

Facultad de Ingeniería
Universidad Nacional del Comahue

Efecto de las alteraciones en el contenido de Fe y la salinidad producidas por el cambio climático sobre el metabolismo oxidativo en microalgas antárticas

Autor de Tesis: Lic. María Belén Aguiar

Director de Tesis: Dra. Susana Puntarulo

Co-Director de Tesis: Dra. Gabriela Malanga

Co-Director de Tesis UNCo: Dra. Ana Ferrari

Lugar de trabajo: IBIMOL-CONICET, Fisicoquímica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA. 2 Piso, Junín 956, 1113, CABA
maria.aguiar@fain.uncoma.edu.ar; belenaguiar81@gmail.com

Tesis presentada para optar por el título de Magíster en Intervención Ambiental con orientación: Ingeniería Ambiental.

Diciembre de 2016

Agradecimientos

Ante todo, quiero agradecer a mi Directora de Tesis la Dra. Susana Puntarulo, por la posibilidad y el espacio de trabajo que me brindó. A la Dra. Gabriela Malanga, mi Co-directora, agradecer fundamentalmente la oportunidad de trabajar con ella, la paciencia, perseverancia y entusiasmo que siempre me dedicó; y a la Dra. Ana Ferrari, mi Co-Directora en UNCo, por la por la dedicación y oportunidad de aprender con ella. Agradecer por toda la experiencia adquirida a lo largo de estos años junto a ellas, no sólo a nivel académico, profesional sino, personal.

Al Dr. Marcelo Hernando por sus aportes y colaboración en este trabajo de Tesis y su buena predisposición siempre que trabajamos juntos.

A mi familia en general y en particular a Ariel y a mi mamá, por el amor, la paciencia y acompañamiento en todo este tiempo.

Por último, reconocer especialmente el apoyo incondicional en este camino, de mis compañeros de trabajo de laboratorio del IBIMOL-CONICET, del Laboratorio de Cromatografía de FAIN-UNCo; y particularmente a la Dra. Natacha Piloni y la Dra. Marcia Mazzuca, quienes fueron también un pilar fundamental y formaron parte en esta etapa de aprendizaje.

Este trabajo es dedicado especialmente a mis Abuelos.....

Índice

AGRADECIMIENTOS	I
ÍNDICE	II
RESUMEN.....	III
ABREVIATURAS	V
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. EFECTO DEL CAMBIO CLIMÁTICO	2
1.2. COMUNIDADES MICROALGALES, FITOPLANCTON Y DIATOMEAS.....	3
1.3. PAPEL DEL FE EN EL DESARROLLO DE LAS MICROALGAS	5
1.4. EFECTOS DE CAMBIOS EN LA SALINIDAD EN MICROALGAS	7
1.5. BIOQUÍMICA DE LOS RADICALES LIBRES.....	8
1.6. SISTEMA DE DEFENSA ANTIOXIDANTE	12
1.7. EMPLEO DE RESONANCIA PARAMAGNÉTICA ELECTRÓNICA (EPR) PARA LA DETERMINACIÓN DE RADICALES LIBRES... 14	
1.8. DISEÑOS EXPERIMENTALES PARA EL ESTUDIO DE EFECTOS AMBIENTALES.....	16
1.9. HIPÓTESIS Y OBJETIVO.....	18
2. MATERIALES Y MÉTODOS	19
2.1. MATERIAL BIOLÓGICO	20
2.2. SITIO DE MUESTREO.....	20
2.3. EXPERIMENTOS A CAMPO Y EN MICROCOSMOS	20
2.4. CULTIVOS EN LABORATORIO	21
2.5. DISEÑO EXPERIMENTAL	23
2.6. DETERMINACIONES BIOQUÍMICAS	24
2.7. SUPLEMENTACIÓN DE LOS MEDIOS DE CULTIVOS CON FE	28
2.8. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE PROTEÍNAS.....	32
2.9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	33
2.10. REACTIVOS	33
3. RESULTADOS	34
3.1. ESTUDIOS EN CULTIVOS AISLADOS DE DISTINTAS ESPECIES ALGALES.....	35
3.2. CARACTERIZACIÓN DE CULTIVO DE LA DIATOMEA ANTÁRTICA, P. GLACIALIS, EN CONDICIONES CONTROLES.....	38
3.3. EFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN DE FE EN CULTIVOS DE P. GLACIALIS.....	40
3.4. EFECTOS DE LA SALINIDAD SOBRE LA COMUNIDAD ALGAL ANTÁRTICA EN MICROCOSMOS	47
3.5. EFECTO DE LA DISMINUCIÓN DE LA SALINIDAD SOBRE UNA COMUNIDAD MICROALGAL EN CONDICIÓN A CAMPO	57
4. DISCUSIÓN	65
4.1. ESTUDIOS EN CULTIVOS AISLADOS DE DISTINTAS ESPECIES ALGALES.....	66
4.2. CARACTERIZACIÓN DE CULTIVO DE LA DIATOMEA ANTÁRTICA P. GLACIALIS EN CONDICIONES CONTROLES Y FRENTE A LA SUPLEMENTACIÓN CON FE	68
4.3. EFECTOS DE LOS CAMBIOS DE SALINIDAD SOBRE LOS MICROCOSMOS	72
4.4. EFECTOS DE LA DISMINUCIÓN DE LA SALINIDAD SOBRE LOS PARÁMETROS OXIDATIVOS EN UNA COMUNIDAD ALGAL ANTÁRTICA IN SITU	76
5. CONCLUSIONES	79
6. BIBLIOGRAFÍA	83

Resumen

El derretimiento de glaciares con aporte de agua dulce al mar, como consecuencia del cambio climático, modifica la salinidad, disponibilidad y concentración de nutrientes en la columna de agua. Las diatomeas son indicadores sensibles de alteraciones ambientales. El objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto del Fe y la salinidad en el fitoplancton antártico, para contribuir al diseño de una solución ecológica para regular la producción de CO₂ atmosférico e incrementar la producción primaria. En condiciones basales, *Porosira glacialis* mostró un mayor índice daño/protección sugiriendo que la situación de estrés oxidativo no fue adecuadamente controlada por los antioxidantes liposolubles en condiciones de laboratorio. Los efectos de alteraciones en los niveles de Fe fueron estudiados en cultivos suplementados con altas concentraciones Fe:EDTA. Se observó una disminución de la biomasa y el crecimiento instantáneo con respecto a los cultivos controles. El contenido de Fe total intracelular aumentó y el contenido del LIP disminuyó, según el contenido de Fe en el medio de cultivo. En microcosmos a 30 psu se observó un reemplazo de diatomeas grandes por diatomeas pennadas pequeñas; un aumento de los parámetros oxidativos y la disminución del metabolismo comparado con los microcosmos controles. Los resultados en los experimentos *in situ* concuerdan con los hallados en microcosmos. La disminución de la salinidad del medio afectaría significativamente las comunidades y contribuirá a cambios en el fitoplancton marino antártico.

Palabras claves: Fitoplancton antártico, salinidad, hierro, estrés oxidativo, microcosmos.

Summary

The melting of glaciers caused by climate change contributing with fresh water to the sea, modifies the salinity, the availability and concentration of nutrients in the water column. Diatoms are sensitive indicators of environmental disturbances. The objective of this work was to study the effect of Fe and salinity on Antarctic phytoplankton to contribute with key information for designing an ecological solution to regulate atmospheric CO₂ production and increase primary production. Under basal conditions, *Porosira glacialis* showed a higher damage/protection index as compared to ecological status in the absence of freshwater presence suggesting that the oxidative stress situation was not adequately controlled by the activity of liposoluble antioxidants under laboratory culture conditions. The effects of alterations in Fe levels were studied in cultures supplemented with high Fe:EDTA concentrations. A decrease in biomass and instantaneous growth rate were observed as compared to the control cultures. Total intracellular Fe content increased and the labile iron pool content decreased as Fe content in culture medium was increased. In microcosms, the labile iron pool at 30 psu a large diatoms were replaced by small pennate diatoms; an increase in oxidative parameters and a decrease in metabolism compared to control microcosms was observed. The results in the *in situ* experiments agree with those found in microcosms. Thus, the decrease in salinity would significantly affect communities and contribute to changes in Antarctic marine phytoplankton.

Key words: Antarctic phytoplankton, salinity, iron, oxidative stress, microcosm.

Abreviaturas

A[•]: Radical ascorbilo

Abs: Absorbancia

ϵ : Absortividad molar

AcH: Ácido acético

AH: Ácido ascórbico

ANOVA: Análisis de varianza

APX: Ascorbato peroxidasa

Ast: Astaxantina

α -T: α -Tocoferol

β -C: β -Caroteno

BSA: Albúmina sérica bovina

BT: Batofenantrolina

CA: Bis[N,N-bis(carboxymetil)aminometil] fluoresceína

β : Campo magnético

CAT: Catalasa

DCFH-DA: 2'-7'-diclorofluoresceína diacetato

DF: Mesilato de deferroxamina

DHA: Deshidroascorbato

DMSO: Dimetil-sulfóxido

DNA: Ácido desoxiribonucleico

Ea: Energía de activación

EPR: Espectroscopía de resonancia paramagnética electrónica

EPR: Resonancia paramagnética electrónica

EtOH: Etanol

FM: Fase móvil

Fn: Fotosíntesis neta

Ft: Ferritina

H₂O₂: Peróxido de hidrógeno

HNLC: Altos nutrientes- Baja clorofila

HPLC: Cromatografía líquida de alta resolución

Hx: Hexano

IFW: Agua libre de hierro

LIP: Pool de hierro lábil

LR•: Radical lipídico

MeOH: Metanol

MPA: Ácido metafosfórico

NADPH: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

O••: Radical superóxido

•OH: Radical hidroxilo

PBN: p-butil-nitrona

PSII: Fotosistema II

R: Respiración celular

ROS: Especies reactivas del oxígeno

SDS: Dodecilsulfato de sodio

SI: Sistema Internacional

SOD: Superóxido dismutasa

TBA: Ácido tiobarbitúrico

TBARS: Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico

TEMPOL: 2,2,6,6-tetrametilpiperidina-N-oxil

Tf: Transferrina

TGA: Ácido tioglicólico

UA: Unidades arbitrarias

UF: Unidades de fluorescencia

UV: Radiación ultravioleta

μ instantánea: Velocidad instantánea de crecimiento

1. Introducción

1.1. Efecto del cambio climático

El cambio climático es un fenómeno de origen antropogénico que está determinado principalmente por el incremento del dióxido de carbono (CO_2) atmosférico emitido en las grandes urbes, principalmente por emanación de fábricas, oxidación de combustibles fósiles, etc. Este incremento de CO_2 es uno de los gases responsables del efecto invernadero, que generan efectos de lluvia ácida, smog y aumento superficial de la temperatura. Por otro lado, existe otro fenómeno asociado al cambio climático que fundamentalmente en las décadas pasadas, preocupó al mundo científico, que fue el adelgazamiento de la capa de ozono (O_3). La influencia del hombre produjo un desbalance natural del equilibrio que presenta este gas fundamental para filtrar la radiación UV-B que llega del sol a la superficie terrestre. Estos procesos, generan directa o indirectamente efectos sobre los ecosistemas, particularmente sobre los ecosistemas marinos. El cambio climático afecta drásticamente a las zonas polares y es un hecho que refleja sus efectos deletéreos en los últimos 50 años. Los incrementos de temperatura del aire en la zona de la Península Antártica y en el Ártico se encontraron entre los más elevados del planeta, registrándose alteraciones varias veces superiores a la media planetaria (Vaughan et al. 2003; Trenberth et al. 2007).

El derretimiento de las masas de agua contribuye al incremento global del nivel del mar (Vaughan, 2006), promoviendo la estratificación de la columna de agua, especialmente en ambientes costeros poco profundos, donde el agua dulce está impactando en la estructura y función de las cadenas tróficas costeras (Dierssen et al. 2002). Como ejemplo del derretimiento de glaciares en la Figura 1, se muestran los resultados obtenidos por Deregibus et al. (2015) frente al retroceso del glaciar en la Caleta Potter, ubicada en la Isla 25 de Mayo al este de la Península Antártica. Específicamente, el aporte de agua en las capas superficiales del mar, modifica indirectamente la disponibilidad y concentración de nutrientes tales como hierro (Fe) en la columna de agua, afectando directamente la producción primaria. Puesto que el fitoplancton y las macroalgas de las zonas costeras cumplen un papel fundamental como fuente de energía para organismos herbívoros planctónicos y bentónicos (Iken et al. 1997; Amsler et al. 2005), es fundamental estudiar los efectos que generan las distintas variables ambientales sobre las comunidades de fitoplancton en los ecosistemas acuáticos costeros (Day et al. 1989).

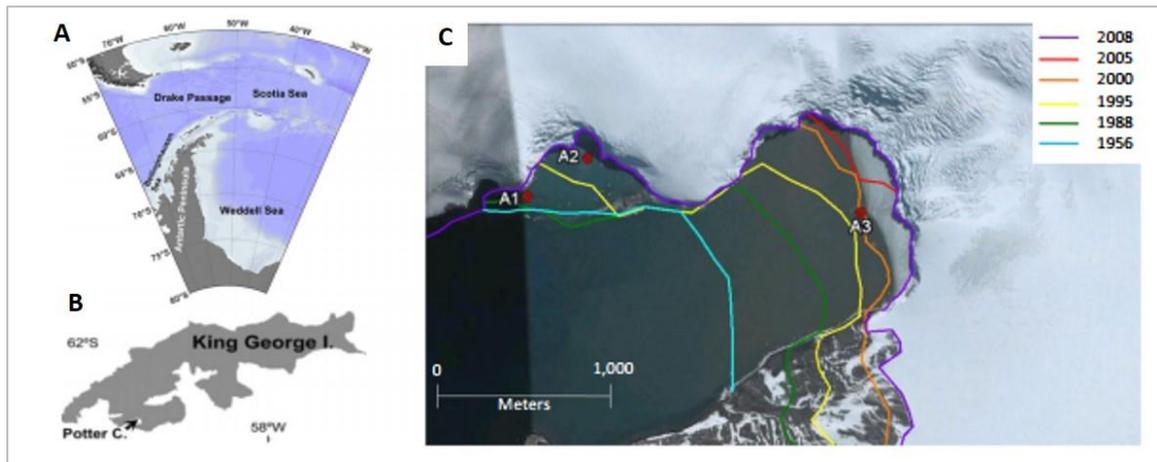


Figura 1. A: Ubicación geográfica de la Isla 25 de Mayo/King George al este de la Península Antártica. **B:** Localización de Caleta Potter. **C:** Imagen satelital dentro de la Caleta (Google Earth, 2011) donde las líneas marcan el retroceso del glaciar desde 1956 (Rückamp et al. 2011). Imagen Deregibu et al. (2015).

1.2. Comunidades microalgales, fitoplancton y diatomeas

El origen de la vida y los cambios subsecuentes en la productividad del océano está seguida por la evolución de la fotosíntesis que tiene una gran influencia geoquímica en el planeta desde hace tres billones de años (Falkowski et al. 1998). En el océano contemporáneo, el picoplancton marino está formado por bacterias fotosintéticas tales como, proclorofitas y cianobacterias, y por microalgas eucarióticas. Estas microalgas feofitas (algas pardas), rodofitas (algas rojas) y clorofitas (algas verdes) son responsables en forma mayoritaria de la fijación marina del carbono. En algunas regiones del océano, estos organismos pueden fijar aproximadamente la misma cantidad de carbono (unos pocos gramos por día) que en el bosque en la tierra (Smetacek, 2001a). Actualmente el picoplancton es el responsable del 50% de la producción primaria en el planeta (Falkowski & Raven, 2007).

Las diatomeas son el grupo unicelular de algas cromóforas que colonizan las profundidades a las que la radiación fotosintéticamente disponible puede penetrar. Pueden considerarse como las células individuales más importantes de los océanos. Adicionalmente, los niveles de abundancia y asociaciones de floraciones de especies de diatomeas también son estudiadas como indicadores sensibles de alteraciones ambientales tales como el cambio climático (Stoermer & Smol, 2001) que es un fenómeno que afecta particularmente a las regiones polares que son vulnerables. Las diatomeas están clasificadas como *Bacillariophyceae* dentro de la división *Heterokontophyta* (Figura 2). Se caracterizan por formar una pared externa compuesta por sílice amorfo $[(\text{SiO}_2)_n (\text{H}_2\text{O})]$, llamada frústula. La Figura 2A esquematiza dicha frústula que está constituida por dos valvas similares; formando una placa de Petri. La valva más grande se llama epitoca, y la interior y más pequeña

se conoce como hipoteca. Cada teca está constituida de dos partes; una valva que forma la superficie externa más grande, y una faja o surco, que forman bandas circulares de sílice en el borde de la misma. El material silíceo de la frústula está dispuesto en patrones regulares por mecanismos que se desconocen. Las diatomeas generalmente se clasifican en dos grupos principales dependiendo de la simetría de las frústulas. Las diatomeas céntricas son simétricas radialmente y tienden a ser planctónicas, mientras que las diatomeas pennadas son elongadas, poseen simetría bilateral y son bentónicas ya, que viven en sedimentos u otras superficies (Figura 2B).

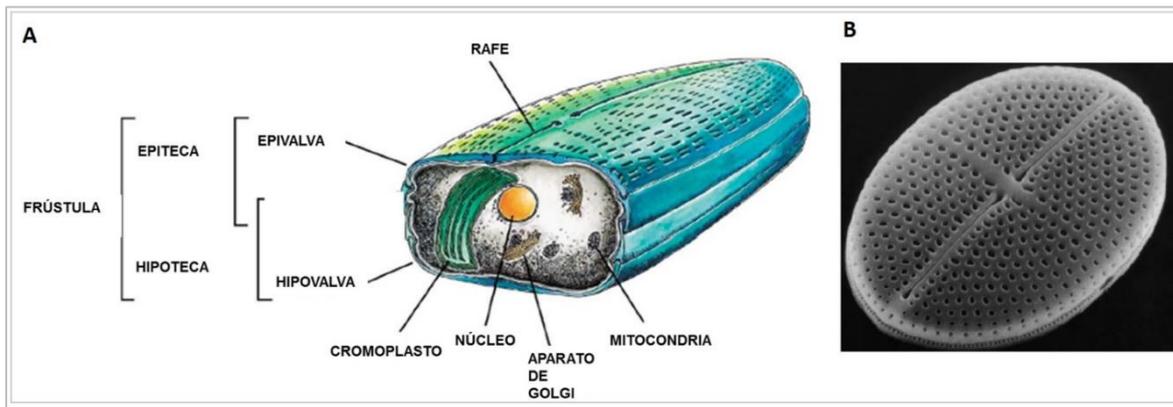


Figura 2. A: Esquema general de la estructura de una diatomea pennada. **B:** Microscopía electrónica de una diatomea céntrica. Tomado de Falciatore & Bowler (2002).

Algunas de las diatomeas pennadas son capaces de secretar un mucílago a través de una pequeña grieta conocida como rafe lo cual les permite el deslizamiento sobre las superficies (Falciatore & Bowler, 2002). El tamaño de las diatomeas oscila entre 2 a 5 μm , están presentes en todos los océanos y su abundancia tiene poca variabilidad estacional. Sus paredes de sílice predominan en los sedimentos de los océanos, convirtiéndose en los principales actores de la biogeoquímica en escalas geológicas significativas (Kemp et al. 2000). Estas especies son las protagonistas principales en los ciclos biogeoquímicos del carbono (C), nitrógeno (N), fósforo (P), silicio (Si) y Fe, y tienden a dominar la producción primaria (Buessler, 1998). Sin embargo, su volumen superficial relativamente bajo necesita condiciones ricas en nutrientes para el crecimiento; en contraste con el nano o picoplancton, con relación volumen-superficie mayor, que les posibilita una exportación más eficiente a concentraciones de nutrientes menores (Chisholm, 1992). Las diatomeas forman parte del grupo más importante de fitoplancton eucariótico responsable de aproximadamente el 40% de la productividad primaria (Falkowski et al. 1998). A pesar de que las diatomeas planctónicas se encuentran en todas las masas de aguas abiertas, hay muchas formas bénticas, que crecen sobre sedimentos, rocas o macroalgas; y algunas especies también pueden ser encontradas en el suelo (Lee, 1999). Asimismo, las diatomeas constituyen un componente mayoritario de las algas

asociadas en el hielo Antártico y Ártico. Además, en mares cálidos oligotróficos es posible encontrar una simbiosis entre las bacterias fijadoras de N_2 (cianobacterias) y las diatomeas (Villareal, 1989). Cabe destacar, que las diatomeas dominan las comunidades de fitoplancton bajo condiciones de altas concentraciones de nutrientes. La dominancia de diatomeas largas se observa también en perturbaciones antropogénicas en las regiones denominadas de Altos Nutrientes Baja Clorofila (HNLC), por ejemplo, los experimentos a mesoescala IronEx: Experimento De Enriquecimiento De Fe En El Océano Abierto y SOIREE: Southern Ocean Iron Release Experiment. Las fertilizaciones *in situ*, en la región del Pacífico Ecuatorial, del Atlántico Sur y del Pacífico Subantártico, así como también las fertilizaciones naturales, indujeron un salto en el conjunto natural del fitoplancton hacia la predominancia de especies de diatomeas alargadas, bajo condiciones adecuadas de Si (De Baar et al. 1995; Bucciarelli, et al. 2001; Smetacek 2001b).

Este tipo de células microalgales presentan una curva de crecimiento típica donde se distinguen tres (3) fases. La fase inicial llamada fase de latencia (lag) es el tiempo transcurrido entre la inoculación de células algales en un medio fresco y el comienzo del crecimiento. Puede ser breve o extendida de acuerdo a las condiciones de las células inoculadas y del medio. Luego se distingue la fase exponencial o logarítmica (log), que se caracteriza por un crecimiento exponencial, las células están en su estado más saludable y son utilizadas para estudios enzimáticos y de componentes celulares. Cuando cesa el crecimiento de una comunidad microbiana debido a la escasez de nutrientes o acumulación de desechos comienza la fase estacionaria (Madigan et al. 2015).

1.3. Papel del Fe en el desarrollo de las microalgas

El Fe es un metal de transición y un micronutriente para plantas y animales. La fuente más significativa de Fe en agua de mar es la deposición de polvo en la superficie marina (Dierssen et al. 2002) y en menor grado el afloramiento desde las profundidades de sitios hidrotermales. En los ambientes marinos, el Fe^{3+} es poco soluble, se encuentra mayoritariamente suspendido, unido a materia orgánica particulada (tamaño de partícula $>0,4 \mu m$) y se encuentra como $Fe(OH)_x$. Por el contrario, más del 99% del Fe disuelto, se reduce a Fe^{2+} y se compleja con quelantes orgánicos que lo mantienen en solución. A esta fracción se la denomina “pool de Fe biodisponible” (Abele et al. 2008). En mar abierto, en el agua superficial, el Fe se encuentra mezclado en forma coloidal ($>0,4 \mu m$) y complejado en un rango de concentraciones entre 0,1 y 2 nM (5,6-110 $ng\ l^{-1}$) (Bucciarelli et al. 2001; Klinkhammer et al. 2001). En las zonas cercanas a la costa de la Península Antártica, la expulsión de sedimento por parte del derretimiento del glaciar y la erosión de rocas superficiales bajo los glaciares permiten la liberación de Fe a través del transporte litogénico derivado de partículas (Ahn et al. 1996; Dierssen et al. 2002). Particularmente, en la Isla 25 de Mayo las rocas volcánicas contienen entre el 5 y el

7% de Fe (Tatur et al. 1999). El Fe es lavado y llega al mar por arroyos de agua turbia que resultan visibles alrededor de toda la isla. La mayoría del Fe en las aguas costeras está unido a partículas de sedimentos suspendidas y la concentración de Fe en materia suspendida está dentro del rango de 0,2 a 318 $\mu\text{g Fe l}^{-1}$ (Ahn et al. 2004). Concentraciones de Fe disuelto superiores a 10 nM (560 ng l^{-1}) han sido medidas en áreas costeras alrededor de los archipiélagos Sub-Antárticos, donde ocurre la fertilización natural del Fe a través de la erosión de sedimentos (Bucciarelli et al. 2001; Schloss et al. 2008). La escorrentía de agua por derretimiento hacia el oeste de la Península Antártica se incrementa durante los meses de verano (noviembre a febrero) cuando los glaciares terrestres incrementan el derretimiento a medida que se incrementa la temperatura del aire y el proceso se intensifica con el cambio climático predicho para estas áreas (Abele et al. 2008).

En regiones HNLC, se ha demostrado que el déficit en el contenido de Fe es un factor crítico que puede generar baja productividad primaria sobre la base de la predicción de los niveles disponibles de macronutrientes (Martin, 1992). Este metal está involucrado en la biosíntesis de la clorofila y la ficobilina, muchos componentes del sistema fotosintético I y II (PSI y PSII, respectivamente) y del sistema de transporte de electrones (e^-); así como también, en la asimilación de nitrato, co-factor de las enzimas nitrato reductasa y nitrito reductasa (Geider & La Roche, 1994). En general, los metales de transición como el Fe y el cobre (Cu) son muy importantes para bajar la energía de activación (E_a) actuando como catalizadores en muchas reacciones metabólicas que ocurren dentro de las células. En particular, estos metales se unen con el O, N y átomos de azufre (S) presentes en las biomoléculas. El Fe intracelular se puede encontrar almacenado de diferentes formas. La concentración de Fe en sistemas biológicos es baja excepto en la ferritina (Ft), que es una proteína que almacena Fe (Miller et al. 1990). Sin embargo, cuando el contenido de Fe intracelular excede las necesidades metabólicas, este elemento forma un pool de compuestos de bajo peso molecular denominado de pool de Fe lábil (LIP) (Robello et al. 2007). Es importante destacar que, la Ft es la principal proteína encargada de secuestrar, almacenar y liberar Fe (Harrison & Aroiso 1996; Aroiso & Levi 2002; La Fontaine et al. 2002). Esta proteína tiene una estructura de esfera hueca, en cuya cubierta se ensamblan 24 subunidades. En plantas y bacterias la Ft sólo contiene cadenas del tipo H que están asociadas con la presencia de centros que catalizan la oxidación de 2 átomos de Fe^{2+} y están vinculadas al ingreso de Fe al interior de la Ft (Harrison & Aroiso, 1996). En un alga verde unicelular Long et al. (2008) han identificado diferentes genes que codifican para Ft 1 y 2. Bajas concentraciones de Fe limitan el crecimiento celular algal (Estevez et al. 2001a); sin embargo, concentraciones de Fe superiores a las necesarias para favorecer el desarrollo de fitoplancton podrían producir efectos tóxicos a través de la catálisis de reacciones de formación de especies reactivas del oxígeno (ROS). Otro efecto que produce el aumento del contenido de Fe en el medio en las comunidades planctónicas del Océano Sur, está relacionado con la mejora en la eficiencia de la conversión fotosintética (Kolber et al. 1994; Van Leeuwe et al. 1997). En este sentido, se ha observado que en la diatomea *Chaetoceros muelleri*

la limitación en el contenido de Fe puede inducir indirectamente a la reducción de la abundancia celular o actividad de las enzimas que requieren de la presencia de este metal en la vía de síntesis de clorofila-a (Chla) (Davey & Geider, 2001). Por otra parte, Liu et al. (2008) demostraron que altas concentraciones de Fe contribuyen a la acumulación de lípidos neutros en *Chlorella vulgaris*; y Estevez et al. (2001a) observaron que el incremento de Fe en el medio de cultivo de esta especie aumenta el contenido de antioxidantes.

