos). Si el estrés de radiación permanece, las especies estudiadas no tienen la capacidad de revertir el daño producido.

- Las poblaciones fitoplanctónicas de la zona de estudio son capaces de utilizar parte del espectro de RUV para realizar fotosíntesis, frente a niveles bajos de radiación PAR.

REFERENCIAS

- Ayestarán, M. G. & A. V. Sastre. 1995. Diatomeas del curso inferior del Río Chubut (Patagonia Argentina). Pennales I: Naviculaceae. Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica, 31: 57-68.
- Banase, K. 1977. Determining the carbon-to-chlorophyll ratio of natural phytoplankton. Marine Biology, 41: 199-212.
- Barbieri, E. S., V. E. Villafañe & E. W. Helbling. 2000. Inhibición fotosintética producida por la RUV en el fitoplancton de Bahía Engaño (Chubut, Argentina). *IV Jornadas Nacionales de Ciencias del Mar*, Puerto Madryn, Argentina (poster / abstract).
- Booth, C. R., T. B. Lucas, J. H. Morrow, C. S. Weiler, & P. A. Penhale. 1994. The United States National Science Foundation's polar network for monitoring ultraviolet radiation. En: C. S. Weiler & P. A. Penhale (eds.) *Ultraviolet radiation in Antarctica: Measurements and biological effects*, American Geophysical Union, Washington, D.C. Antarctic Research Series, 62: 17-37.
- Buma, A. G. J., E. J. Van Hannen, M. J. W. Veldhuis, & W. W. C. Gieskes. 1995. Monitoring ultraviolet-B-induced DNA damage in individual diatom cells by immunofluorescent thymine dimer detection. Journal of Phycology, 31: 314-321.
- Buma, A. G. J., A. H. Engelen & W. W. C. Gieskes. 1997. Wavelength dependent induction of thymine dimers and growth rate reduction in the marine diatom *Cyclotella* sp. exposed to ultraviolet radiation. Marine Ecology Progress Series, 153: 91-97.
- Buma A. G. J., M. K. de Boer & P. Boelen. 2001. Depth distributions of DNA damage in Antarctic marine phyto- and bacterioplankton exposed to summertime ultraviolet radiation. Journal of Phycology. En prensa.
- 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.
- Carreto, J. I., M. O. Carignan, G. Daleo & S. G. De Marco. 1990. Occurrence of mycosporine-like aminoacids in the red-tide dinoflagellate *Alexandrium excavatum*: UV-photoprotective compounds? Journal of Plankton Research, 12: 909-921.
- Denman, K. L. & A. E. Gargett. 1983. Time and space scales of vertical mixing and advection of phytoplankton in the upper ocean. *Limnology and Oceanography*, 28: 801-815.
- Farman, J. C., B. G. Gardiner & J. D. Shanklin. 1985. Large losses of total ozone in Antarctica reveal seasonal ClOx/NOx interaction. *Nature*, 315: 207-210.
- Ferrario, M. & A. V. Sastre. 1990. Ultraestructura, polimorfismo y ecología de *Odontella Aurita* (Lingbye) Agardh (Bacillariophyceae) en el estuario del río Chubut, Argentina. *Revista de la Facultad de Oceanografía Pesquera y Ciencias Alimentarias de la Universidad Nacional Federico Villarreal*, 2: 98-106.