1.4. Efectos de cambios en la salinidad en microalgas

Como se señaló anteriormente, los ecosistemas costeros de altas latitudes se ven afectados por el aumento de la temperatura y la disminución de la salinidad en las capas superficiales del mar. Particularmente, Steig et al. (2009) observaron que la media de temperatura en la Península Antártica oeste se había incrementado significativamente (1-2°C) en los últimos 50 años. El incremento del aporte de agua dulce desde la costa como resultado de precipitaciones más intensas, y el derretimiento del hielo glaciar, en algunas zonas ha alcanzado hasta un 87% de la extensión de los mismos (Cook et al. 2005). Se sabe que, en el medio marino, la salinidad es habitualmente de alrededor de 35 psu, pero puede variar desde 10 a 70 psu como resultado de la evaporación o precipitación de agua dulce (Graham & Wilcox, 2000). Moline et al. (2004) han demostrado que la dominancia de las criptófitas sobre las diatomeas durante el verano austral está asociada a la disminución de la salinidad por condiciones ligadas al calentamiento global. Sin embargo, en la superficie bajo condiciones de menor salinidad en la Península Antártica oeste, Piquet et al. (2011) informaron cambios en grupos dominantes de diatomeas, así como en bacterias. La salinidad es uno de los factores primarios responsables de la restricción del crecimiento y desarrollo de las macroalgas en las zonas de estuarios (Jahnke & Withe 2003; Parida & Das 2005). Estudios realizados por Neale & Melis (1989) en la microalga verde *Chlamydomonas reinhardtii* mostraron que el estrés por salinidad fotoinhibe los fotosistemas. El estrés inducido por cambios en la salinidad ha sido asociado a una mayor generación de ROS, causando daño oxidativo (Liu et al. 2007). En este sentido, diversos estudios indican que, en diferentes especies de algas sometidas a condiciones de estrés salino, hay una rápida acumulación de ROS que causan estrés oxidativo (Lu et al. 2006; Dring 2006; Liu & Pang 2010). Por otra parte, Rijstenbil (2003) mostró que cuando la diatomea *Cylindrotheca closterium* (Ehrenberg) era expuesta a la combinación de radiación UV-B y estrés por salinidad se observaba una inhibición en el crecimiento. Las variaciones en la composición del fitoplancton a través de gradientes salinos generalmente han sido atribuidas al hecho de que la mayoría de las especies de fitoplancton son estenohalinas (por ejemplo, tienen un rango de tolerancia a la salinidad muy estrecha) y sufren estrés osmótico cuando se exponen a cambios de salinidad (Bisson & Kirst 1995; Lionard et al. 2005). Cualquier cambio drástico en la

salinidad es suficiente para cambiar los grupos locales de fitoplancton y establecer una nueva comunidad estable (Chakraborty et al. 2011). El estrés por baja salinidad en algas así como también en plantas, perturba gravemente la homeóstasis celular produciendo diferencias entre la concentración de iones externa e interna (predominantemente Na^+ y Cl^-) causando un influjo de agua, incrementando el volumen celular y la salida de iones (Guillard, 1962).

1.5. Bioquímica de los radicales libres

Un radical libre es una especie capaz de existir independientemente en términos de especie libre, que contiene uno o más e^- desapareados (Halliwell & Gutteridge, 2006). Un e^- desapareado ocupa sólo un orbital atómico o molecular. El radical libre más simple es el hidrógeno (H^\bullet) ya que el átomo de hidrógeno tiene un solo e^- y debe estar desapareado. Varias especies de radicales libres son generados en los sistemas vivos. Los radicales pueden formarse por numerosos mecanismos, tales como adición de un e^- a una molécula no-radical (Halliwell, 2006). En condiciones normales en los organismos vivos aerobios el 90% del O_2 consumido es usado en la cadena de transporte de e^- ; para la oxidación de nutrientes que resulta en la producción de energía, CO_2 y H_2O . Sin embargo, hasta un 5% del O_2 consumido sufre la reducción parcial con adición univalente de e^- que llevan a la formación de una serie de productos denominados en conjunto ROS. Por consiguiente, la generación de ROS tiene lugar continuamente en las células vivas como producto del metabolismo. Esta reducción parcial del O_2 produce especies como el anión radical superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), el radical hidroxilo ($\bullet\text{OH}$) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Estas especies son capaces de generar diversos efectos en los sistemas biológicos, tales como la señalización, la defensa contra infecciones, la modificación de moléculas y el daño a constituyentes celulares (Halliwell, 2006; Pospíšil, 2009).

Durante la fotosíntesis, el O_2 producido por el PSII, incrementa el O_2 intra-organela y potencialmente aumenta las posibilidades de formación de ROS, especialmente bajo condiciones de estrés (Halliwell, 1987). La Figura 3 ilustra la formación de ROS a partir de la reducción univalente del O_2 . La reducción del O_2 resulta en la generación de $\text{O}_2^{\bullet-}$. A pH bajo, el $\text{O}_2^{\bullet-}$ dismuta, para generar H_2O_2 . Asimismo, el $\text{O}_2^{\bullet-}$ puede ser protonado y producir peroxi-hidroxi radical (HO_2^\bullet). El $\text{O}_2^{\bullet-}$ también puede reaccionar con otros radicales libres como el óxido nítrico (NO^\bullet) para dar el peroxinitrito (OONO^-). El oxígeno singulete ($^1\text{O}_2$) es otra especie de ROS, uno de sus e^- se encuentra en un nivel de energía superior, de este modo se libera energía al volver al estado fundamental desde este estado de espín restringido. El $^1\text{O}_2$ se puede formar por fotoexcitación de la clorofila y su reacción con el O_2 (Sarvajeet & Narendra, 2010).

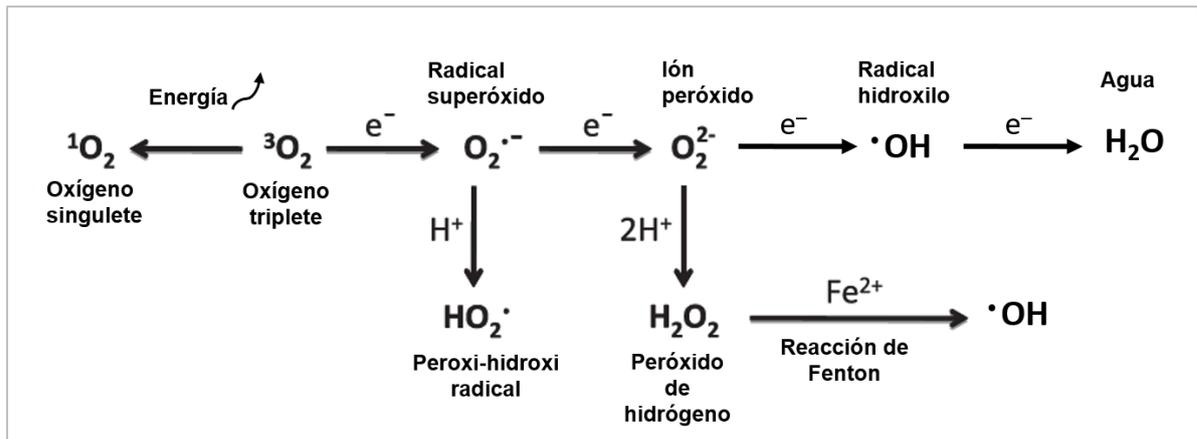
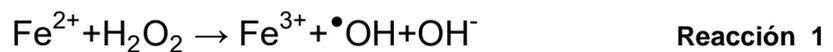


Figura 3. Generación de ROS por transferencia de energía. Tomado y modificado de Sarvajeet & Narendra (2010).

El H_2O_2 y el $\text{O}_2^{\bullet-}$ por sí mismos son las ROS relativamente menos dañinas, pero son capaces de formar especies como el $\bullet\text{OH}$ muy nocivas para los componentes celulares esenciales y biomoléculas. La presencia de metales con valencia intercambiable, como el Fe y Cu, que son de gran importancia biológica, puede generar $\bullet\text{OH}$ mediante la reacción de Fenton (Reacción 1) y la reacción de Haber-Weiss (Reacción 3). El $\bullet\text{OH}$ es una de las especies químicas más reactivas conocidas a nivel biológico.



En la reacción de Fenton el producto es el $\bullet\text{OH}$. En sistemas biológicos la disponibilidad del ion Fe^{2+} puede limitar la reacción, pero el ion Fe^{3+} puede ser reciclado a la forma reducida utilizando especies tales como $\text{O}_2^{\bullet-}$, como se muestra en la Reacción 2. Luego, el balance total de las reacciones 1 y 2 da la llamada reacción de Haber-Weiss. Las reacciones 1 y 2 demuestran claramente que el ion metálico tiene un papel catalítico y no se consume durante las reacciones.



En algas y plantas superiores, la fotosíntesis se realiza en los cloroplastos, que contienen un sistema de membrana tilacoide altamente organizado capaz de albergar todos los componentes del aparato de captura de radiación fotosintética y provee todas las propiedades estructurales para una óptima absorción de energía (Sarvajeet & Narendra, 2010). El O_2 generado durante la fotosíntesis puede aceptar e^- a través de los fotosistemas, generando $\text{O}_2^{\bullet-}$. En plantas, bajo condiciones de estado estacionario, los ROS son eliminados por mecanismos de defensas

antioxidantes (Foyer & Noctor, 2005). Se conoce que la sobreproducción de ROS en organismos vivos incluidos los autótrofos, bajo condiciones de estrés, resulta potencialmente tóxica ya que estos compuestos pueden atacar biomoléculas tales como lípidos, proteínas, y DNA que resultan en daño oxidativo e incluso la muerte de los organismos (Halliwell & Gutteridge, 1999). Actualmente, se conoce que la producción intracelular de ROS no necesariamente implica oxidación celular, sin embargo, el estrés oxidativo ocurre cuando la formación de ROS excede la capacidad de las defensas antioxidantes o producen disrupción de la señalización redox, afectando la funcionalidad celular (Jones, 2006).

1.5.1. Estrés oxidativo y daño a macromoléculas

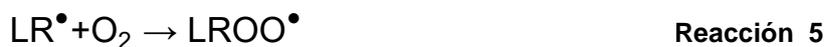
Se denomina estrés oxidativo al conjunto de condiciones extra o intracelulares que producen una alteración en las concentraciones de las ROS en estado estacionario. Esta situación se alcanza a nivel celular ya sea debido a un aumento en las velocidades de producción de las ROS o por una disminución en la actividad de las defensas antioxidantes. Se ha postulado que el daño oxidativo causado a las macromoléculas tales como lípidos, proteínas o DNA es iniciado por la adición del $\bullet\text{OH}$, seguido por las reacciones de propagación características de las reacciones radicalarias (Porter, 1986). La formación de $\bullet\text{OH}$ según la Reacción 1 requiere la reducción secuencial por un e^- del O_2 a $\text{O}_2^{\bullet-}$ y por un segundo e^- al H_2O_2 para luego incorporar un tercer e^- que conduce a la generación de $\bullet\text{OH}$ que lleva a la oxidación de las biomoléculas (Miller et al. 1990). Otro mecanismo propuesto para la iniciación de la reacción en cadena involucra la producción y adición del $^1\text{O}_2$ a estas moléculas generando endoperóxidos. Este mecanismo implica más energía, usualmente en forma de luz, para excitar el O_2 generando $^1\text{O}_2$. Como el estado fundamental de la molécula de O_2 es el estado triplete, esta reacción con la mayoría de las biomoléculas presenta restricción de espín. También pueden existir reacciones directas entre las biomoléculas y el O_2 , pero sus velocidades son lentas (menores a $10^{-5} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) (Uri, 1961). Sin embargo, como las reacciones directas de las moléculas con el O_2 son improbables a proporciones significativas, se requieren catalizadores tales como los metales de transición (Aust et al. 1985).

Particularmente, los procesos de peroxidación lipídica ocurren mediante un conjunto de reacciones en cadena (Reacciones 4-6). Los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (LRH) son muy sensibles a las reacciones oxidativas producidas por las ROS debido a la presencia de los dobles enlaces en las estructuras químicas. En la etapa de iniciación de la reacción en cadena, se produce el radical alquilo (LR^\bullet), que posteriormente reacciona en la etapa de propagación para dar el radical lipoperoxilo (LROO^\bullet). Seguidamente este intermediario puede reaccionar con otra molécula de ácido graso, obteniéndose el hidroperóxido lipídico (LROOH) y otro LR^\bullet .

Iniciación:



Propagación:



La terminación de la peroxidación lipídica se logrará cuando los radicales lipídicos reaccionen produciendo especies no radicales (Valavanidis et al. 2006). El hidroperóxido (LROOH) resultante puede descomponerse fácilmente en especies muy reactivas, tales como radicales lipídicos, alquilos, aldehídos (malonaldehído, MDA), alcanos epóxidos lipídicos y alcoholes. La mayoría de estos productos son tóxicos y mutagénicos (Esterbauer et al. 1990; Porter et al. 1995; d'Ischia et al. 1996).

El estrés oxidativo no sólo puede generarse en el metabolismo de los organismos vivos, sino que existen otros factores y la presencia de xenobióticos que son capaces de generar esta condición. Por ejemplo, en algas, el estrés por cambios en la salinidad del medio tiene efectos sobre muchas vías metabólicas, como la fotosíntesis (Allakhverdiev et al., 2002), la biosíntesis de membranas lipídicas (Sakamoto & Murata, 2002; Singh et al. 2002) y el aumento de la respiración celular para mantener el balance osmótico (Qasim et al. 1972). Las ROS alteran el metabolismo normal a través de la peroxidación de lípidos de membrana, desnaturalizando proteínas y ácidos nucleicos (Apel & Hirt, 2004). En la diatomea *Amphora subtropica* y el alga verde *Dunaliella sp.*, los cambios de salinidad en el medio de cultivo producen cambios en las respuestas celulares que implican reactivación del sistema de defensa antioxidante tal como aumento del contenido de carotenoides; de la actividad de la enzima superóxido dismutasa (SOD); incremento del contenido de daño oxidativo a lípidos y proteínas (BenMoussa-Dahmen et al. 2016). Por otra parte, Estevez et al. (2001b), mostraron que el contenido de α -tocoferol (α -T), β -caroteno (β -C) y tioles totales se redujo durante la fase logarítmica y estacionaria de crecimiento en cultivos del alga de agua dulce *Chlorella sp.* cuando fueron sometidos a un incremento de radiación UV-B. En otra microalga de agua dulce como *Scenedesmus vacuolatus* el incremento de Cu en el medio de cultivo indujo el aumento del estrés oxidativo y la actividad de las defensas antioxidantes (Sabatini et al. 2009). Estas situaciones generadoras de estrés oxidativo también pueden ser de tipo estacional; se han informado cambios en el metabolismo de los radicales libres en ectotermos marinos (Wilhelm Filho et al. 2001), incluyendo peces ciclídeos, poliquetos de estuarios (Abele-Oeschger et al. 1994; Geracitano et al. 2004; Keller et al. 2004) y moluscos (Malanga et al. 2007). Algunos de los efectos están mediados por la liberación de ROS causando estrés oxidativo adicional (Mittler, 2002).

1.6. Sistema de defensa antioxidante

Los sistemas biológicos durante su evolución desarrollaron mecanismos antioxidantes adecuados, enzimáticos y no-enzimáticos, para proteger los componentes celulares del daño oxidativo. Según Halliwell & Gutteridge (1999), un antioxidante es cualquier sustancia que, a bajas concentraciones en comparación con un sustrato oxidable, disminuye significativamente o inhibe la oxidación. Existen numerosas estrategias en biología para evadir el estrés oxidativo. La prevención de la iniciación de las reacciones en cadena incluye la quelación de los iones metálicos, en particular el Fe y Cu. La quelación del metal es el medio principal para controlar la peroxidación y la fragmentación del DNA. Además, la unión del metal a proteínas tales como Ft, transferrina, ceruloplasmina y metalotioneína, es de gran importancia en el control de reacciones generadoras de radicales. Otra estrategia es disminuir las reacciones redox dependientes de iones metálicos modificando el potencial de los sitios activos (Sies, 1997). Un objetivo biológico de importancia es la transferencia de radicales desde sitios sensibles hacia otros compartimentos celulares en los cuales la oxidación puede ser menos deletérea. En general, implican transferencias de estas especies químicas desde la fase hidrofóbica a la fase acuosa, por ejemplo, desde la membrana al citosol. Biológicamente, es más eficiente tener antioxidantes que combinen propiedades óptimas para estos dos objetivos; primero ser capaces reaccionar con los radicales libres iniciales, tales como los $LROO^{\bullet}$ en proporciones sustanciales; en segundo lugar, deben ser capaces de interactuar con compuestos solubles en fase acuosa (Sies, 1997), para regenerar el antioxidante.

Los sistemas antioxidantes en algas y plantas que pueden secuestrar ROS, incluyen moléculas tales como carotenoides, tocoferoles, ascorbato (AH^{-}), glutatión reducido (GSH), y enzimas antioxidantes (Foyer et al. 1994a). Los antioxidantes enzimáticos involucran la actividad de las enzimas SOD, catalasa (CAT), ascorbato peroxidasa (APX), monodehidroascorbato reductasa (MDHAR), dehidroascorbato reductasa (DHAR) y glutatión reductasa (GR) (Gill et al. 2011; Mittler et al. 2004). La SOD es una metaloproteína que cataliza la dismutación del $O_2^{\bullet-}$ a H_2O_2 . Esta reacción reduce el riesgo de formación de $^{\bullet}OH$ a través de reacciones catalizadas por metales como la reacción de Haber-Weiss. Esta enzima puede hallarse en diferentes localizaciones celulares. Por ejemplo, Cu/Zn SOD es una enzima presente en el citosol, cloroplastos y peroxisomas de células eucarióticas; también está presente en bacterias y como enzima extracelular (Sandalio & del Río, 1988; Halliwell & Gutteridge, 1999). La Fe-SOD se encuentra en cloroplastos y bacterias y la forma Mn-SOD principalmente en mitocondrias y bacterias (Asada & Takahashi, 1987; Halliwell & Gutteridge, 1999). Otra enzima indispensable para la detoxificación de ROS es la CAT; es una metaloenzima que reacciona por dismutación específicamente con el H_2O_2 , cuyo producto es H_2O y O_2 (Garg & Manchanda, 2009). La APX también forma parte del sistema de defensa antioxidante enzimático en algas, plantas y otros organismos. Reacciona con H_2O_2 en medio acuoso; también

actúa en los ciclos AH^- -GSH y utiliza AH^- como dador de e^- (Sarvajeet & Narendra, 2010).

El AH^- es el antioxidante hidrosoluble más abundante y poderoso capaz de prevenir o minimizar el daño generado por las ROS en plantas (Smirnoff 2005; Athar et al. 2008) siendo su papel fundamental la remoción de H_2O_2 (Foyer, 1993). En plantas, el AH^- está presente en altas concentraciones en los cloroplastos, el citosol, las vacuolas y el espacio apoplástico de las células de las hojas (Polle et al. 1990; Foyer et al. 1991). Por otra parte, los organismos acuáticos marinos contienen una gran variedad de antioxidantes hidrosolubles, entre ellos el AH^- . Este antioxidante tiene un potencial de oxidación bajo que le permite donar un e^- a la mayoría de los radicales libres presentes en los sistemas biológicos y también puede reducir a los atrapadores de radicales biológicos tales como el α -T (Vergely et al. 1998). La Figura 4 muestra la formación del radical ascorbilo (A^\bullet) como el intermediario en la oxidación del AH^- a deshidroascorbato (DHA) (Hubel et al. 1997). Esta especie posee un e^- desapareado en el sistema π deslocalizado otorgándole estabilidad como un “pequeña molécula antioxidante terminal” (Buettner, 1993).

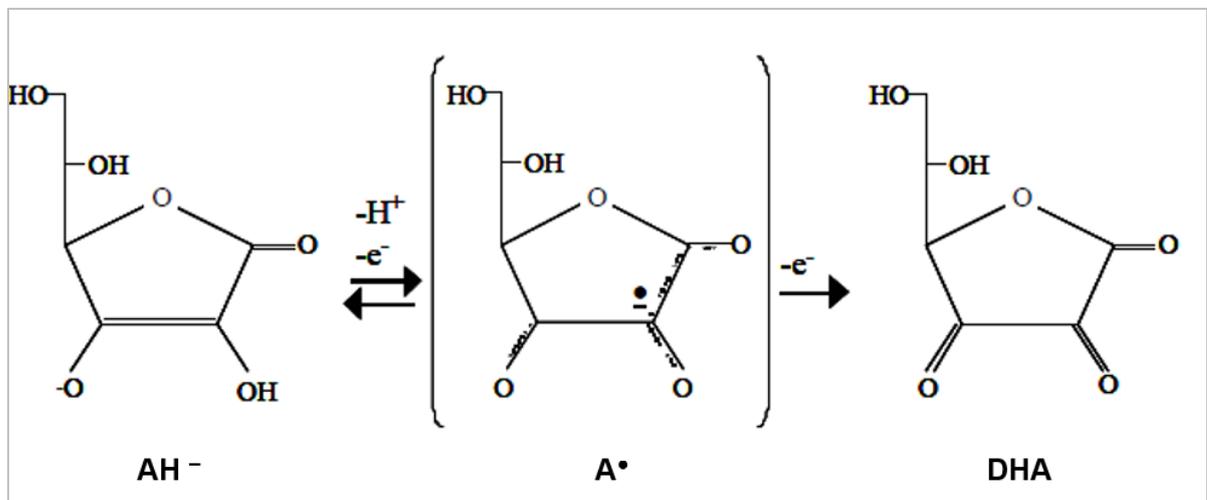


Figura 4. Reducción del AH^- a DHA con formación del radical A^\bullet como intermediario de reacción. Tomado de Malanga et al. (2012).

Los tocoferoles son antioxidantes liposolubles considerados como los potenciales secuestrantes de las ROS y radicales lipídicos más activos (Hollander-Czytko et al. 2005). Son considerados los antioxidantes más importantes en las membranas, pero también cumplen otras funciones metabólicas. El mecanismo por el cual protegen la estabilidad de la membrana, incluye la quelación o eliminación de ROS del tipo 1O_2 . En plantas, estos antioxidantes están presentes en las membranas tilacoides de los cloroplastos. Se han encontrado 4 tocoferoles isómeros (α ; β ; γ ; δ), siendo el α -T el de mayor actividad por la presencia de tres grupos metilos en su estructura molecular (Kamal-Eldin & Appelqvist, 1996) (Figura 5).

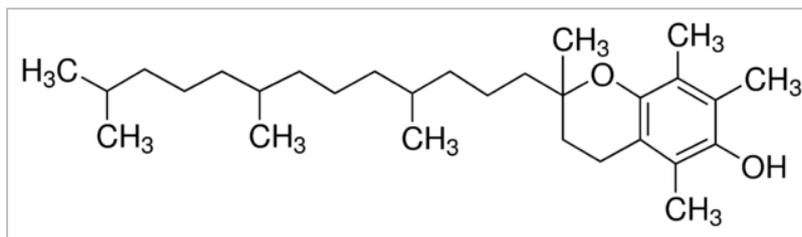


Figura 5. Estructura química del α -T; antioxidante liposoluble presente en animales, plantas y microalgas.

La información que se conoce en diferentes sistemas sugiere que cuando el contenido de AH^{\cdot} está afectado por condiciones pro-oxidantes la relación del contenido A^{\cdot}/AH^{\cdot} puede utilizarse como un indicador general de estrés oxidativo en medio hidrofílico (Kozak et al.1997; González et al. 2008). Dicha relación puede utilizarse como un balance entre el daño producido por radicales libres y la protección antioxidante (Galleano y col., 2002). Por ejemplo, Malanga et al. (2009) encontraron que la relación A^{\cdot}/AH^{\cdot} decreció un 66% en gónadas de *Loxechinus albus* colectados en verano, comparados con valores obtenidos a partir de erizos colectados en invierno. Por otra parte, en fase lipídica, los índices del contenido de LR^{\cdot} /contenido de α -T y contenido de LR^{\cdot} /contenido β -C, reflejan el estado oxidativo en medio lipofílico; dando un diagnóstico rápido y simple de estrés (Galleano et al. 2002; González et al. 2016).

1.7. Empleo de Resonancia Paramagnética Electrónica (EPR) para la determinación de radicales libres

Debido a la inherente inestabilidad y reactividad de las ROS y sus bajos niveles en estado estacionario, el análisis es una tarea muy difícil (Jakubowski & Bartosz, 2000). Tanto los e^{\cdot} , como los protones (H^+), tienen 2 estados cuánticos, por lo tanto, dos orientaciones frente a un campo magnético (β) (Eisenberg & Crothers, 1979); la energía del espín nuclear y electrónica depende de la orientación del campo magnético. Mediante la aplicación de un β alternante a una frecuencia correcta, se puede inducir la resonancia entre 2 estados. Cuando el e^{\cdot} se alinea con el β , entra en resonancia, y puede captar o ceder energía. Entonces, la absorción resultante de energía del β aplicado será la señal de la muestra en espectroscopia de EPR. Mediante el empleo de la técnica de EPR, sólo se determina la presencia de sustancias paramagnéticas, tales como radicales libres, sustancias con estados tripletes e iones paramagnéticos.

La mayoría de los radicales contienen uno o más átomos con núcleos magnéticos; un e^{\cdot} desapareado en un radical fragmentado es apto para interactuar con los campos internos de acuerdo con los momentos dipolares magnéticos nucleares, así también como con el β aplicado. Este fenómeno es llamado "interacción nuclear hiperfina". Esta interacción resulta en un desdoblamiento de las

líneas de resonancia en 2 o más componentes llamadas desdoblamiento hiperfino. La Figura 6, muestra como ejemplo, el espectro de EPR obtenido para la detección de A^\bullet en una solución de AH^- que contiene $FeSO_4$ a $pH = 7,8$. El espectro obtenido es un doblete; los parámetros espectroscópicos obtenidos son $g = 2,005$ y $a_H = 1,8$ G, consistente con el espectro de A^\bullet .

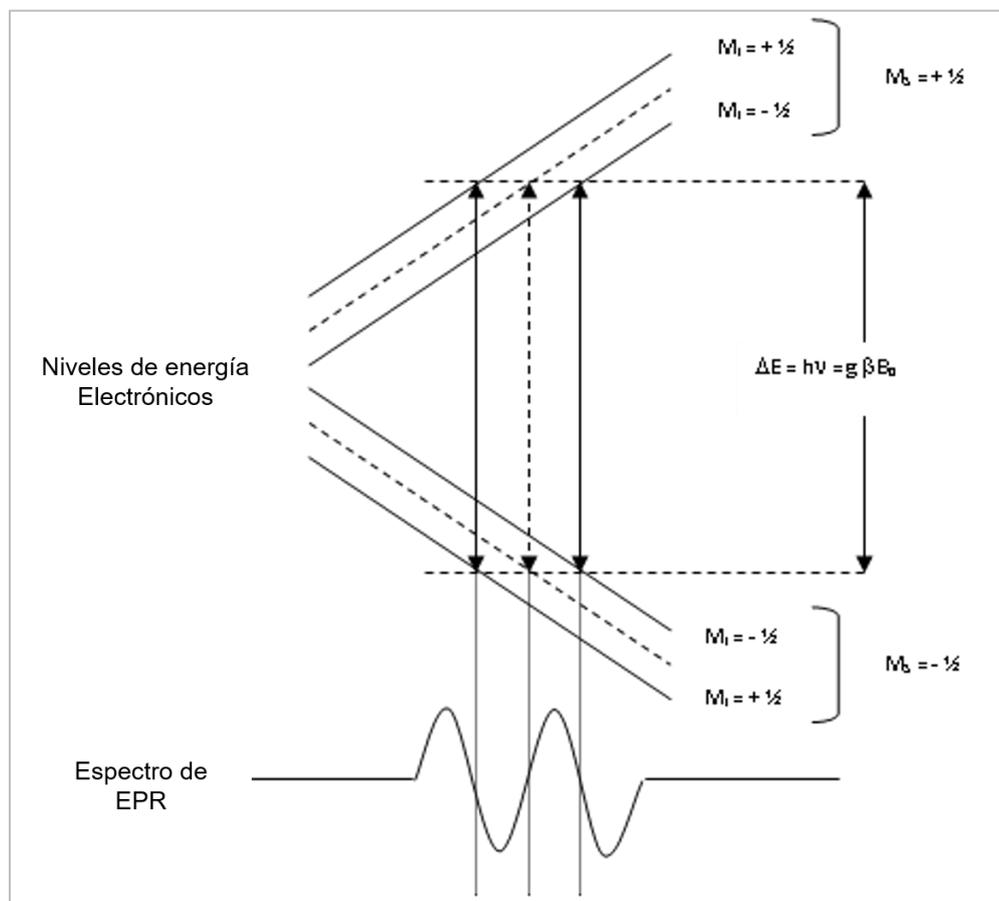


Figura 6. Espectro típico de EPR correspondiente a 2 mM de solución de AH^- en solución amortiguadora de fosfato ($pH 7,8$) con $100 \mu M$ EDTA y $10 \mu M$ $FeSO_4$. Parámetros espectrales: $g = 2,005$ y $a_H = 1,8$ G (Buettner & Jurkiewicz 1993).

La limitante de la observación directa por EPR es la concentración de los radicales libres. Alrededor de 10^{-13} moles de sustancias paramagnéticas proveen una señal medible, de manera que esta técnica es una de las herramientas espectroscópicas más sensibles (Eisenberg & Crothers, 1979). En la práctica, puede dificultarse la detección de los radicales libres en algunos sistemas biológicos por su gran reactividad y corta vida media. Esta característica hace que las determinaciones por EPR sean problemáticas en ausencia de atrapadores de espín.

Para retener intermediarios de corta vida media en concentraciones constantes durante períodos relativamente largos para realizar medidas de EPR, se utilizan generalmente las siguientes herramientas: i) atrapadores, que generalmente

son especies reactivas que secuestran radicales libres en matrices no-reactivas; ii) procedimientos regenerativos, que producen estados estacionarios dinámicos cuyas concentraciones estacionarias pueden mantenerse por períodos prolongados de tiempo; y iii) métodos rápidos de perturbación que pueden repetirse cíclicamente cuando sólo se busca información cinética de EPR (Malanga & Puntarulo, 2012). Las especies químicamente reactivas pueden atraparse si forman matrices deshidratadas, muestras sólidas, solventes apróticos o apolares, y a bajas temperaturas o bajo condiciones que supriman las reactividades características. También se forman especies radicales estables adicionando moléculas-atrapadoras de espín exógenas que reaccionan primariamente con los radicales libres para dar aductos radicales con tiempos de vida media más largos y con espectros de EPR característicos. Estos atrapadores de espín generalmente son nitróxidos o nitrona-derivados que reaccionan con biomoléculas lábiles (Borbat et al. 2001). Para determinar $\cdot\text{OH}$ o $\text{LR}\cdot$, a temperatura ambiente, generalmente se emplean atrapadores de espín. En casos de detección de NO, se trabaja a baja temperatura. La cuantificación por EPR requiere ciertos cuidados, y es importante señalar que se consiguen cuantificaciones relativas.

1.8. Diseños experimentales para el estudio de efectos ambientales

El análisis de los efectos de cambios ambientales se puede realizar sobre diferentes objetos de estudio, considerando distintos niveles de investigación: observaciones a campo o *in situ*; microcosmos y laboratorio (Figura 7). En cada uno de estos niveles se pueden controlar diferentes variables que llevarán a conclusiones que abarcan desde interacciones ecológicas hasta mecanismos intracelulares. En los estudios a campo no se controlan las variables ambientales, se pueden dar efectos sinérgicos o antagónicos sobre los organismos ya que pueden ocurrir múltiples exposiciones a tóxicos, por lo tanto, sólo se puede estudiar lo que está ocurriendo en ese momento en el sistema. Sin embargo, en este tipo de protocolos los resultados son ecológicamente más representativos que en otros tipos de estudios. Para realizar investigaciones relacionadas con efectos de cambios en parámetros ambientales sobre el plancton, los microcosmos representan una posibilidad intermedia entre estudios realizados en el laboratorio y aquellos, más complejos, en el medio natural. Son ecosistemas artificialmente creados con condiciones similares a las naturales, pero definidos como tanques de 100 l que contienen la comunidad planctónica representativa que se pretende estudiar. De esta manera, es posible estudiar la estructura y función de cada nivel trófico, así como la interacción entre una gran cantidad de especies y determinar además el impacto de cambios ambientales en ecosistemas marinos. Al igual que cualquier diseño experimental, el análisis empleando microcosmos tiene limitaciones, siendo los problemas de escala los de mayor importancia (Carpenter, 1996). Sin embargo,

es un diseño que permite el estudio de factores sinérgicos entre comunidades que serían imposibles de determinar en el laboratorio o en estudios *in situ* (Huston, 1999). Por otro lado, el trabajo en laboratorio se caracteriza por el control de las variables de experimentación, tales como concentraciones, tiempos de exposición, etc. De esta manera, es posible dilucidar los mecanismos de acción de los xenobióticos investigados, así como estimar la concentración o dosis en la que la sustancia produce los efectos adversos (González et al. 2015).

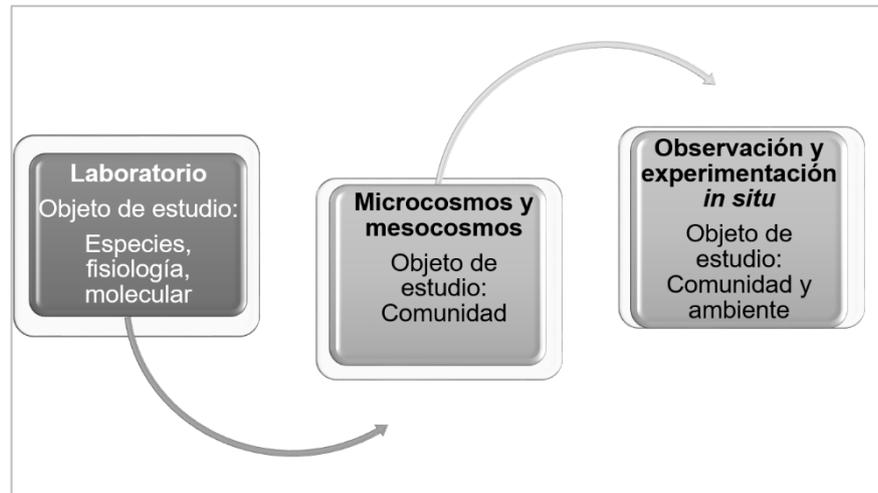


Figura 7. Diferentes niveles para abordar los estudios ecológicos en una comunidad fitoplanctónica.

Estos diferentes tipos de estudios son importantes ya que, en su conjunto, y logrando combinarlos, nos permiten tener una aproximación a la realidad de los sistemas biológicos expuestos a variaciones ambientales naturales y antropogénicas, y entender los efectos perjudiciales sobre los mismos.

1.9. Hipótesis y objetivo

Hipótesis: La hipótesis de trabajo es que tanto el contenido de Fe como los cambios en la salinidad asociados al cambio climático, llevan a alteraciones en la composición de las comunidades fitoplanctónicas antárticas. Estas alteraciones del ambiente marino, actúan como agentes estresores que conducen a modificaciones en el metabolismo celular, alterando la fisiología y la bioquímica de las células microalgales.

Objetivo General: El objetivo del siguiente trabajo es obtener información sobre el efecto del Fe y la salinidad en diatomeas antárticas empleando estudios en distintos niveles (laboratorio, microcosmos y experimentación *in situ*); a fin de contribuir y proponer bases para el diseño de una estrategia que permita una solución práctica y ecológica para regular la producción de CO₂ en la atmósfera e incrementar la producción primaria en el Océano Atlántico Sur.

Objetivos específicos:

Objetivo 1: Caracterizar el crecimiento y la fisiología de las microalgas, picoplancton y diatomeas, en cultivos independientes en condiciones de laboratorio. Estudiar en laboratorio, el efecto del aumento del Fe en el medio de cultivo sobre los parámetros fisiológicos y oxidativos en cultivos de diatomeas *Porosira glacialis*.

Objetivo 2: Estudiar una comunidad fitoplanctónica antártica en microcosmos. Evaluar las condiciones fisiológicas y la respuesta antioxidante generada por la producción de especies ROS.

Objetivo 3. Estudiar la comunidad fitoplanctónica antártica *in situ*. Evaluar las condiciones fisiológicas y la respuesta antioxidante generada por la producción de ROS.

2. Materiales y Métodos

2.1. Material biológico

Se trabajó con una comunidad fitoplanctónica antártica, compuesta principalmente por diatomeas, aisladas de zonas que presentan diferente salinidad.

Los estudios en laboratorio se realizaron con diatomeas pertenecientes a la especie *Porosira glacialis* (alga eucariota unicelular perteneciente a la clase Bacillariophyta) procedente de comunidades microalgales aisladas en diferentes campañas antárticas y con picoplancton proveniente de la misma zona.

2.2. Sitio de muestreo

Las muestras de poblaciones naturales de la zona Antártica, fueron obtenidas en la Caleta Potter (Base Científica Carlini, ex Teniente Jubany, 62°14'S-58°38'W en la Isla 25 de Mayo en la Península Antártica), (Figura 8A-B) con muestreos superficiales utilizando botella Niskin y red fitoplanctónica (20 µm). Las comunidades Antárticas y los experimentos en microcosmos fueron realizados durante la campaña antártica 2011/12. El sitio E1 corresponde al punto más cercano al glaciar y el sitio E2 a un punto más alejado.

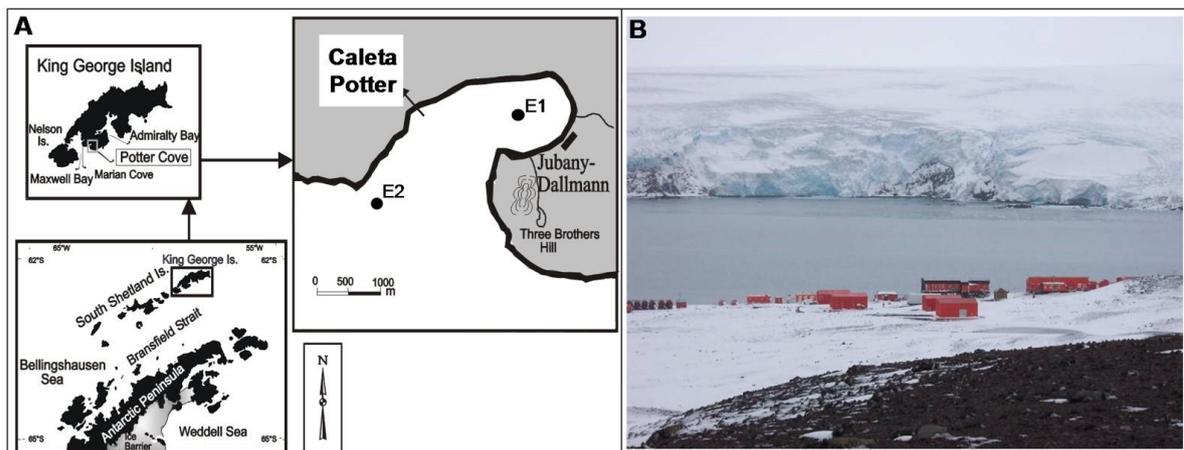


Figura 8. Ubicación geográfica de la Base Científica Carlini, ex Teniente Jubany. **A:** Zonas de muestreo, una cercana al glaciar (E1) y otra lejana al mismo (E2). Tomada de Malanga (2001). **B:** Foto de la Caleta Potter y la Base Carlini. Gentileza de la Dra. PM. González.

2.3. Experimentos a campo y en microcosmos

El estudio de la comunidad microalgal antártica, se realizó *in situ*, en los sitios E1 y E2 ubicados en la Caleta Potter, señalados en la Figura 8A, donde se encontraron diferencias de salinidad por derretimiento del glaciar. Se tomaron

muestras de fitoplancton y se realizaron perfiles de la columna de agua a diferentes profundidades desde la superficie hasta los 30 m, en los cuales se determinaron valores de temperatura, salinidad y turbidez utilizando una sonda multiparamétrica Seabird CTD (19 plus V2).

La Figura 9 muestra la configuración de los microcosmos. Se utilizaron 6 tanques de polietileno de 100 l que fueron lavados previamente con HCl diluido, 0,02 M, y enjuagados con agua destilada. Se tomó agua de mar a 5 m de profundidad de la zona más alejada de la Caleta Potter. La muestra fue filtrada a través de una malla Nitex dispuesta con un distribuidor en el agua para evitar el paso de mesozooplancton y organismos más grandes. Cada tanque se tapó con film entre las 23:00 h y las 7:00 h del día siguiente y durante las tormentas con el fin de evitar contaminación con partículas de polvo que puedan ingresar en los microcosmos durante la noche e interfieran con la transparencia del agua necesaria para la adecuada penetración de la luz solar. No se adicionaron nutrientes al agua. Cada 8 h se midió la temperatura y la salinidad con un conductímetro Horiba U-10 (Kyoto, Japan). La temperatura se mantuvo durante el experimento en $1,0 \pm 0,7^{\circ}\text{C}$. Para lograr este objetivo, los microcosmos se colocaron dentro de un tanque de acero inoxidable de mayor volumen con agua, conectado a una bomba de agua de mar (Marca Lowara, origen Italia), bombeando agua costera de 4 a 6 m de profundidad, según las mareas y aproximadamente a 25 m de la costa.



Figura 9. Disposición de los microcosmos en la zona costera de estudio. Gentileza Dr. M. Hernando.

2.4. Cultivos en laboratorio

Las células fueron aisladas de forma manual según métodos ficológicos estándar. Estas células provenientes de Caleta Potter, Isla 25 de Mayo/King-George ($62^{\circ} 14'S$, $58^{\circ} 38' W$) fueron cultivadas en medio f-2 (Guillard, 1973) (Figura 10).

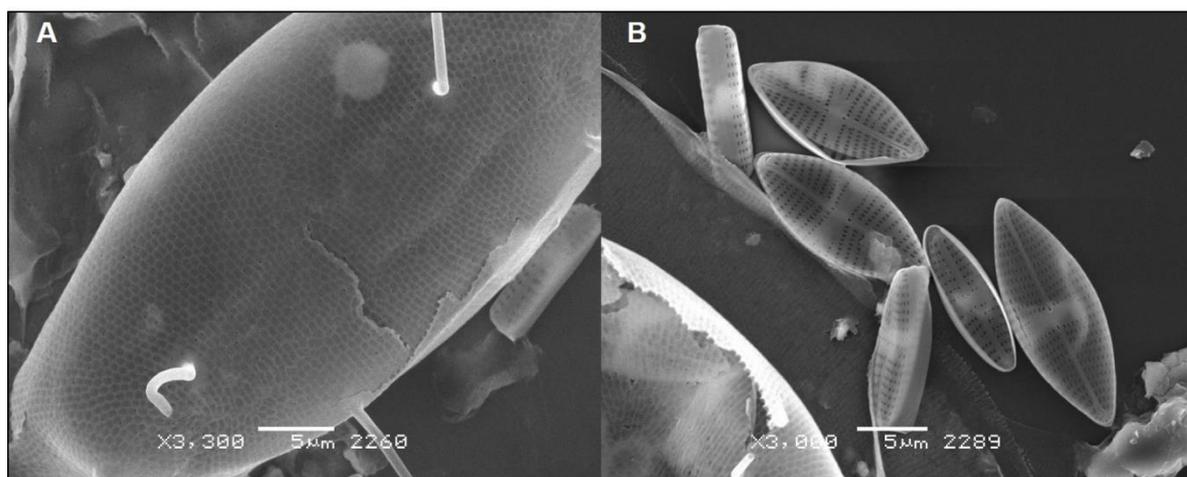


Figura 10. Microscopía electrónica de las principales diatomeas identificadas. **A:** Diatomeas céntricas grandes *Odontella weissflogii*, *Chaetoceros tortissimus/sociales*, *Thalassiosira antártica*, *Porosira sp.* **B:** Diatomeas pennadas pequeñas *Navicula glaciei*, *Navicula perminuta*, *Nitzschia sp.* Tomada de Hernando et al. (2013).

El medio de cultivo se preparó a partir de 1 l de agua de mar filtrada en filtro Whatman GF/F 47 mmØ; con posterior adición de 1 ml de soluciones de macronutrientes, 1 ml de solución Stock secundaria 1 y 0,5 ml de solución Stock secundaria 2. Estas soluciones fueron preparadas en agua ultra pura en las proporciones que se señalan en la Tabla I. A la solución Stock Secundaria 1 de micronutrientes se le adicionó solución de Fe:EDTA preparada a partir de 4,36 g EDTA/l y 3,15 g $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ /l en agua ultra pura.

Solución	Soluto	Concentración % (m/v)
Macronutrientes	NaNO_3	7,5
	$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,5
	$\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$	3,0
Micronutrientes (Solución Stock Secundaria 1)	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,96
	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2,20
	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1,05
	$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	18,0
	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,63
Solución Stock secundaria 2	Biotina	0,1
	Vitamina B12	0,1
	Tiamina HCl	0,02

Tabla I. Composición del medio de cultivo f-2.

2.4.1. Condiciones de cultivo

Los cultivos fueron realizados por inoculación de una especie de diatomea: *Porosira glacialis* y picoplancton en medio f-2 a 4°C y bajo ciclos luz-oscuridad de 12:12 h. La temperatura fue seleccionada sobre la base de los datos registrados en el hábitat natural. La irradiancia de luz fotosintéticamente activa en la superficie de los cultivos fue de 38 W m⁻² provista por una lámpara fluorescente Philips 40-W adecuada para el crecimiento del fitoplancton.

2.5. Diseño experimental

2.5.1. Índices de crecimiento celular

El crecimiento se evaluó mediante la determinación del contenido de clorofila por espectrofotometría, y el recuento celular. Para el recuento celular se utilizó el método de sedimentación descrito por Utermöhl (1958) mediante el uso de un microscopio invertido. El principio de esta técnica consiste en dejar sedimentar la muestra en un cilindro de sedimentación, de manera tal que después de un cierto tiempo (24 h) se puede asumir que todos los microorganismos presentes en la muestra se encuentran en la base de vidrio de la cámara. El cilindro, que tiene una altura menor que la distancia focal del condensador, se separa de la cámara para permitir la observación de las algas con el microscopio invertido.

2.5.2. Velocidad de crecimiento celular

La velocidad de crecimiento instantánea celular se determinó de acuerdo a la Ecuación 1:

$$\mu_{\text{instantánea}} = \ln(N_i/N_{i-1})/(t_i - t_{i-1}) \quad \text{Ecuación 1}$$

donde μ es la constante de velocidad específica; t_i es el tiempo de la medida; t_{i-1} es el tiempo previo; N_i es la concentración celular al tiempo t_i y N_{i-1} es la concentración celular al tiempo t_{i-1} .

2.5.3. Determinación del contenido de Chla

Las muestras de campo y provenientes de microcosmos, fueron filtradas a través de filtros (Whatman GF/F, 25 mm) y posteriormente los pigmentos fueron extraídos con 10 ml de metanol absoluto en oscuridad a 4°C (Holm-Hansen &

Riemann, 1978). Una vez extraída la Chla, las muestras se agitaron, se centrifugaron, y se midió la fluorescencia del extracto antes y después de la acidificación con HCl 1M. En el caso de los cultivos de laboratorio, el contenido de Chla fue determinado espectrofotométricamente de acuerdo a la técnica modificada de Philips et al. (1992). Las células se cosecharon por centrifugación de 3 ml de cultivo a las cuales se les adicionó 0,5 ml de acetona 90% en MgCO₃ 1 %; se sonicaron 30 segundos y se completó el volumen de 1 ml de acetona al 90%. Posteriormente se mezcló en vortex y se incubó durante 2 h a 4 °C en oscuridad. Dicho homogeneizado se centrifugó a 4°C, durante 20 min a 10.800 x g. El contenido de Chla fue determinado en el sobrenadante resultante antes y después del agregado de 100 µl de HCl 0,1 M en espectrofotómetro a $\lambda = 665$ nm y $\lambda = 750$ nm.

2.5.4. Determinación de respiración (R) y fotosíntesis neta (Fn)

La R celular, definida como velocidad de consumo de O₂ por unidad de tiempo, y la Fn, definida como la velocidad de producción de O₂ por unidad de tiempo, de la comunidad planctónica fueron medidas según Cole (1974). La concentración de O₂ disuelto fue determinada siguiendo el método modificado de Winkler (Labasque et al. 2004) utilizando botellas de 250 ml para demanda bioquímica de oxígeno claras, que permiten el ingreso de la radiación fotosintéticamente activa (PAR) y oscuras, que no lo permiten. Tres (3) réplicas para cada tratamiento fueron incubadas durante 6 h.

2.6. Determinaciones bioquímicas

2.6.1. Determinaciones específicas de parámetros de estrés oxidativo

2.6.1.1. Determinación de la producción de ROS mediante la velocidad de oxidación de 2'-7' diacetato de diclorofluoresceína (DCFH-DA)

El uso de DCFH-DA ha permitido acceder a medidas indirectas de la producción de ROS en numerosos sistemas biológicos (Malanga et al. 2001; 2015) La DCFH-DA es una molécula estable, que al ser oxidada por diferentes ROS (Zhu et al. 1994) se convierte en un producto fluorescente. Las células se recolectaron por centrifugación y fueron incubadas durante 30 min a 37°C, en 2 ml de solución reguladora Tris-HCl 40 mM, pH 7,0, en presencia de DCFH-DA 5 µM. Luego se centrifugó 4 min a 10.800 x g a temperatura ambiente, se tomó el sobrenadante y

se midió la fluorescencia en un espectrofluorómetro Hitachi ($\lambda_{exc}= 488 \text{ nm}$, $\lambda_{em}= 525 \text{ nm}$). Para corregir por autofluorescencia, en cada experimento, se incluyó un blanco paralelo consistente en la mezcla de reacción sin muestra.

2.6.1.2. Detección de A^\bullet por EPR

La determinación del A^\bullet se realizó por la técnica de EPR según Kozak et al. (1997) con modificaciones. Las células se cosecharon por centrifugación de 5 ml de cultivo. Se descartó el sobrenadante y al pellet obtenido se adicionaron 167 μl de dimetil-sulfóxido (DMSO). Luego se transfirió a una pipeta Pasteur y se efectuó la medida en un espectrómetro Bruker ECS 106 (Figura 11). Los espectros fueron obtenidos bajo las siguientes condiciones: $g= 2,005$, $a_H=1,8 \text{ G}$, número de escaneos 3; frecuencia de modulación 50 kHz; poder de microonda 20 mW; amplitud de modulación 1 G; constante de tiempo 655 ms; ganancia 1.10^5 ; frecuencia de microonda 9,81 GHz; Intervalo de escaneo 0,18 G/s. La cuantificación se realizó con 2,2,6,6-tetrametilpiperidina-N-oxil (TEMPOL) 1,965 mM como estándar (Kotake et al. 1996).