- Gayoso, A. M. 1998. Long-term phytoplankton studies in the Bahía Blanca estuary, Argentina. *ICES Journal of Marine Science*, 55: 655-660.
- Garcia-Pichel, F. 1994. A model for internal shelf-shading in planktonic organisms and its implications for the usefulness of ultraviolet sunscreens. *Limnology and Oceanography*, 39: 1704-1717.
- Genty, B. E., J. M. Briantais, N. R. Baker. 1989. Relative quantum efficiencies of the two photosystems of leaves in photorespiratory and non-photorespiratory conditions. *Plant Physiology and Biochemistry*, 28: 1-10.
- Gribbin, J. 1988. *The hole in the sky*. Bantam Books, New York, 192 pp.
- Häder, D. P., R. C. Worrest, H. D. Kumar & R. C. Smith. 1995. Effects of increase solar ultraviolet radiation on aquatic ecosystems. *Ambio*, 24: 174-180.
- Häder, D. P., & R. C. Worrest. 1997. Consequences of the effects of increased solar ultraviolet radiation on aquatic ecosystems. En: D. P. Häder (ed.). *The effects of ozone depletion on aquatic ecosystems*. Environmental Intelligence Unit. R. G. Landes Company, Academic Press, Texas, USA, 11-30.
- Helbling, E. W. 1990. Estuarine circulation and nutrient variability in the Chubut River Estuary (Argentina) during 1986-1987. Tesis para optar el título de Master of Sciences in Biological Oceanography. Scripps Institution of Oceanography, University of California San Diego, 138 pp.
- Helbling, E. W., V. E. Villafañe, M. E. Ferrario & O. Holm-Hansen. 1992a. Impact of natural ultraviolet radiation on rates of photosynthesis and on specific marine phytoplankton species. *Marine Ecology Progress Series*, 80: 89-100.
- Helbling, E. W., J. M. Santamarina, & V. E. Villafañe. 1992b. Chubut River estuary (Argentina): Estuarine variability under different conditions of river discharge. *Revista de Biología Marina*, 27: 73-90.
- Helbling, E. W., V. E. Villafañe & O. Holm-Hansen. 1994. Effects of ultraviolet radiation on Antarctic marine phytoplankton photosynthesis with particular attention to the influence of mixing. En: Weiler, C.S. & P.A. Penhale (eds.) *Ultraviolet radiation in Antarctica: Measurements and biological effects*. American Geophysical Union, Antarctic Research Series, 62: 207-227.
- Helbling, E. W., V. E. Villafañe & O. Holm-Hansen. 1995. Variability of phytoplankton distribution and primary production around Elephant island, Antarctica, during 1990-1993. *Polar Biology*, 15: 233-246.
- 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., V. L. Orce & V. E. Villafañe. 1998. Solar radiation and ozone depletion in Patagonia, Argentina (1994-1997). Workshop *Understanding stratospheric ozone and UV-B radiation*, Buenos Aires, Argentina (poster / abstract).

- Helbling, E. W., R. Gonçalves, E. S. Barbieri & V. E. Villafañe. 2000. Radiación ultravioleta y ozono en Patagonia central. *IV Jornadas Nacionales de Ciencias del Mar*, Puerto Madryn, Argentina (poster / abstract).
- Helbling, E. W., A. G. J. Buma., M. K. de Boer & V. E. Villafañe. 2001a. *In situ* impact of solar ultraviolet radiation on photosynthesis and DNA in temperate marine phytoplankton. *Marine Ecology Progress Series*, 211: 43-49.
- Helbling, E. W., V. E. Villafañe, A. G. J. Buma, M. Andrade & F. Zaratti. 2001b. DNA damage and photosynthetic inhibition induced by solar UVR in tropical phytoplankton (Lake Titicaca, Bolivia). *European Journal of Phycology*. En prensa.
- Helbling, E. W., V. E. Villafañe & E. S. Barbieri. 2001c. Sensitivity of winter phytoplankton communities from Andean lakes to artificial ultraviolet-B radiation. *Revista Chilena de Historia Natural*. En prensa.
- Hernando, M. P. & N. San Román. 1999. Preliminary data on chronic effects of ultraviolet radiation on the growth of some phytoplankton species of the Beagle Channel, Argentina. *Scientia Marina*, 63 (Supl. 1): 81-88.
- Holm-Hansen, O., C. J. Lorenzen, R. W. Holmes & J. D. H. Strickland. 1965. Fluorometric determination of chlorophyll. *Journal de Conseil pour l'Exploration de la Mer*, 30: 3-15.
- Holm-Hansen, O. & B. Riemann. 1978. Chlorophyll a determination: Improvements in methodology. *Oikos*, 30: 438-447.
- Holm-Hansen, O., E. W. Helbling & D. Lubin. 1993. Ultraviolet radiation in Antarctica: Inhibition of primary production. *Photochemistry and Photobiology*, 58: 567-570.
- Holm-Hansen, O. & E. W. Helbling. 1995. Técnicas para la medición de la productividad primaria en el fitoplancton. En: Alveal, K., M. E. Ferrario, E.C. Oliveira & E. Sar (eds.). *Manual de métodos ficológicos*, Universidad de Concepción, Concepción, Chile, 329-350.
- Karentz, D., J. E. Cleaver & D. L. Mitchell. 1991. Cell survival characteristics and molecular responses of Antarctic phytoplankton to ultraviolet-B radiation. *Journal of Phycology*, 27: 326-341, 1991.
- Kirk, J. T. O. 1994. *Light and photosynthesis in aquatic ecosystems*. Cambridge University Press, United Kingdom, 509 pp.
- Laurion, I. & W. F. Vincent. 1998. Cell size versus taxonomic composition as determinants of UV-sensitivity in natural phytoplankton communities. *Limnology and Oceanography*, 43: 1774-1779.
- Lesser, M. P., J. J. Cullen, & P. J. Neale. 1994. Carbon uptake in a marine diatom during acute exposure to ultraviolet B radiation: Relative importance of damage and repair. *Journal of Phycology*, 30: 183-192.
- Longhurst, A. S. Sathyendranath, T. Platt & C. Caverhill. 1995. An estimate of global primary production in the ocean from satellite radiometer data. *Journal of Plankton Research*, 17: 1245-1271.
- Lubin, D. & O. Holm-Hansen. 1995. Atmospheric ozone and the biological impact of solar ultraviolet radiation. En: *Encyclopedia of environmental biology*. Academic Press, Inc., 147-168.