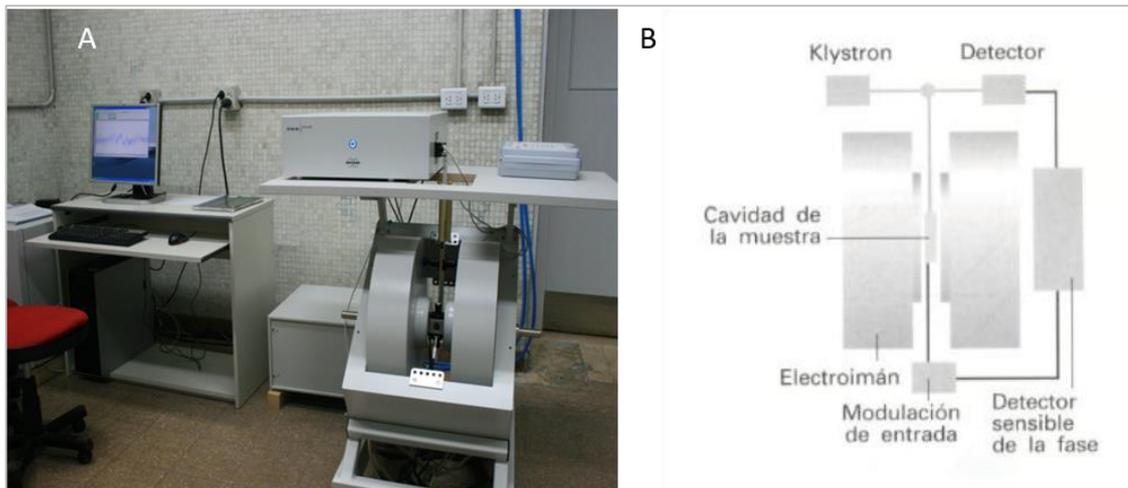


Figura 11. Equipo de EPR. **A:** Espectrómetro compuesto por un electroimán que rodea la cavidad donde se coloca la muestra y el detector que capta la señal espectrométrica. **B:** Esquema del equipo.

2.6.2. Determinación del daño oxidativo a lípidos

La oxidación de lípidos en el fitoplancton fue determinada midiendo el contenido de las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) según Malanga & Puntarulo (1995). Las células se obtuvieron por filtración de 5 y 50 ml para los cultivos y la muestra de la comunidad microalgal, microcosmos e *in situ*, respectivamente. Se homogenizaron en 1 ml de solución reguladora de fosfato 50

mM, pH=7. Posteriormente, se centrifugó a $600 \times g$ a 4°C durante 10 min. Se tomaron 0,5 ml del sobrenadante y se adicionaron 0,2 ml de dodecilsulfato de sodio (SDS) 3% (m/V), 0,05 ml de butil-hidroxitolueno (BHT), 4% (V/V) en etanol con posterior agitación en vortex. Se adicionaron 2,0 ml de HCl 0,1 M; 0,3 ml de ácido fosfotúngstico 10% (m/V) y 1,0 ml de ácido 2-tiobarbitúrico (TBA) 0,7% (m/V), se homogenizó y se incubó a 100°C durante 45 min. Una vez alcanzada la temperatura ambiente, se adicionaron 5,0 ml de butanol, se mezcló en vortex durante 1 min y se centrifugó durante 10 min. Se tomó la fase orgánica superior y se midió la fluorescencia a $\lambda_{\text{exc}}=515 \text{ nm}$ y $\lambda_{\text{em}}=555 \text{ nm}$ en un espectrofluorómetro HITACHI F-3010. Los resultados se expresaron como nmol TBARS (10^4 cel^{-1}).

2.6.3. Detección de LR*

Los LR* se determinaron según el método descrito por Malanga & Puntarulo (2012). Se centrifugaron alícuotas de 2 ml de cultivo. Se descartó el sobrenadante y al pellet de células se le adicionaron 150 μl de atrapador PBN 40 mM, en DMSO preparado en el momento de ser utilizado. Las lecturas fueron realizadas a temperatura ambiente alrededor de 17°C . Las condiciones de operación del equipo frecuencia de modulación 50 kHz; poder de microonda 20 mW; amplitud de modulación 1,232 G; constante de tiempo 81,92 ms; ganancia $1 \cdot 10^4$; frecuencia de microonda 9,81 GHz; Intervalo de scan 0,18 G/s; campo 3515 G. Los LR* combinados con el atrapador tienen un espectro característico cuya constante de acoplamiento hiperfina es $a_{\text{H}} = 2,6 \text{ G}$ y $a_{\text{N}} = 15,8 \text{ G}$. Para la cuantificación se utilizó TEMPOL 1,965 mM según Kotake et al. (1996).

2.6.4. Determinación de antioxidantes no enzimáticos

La determinación de antioxidantes liposolubles α -T y β -C y astaxantina (Ast) se realizó por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) según la técnica modificada de Desai (1984). Para la determinación del contenido de los antioxidantes α -T, β -C y Ast, se filtró una alícuota de 50 ml de microcosmos y muestras *in situ*; mientras que en el caso de los cultivos se analizó un pellet obtenido por centrifugación de un volumen de 5 ml muestra. Se adicionaron 0,25 ml de solución etanol:metanol (1:1) se mezclaron y se incubaron en hielo durante 30 min. Luego se agregó 1 ml de hexano y se agitó en vortex durante 1 min. Se incubó nuevamente en hielo durante 30 min. Pasado este período, los tubos se centrifugaron en equipo refrigerado durante 10 min a $400 \times g$. Se tomó una alícuota de 750 μl de la fase orgánica, y se procedió a evaporar el solvente con N_2 calidad industrial hasta llegar a sequedad. El material se resuspendió en solución etanol:metanol (1:1). A partir de la solución obtenida en la etapa de extracción se inyectaron 20 μl en el equipo de HPLC provisto con una columna Supercosil LC-18

15 cm x 4,6 mm ID, una bomba Perkin Elmer 250 LC, detector electroquímico ESA Coulochem II con celda analítica ESA modelo 5011 con un potencial aplicado +0,6 V. La corrida se realizó con una fase móvil isocrática de metanol:H₂O (97:3) y LiClO₄ 2,13 g l⁻¹. La cuantificación de los antioxidantes se realizó empleando los estándares de α -T (Sigma T-3251), β -C (Sigma C-9750) y Ast (Sigma A-9335) (Figura 12).

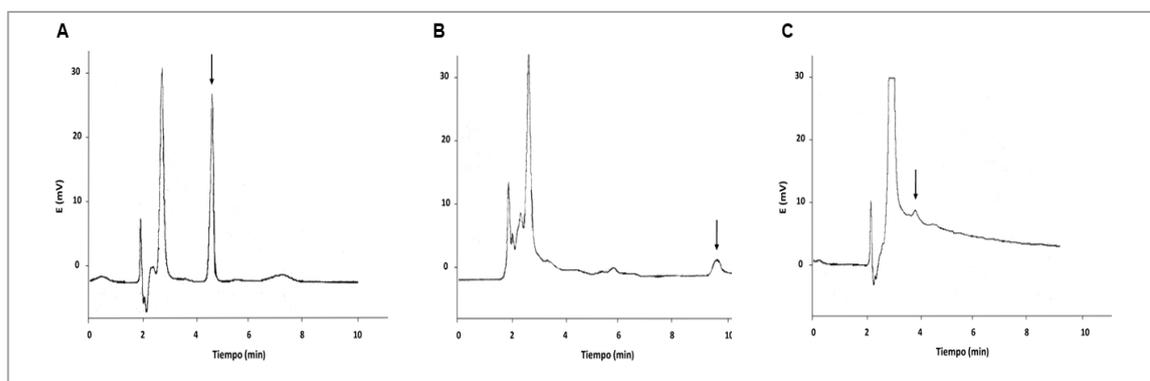


Figura 12. Cromatogramas de estándares de antioxidantes liposolubles analizados por HPLC. **A:** Espectro de α -T, tiempo de retención (T_R) 4,487 min; área 781264, Concentración: 86,6 μ M. **B:** Espectro de β -C, T_R : 8,803 min; área: 63456, Concentración: 24,6 μ M. **C:** Espectro de Ast, T_R : 3,6633 min; área: 154246, Concentración: 74,1 μ M.

2.6.5. Determinación del contenido de $AH^{\cdot-}$ por HPLC

Se trabajó con la técnica modificada descrita por Malanga et al. (2009). Los homogeneizados preparados a partir de muestras se realizaron en ácido metafosfórico (MPA) calidad HPLC 10% (v/v). En el caso de las algas obtenidas en cultivo, en condiciones de laboratorio, se centrifugaron 5 ml de cultivo a 4°C; se descartó el sobrenadante y sobre el pellet se adicionaron 208 μ l de MPA al 10% (m/v). De manera inmediata se congelaron a -80°C y se conservaron en estas condiciones por un período de 1 mes. Los homogeneizados de cultivos algales se sonicaron y se centrifugaron nuevamente a 4°C a 10.800 x g por 10 min en microtubos con membrana PVDF de 0,22 μ m para microcentrifuga. Se inyectaron en el HPLC 25 μ l del producto de centrifugación. La cuantificación de $AH^{\cdot-}$ se realizó con una solución estándar de $AH^{\cdot-}$ de 1 mg/ml en MPA al 10% (m/v), que fue titulada por método directo por espectrofotometría UV-VISIBLE previa dilución 1:100, a una $\lambda = 265$ nm ($\epsilon_{AH^{\cdot-}} = 14,3$ mM⁻¹ cm⁻¹). El análisis por HPLC se realizó con una bomba Perkin Elmer 250 LC, a 0,8 ml/min y detector electroquímico ESA Coulochem II con celda analítica ESA modelo 501 (potencial aplicado +0.6 V). Se trabajó en fase reversa, con una columna Supercosil LC-18 (tamaño de partícula 3 μ m) 4,6 x 33 mm, modalidad isocrática (Kutnink et al. 1987). Se utilizó como fase móvil MPA al 0,8% (m/v).

2.7. Suplementación de los medios de cultivos con Fe

Para los estudios del efecto del Fe, los medios de cultivo fueron suplementados con Fe:EDTA (1:2) de manera tal que las concentraciones finales de Fe en el medio de cultivo fueran 12, 60, 100 y 300 μM . Los cultivos controles fueron suplementados con Fe:EDTA (1:2) hasta una concentración final de 12 μM . Las curvas de crecimiento fueron realizadas con agua libre de Fe (IFW) con adición de sales para medio f-2, como se indica en el punto 2.4 de esta sección.

Como tratamiento previo a la suplementación con las sales y el quelante; tanto el agua de mar como el agua ultra pura, fueron puestas en contacto con resina Chelex 100 (3 g l⁻¹), en agitación constante durante aproximadamente 24 h hasta alcanzar un pH=9; con el fin de extraer el Fe presente en el medio. Asimismo, todo el material de vidrio fue sometido a un lavado adicional empleando solución de HCl 0,02 M en agua IFW durante 12 h.

2.7.1. Determinación del contenido de Fe total intracelular

La cuantificación del contenido de Fe total en las células fue realizada espectrofotométricamente según la técnica modificada de Brumby & Massey (1967). Se tomaron 5 ml de cultivo algal, que se centrifugaron a 2.700 x g, durante 10 min a 4°C. Se descartó el sobrenadante y el pellet resultante fue lavado con IFW para eliminar restos de Fe proveniente del medio de cultivo, luego se centrifugó en las mismas condiciones que la alícuota de cultivo a 2.700 x g, durante 10 min a 4°C. Las células obtenidas fueron mineralizadas.

a. Mineralización

Los cultivos fueron mineralizados con el objetivo de eliminar la materia orgánica presente, según la técnica modificada de Du Laing et al. (2003). Se utilizaron crisoles de porcelana previamente lavados con solución de HCl 0,2 M y enjuagados con IFW. Las muestras fueron llevadas a una mufla (ORL Horno Eléctrico, Volts=220, kW=3, Amp=13), y sometidas a los siguientes cambios de temperatura: 40 min a 65°C, y 30 min a 100°C. Posteriormente, la temperatura se incrementó gradualmente de a 100°C cada 30 min hasta alcanzar una temperatura final de 500°C, que se mantuvo constante durante 30 min. Finalizada la calcinación y luego de enfriar los crisoles, las cenizas fueron resuspendidas en 0,6 ml de HCl 1 M.

b. Curva de calibración de Fe

Se realizó una curva de calibración a partir de una solución estándar 0,1229 M de Fe(NH₄)(SO₄)₂.6H₂O en IFW/H₂SO₄, pH=2,3, que recibieron el mismo

tratamiento de mineralización que se aplicó a las muestras. El material resultante fue resuspendido en 0,6 ml de HCl 1 M.

c. Titulación de Fe con estándar de ferrocina

Se tomaron 50 μ l de solución estándar de Fe reducida con TGA al 8% y 50 μ l de ferrocina (10 mM en $\text{H}_2\text{KPO}_4/\text{KCl}$) y se llevó a 1 ml en cubeta con solución de $\text{H}_2\text{KPO}_4/\text{KCl}$. Se leyó la absorbancia (Abs) en el espectrofotómetro (JASCO UV-visible 7850) a $\lambda=562$ nm.

d. Cuantificación

La cuantificación se realizó a partir de 150 μ l de resuspensión de muestra. Se adicionaron 100 μ l de IFW, 50 μ l de ácido tioglicólico (TGA) al 8% en IFW (V/V), se agitó en vortex durante 30 s; se adicionaron 600 μ l de acetato de sodio (NaAc) 1,63 M en IFW (pH=5,7) y 500 μ l de batofenantrolina sódica (BT) 40 mM en IFW. Se agitó en vortex y se leyó en espectrofotómetro (JASCO UV-visible 7850) a $\lambda=535$ nm. Para cada muestra se realizó un blanco de reactivo, que fue tratado igual que las muestras, manteniendo el orden de adición de reactivos, pero reemplazando el volumen de BT por solución de NaAc.

2.7.2. Determinación de LIP

La determinación del LIP se realizó por el método fluorométrico descrito por Robello et al. (2007). La detección del LIP por fluorescencia se basa en el uso de moléculas que sufren cambios de la señal emitida como resultado de su interacción con el LIP. La calceína (CA) (bis[N,N-bis(carboxymetil)aminometil] fluoresceína), que es la forma conjugada de la fluoresceína (Figura 13), con una estructura similar al EDTA, evidencia cambios en su fluorescencia ($\lambda_{\text{exc}}=485$ nm, $\lambda_{\text{em}}=535$ nm) cuando es expuesta a Fe soluble y lábil.

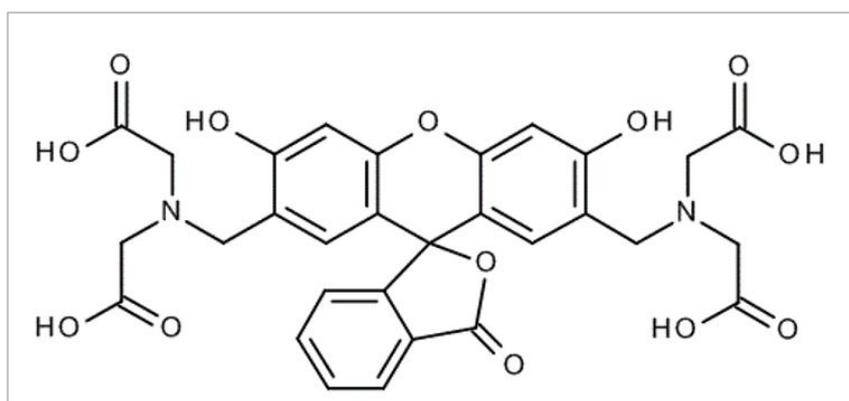
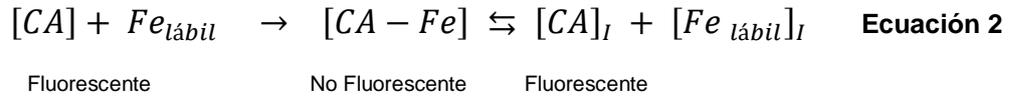


Figura 13. Estructura molecular de la CA.

La fluorescencia de la CA en solución es apagada eficientemente (más del 90%) al unirse en una relación 1:1 con el LIP (Espósito et al. 2002), formándose el complejo [CA-Fe] no fluorescente. Por lo tanto, parte de la CA total que permanece libre ([CA]_I) es la que continúa emitiendo fluorescencia (F₁) (Ecuación 2),



Sin embargo, dado que la disminución de la fluorescencia puede deberse a distintos factores (la composición del medio y la presencia de otras especies tales como Cu y Co capaces de unirse a la CA y apagar su fluorescencia); para evaluar la fracción de esta disminución asociada a la interacción [CA-Fe] se agrega un quelante de Fe específico, como el mesilato de deferroxamina (DF). Este quelante actúa secuestrando al Fe unido a la CA produciendo un incremento de la fluorescencia (a un nuevo valor F₂), donde ΔF = F₂ - F₁ resulta lineal con la concentración del LIP presente en el medio (Espósito et al. 2002) (Figura 14).

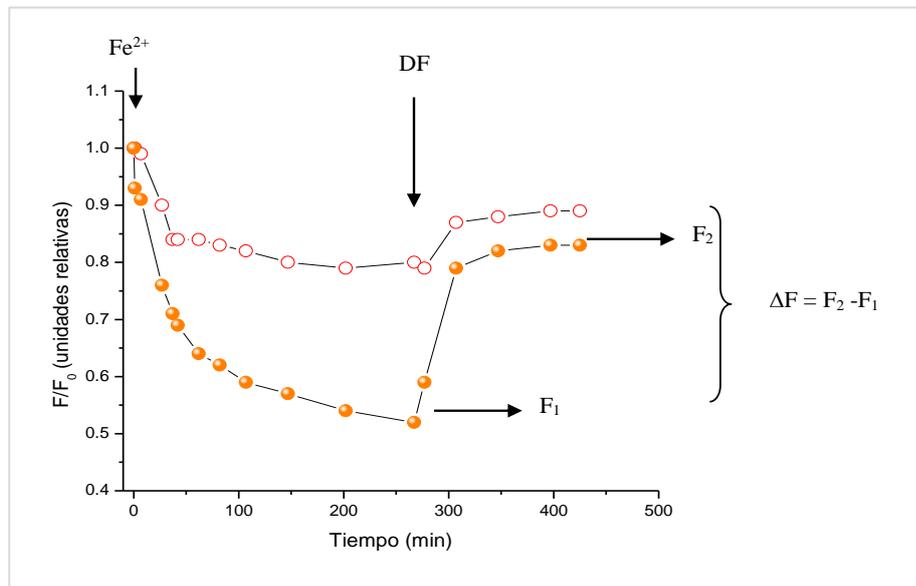
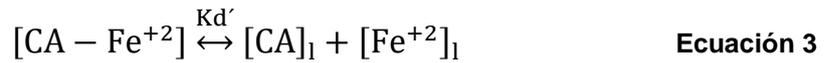


Figura 14. Evolución de la fluorescencia (expresada en unidades relativas) de la CA en presencia de Fe lábil y recuperación al agregar un exceso de un quelante específico de Fe (DF). —○— 0,1 μM Fe²⁺, 3 μM CA; —●— 1 μM Fe²⁺, 3 μM CA.

Para la cuantificación del LIP se debe considerar que la forma de la CA unida al Fe está en rápido equilibrio con el Fe⁺² libre ([Fe⁺²]) y con la CA libre (Epsztejn et al. 1997; Breuer et al. 1995; Espósito et al. 2002). Por lo tanto, se plantea el siguiente equilibrio (Ecuación 3),



La constante de disociación aparente, K_d' , puede ser expresada en términos de las concentraciones relativas de los reactivos (Ecuación 4):

$$K_d' = \frac{[CA]_l \cdot [Fe^{+2}]_l}{[CA-Fe]} \quad \text{Ecuación 4}$$

La fluorescencia basal que tiene el sistema es F_1 . A través del agregado de un exceso de DF, rápidamente se desplaza el equilibrio hacia las formas libres, $[CA]_l + [Fe^{2+}]_l$ (Ecuación 3). Se produce entonces la liberación de la CA incrementando la intensidad de la fluorescencia alcanzando un nuevo valor de fluorescencia que denominaremos F_2 . El incremento relativo de la fluorescencia (ΔF_r) refleja la concentración del Fe lábil (Ecuación 5) (Darbari et al. 2003).

$$\Delta F_r = \frac{\Delta F}{F_2} = \frac{(F_2 - F_1)}{F_2} \quad \text{Ecuación 5}$$

Donde F_1 es la fluorescencia antes de la adición del quelante y F_2 es la fluorescencia después de la adición del quelante. Para calcular la concentración del LIP se utiliza la siguiente ecuación (Ecuación 6):

$$LIP = (\Delta F_r [CA]) + \left[\frac{(K_d' \Delta F_r)}{(1 - \Delta F_r)} \right] \quad \text{Ecuación 6}$$

Donde ΔF_r es el incremento fraccional de la fluorescencia luego de la adición de DF; K_d' es la constante de disociación de la CA y el Fe en el medio de reacción (0,46 μM) (Robello et al. 2007); y $[CA]$ es la concentración de CA utilizada en el medio de reacción.

Se centrifugaron 10 ml de cultivo algal a 4°C a 10.800 x g durante 15 min. El pellet obtenido se lavó con 500 μl de IFW. Luego se centrifugó nuevamente en las condiciones mencionadas anteriormente. Se descartó el sobrenadante y se resuspendieron las células en 500 μl de solución reguladora de CA preparada a partir de solución reguladora de fosfato de potasio en IFW, pH= 7,4. Se sonicó en hielo durante 2 min y se volvió a centrifugar a 4°C a 10.800 x g durante 15 min. El sobrenadante obtenido fue centrifugado a través de un filtro de 30.000 PM nominal a 10.800 x g y 4°C durante 30 min.

Para la determinación del LIP se tomaron 40 μl de muestra filtrada y se redujo el Fe presente con 40 μl de TGA 8% en IFW; se incubó durante 10 min. Se llevaron a una cubeta nueva 40 μl de muestra reducida, se midió la fluorescencia a $\lambda_{exc}=497$ nm y $\lambda_{em}=518$ nm. Luego se adicionaron 10 μl de CA en solución reguladora de

fosfato, se homogenizó y se efectuó otra lectura de fluorescencia bajo las mismas condiciones mencionadas; la cubeta, se incubó en baño termostático a 37°C y se repitió la lectura cada 30 min hasta llegar a una meseta. Al cabo de 24 h se midió nuevamente la fluorescencia en cada cubeta y se les adicionó a cada una 20 µl de DF 40 mM en solución reguladora. Inmediatamente se leyó la fluorescencia y se repitió cada 60 min hasta que las lecturas fueron constantes. Se realizó un blanco de muestra cada 4 muestras siguiendo el mismo procedimiento, utilizando 200 µl de solución reguladora de fosfato y 200 µl de TGA, se incubó durante 10 min y se midió la fluorescencia. Se incluyó un blanco de solución reguladora de fosfato de potasio y 10 µl de CA por grupo de determinaciones.

2.7.3. Determinación de la velocidad de reducción de Fe *in vitro*

Esta determinación se realizó según la técnica de Puntarulo et al. (1995) con modificaciones. Se centrifugaron 10 ml de cultivo a 4°C y 10.800 x g durante 15 min, se lavó el pellet con IFW, se centrifugó nuevamente en iguales condiciones. Las células obtenidas se resuspendieron en solución reguladora de fosfato 100 mM pH=7,4, se sonicaron durante 2 min y se centrifugaron, conservando el sobrenadante.

En una cubeta de plástico de 1 ml, sin uso previo, se colocan 603 µl de solución reguladora de fosfato de potasio, 9,37 µl Fe:EDTA 5 mM, 37,5 µl de homogeneizado y 75 µl de α-α'-dipiridilo en etanol absoluto (0,2753 M) se agitó y se adicionaron 25 µl de NADPH 10 mM, se agitó nuevamente y se realizó la lectura inicial en espectrofotómetro a λ=520 nm. Posteriormente, se hicieron lecturas cada 30 s durante 1 h para cada muestra. La velocidad de reducción de Fe se determinó calculando la pendiente según la Ecuación 7:

$$V = \frac{a \cdot 10^3}{t \text{ (h)} \cdot \epsilon \cdot \text{cél} / V_f \text{ (l)}} \quad \text{Ecuación 7}$$

Donde $\epsilon = 22,14 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

2.8. Determinación del contenido de proteínas

Para la determinación del contenido de proteínas de las muestras se empleó la técnica espectrofotométrica descrita por Bradford (1976). Como estándar se utilizó albúmina sérica bovina (BSA) en una concentración de 1 mg ml⁻¹.

2.9. Análisis estadístico

Los datos fueron expresados como media \pm ESM de 5 experimentos independientes ($n=5$), con tres (3) réplicas por muestra. El análisis estadístico para los experimentos en general, fue ANOVA de una vía y Test de Tuckey como test a posteriori. Se utilizó Statview para Windows, SAS Institute Inc., versión 5.0. En el caso del experimento de microcosmos se realizó mediante medidas repetidas ANOVA (Statistica, versión 9) para determinar la significancia de las diferencias observadas en Chla, velocidad de oxidación de DCFH-DA, contenidos de TBARS, α -T y contenido de β -C, así como también la composición específica y la abundancia entre tratamientos. La normalidad fue verificada usando el Test de Kolmogorov. Los principales factores considerados en el análisis fueron el tiempo de exposición y el tipo de tratamiento. Se utilizó el Test de Tuckey para determinar las diferencias entre tratamientos.

2.10. Reactivos

Los siguientes reactivos empleados fueron del mayor grado analítico disponible. Acetato de sodio. (AcNa). Ácido fosfotúngstico. Ácido ortofosfórico. Ácido tiobabaturico (TBA). Albúmina sérica bovina (BSA). Batofenantrolina sódica (BT). Butil-hidroxi-tolueno (BHT). Disulfato amónico férrico $[\text{Fe}(\text{NH}_4)(\text{SO}_4)_2]$. Dodecil sulfato de sodio (SDS). Ferrocina [3-(2-piridil)- 5-6-difenil-1,2,4-triazina-4-4'- ácido disulfónico de sodio] Sigma. HEPES (N-[2-hidroxietil]piperazida- N'-[2-ácido etansulfónico]). Sigma. Hierro estándar. K_2HPO_4 Merck. KCl. Anhedra. KH_2PO_4 . Sigma. Mesilato de deferoxamina (DF). NaH_2PO_4 . H_2O Merck. n-Butanol. Ácido tioglicólico (TBA). Resina Chelex 100 forma sódica, Sigma. TRIZMA® BASE. Sigma.

Los reactivos empleados de calidad HPLC fueron Hexano, Metanol, Etanol y agua.

3. Resultados

3.1. Estudios en cultivos aislados de distintas especies algales

3.1.1. Especies aisladas de la comunidad fitoplanctónica antártica en condiciones basales

A partir de la comunidad algal antártica se aislaron diferentes especies y grupos de algas. Se trabajó con picoplancton y *P. glacialis* en condiciones basales y se realizaron determinaciones que permitieron caracterizar el crecimiento de las mismas a través del estudio los parámetros fisiológicos y oxidativos. La Fn resultó significativamente menor en el cultivo de *P. glacialis* con respecto al picoplancton en condiciones basales. Una tendencia similar se halló para la R. En *P. glacialis* se observa que la R es significativamente menor comparada con el cultivo de picoplancton (Tabla II).

Especie	Fn (mg O ₂ l ⁻¹ h ⁻¹)	R (mg O ₂ l ⁻¹ h ⁻¹)
Picoplancton	97 ± 4	13 ± 6
<i>P. glacialis</i>	60 ± 12*	6 ± 2*

Tabla II. Parámetros de metabólicos para especies aisladas de fitoplancton.

* Significativamente diferente respecto del picoplancton, ANOVA (p<0,05).

La Figura 15 muestra el espectro de EPR para el A•, en condiciones de estado estacionario. En medio hidrosoluble el contenido de A• no mostró diferencias estadísticamente significativas entre especies microalgales (Tabla III).

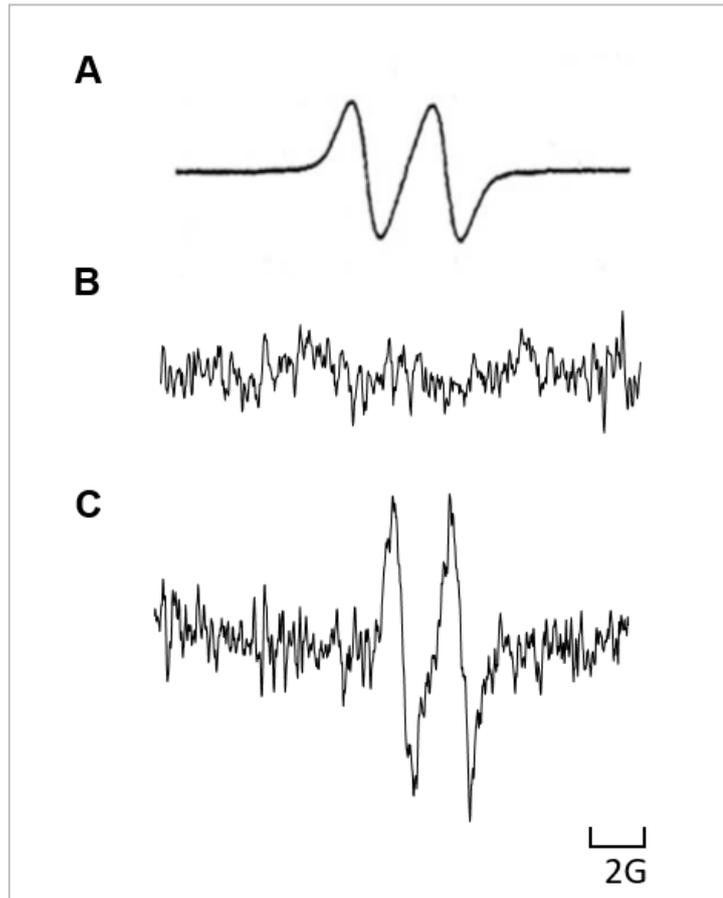


Figura 15. Espectro característico del A• por EPR. **A:** Espectro simulado mostrando las constantes hiperfinas características del radical; $a_H = 1,86$ G). **B:** DMSO puro. **C:** Espectro correspondiente a fitoplancton antártico.

El análisis de TBARS en condiciones basales indica mayor daño oxidativo a lípidos en los cultivos de *P. glacialis* respecto del picoplancton (Tabla III). El mismo comportamiento se puede observar en la velocidad de oxidación de DCFH-DA; sugiriendo que el estrés oxidativo es significativamente mayor en el cultivo de *P. glacialis*.

	Picoplancton	<i>P. glacialis</i>
Contenido A [•] (pmol A [•] (mg prot) ⁻¹)	212 ± 36	89 ± 53
Contenido TBARS (nmol (μg chl _a) ⁻¹)	359 ± 151	823 ± 243 *
Velocidad de oxidación DCFH-DA (UA (μg chl _a h) ⁻¹)	0,05 ± 0,01	0,084 ± 0,003 *

Tabla III. Parámetros oxidativos en medio hidrosoluble y liposoluble en cultivo de picoplancton y diatomea en condiciones basales.

* Significativamente diferente respecto del cultivo de picoplancton, ANOVA (p<0,05).

La Tabla IV muestra el contenido de antioxidantes en los cultivos en estudio. En el caso de los antioxidantes liposolubles, el contenido de α-T y de β-C medidos en ambas especies, indica que el cultivo de *P. glacialis* mostró contenidos significativamente menores que el picoplancton en condiciones basales. Incluso, en el caso del α-T la diferencia es tres veces menor respecto del picoplancton. En medio hidrosoluble, el contenido de AH⁻, no presenta diferencias significativas entre cultivos.

Antioxidante	Picoplancton	<i>P. glacialis</i>
AH ⁻ (nmol AH ⁻ (mg prot) ⁻¹)	122 ± 16	128 ± 21
α-T (nmol (μg chl _a) ⁻¹)	346 ± 25	105 ± 37 *
β-C (nmol (μg chl _a) ⁻¹)	2,7 ± 0,7	1,0 ± 0,1 *

Tabla IV. Determinación de antioxidantes en cultivos en condiciones basales.

* Significativamente diferente respecto del picoplancton, ANOVA (p<0,05).

A partir de los resultados del contenido de antioxidantes y los valores de los parámetros oxidativos se calcularon los indicadores de estrés (Tabla V). Se

obtuvieron los índices de daño/protección en medio hidrofílico (A^*/AH^+) y lipofílico (TBARS/ α -T y TBARS/ β -C). No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre picoplancton y *P. glacialis* en el medio hidrofílico. Al contrario, en el medio lipofílico, los índices en el cultivo de *P. glacialis* resultaron significativamente mayores respecto al cultivo de picoplancton.

El mayor índice daño/protección sugiere el establecimiento en *P. glacialis* de una situación de estrés oxidativo que no ha podido ser adecuadamente controlada por los antioxidantes que fueron consumidos, ya que se observó un significativo aumento en la oxidación de lípidos.

Índices oxidativos	Picoplancton	<i>P. glacialis</i>
A^*/AH^+ (10^{-3})	$1,7 \pm 0,2$	$0,6 \pm 0,3$
TBARS/ α -T	$1,0 \pm 0,2$	$7,9 \pm 0,3$ *
TBARS/ β -C	150 ± 75	845 ± 273 *

Tabla V. Índices de estrés oxidativos en cultivos microalgales en condiciones basales.

* Significativamente diferente respecto del cultivo de picoplancton, ANOVA ($p < 0,05$).

3.2. Caracterización de cultivo de la diatomea antártica, *P. glacialis*, en condiciones controles

Los cultivos controles de diatomea antártica fueron realizados con medio f-2 con $12 \mu\text{M}$ de Fe considerando la concentración de Fe que requiere esta especie en este medio de cultivo según el protocolo empleado para caracterizar el crecimiento en condiciones basales. En la Figura 16 se indican las fases de crecimiento características para esta especie. Los primeros 5 días corresponden a la fase de latencia, posteriormente se establece la fase logarítmica que demanda 5 días y luego se observa la fase estacionaria. También se estudió la curva de crecimiento del cultivo de *P. glacialis* en función de la concentración de Chl_a y Abs (Figura 16 inserto). Ambos parámetros describen adecuadamente el desarrollo de los cultivos microalgales.

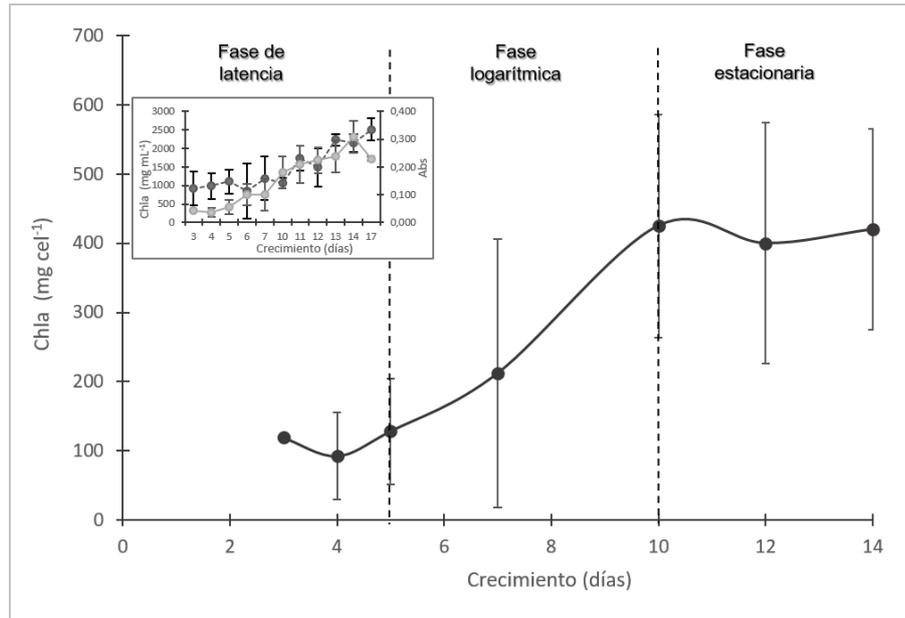


Figura 16. Caracterización del crecimiento de diatomea en un cultivo control (12 $\mu\text{M Fe}$). Inserto: Caracterización de cultivo de diatomea en condiciones control (12 $\mu\text{M Fe}$) (●) Chla, (○) Abs.

Las μ instantánea de crecimiento estimadas en las tres fases de crecimiento del cultivo control, demuestran que en la fase log es estadísticamente mayor respecto a las otras dos fases estudiadas. De esta forma, el resultado muestra que la fase log es la fase de mayor crecimiento y metabolismo (Figura 17) en los cultivos. La disminución de la μ instantánea en la fase estacionaria sugiere el agotamiento de nutrientes esenciales para el crecimiento.

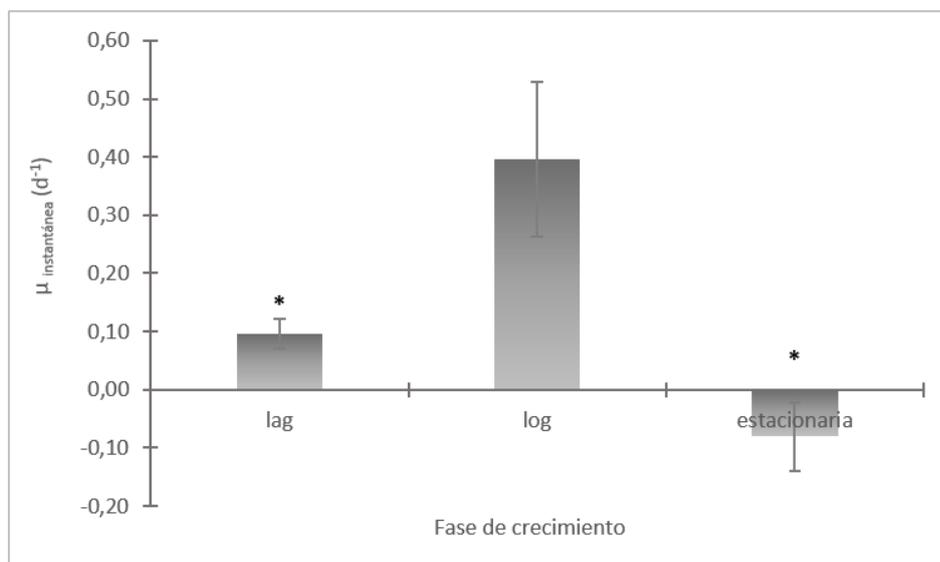


Figura 17. Estimación de la μ instantánea de crecimiento para cultivo control (12 $\mu\text{M Fe}$) de diatomea calculado a partir de datos de Abs.

* Significativamente diferente respecto del cultivo en fase de logarítmica. ANOVA ($p < 0,05$).

3.3. Efecto de la suplementación de Fe en cultivos de *P. glacialis*

Se realizaron curvas de crecimiento para caracterizar el desarrollo de los cultivos frente al agregado de Fe al medio de cultivo. La Figura 18 muestra los resultados obtenidos. Se puede observar que conforme aumenta la concentración de Fe en el medio, también aumenta la Abs en los cultivos. Esto indicaría que el aumento de Fe en el medio de cultivo estimuló el crecimiento celular que se traduce en el aumento de Abs diario en este rango de concentración de Fe. En base a esta información se seleccionaron los días a estudiar para la evaluación de los efectos del Fe agregado en la fase log.

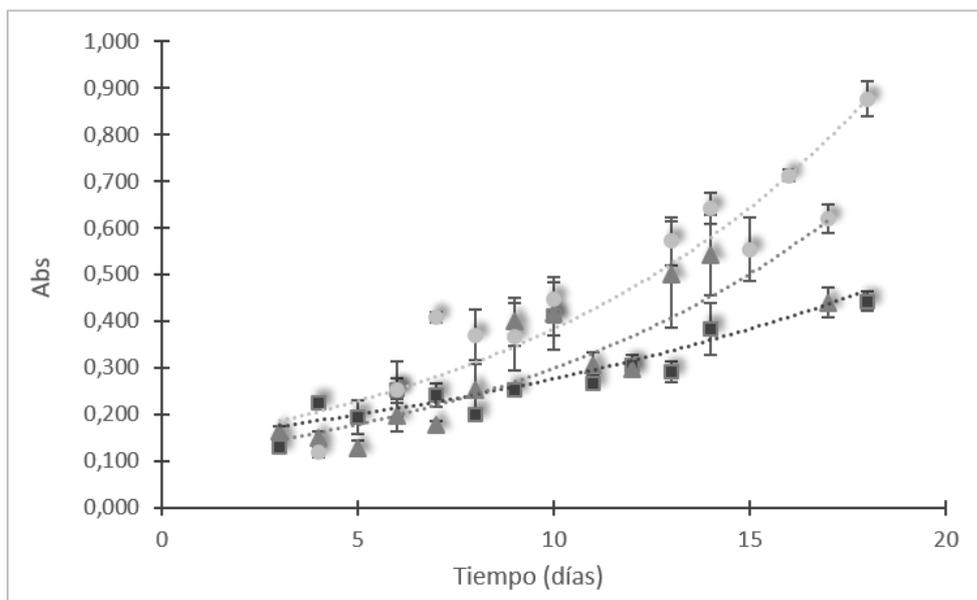


Figura 18. Curvas de crecimiento para cultivos de diatomea en condiciones de laboratorio frente a (■) 60 µM Fe; (▲) 100 µM Fe y (●) 300 µM Fe adicionado al medio de cultivo como Fe:EDTA.

El contenido de Chla en la fase log de desarrollo se presenta en la Figura 19. Se observa una disminución estadísticamente significativa con respecto al cultivo control para todos los cultivos expuestos a Fe (60, 100 y 300 µM Fe). Este comportamiento podría deberse a un efecto tóxico por parte de este micronutriente, que podría provocar la disminución de la Fn para esta especie.

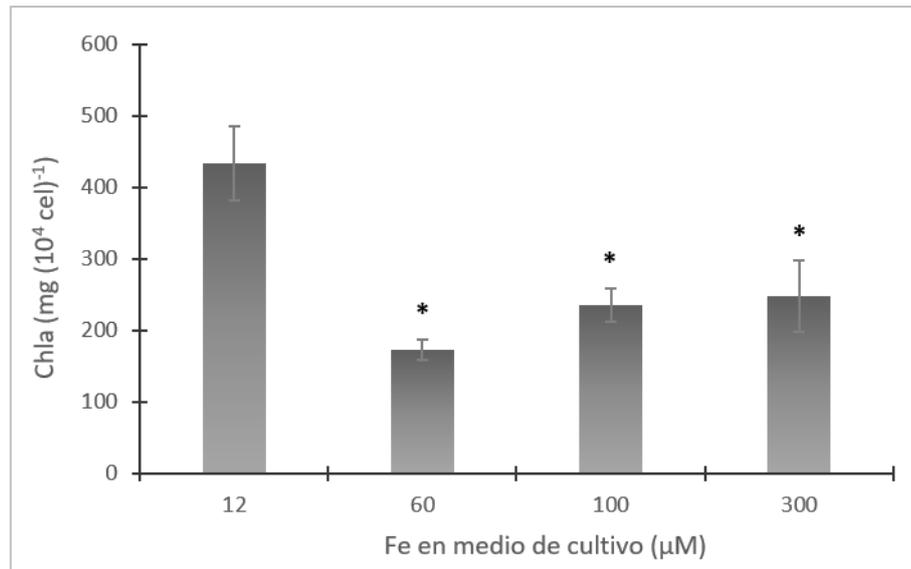


Figura 19. Contenido de Chla en fase logarítmica de crecimiento para cultivos de *P. glacialis* a distintas concentraciones de Fe.

* Significativamente diferente respecto del cultivo control (12 μM Fe). ANOVA ($p < 0,05$).

La Figura 20A muestra la μ instantánea para los cultivos control y tratados calculados a partir de los valores de Abs obtenidos en los estudios de la caracterización del crecimiento. Adicionalmente, a los resultados hallados a concentraciones de Fe mayores al control, se muestran datos correspondientes a concentraciones menores (2,5 y 4 μM Fe) en el medio de cultivo. Como indica la figura, los resultados obtenidos para las concentraciones de Fe más bajas, concuerdan con los valores descriptos en la literatura. De esta manera, se confirma la importancia del Fe como micronutriente, para el crecimiento de microalgas fotosintéticas.

Las μ instantáneas de crecimiento para los cultivos expuestos a 2,5 y 4 μM Fe son menores ($0,20 \pm 0,03$) y ($0,19 \pm 0,09$) d^{-1} respectivamente, en comparación con el cultivo control. Sin embargo, con concentraciones mayores de Fe en el medio, muestran μ instantánea similares, con la excepción del cultivo expuesto a 100 μM Fe.

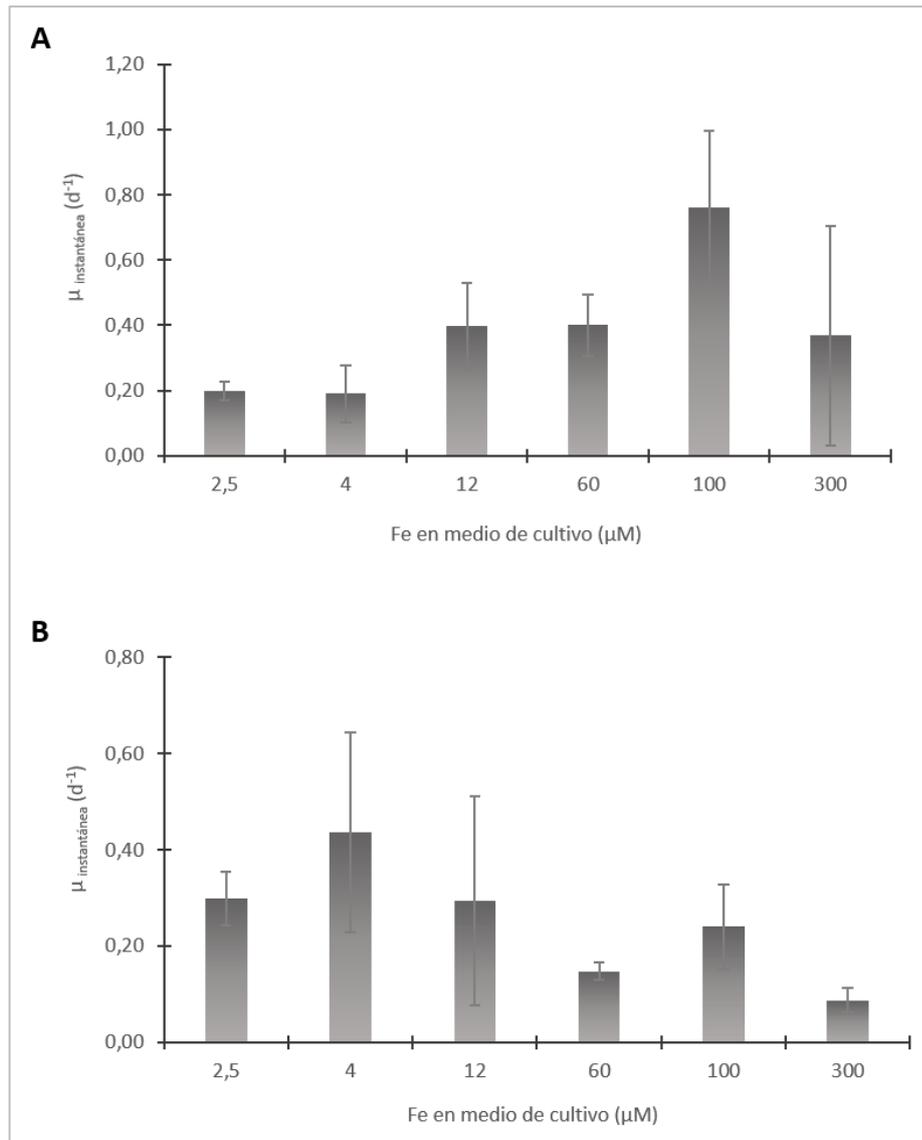


Figura 20. Velocidad instantánea de crecimiento para cultivo control y tratados en función de la concentración de Fe en el medio de cultivo en fase log de crecimiento. **A:** Calculada a partir de datos Abs. **B:** μ instantánea calculada a partir de datos de contenido de Chla.

La Figura 20B muestra la μ instantánea empleando los valores obtenidos del contenido de Chla en cada cultivo suplementado con Fe. Los parámetros utilizados (Abs y contenido de Chla) no muestran diferencias sustanciales en la μ instantánea en la fase log de crecimiento frente a distintas concentraciones de Fe en el medio de cultivo.

La incorporación de Fe en el interior celular fue significativamente mayor sólo en el cultivo expuesto a una concentración de 300 μM Fe en el medio (11 veces el cultivo control, Figura 21).

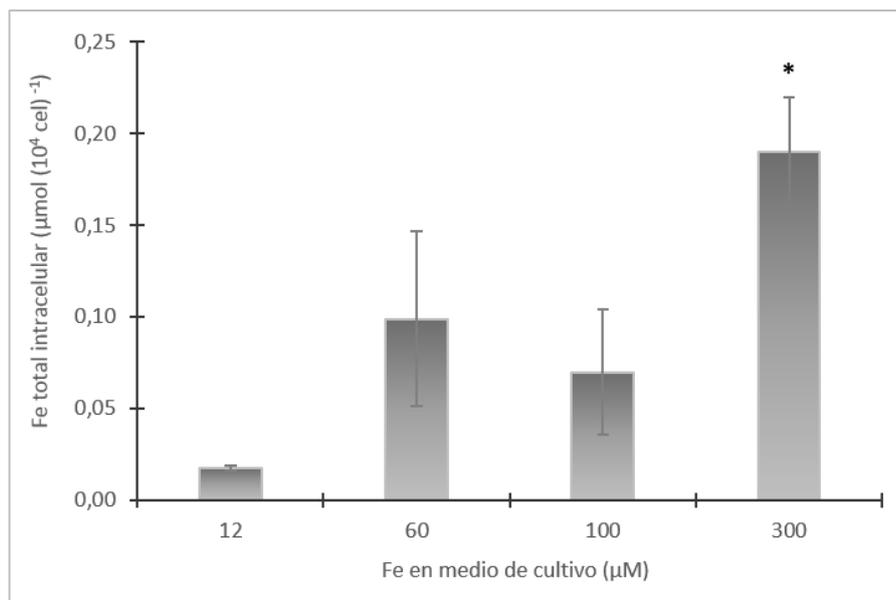


Figura 21. Contenido de Fe total intracelular en fase log en cultivos suplementados con Fe.

* Significativamente diferente respecto del cultivo control (12 μM Fe). ANOVA ($p < 0,05$).

Considerando que la toxicidad del Fe intracelular depende del contenido de Fe catalíticamente activo, se estudió el contenido de LIP en los cultivos (Tabla VI). El LIP celular resultó significativamente menor para todos los cultivos tratados respecto del cultivo control. El porcentaje de Fe correspondiente al LIP respecto al Fe total incorporado presentó el mismo comportamiento; se observó para los cultivos suplementados con Fe una disminución significativa comparado con el porcentaje de Fe como LIP hallado en el control. Este efecto podía deberse a una mayor movilización de Fe para cubrir las necesidades del desarrollo celular cuando el Fe es deficitario.

Fe en medio de cultivo (μM)	LIP (nmoles (10 ⁴ cel) ⁻¹)	% LIP
12	0,290±0,007	1,65±0,04
60	0,08±0,03 *	0,08±0,03 *
100	0,10±0,01 *	0,14±0,02 *
300	0,09± 0,002 *	0,05±0,001 *

Tabla VI. Contenido de LIP intracelular para cultivos control y tratados con Fe en fase log de crecimiento.

* Significativamente diferente respecto del cultivo control (12 μM Fe). ANOVA ($p < 0,05$).

La velocidad de reducción de Fe intracelular se estimó para todos los cultivos de diatomeas estudiados. Los resultados demostraron que existe un aumento en la velocidad de reducción de Fe conforme se incrementa el Fe en el medio de cultivo (Tabla VII).

Fe en medio cultivo (μM)	Vel reducción de Fe ($\mu\text{M Fe (10}^4 \text{ cel h)}^{-1}$)
12	0,05 \pm 0,2
60	0,08 \pm 0,04 *
100	0,14 \pm 0,03 *
300	0,15 \pm 0,03 *

Tabla VII. Velocidad de reducción de Fe intracelular en cultivos control (12 $\mu\text{M Fe}$) y tratados en fase log de crecimiento.

* Significativamente diferente respecto del cultivo control. ANOVA ($p < 0,05$).