- Madronich, S. 1993. The atmosphere and UV-B radiation at ground level. En: Young, A. R., L. O. Björn, J. Moan & W. Nultsch (eds.). *Environmental UV photobiology*. Plenum Press, New York, 1-39.
- Marangoni, R., A. Barsella, D. Gioffré, G. Colombetti, M. Lebert & D. P. Häder. 2001. ELDONET –European Light dosimeter network. Structure and function of the ELDONET server. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biol.* En prensa.
- Marra, J. 1978a. Effect of short-term variations in light intensity on photosynthesis of a marine phytoplankton: A laboratory simulation study. *Marine Biology*, 46: 191-202.
- Marra, J. 1978b. Phytoplankton photosynthetic response to vertical movement in a mixed layer. *Marine Biology*, 46: 203-208.
- Mitchell, B. G. & O. Holm-Hansen. 1991. Observations and modelling of the Antarctic phytoplankton crop in relation to mixing depth. *Deep-Sea Research*, 38: 981-1007.
- Molina, M. J. & F. S. Rowland. 1974. Stratospheric sink for chlorofluoromethanes: chlorine atom-catalysed destruction of ozone. *Nature*, 249: 810-812.
- Neale, P. J., R. F. Davis & J. J. Cullen. 1998a. Interactive effects of ozone depletion and vertical mixing on photosynthesis of Antarctic phytoplankton. *Nature*, 392: 585-589.
- Neale, P. J., A. T. Banaszak & C. R. Jarriel. 1998b. Ultraviolet sunscreens in *Gymnodinium sanguineum* (Dinophyceae): Mycosporine-like amino acids protect against inhibition of photosynthesis. *Journal of Phycology*, 34: 928-938.
- 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.
- Otaño, S. H. & N. H. Santinelli. 1997. Chlorophyta del Río Chubut (Patagonia, Argentina) I. Chlorococcales. *Physis Sec. B*, 53: 11-20.
- Perillo, G. M. E., M. C. Piccolo, M. C. Scapini, & J. Orfila. 1989. Hydrography and circulation of the Chubut river estuary (Argentina). *Estuaries*, 12: 186-194.
- Sancar, A. & G. B. Sancar. 1988. DNA repair enzymes. *Annual Review of Biochemistry*, 57: 29-67.
- Santinelli, N. & J. L. Estéves. 1993. Características químicas y fitoplanctónicas del estuario del río Chubut (Patagonia Argentina). *Naturalia Patagónica Ciencias Biológicas*, 1: 22-34.
- Sastre, A. V., N. Santinelli & M. E. Sendin. 1994a. Floraciones de *Aulacoseira granulata* (Ehr.) Simonsen (Bacillariophyceae) en el curso inferior del río Chubut, Patagonia Argentina. *Revista Brasileira de Biología*, 54: 641-647.
- Sastre, A. V., N. H. Santinelli, S. H. Otaño, M. E. Ivanissevich, & M. G. Ayestarán. 1994b. Diatom blooms and their relation to water supply. *Verhandlungen Internationale Vereinigung für Theoretische und Angewandte Limnologie*, 25: 1974-1978.