Trazas de Fe libre pueden catalizar la generación de $\bullet\text{OH}$ altamente reactivo, mediante la reacción de Fenton o de Haber-Weiss. El Fe conduce a la generación de ROS que favorecen la oxidación de proteínas, lípidos y lipoproteínas y ácidos nucleicos y otros compuestos celulares (Kruszewski, 2003). En este sentido, se analizó el contenido de $\text{LR}\bullet$ en las células. La Figura 22 muestra los espectros obtenidos por EPR empleando PBN como atrapador de espín para la detección del $\text{LR}\bullet$. Particularmente se muestra el espectro obtenido en el cultivo de la diatomea en fase log de crecimiento.

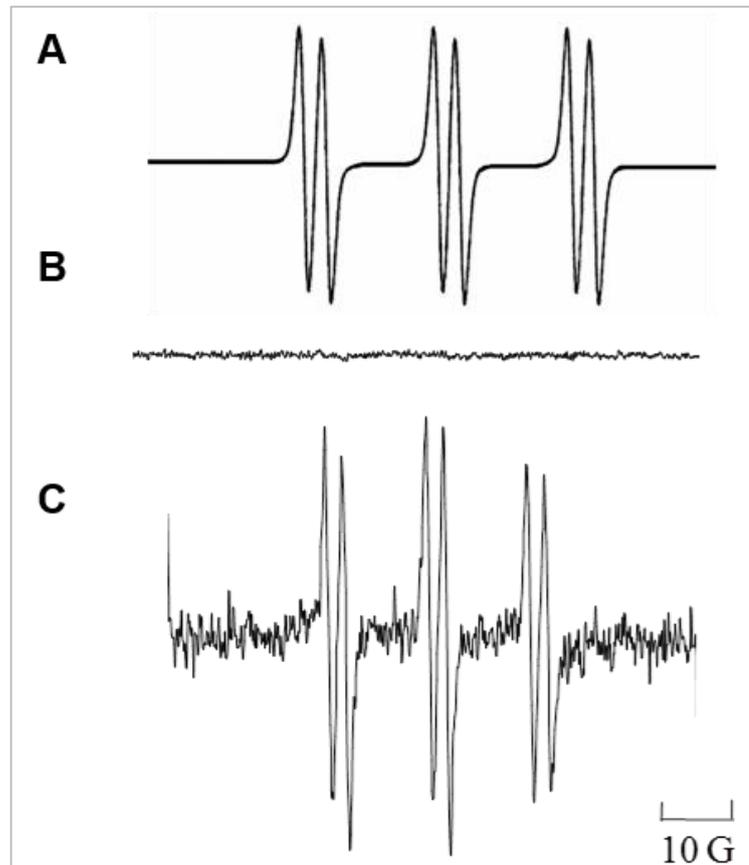


Figura 22. Espectros característicos de LR• por EPR. **A:** Espectro simulado mostrando las constantes hiperfinas características de los radicales PBN/LR•, $a_N = 15,8$ G y $a_H = 2,6$ G; **B:** PBN en DMSO solo; **C:** espectro en cultivos controles de *P. glacialis* ($12 \mu\text{M Fe}$) en fase log de crecimiento.

Por otra parte, se analizó el efecto del agregado de Fe al medio de cultivo sobre el contenido de LR•. La Figura 23 muestra la cuantificación del contenido de estos radicales que estima la oxidación lipídica generada por radicales libres en función del Fe adicionado al medio de cultivo. En los cultivos microalgales sólo se observa una disminución significativa ($0,7 \pm 0,4$ nmoles $(10^4 \text{ cel})^{-1}$) en el contenido de LR• para el cultivo con $60 \mu\text{M Fe}$ en el medio, sin embargo, para el resto de los tratamientos el contenido de LR• no varía respecto del control.

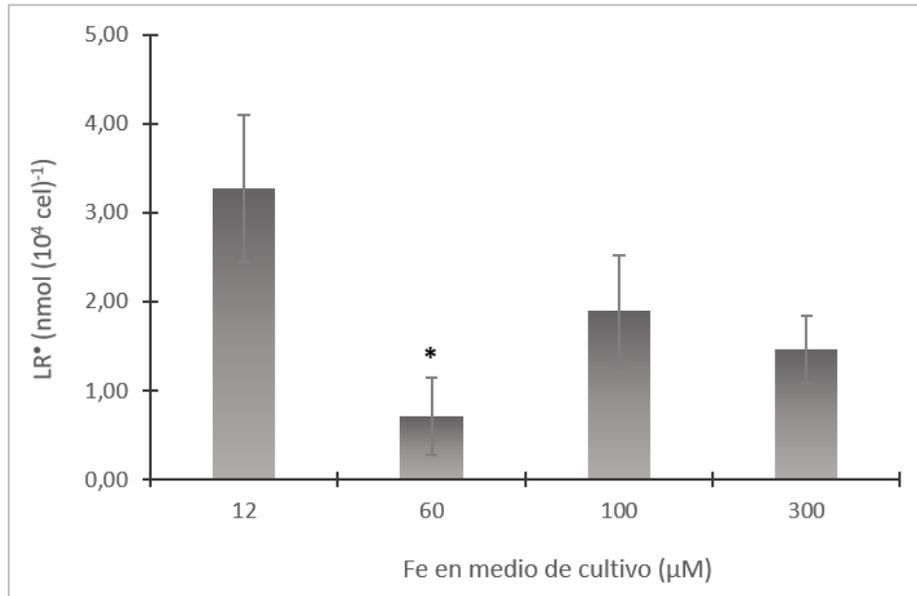


Figura 23. Contenido de LR* en cultivos tratados con Fe y control de diatomeas antárticas en fase log de crecimiento.

* Significativamente diferente respecto del cultivo control. ANOVA ($p < 0,05$).

Como respuesta frente a la exposición a potenciales factores dañinos, las algas pueden incrementar el contenido de antioxidantes liposolubles e hidrosolubles; entre ellos el α -T y β -C que tienen la capacidad de proteger los ácidos poliinsaturados de la peroxidación y favorecer la desaparición del medio celular los radicales libres (Evstigneeva et al. 1998). La Figura 24 muestra un cromatograma típico obtenido para estándares de antioxidantes liposolubles por HPLC con detector electroquímico (línea gris claro). En la misma figura se puede observar que la muestra de fitoplancton antártico contiene α -T y β -C (A y B respectivamente).

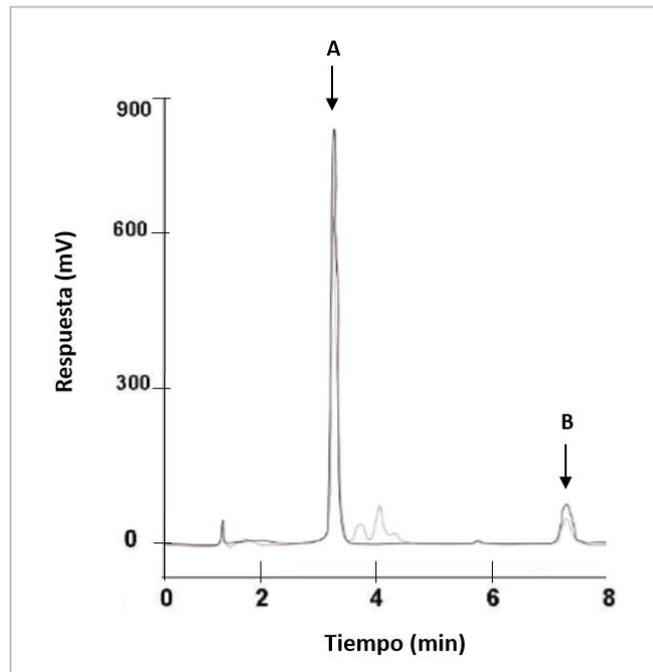


Figura 24. Espectro característico de HPLC de antioxidantes liposolubles para fitoplancton antártico en fase log de crecimiento. **A:** α -T, **B:** β -C. Comunidad fitoplanctónica antártica (—) y mezcla de estándares de antioxidantes (---).

Estudios preliminares del contenido de α -T (0,053 nmol α -T cada 10^4 células y Ast (0,144 nmol Ast cada 10^4 células) en de cultivos de *P. glacialis* con adición de 60 μ M de Fe en el medio mostraron un menor contenido de estos antioxidantes liposolubles respecto del cultivo control 0,118 nmol α -T cada 10^4 células y 0,167 nmol Ast cada 10^4 células, en fase log de crecimiento.

3.4. Efectos de la salinidad sobre la comunidad algal antártica en microcosmos

3.4.1. Caracterización del crecimiento en microcosmos

El crecimiento de la comunidad algal, se evaluó tanto en los microcosmos controles expuestos a salinidad normal (34 psu) como en aquellos expuestos a salinidad disminuida (30 psu), a través del recuento celular de la comunidad. En ambos se observó un comportamiento trifásico; diferenciándose las tres fases típicas (lag, log y estacionaria) de crecimiento para estos microorganismos (Figura 25). El crecimiento de los cultivos en condiciones de salinidad disminuida resultó significativamente menor respecto al observado en los experimentos en condiciones normales durante todo el tiempo de desarrollo del cultivo.

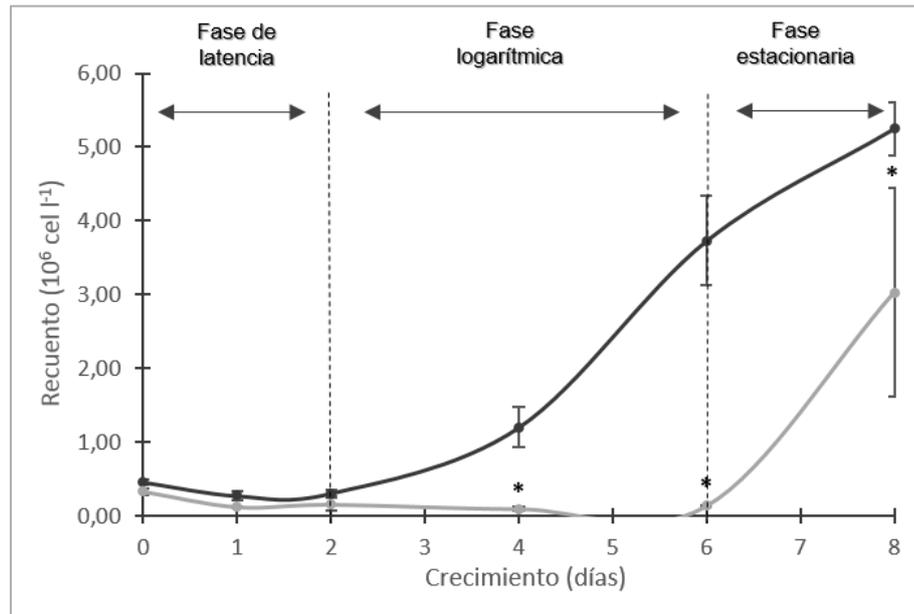


Figura 25. Recuento celular en función del tiempo para condiciones de salinidad variable, (●) 34 psu, (◐) 30 psu.

*Significativamente diferente del cultivo a salinidad 34 psu e igual tiempo de crecimiento. ANOVA ($p < 0,05$).

Por otra parte, se analizó el contenido de Chla durante el desarrollo del cultivo de microcosmos, obteniéndose un perfil similar cuando se estudió el contenido de Chla. Se observó en los microcosmos que crecieron en condiciones de salinidad normal un aumento progresivo del contenido de Chla se durante los 8 días de cultivo (Figura 26). En comparación en los experimentos con salinidad disminuida, el contenido de Chla resultó menor durante todo el período experimental estudiado.

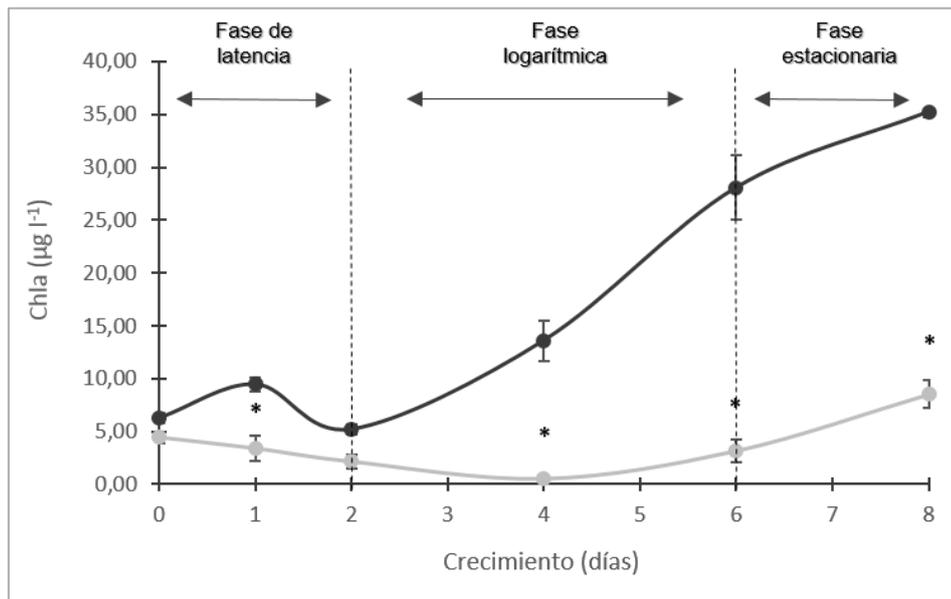


Figura 26. Curvas de crecimiento de los microcosmos en función del tiempo y expuestos a salinidad variable, (●) 34 psu y (◐) 30 psu.

* Significativamente diferente del cultivo con salinidad control (34 psu) a igual tiempo de crecimiento. ANOVA ($p < 0,05$).

La μ instantánea en condiciones de salinidad normal, mostró al día 2 de desarrollo una disminución significativa con respecto a los días 4 y 6 en el mismo experimento. El día 4 muestra la máxima μ instantánea y disminuye paulatinamente hasta alcanzar un mínimo al día 8 del tratamiento (Tabla VIII). Sin embargo, en los cultivos expuestos a condiciones de baja salinidad, la μ instantánea presenta una tendencia negativa desde el inicio del experimento hasta el día 6 de crecimiento. El análisis estadístico de los valores hallados indica que la μ instantánea al día 2 es significativamente diferente de los valores a los días 6 y 8, y que los datos el día 1 son diferentes a los medidos al día 6. Estos resultados sugieren que el cultivo expuesto a salinidad disminuida necesita mayor tiempo de adaptación para crecer en condiciones de salinidad diferentes a las óptimas para el crecimiento.

Salinidad (psu)	μ instantánea (d ⁻¹)				
	Día 1	Día 2	Día 4	Día 6	Día 8
34	0,41 ± 0,2	-0,60 ± 0,04	0,95 ± 0,05***	0,73 ± 0,04***	0,24 ± 0,11
30	-0,35 ± 0,03	-0,4 ± 0,01	-0,58 ± 0,05	-1,3 ± 0,04***	0,69 ± 0,02*

Tabla VIII. μ instantánea en microcosmos a 30 y 34 psu en el medio de cultivo.

* Significativamente diferente respecto del día 2 para el cultivo a salinidad 30 psu. ANOVA ($p < 0,05$).

** Significativamente diferente respecto del día 1 para el cultivo a salinidad 30 psu. ANOVA ($p < 0,05$).

*** Significativamente diferente respecto del día 2 para el cultivo a salinidad 34 psu. ANOVA ($p < 0,05$).

3.4.2. Efecto de la salinidad sobre la composición del microcosmos

El análisis taxonómico del fitoplancton mostró una composición principalmente de diatomeas, criptófitas, dinoflagelados, prasinofitas, silicoflagelados y otro tipo de fitoflagelados pequeños no identificados. Dentro de las diatomeas se identificaron *Odontella weissflogii*, *Chaetoceros tortissimus/sociales*, *Thalassiosira antártica* y *Porosira glacialis*. Las diatomeas son los organismos más abundantes y las especies de diatomeas céntricas grandes fueron las especies dominantes del conjunto de organismos (Tabla IX y X).

Salinidad (psu)	Crecimiento de Diatomeas Céntricas Grandes (número (10 ⁴ cel ⁻¹))					
	Día 0	Día 1	Día 2	Día 4	Día 6	Día 8
34	17 ± 1	16 ± 3	25 ± 5	94 ± 6	250 ± 29	400 ± 4
30	14 ± 0,6	4 ± 0,5*	10 ± 4 *	3 ± 0,4*	7 ± 0,4*	3 ± 1*

Tabla IX. Recuento de diatomeas céntricas grandes en microcosmos en condiciones de salinidad normal (34 psu) y disminuida (30 psu).

* Significativamente diferente comparando valores de densidad celular entre tratamientos a igual tiempo. ANOVA ($p < 0,05$).

Salinidad (psu)	Crecimiento de Diatomeas Pennadas Pequeñas (número (10^4 cel $^{-1}$))					
	Día 0	Día 1	Día 2	Día 4	Día 6	Día 8
34	4 ± 2	0,8 ± 0,1	0,7 ± 0,2	14 ± 4	98 ± 3	100 ± 2
30	0,6 ± 0,2	0,5 ± 0,2*	0,3 ± 0,2*	0,6 ± 0,3*	8 ± 3*	280 ± 12*

Tabla X. Recuento de diatomeas pennadas pequeñas en microcosmos en condiciones de salinidad normal (34 psu) y disminuida (30 psu).

*Significativamente diferente del cultivo control (34 psu) comparando valores de densidad celular entre tratamientos. ANOVA ($p < 0,05$).

En los cultivos algales en condiciones de salinidad normal, la abundancia de las diatomeas céntricas grandes se incrementó respecto del total a lo largo del experimento. Como se puede observar en la Figura 27, al día 8 la composición total del sistema muestra un 78% de este tipo de diatomeas. En los cultivos expuestos a baja salinidad, la abundancia relativa de las diatomeas grandes céntricas disminuye significativamente respecto del cultivo en condiciones de salinidad normal luego de 6 y 8 días de cultivo. En estos cultivos se observa que este grupo de diatomeas fue reemplazado por diatomeas pennadas pequeñas; siendo *Navicula glaciei*, *Navicula perminuta*, *Nitzschia* sp. y *Fragilaria psiscylindrus*, las que se hallaron principalmente.

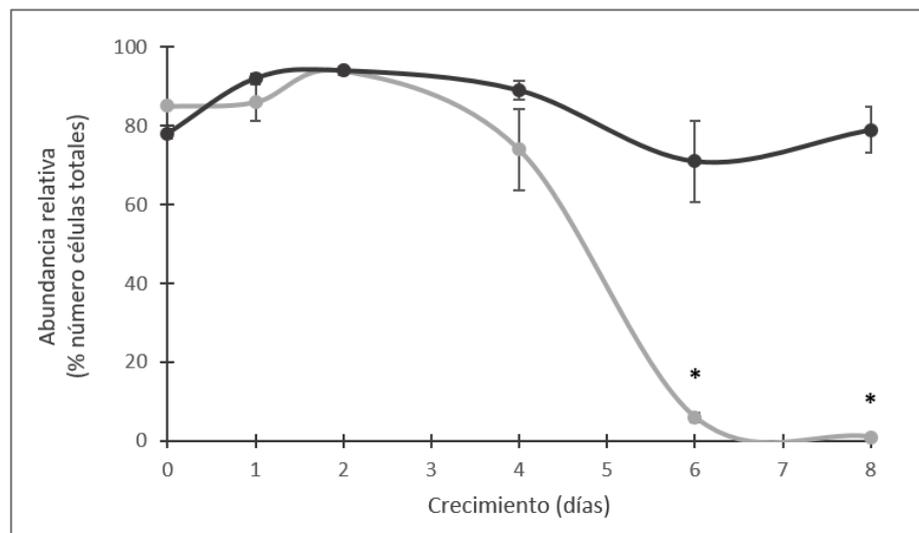


Figura 27. Abundancia relativa de diatomeas grandes céntricas en cultivos expuestos a (●) 34 psu y (◐) 30 psu.

* Significativamente diferente del cultivo desarrollado a salinidad 34 psu a igual tiempo de crecimiento. ANOVA ($p < 0,01$).

En condiciones de cultivo con una salinidad de 34 expuesto a 30 psu predominaron fitoflagelados de un tamaño inferior a 5 μm (Tabla XI).

Salinidad (psu)	Recuento de Fitoflagelados (número (10^4 cel^{-1}))					
	Día 0	Día 1	Día 2	Día 4	Día 6	Día 8
34	21 \pm 0,4	6 \pm 0,5	4 \pm 0,9	10 \pm 1	13 \pm 3	29 \pm 4
30	19 \pm 0,2	6 \pm 1	4 \pm 1	5 \pm 2	7 \pm 2	16 \pm 3

Tabla XI. Recuento de fitoflagelado en microcosmos en condiciones de salinidad normal (34 psu) y disminuida (30 psu).

3.4.3. Efectos de la salinidad sobre la actividad metabólica del microcosmos

En los microcosmos de las comunidades algales en estudio se determinó la Fn producida y la R. Los resultados de Fn se muestran en la Tabla XII. Se observa que una disminución en la salinidad del medio de cultivo, afecta la Fn algal. En el cultivo expuesto a 34 psu de salinidad se genera un máximo de Fn al día 4 de crecimiento. Sin embargo, la Fn producida en el microcosmos expuesto a salinidad inferior fue significativamente menor respecto del control, en toda la curva de crecimiento (día 1 al 8).

Crecimiento (días)	Fn (mg O ₂ l ⁻¹ h ⁻¹ Chla ⁻¹)	
	34 psu	30 psu
0	5,5 ± 0,3	5,50 ± 0,08
1	2 ± 1	-3 ± 1*
2	3,4 ± 0,3	-4,3 ± 0,8*
4	9 ± 1	-1,3 ± 0,8*
6	7 ± 1	-1 ± 2*
8	3,4 ± 0,6	0,8 ± 0,9*

Tabla XII. Fotosíntesis neta (Fn) producida en los microcosmos según condiciones de salinidad control (34 psu) y disminuida (30 psu).

*Significativamente diferente del cultivo a salinidad 34 psu a igual tiempo de crecimiento. ANOVA (p<0,05).

En el cultivo expuesto a condiciones normales de salinidad, la R disminuye en el día 1 mientras que presenta un aumento máximo al día 2. En los siguientes días experimentales, la R tiende a alcanzar valores similares a los primeros días, hasta el final del experimento. A diferencia del control, el cultivo bajo condiciones de salinidad disminuida, incrementa la R en los primeros días de crecimiento, llegando a un máximo al día 2 a excepción del día 6 (Tabla XIII).

Crecimiento (días)	R (mg O ₂ l ⁻¹ h ⁻¹ Chla ⁻¹)	
	34 psu	30 psu
0	4,2 ± 0,2	4,2 ± 0,1
1	2,5 ± 1	7 ± 1*
2	5 ± 2	8,87 ± 0,08*
4	0,5 ± 0,6	4,8 ± 0,4*
6	4 ± 2	0,4 ± 0,9*
8	3 ± 2	3,3 ± 0,9

Tabla XIII. Efecto de la salinidad sobre la R de microcosmos control (34 psu) y tratados (30 psu).

* Significativamente diferente del cultivo a salinidad 34 psu a igual tiempo de crecimiento. ANOVA (p<0,05).

3.4.4. Parámetros de estrés oxidativo en los microcosmos

La evaluación del estrés oxidativo generado en los cultivos, se realizó por medio de la determinación de la velocidad de oxidación de la DCFH-DA (Figura 28). En los cultivos desarrollados en condiciones de salinidad normal la velocidad de oxidación de la DCFH-DA mostró un aumento significativo al día 2 de crecimiento con respecto al día inicial (día 0). Por el contrario, en el cultivo con medio de menor salinidad, se encontró que los valores para la velocidad de oxidación de la DCFH-DA fueron significativamente mayores respecto de los registrados a 34 psu para los días 2, 4 y 6 (2,3; 3,2 y 8,7-veces, respectivamente). Esto podría indicar que la presencia de especies oxidantes aumenta cuando la salinidad del medio disminuye y la situación de estrés oxidativo generada puede deberse tanto al aumento en las concentraciones de especies reactivas como a una disminución en el contenido o actividad de antioxidantes.

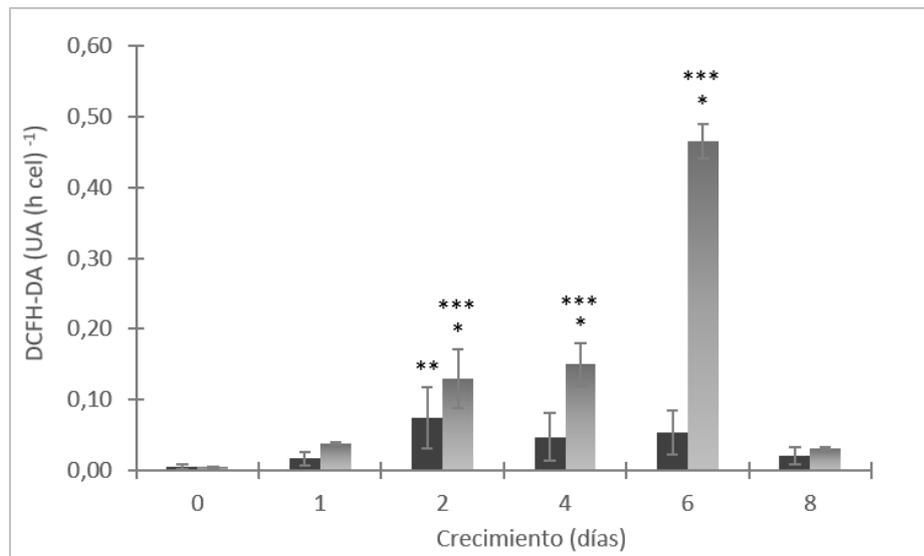


Figura 28. Velocidad de oxidación de la DCFH-DA en la comunidad fitoplanctónica antártica bajo condiciones de salinidad (●) 34 psu y (●) 30 psu.

* Significativamente diferente del cultivo a salinidad a 34 psu a igual tiempo de desarrollo. ANOVA ($p < 0,05$).

** Significativamente diferente respecto del día 0 de crecimiento en el cultivo a salinidad 34 psu. ANOVA ($p < 0,05$).

*** Significativamente diferente respecto del día 0 de crecimiento en el cultivo a salinidad 30 psu. ANOVA ($p < 0,05$).

Por otra parte, se evaluó el contenido de TBARS como un índice de daño oxidativo a lípidos, tanto en los cultivos desarrollados en condiciones de salinidad normal como en los expuestos a condiciones de salinidad disminuida (Figura 29). Los resultados observados fueron coincidentes con los obtenidos en la evaluación de la velocidad de oxidación de DCFH-DA. En los experimentos en condiciones de

salinidad control se observó un aumento significativo del daño oxidativo los días 1 y 2 de cultivo respecto del día 0. Con el avance del desarrollo de la comunidad, se observa que a esta salinidad (34 psu) el contenido de TBARS disminuye. Para los microcosmos a 30 psu durante el desarrollo del estudio, se observó un aumento significativo en todos los días con respecto al día 0, retornando a los valores iniciales en el día 8. Por otra parte, el contenido de TBARS en el cultivo expuesto a 30 psu resultó 4,8-veces superior al observado en cultivos desarrollados en condiciones controles de salinidad los días 4 y 6 del experimento. Estos resultados sugerirían un aumento en el daño generado por ROS cuando la salinidad se encuentra disminuida en el medio de cultivo.

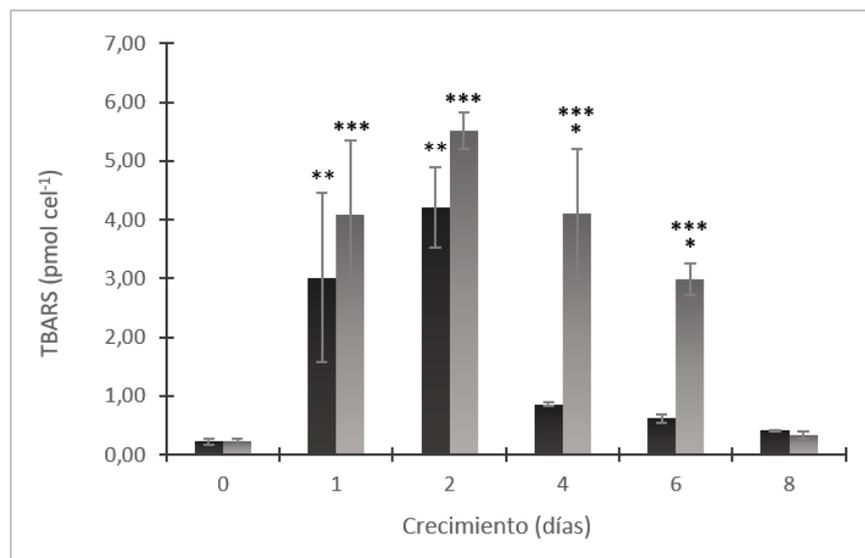


Figura 29. Peroxidación lipídica durante el desarrollo de la comunidad fitoplanctónica antártica evaluada como contenido de TBARS para cultivos expuestos a salinidad (●) 34 psu y (●) 30 psu.

* Significativamente diferente del cultivo a salinidad a 34 psu a igual tiempo de desarrollo. ANOVA ($p < 0,05$).

** Significativamente diferente respecto del día 0 de crecimiento en el cultivo a salinidad 34 psu. ANOVA ($p < 0,05$).

*** Significativamente diferente respecto del día 0 de crecimiento en el cultivo a salinidad 30 psu. ANOVA ($p < 0,05$).

En la Figura 30 se muestra el contenido de los antioxidantes liposolubles, α -T y β -C. En los cultivos controles no se encontraron cambios significativos durante el período estudiado en el contenido de α -T respecto del día 0. Sin embargo, en los cultivos expuestos a baja salinidad, el crecimiento mostró un aumento significativo del contenido de α -T para los días 1, 2, 4 y 6 del experimento. Posteriormente, se observa una disminución al día 8 que alcanza los valores iniciales. El contenido de α -T en cultivos desarrollados a 30 psu, presenta una tendencia creciente respecto a los microcosmos controles. Asimismo, en los cultivos con salinidad disminuida, se observó un aumento significativo, durante el desarrollo del experimento (Figura

30A). Con respecto al contenido de β -C en los microcosmos controles (34 psu), se observó un aumento significativo del contenido de este antioxidante el día 1 respecto del día 0 (Figura 30B). El contenido de β -C mostró el mismo patrón que el observado en el contenido de α -T a lo largo del tiempo, en los microcosmos expuestos a 30 psu respecto del día 0 de trabajo. El contenido de β -C también se incrementa en el cultivo expuesto a 30 psu de salinidad respecto al desarrollado bajo condiciones normales. Las células podrían mostrar un aumento en el contenido de antioxidantes para contrarrestar el estrés oxidativo producido, en estas condiciones, por crecimiento.

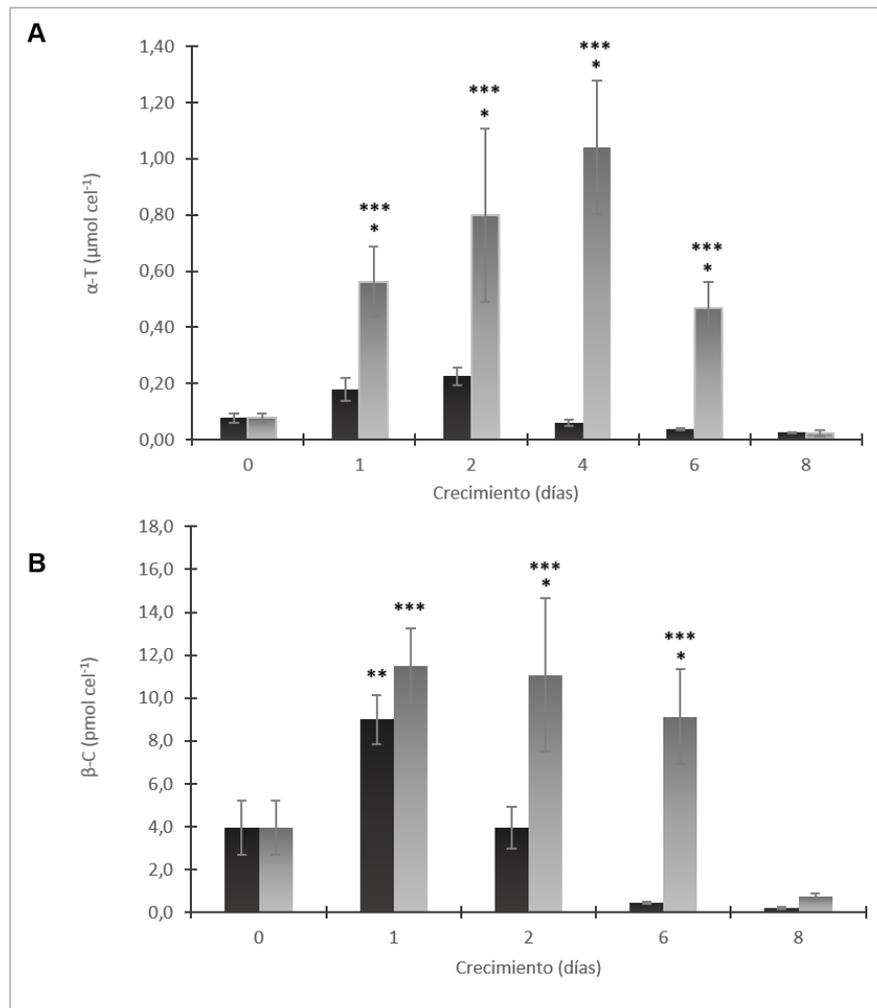


Figura 30. Contenido de antioxidantes liposolubles para la comunidad algal desarrollada a 34 (●) y 30 (●) psu. **A:** Contenido celular de α -T. **B:** Contenido celular de β -C.

* Significativamente diferente del cultivo a salinidad 34 psu a igual tiempo de crecimiento. ANOVA ($p < 0,05$).

** Significativamente diferente respecto del día 0 de crecimiento en el cultivo a salinidad 34 psu. ANOVA ($p < 0,05$).

*** Significativamente diferente respecto del día 0 de crecimiento en el cultivo a salinidad 30 psu. ANOVA ($p < 0,05$).

3.5. Efecto de la disminución de la salinidad sobre una comunidad microalgal en condición a campo

3.5.1. Caracterización del sitio de muestreo

Se efectuaron estudios *in situ* de variables ambientales salinidad, turbidez y temperatura, a diferentes profundidades en la columna de agua, que permitieron caracterizar las condiciones ambientales de trabajo. Los sitios de muestreo E1, cercano al glaciar, y E2, alejado del glaciar, se encuentran señalados en la Figura 8A en la sección de Materiales y Métodos de este trabajo. Para el estudio de estas variables ambientales, se muestran los datos correspondientes a determinaciones puntuales realizadas un día de muestreo sin aporte de agua de deshielo y otro día con importante aporte de agua de deshielo por aumento de la temperatura en las zonas E1 y E2.

La Figura 31 muestra los resultados obtenidos para las determinaciones de salinidad de las zonas en E1 y E2, en función de la profundidad. Se pudo observar que la salinidad del medio en los días de poco aporte de agua dulce no mostró diferencias significativas entre la superficie y los 2 m de profundidad.

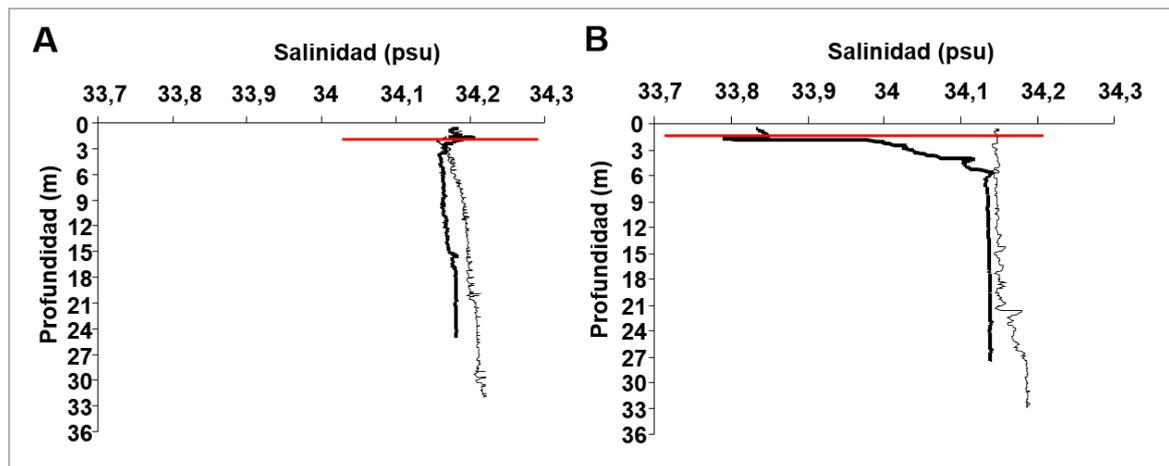


Figura 31. Perfiles contrastantes de salinidad en la columna de agua de Caleta Potter comparando las zonas de estudio E1 (—) y E2 (—) para un día de muestreo. La línea roja, indica los 2 m de profundidad de donde se realizó la toma de las muestras de fitoplancton para realizar los estudios *in situ*. **A:** Sin aporte de agua de deshielo. **B:** Con importante aporte de agua de deshielo por aumento de temperatura.

Por otra parte, se analizó también la turbidez y la temperatura en la columna de agua en las zonas en estudio (Figuras 32 y 33 respectivamente). En los días de muestreo que hubo poco aporte de agua de deshielo, la evaluación de la turbidez y temperatura desde la superficie hasta los 2 m de profundidad, no mostró diferencias significativas entre zonas.

En condiciones de poco aporte de agua de deshielo, los valores hallados en el sitio E1 y E2 fueron 34,18 y 34,19 psu para salinidad ($p>0,05$), la turbidez medida fue de 0,24 y 0,22 Nephelometric Turbidity Unit (ntu) ($p>0,05$) y temperatura registrada de 0,52 y 0,57°C ($p>0,05$) para cada punto, respectivamente.

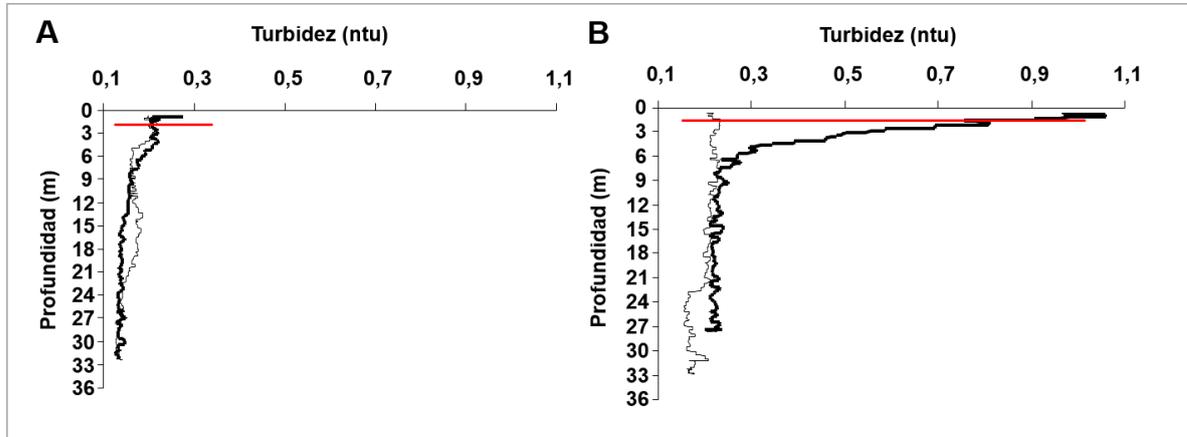


Figura 32. Perfiles contrastantes de turbidez en la columna de agua de Caleta Potter comparando las zonas de estudio E1 (—) y E2 (—) para un día de muestreo. La línea roja, indica los 2 m de profundidad de donde se realizó la toma de las muestras de fitoplancton para realizar los estudios *in situ*. **A:** Sin aporte de agua de deshielo. **B:** Con importante aporte de agua de deshielo por aumento de temperatura.

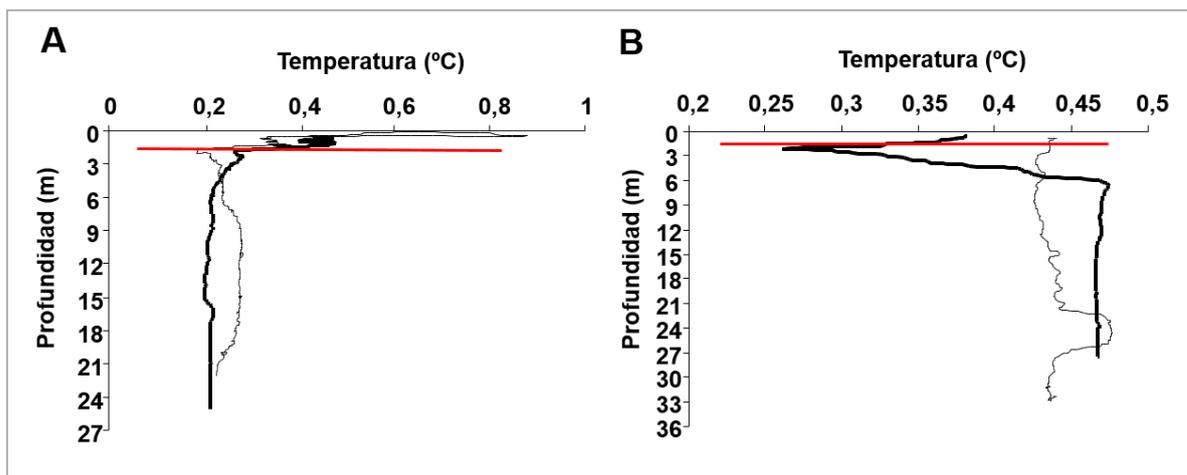


Figura 33. Perfiles contrastantes de temperatura en la columna de agua de Caleta Potter comparando las zonas de estudio E1 (—) y E2 (—) para un día de muestreo. La línea roja, indica los 2 m de profundidad de donde se realizó la toma de las muestras de fitoplancton para realizar los estudios *in situ*. **A:** Sin aporte de agua de deshielo. **B:** Con importante aporte de agua de deshielo por aumento de temperatura.

No obstante, la misma comparación de sitios en días en los que se detectó un importante aporte de agua de deshielo, mostró diferencias estadísticamente

significativas desde la superficie hasta 2 m de profundidad (salinidad: 33,66 y 34,14 psu, $p < 0,01$; turbidez: 0,65 y 0,20 ntu $p < 0,01$ y temperatura: 0,33 y 0,45°C para la zona E1 y E2, respectivamente). Los estudios a mayor profundidad (por debajo de los 6-8 m) no presentaron diferencias estadísticamente significativas al momento de registrar el aporte de agua de deshielo en ambos sitios de estudio.

El análisis de la influencia del deshielo del glaciar durante el tiempo de experimentación, sobre la salinidad hasta 2 m de profundidad en los sitios E1 y E2 se muestra en la Figura 34. Se observa el efecto de dilución del sitio E1 al día 3 del experimento, mientras que, en los días restantes, el aporte de agua dulce no fue significativo. En estos sitios de trabajo, se realizó el estudio de parámetros fisiológicos y bioquímicos. Dichas variables, fueron expresadas en función de la diferencia de salinidad observada entre los dos puntos de muestreo ($\Delta S = |S_{E1} - S_{E2}|$), para los días en los que hubo aportes de agua dulce desde el glaciar hacia la costa. Se detectó que la salinidad en el sitio E2 es constante; sin embargo, se pudo observar que la zona E1 recibe muy poco, mediano y gran aporte de agua dulce, obteniendo como resultado $\Delta S = 0,017$; 0,40 y 1,59 psu, respectivamente.

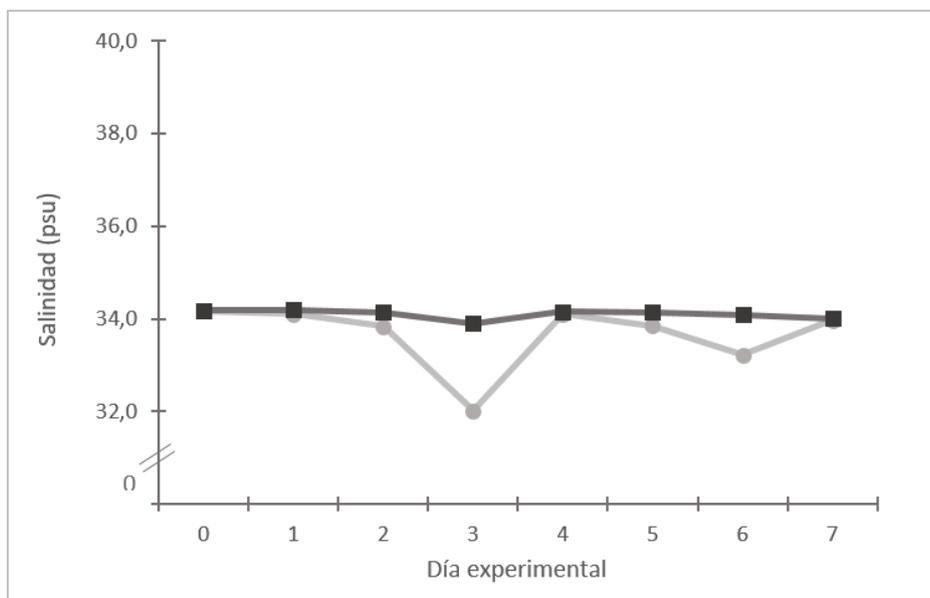


Figura 34. Evolución de la salinidad en los sitios E1 (●) y E2 (■) obtenidos hasta 2 m de profundidad.

Así, considerando que el área adyacente al glaciar; es la más afectada por el aporte de agua dulce debido al derretimiento, con disminución de la salinidad en la zona E1; los resultados observados reflejarían los efectos de las variaciones de salinidad en la comunidad presente en dicho sitio.

3.5.2. Parámetros metabólicos de las comunidades algales

A fin de conocer la fisiología de la comunidad ante variaciones de salinidad en el medio se determinaron los valores de R y Fn en las comunidades algales. En la Figura 35 se muestra la diferencia entre los sitios E1 y E2 en los parámetros hallados de R en función de la variación de la salinidad en el medio. La diferencia de la R entre sitios se calculó como $\Delta R = R_{E1} - R_{E2}$. Cuando la diferencia de la salinidad fue de 0,017 psu, el ΔR fue cercano a cero ($-1 \pm 12 \text{ mg O}_2 (\text{l h})^{-1}$). Este comportamiento es significativamente distinto cuando el aporte de agua dulce es mayor. Se halló que la R en el sitio E1 es significativamente menor comparada con E2 cuando $\Delta S = 0,40$ psu, este resultado se traduce como ΔR negativo.

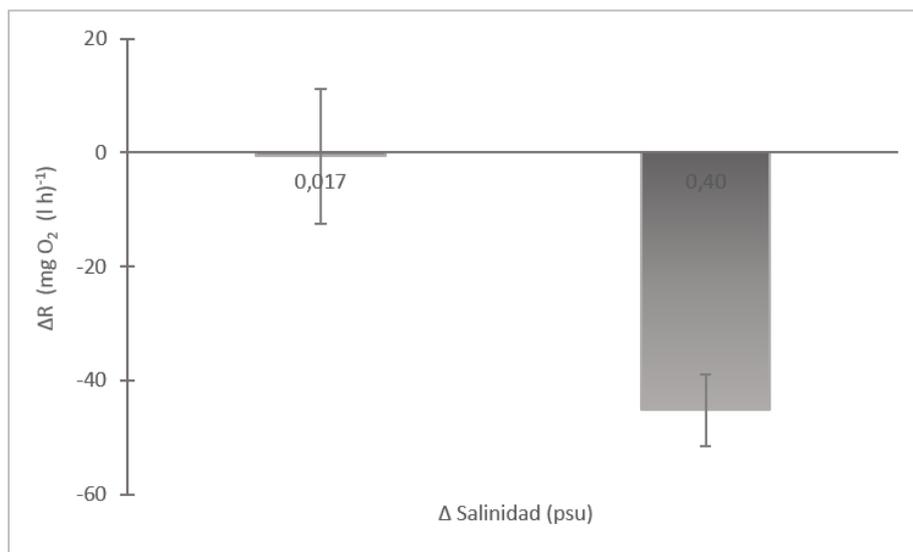


Figura 35. Variación en la ΔR de la comunidad fitoplanctónica antártica, en función de la variación de salinidad en el medio hasta 2 m de profundidad.

La Fn expresada como $\Delta F_n = F_{nE1} - F_{nE2}$; es negativa cuando el aporte del deshielo es pequeño ($\Delta S = 0,017$ psu), lo cual muestra una disminución de la productividad en la zona cercana al glaciar (E1) respecto de la más alejada (E2). En los días de mayor aporte de agua en la zona cercana al glaciar, la ΔF_n resulta ser positiva, señalando que la Fn producida en la zona E1 es significativamente mayor (Figura 36).

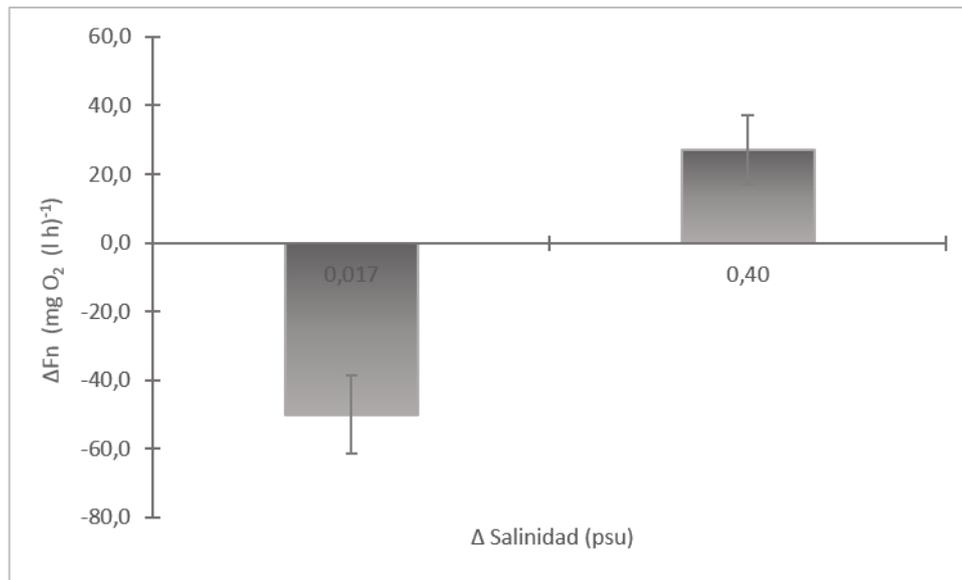


Figura 36. Variación de la Fn producida por la comunidad antártica, en función del ΔS en los sitios E1 y E2 a 2 m de profundidad.

3.5.3. Parámetros oxidativos de las comunidades algales

Por otra parte, se determinaron también los parámetros indicativos de estrés oxidativo en las comunidades algales muestreadas en ambos sitios (E1 y E2). La Figura 37 muestra que una pequeña variación en las condiciones de salinidad (0,017 psu) genera una condición de estrés oxidativo celular con respecto a situaciones de no variaciones de salinidad, puesto que la diferencia de la velocidad de oxidación de la DCFH-DA es positiva ($\Delta V_{\text{DCFH-DA}} = \text{DCFH-DA}_{\text{E1}} - \text{DCFH-DA}_{\text{E2}}$). Sin embargo, cuando se produce la dilución por efecto del deshielo en la zona E1, la $\Delta V_{\text{DCFH-DA}}$ arroja un valor negativo. Dicho resultado, sugiere que el efecto de mayor dilución (0,40 psu) reduce el estrés oxidativo intracelular en la comunidad presente en la zona E1 con respecto a la E2.