- Sastre, A. V., N. H. Santinelli, S. H. Otaño, & M. E. Ivanissevich. 1998. Water quality in the lower section of the Chubut River, Patagonia, Argentina. *Verhandlungen Internationale Vereinigung für Theoretische und Angewandte Limnologie*, 26: 951-955.
- Shick, J. 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.
- 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.
- Stamnes, K., J. Slusser, & M. Bowen. 1991. Derivation of total ozone abundance and cloud effects from spectral irradiance measurements. *Applied Optics*, 30: 4418-4426.
- Stemann Nielsen, E. 1952. The use of radio-active carbon (C14) for measuring organic production in the sea. *Journal de Conseil pour l'Exploration de la Mer*, 18: 117-140.
- Stemann Nielsen, E. 1964. On a complication in marine productivity work due to the influence of ultraviolet light. *Journal de Conseil pour l'Exploration de la Mer*, 29: 130-135.
- Sverdrup, H. U. 1953. On conditions for the vernal blooming of phytoplankton. *Journal de Conseil pour l'Exploration de la Mer*, 18: 287-295.
- Tocho, J. O., L. Da Silva, G. Lifante, F. Cusso & F. Jaque. 1996. Penetración del agujero de ozono en Sudamérica. *Investigación y Ciencia (Febrero)*: 68-73.
- Utermöhl, H. 1958. Zur Vervollkommung der quantitativen Phytoplankton-Methodik. *Mitteilungen- Internationale Vereinigung für Theoretische und Angewandte Limnologie*, 9: 1-38.
- Vernet, M. E. A. Brody, O. Holm-Hansen & B. G. Mitchell. 1994. The response of Antarctic phytoplankton to ultraviolet radiation: absorption, photosynthesis, and taxonomic composition. En: C. S. Weiler & P. A. Penhale (eds.) *Ultraviolet radiation in Antarctica: Measurements and biological effects*, American Geophysical Union, Washington, D.C. Antarctic Research Series, 62: 143-158.
- Vernet, M. 2000. Effects of UV radiation on the physiology and ecology of marine phytoplankton. En: S. De Mora, S. Demers & M. Vernet (eds.). *The effects of UV radiation in the marine environment*, Cambridge University Press, United Kingdom, Cambridge Environmental Chemistry Series, 10: 237-278.
- Villafañe, V. E. 1990. Influencia de la estratificación y salinidad en la dinámica del fitoplancton en el estuario del Río Chubut. Tesis para optar por el título de Licenciada en Ciencias Biológicas. Universidad Nacional de la Patagonia, 46 pp.
- Villafañe, V. E., E. W. Helbling, & J. Santamarina. 1991. Phytoplankton blooms in the Chubut river estuary (Argentina): Influence of stratification and salinity. *Revista de Biología Marina*, 26: 1-20.

- Villafañe, V. E. & F. M. H. Reid. 1995. Métodos de microscopía para la cuantificación del fitoplancton. En K. Alveal, M. E. Ferrario, E. C. Oliveira, E. Sar (eds.). *Manual de métodos ficológicos*, Universidad de Concepción, Concepción, Chile, 169-185.
- Villafañe, V. E., E. W. Helbling, O. Holm-Hansen & B. E. Chalker. 1995. Acclimatization of Antarctic natural phytoplankton assemblages when exposed to solar ultraviolet radiation. *Journal of Plankton Research*, 17: 2295-2306.
- 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., J. I. Albarracín & E. W. Helbling. 2000. Long-term effects of UVR on growth rates and synthesis of UV-absorbing compounds in marine phytoplanktonic species. Workshop *Impacts of UV on aquatic and terrestrial ecosystem*, Mar del Plata, Argentina (poster / abstract).
- Villafañe, V. E., E. W. Helbling & H. E. Zagarese. 2001. Solar ultraviolet radiation and its impact on aquatic ecosystems of Patagonia, South America. *Ambio*, 30: 112-117.
- Wängberg, S. A., J. S. Selmer, & K. Gustavson. 1996. Effects of UV-B radiation on biomass and composition in marine phytoplankton communities. *Scientia Marina*, 60 (Supl. 1): 81-88.
- Wies, E. & J. Berry. 1987. Quantum efficiency of photosystem II in relation to energy-dependent quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochimica et Biophysica Acta*, 894: 498-208.
- Zagarese, H. E., W. R. Cravero, P. González & F. Pedrozo. 1998. Copepod mortality induced by fluctuating levels of natural ultraviolet radiation simulating vertical water mixing. *Limnology and Oceanography*, 43: 169-174.
- Zar, J. H. 1984. *Biostatistical analysis*. Prentice Hall Inc., New Jersey, USA. 2nd ed., 718 pp.
- Zaratti, F. S. 1997. La radiación solar. En: R. Forno G., M. Andrade F. (eds). *Naturaleza y efectos de la radiación ultravioleta y la capa de ozono*. Instituto de Investigaciones Físicas – UMSA, La Paz, Bolivia, 1-7.