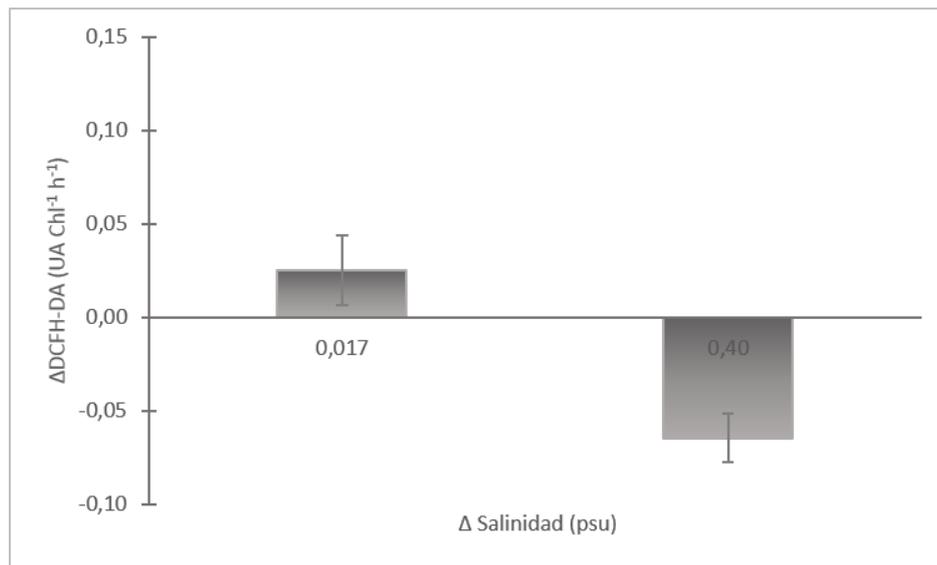


Figura 37. Diferencia de la velocidad de oxidación de la DCFH-DA por la comunidad fitoplanctónica colectada en la zona E1 y E2 en función de la variación de la salinidad a 2 m de profundidad *in situ*.

Considerando el contenido de TBARS como índice de daño oxidativo a lípidos en las células, se observó el mismo perfil que el obtenido para la velocidad de oxidación de la DCFH-DA para las comunidades en las áreas de estudio (Figura 38).

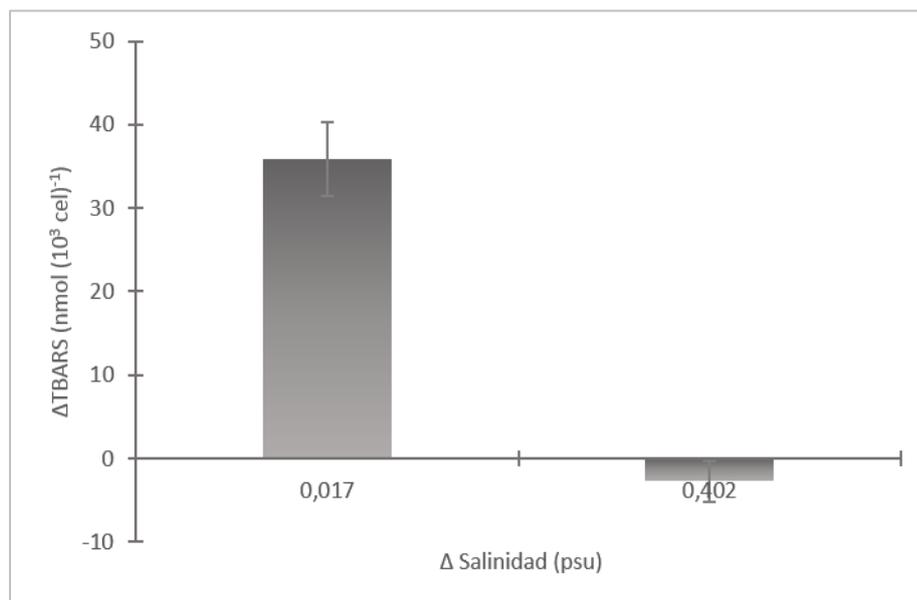


Figura 38. Variación de TBARS en los organismos en estudio con respecto a variación de salinidad en el medio marino, hasta 2 m de profundidad.

Se analizó también el contenido de las defensas antioxidantes presentes en la comunidad frente a la exposición a una condición de salinidad disminuida. Los

resultados encontrados muestran la diferencia del contenido de α -T entre la zona cercana y más alejada del glaciar ($\Delta V_{\alpha-T} = \alpha-T_{E1} - \alpha-T_{E2}$) (Figura 39). Como se observa en la Figura 39 cuando el ΔS es 0,017 psu, la $\Delta V_{\alpha-T}$ es negativa. Este valor indica que el contenido de α -T en la zona cercana al glaciar es menor que el valor obtenido en la zona alejada. Este resultado sugiere un mayor consumo de antioxidante para contrarrestar el estrés oxidativo celular generado por un pequeño aporte de agua dulce en la zona cercana al glaciar. Por otra parte, cuando el aporte de agua de deshielo al sitio E1 es mayor, dando como resultado un $\Delta S = 0,40$, se observa un $\Delta V_{\alpha-T}$ positivo. Este valor sugiere que, probablemente como resultado de un fenómeno de adaptación por parte de la comunidad fitoplanctónica cercana al glaciar, se dispara un aumento en la actividad antioxidante celular para controlar el posible daño.

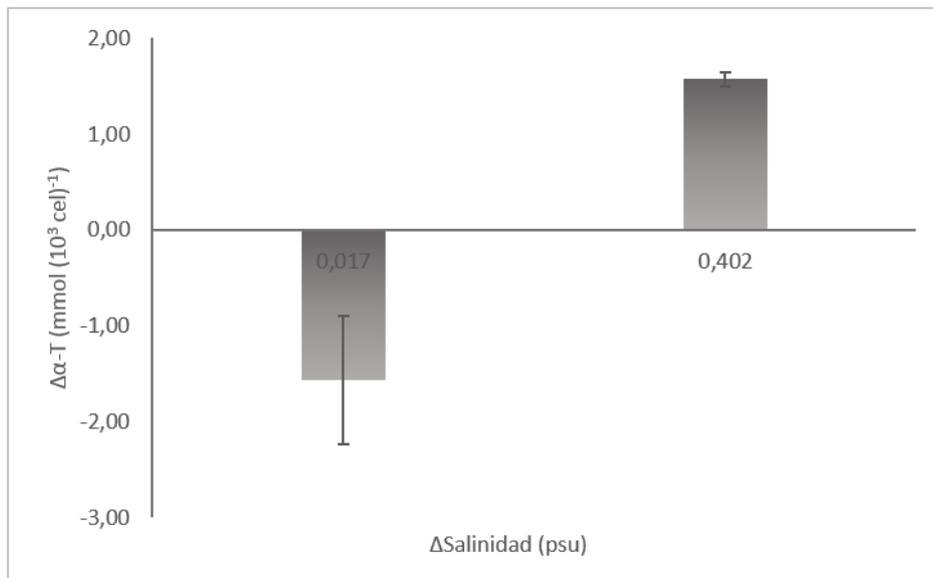


Figura 39. Diferencia del contenido de α -T entre la zona E1 y E2 en función de la variación de la salinidad a 2 m de profundidad *in situ*, en la comunidad fitoplanctónica.

El mismo comportamiento se registra cuando se analiza el contenido del antioxidante liposoluble, β -C en la comunidad antártica según se muestra en la Figura 40.

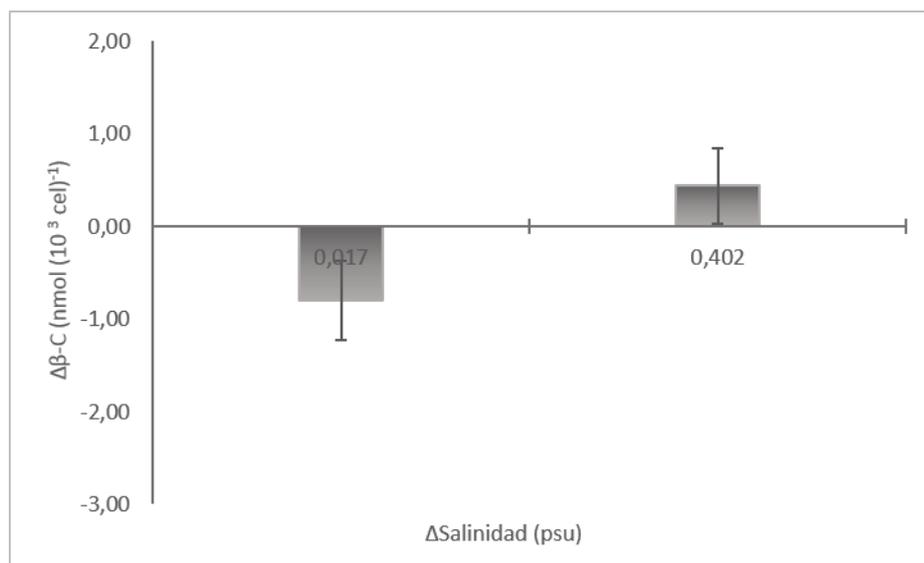


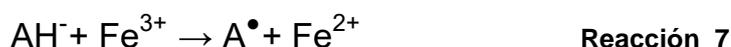
Figura 40. Variación del contenido de β-C para comunidad en función de la variación de salinidad hasta 2 m de profundidad.

4. Discusión

4.1. Estudios en cultivos aislados de distintas especies algales

Las diatomeas son dominantes dentro del pico y el nano-plancton en áreas con altas concentraciones de nutrientes (Sarhou et al. 2005). En la Antártida, el picoplancton constituye una gran porción del fitoplancton y el stock de productividad primaria (Ning et al. 1996; Froneman et al. 2004). En este trabajo de tesis, el estudio de la fisiología algal en condiciones basales se realizó con picoplancton y la diatomea *Porosira glacialis* presentes en la comunidad fitoplanctónica antártica. Tanto la Fn como la R en *P. glacialis* resultó significativamente menor que en el picoplancton probablemente debido a los diferentes mecanismos de adaptación de las especies. Los ecosistemas antárticos marinos están regulados principalmente por el avance y retroceso del hielo sobre el mar y por procesos tales como el derretimiento y la escorrentía que favorece la estabilización de la columna de agua durante el verano austral (Olguín & Alder, 2011). En este sentido, el fitoplancton está expuesto a variaciones ambientales continuas. Dentro de estos cambios se puede mencionar la acción destructiva de la radiación UV, a través de mecanismos directos e indirectos mediados por sensibilizadores endógenos y la generación de ROS (Foyer et al. 1994b). Por otro lado, el derretimiento de glaciares que promueven la estratificación de la columna de agua (Vaughan, 2006), genera cambios de salinidad que causan una variedad de respuestas fisiológicas como estimulación del metabolismo energético, alteraciones en el equilibrio de los electrolitos y del crecimiento y la inhibición de la Fn en algas (Rijstenbil, 2003; Choi et al. 2008), así como también cambios en la composición específica de la comunidad fitoplanctónica (Piquet et al. 2011). Este tipo de modificaciones ambientales, sumado al metabolismo propio de los organismos vivos, generan ROS que son oxidantes altamente reactivos y son consideradas especies químicas dañinas cuya producción en sistemas celulares y extracelulares debe ser controlada adecuadamente para mantener bajas sus concentraciones en estado estacionario.

Uno de los parámetros oxidativos determinados en este trabajo fue el contenido en estado estacionario de A^{\bullet} , que se genera por la oxidación del AH^{\cdot} (Reacción 7). Esta reacción puede estar mediada o no, por catalizadores metálicos como el Fe y Cu (Martel, 1982). La importancia del AH^{\cdot} radica en que tiene un potencial redox bajo, que permite donar un e^{-} a la mayoría de los radicales libres presentes en los sistemas biológicos o reducir a los atrapadores de radicales libres ya oxidados tales como el α -T (Vergely et al. 2003).



En el caso de las microalgas antárticas aisladas que se estudiaron (picoplancton y *P. glacialis*) el contenido de A^{\bullet} en condiciones basales no mostró diferencias significativas entre las mismas. Este parámetro de estrés a nivel hidrofílico es similar entre estas especies que viven en el mismo ambiente. Si bien el contenido de A^{\bullet}

funciona como un marcador de estrés oxidativo dentro de un sistema biológico (Buettner & Jurkiewicz, 1993), el contenido de AH^- puede ser modificado por la condición prooxidativa en el tejido estudiado alterando el balance redox. Así, el índice A^*/AH^- se vuelve un marcador apropiado para evaluar la condición oxidativa hidrofílica del espacio celular (Galleano et al. 2002) que se utiliza en varios sistemas biológicos para tener una información integral del escenario oxidativo celular. Específicamente este índice ha sido medido en diversos organismos acuáticos como marcador de estrés oxidativo, con el fin de estimar globalmente el impacto del ambiente sobre los organismos. En este sentido, se encontró que en las especies antárticas empleadas en este trabajo de Tesis, los valores del índice A^*/AH^- en condiciones basales no muestran diferencias estadísticamente significativas. En este punto es importante señalar que estos cultivos están sometidos a las mismas condiciones ambientales. Estos resultados para el valor del índices A^*/AH^- para estas especies se encuentra dentro de los valores hallados en estudios previos para otras especies microalgales provenientes del mismo ambiente (Figura 41, González et al. 2013). Sin embargo, la comparación del valor del índice A^*/AH^- para otras especies microalgales fotosintéticas provenientes de ambientes diferentes al antártico presenta un rango de valores para distinto (Figura 41).

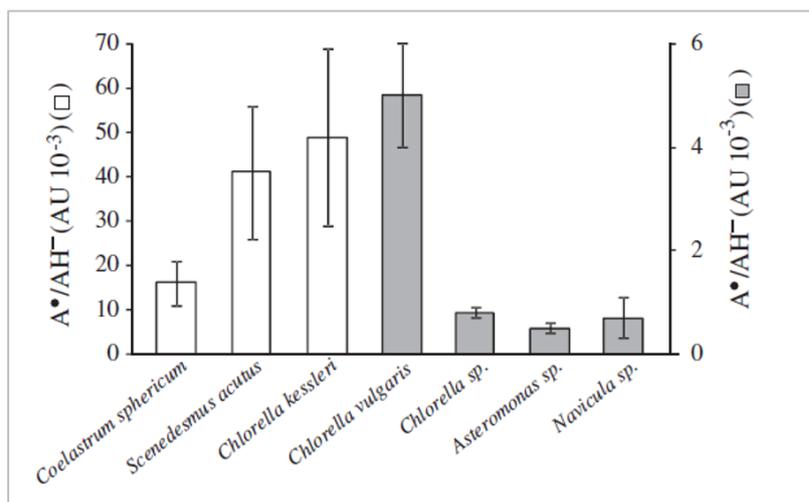


Figura 41. Índice A^*/AH^- en diferentes cultivos algales. Datos expresados como AU, en fase log de crecimiento (día 12). Tomado de González et al. (2013).

Otros autores también señalan que las diferencias en el índice A^*/AH^- se deben principalmente a variaciones estacionales o contaminación antrópica y no a diferencias entre especies (Malanga et al. 2007). En este sentido, Malanga (2001) mostró que el índice A^*/AH^- en *Chlorella sp.* proveniente de Antártida en fase log de crecimiento es significativamente menor que para células de *C. vulgaris* de clima templado. Estos resultados sugieren que los efectos ambientales sobre el estrés oxidativo son diferentes en ambas especies (*C. sp.* antártica y *C. vulgaris*) y estas

diferencias podrían ser factores importantes por ejemplo en el estudio de los efectos en los ecosistemas en relación con la radiación UV-B en zonas donde se registra el agujero de O₃ (Galatro et al. 2011).

Por otro lado, en medio lipofílico celular la peroxidación lipídica, definida como deterioro oxidativo de lípidos que contienen dos o más dobles enlaces C-C (Hummel et al. 2006), es una característica común de los efectos de la oxidación. Los cloroplastos presentes en las algas, están formados por un sistema complejo de membranas ricas en ácidos grasos poliinsaturados que son moléculas blanco potenciales de peroxidación (Halliwell & Gutteridge, 1999). Para contrarrestar estos efectos actúan los mecanismos de defensa antioxidante compuestos por diversas clases de moléculas, tales como el α -T y el β -C. En la microalga antártica *P. glacialis* el contenido de α -T y β -C fue significativamente menor respecto del picoplancton en condiciones basales. Estos resultados pueden estar relacionados con los efectos sobre el contenido de TBARS y la velocidad de oxidación de DCFH-DA, que resultaron significativamente mayores en *P. glacialis* respecto del picoplancton. Posiblemente las defensas antioxidantes se ven disminuidas en *P. glacialis* por efecto de la generación de ROS por el metabolismo celular. Una respuesta similar fue hallada por Hernando et al. (2005) en fitoflagelados marinos subantárticos, sugiriendo que el decrecimiento del contenido de α -T estaba relacionado con la generación de ROS en cultivos sometidos a estrés por radiación UV llevando a un mayor consumo de antioxidantes liposolubles.

El índice daño/protección mostró que el cultivo de *P. glacialis* es más sensible que el picoplancton frente a una situación de estrés oxidativo a nivel liposoluble que se incrementa en función del crecimiento.

4.2. Caracterización de cultivo de la diatomea antártica *P. glacialis* en condiciones controles y frente a la suplementación con Fe

La curva de crecimiento de la diatomea antártica *P. glacialis* en condiciones control y en cultivos suplementados con Fe:EDTA en laboratorio presenta las 3 fases clásicas de crecimiento celular. El contenido de Chla es un indicador de biomasa fitoplanctónica (Creitz & Richards, 1955). La observación del crecimiento ya sea en función del contenido de Chla o de Abs presenta el mismo comportamiento, lo que implica que el aumento de la biomasa se encuentra acompañado de un aumento en el contenido de Chla. Por otra parte, la μ instantánea celular es mayor en la fase de crecimiento log.

En el presente trabajo, la disminución del contenido de Chla en cultivos suplementados con exceso de Fe:EDTA (300 μ M) sugiere un efecto tóxico del Fe sobre el crecimiento en estas condiciones experimentales. El Fe es un nutriente clave en muchos procesos biológicos fundamentales, tiene una gran importancia

ecológica en aguas costeras (Annett et al. 2008). Los resultados obtenidos en este trabajo de Tesis muestran un efecto de la suplementación del Fe en el crecimiento de la *P. glacialis* en fase log de crecimiento. Se puede observar que existe una concentración adecuada ($12 \mu\text{M Fe}$) en la cual el contenido de Chla celular fue máximo considerando el rango de concentraciones estudiado. Sin embargo, el mayor contenido de Fe en el medio de cultivo provocó la disminución de la biomasa. En este sentido, Estevez et al. (2001a) realizaron estudios similares en cultivos de microalgas verdes (*C. vulgaris*) en laboratorio, encontrando que estas microalgas requieren mayor contenido de Fe en el medio de cultivo para un crecimiento óptimo ($90 \mu\text{M Fe}$), pero al sobrepasar la concentración adecuada, la biomasa también disminuye.

En este trabajo se muestra que las μ instantánea de las diatomeas, calculadas a partir de datos de Abs, resultan más bajas cuando las concentraciones de Fe suplementadas son restrictivas, en relación a las empleadas en condiciones control. Estos resultados concuerdan con observaciones previas a este estudio, que aseguran que en aguas de zonas costeras limitadas en el contenido de Fe el crecimiento también es limitado (Martin, 1990; de Baar et al. 2005).

Los resultados obtenidos a escala de laboratorio concuerdan con los informados por otros autores en experimentos de fertilización con Fe a mesoescala, que mostraron que la incorporación de Fe en la superficie de las aguas en regiones "Altos nutrientes-Baja Clorofila" incrementó la productividad local (Bakker et al. 2005; Smetacek et al. 2012; Aumont & Bopp, 2006). Asimismo, Van Leeuwe et al. (1997) observaron en microcosmos suplementados con 2 nM FeCl_3 realizados en el Océano Sur con fitoplancton de ese lugar, que los cultivos presentaron un crecimiento exponencial y una mayor velocidad de crecimiento respecto de los cultivos con menor contenido de Fe (controles). Frente a estas observaciones concluyeron que la composición bioquímica y celular no cambia significativamente a bajas concentraciones de Fe, sin embargo, lleva a una velocidad de crecimiento sub-óptima para el fitoplancton. En cuanto a los resultados del presente trabajo, los medios de cultivo cuyo contenido de Fe fueron superiores al control ($12 \mu\text{M Fe}$), no evidenciaron cambios en la velocidad de crecimiento hasta la concentración de $100 \mu\text{M Fe}$, donde la μ instantánea es máxima. La incorporación de Fe es indispensable para el desarrollo del fitoplancton considerando que el aparato fotosintético cuenta con numerosos *locis* para el Fe. En el PSII hay dos átomos de Fe, uno en el grupo hemo del citocromo b559, y otro Fe no-hemo que se encuentra coordinado en el centro de dos proteínas, D1 y D2 (Kolber et al. 1994). Se observó que la μ instantánea calculada a partir de datos de Chla obtenidos a diferentes concentraciones de Fe, no mostró diferencias significativas. En el mismo sentido, otros autores observaron que los nutrientes liberados en la remineralización dentro de la capa superficial pueden ser inmediatamente tomados por el fitoplancton en cuyo caso la producción se conoce como producción regenerada o reciclada, ya que no hay aumento neto en biomasa (Smetacek, 1999). El Fe llega a los océanos principalmente por los ríos que transportan sedimentos y polvo suspendido en el viento proveniente de las zonas desérticas que se depositan en la superficie de los océanos (Jickells et al. 2005).

Otra contribución está dada por el Fe atmosférico por aporte volcánico, antropogénico y fuentes extraterrestres (Jickells & Spokes, 2001; Johnson, 2001), este Fe puede estar en forma más soluble que el Fe del suelo donde se encuentra en la forma de aluminosilicatos. Asimismo, puede encontrarse como Fe^{3+} , cuya solubilidad es baja en agua de mar y como consecuencia, se hidroliza rápidamente a oxi-hidróxidos de Fe^{3+} (Liu & Millero, 2002). El Fe^{2+} reducido, además de ser más soluble en agua, se oxida rápidamente por el O_2 y el H_2O_2 (King et al. 1995; Millero & Sotolongo 1989; Millero et al. 1987). Si bien no se conoce aún en detalle el mecanismo de incorporación del Fe por parte del fitoplancton, se ha observado que estos organismos adsorben pasivamente el Fe del medio marino, lo asimilan biológicamente y liberan sustancias extracelulares orgánicas capaces de complejar este metal (Price & Morel, 1998).

En relación al contenido de Fe total intracelular, los resultados obtenidos mostraron un incremento cuando la concentración de Fe fue mayor en el medio de cultivo. Si bien el incremento intracelular del micronutriente para 60 y 100 μM Fe en el medio muestra una tendencia al aumento con respecto al control, dicho aumento no es significativo sugiriendo la existencia de un mecanismo ajustado para la absorción de Fe en las células algales. Sin embargo, la diferencia resulta significativa frente a la suplementación con 300 μM Fe con respecto al control. En la mayoría de las células la homeostasis del Fe es un proceso de varias etapas que consiste en la incorporación de Fe, la utilización y el almacenamiento. Sin embargo, las propiedades químicas del Fe establecen limitaciones en cuanto a la acumulación intracelular de este elemento. El Fe^{2+} y Fe^{3+} pueden actuar como catalizadores y generar ROS. En este sentido, otros autores indican que en algunos cultivos de microalgas se registran efectos deletéreos cuando se excede el contenido de Fe (14-28 μM) en agua dulce no contaminada (Brand et al. 1983). Para prevenir el daño oxidativo inducido por Fe, su incorporación y almacenamiento están reguladas por un fino proceso que involucra el esfuerzo cooperativo de un conjunto de moléculas que lo captan y transportan (Alkhateeb & Connor, 2010). Como se indicó previamente, el LIP se define como un "pool" de compuestos de bajo peso molecular, que están débilmente quelados al Fe. En este sentido se cuantificó el LIP en las células de *P. glacialis*, determinando que, ante la situación de aumento de Fe en el medio de cultivo, el LIP disminuye significativamente respecto del cultivo control. Estos datos sugieren que el Fe intracelular está almacenado en forma segura dentro de la célula. Normalmente el LIP representa una fracción minoritaria respecto del contenido total de Fe intracelular (3-5% en animales) (Kakhlon & Cabantchik, 2002) pero esta proporción cambia con el estado redox de la célula (Arredondo & Núñez, 2005). En el caso de las diatomeas antárticas marinas en estudio bajo condiciones control de cultivo, los valores de LIP hallados también representan una pequeña fracción respecto del valor total de Fe intracelular (1,65±0,04 %). Las células con alto LIP invariablemente exhiben altos niveles de ROS. Por lo tanto, el LIP no sólo es un indicador del contenido de Fe total intracelular, también determina el estado redox de la célula (Kruszewski, 2003; Núñez et al. 2004).

Chen et al. (2003) señalaron que en el fitoplancton la absorción del Fe^{3+} quelado a ligandos orgánicos, involucra la reducción a Fe^{2+} antes de ser transportado dentro del compartimento celular o incorporarse sólo por difusión. Otros autores aseguran que la absorción de Fe no es simplemente por difusión, y la internalización de Fe por el picoplancton marino se produce por estrategias de internalización altamente específicas y especie-dependientes (Volker & Wolf-Gladrow, 1999; Worms et al. 2006). La absorción puede ser por el reconocimiento del complejo de Fe^{3+} -sideróforo por un receptor específico de membrana, que transporta hacia adentro del fitoplancton marino y reduce el fuerte complejo de Fe^{3+} a un complejo más débil de Fe^{2+} con el fin de permitir la disociación (Volker & Wolf-Gladrow, 1999). Otros autores han descrito que si bien, la mayoría del fitoplancton marino no secreta sideróforos, muchos tienen sistemas de transporte para el complejo Fe^{3+} -sideróforo (Hutchins et al. 1999; Maldonado & Price, 1999). Hutchins et al. (1999) observaron que otros tipos de fitoplancton marino contienen transportadores de Fe unidos a una reductasa en la superficie, para que el Fe quelado se disocie antes de la incorporación intracelular. Una vez en el citosol, el Fe^{2+} forma parte del LIP (Breuer et al. 1995) y eventualmente, el exceso se almacena de forma segura en la Ft, que puede aceptar hasta 4500 átomos de Fe^{3+} en la forma de oxi-hidroxilo. En consecuencia, la determinación de velocidad de la reducción de Fe intracelular permite conocer la incorporación de Fe celular. Los resultados de la velocidad de incorporación de Fe obtenidos en *P. glacialis* coinciden con el aumento de Fe total intracelular, sugiriendo que el mecanismo de incorporación de Fe no se ve afectado por altas concentraciones de Fe extracelular. Cuando el Fe entra a la célula se espera un activo tránsito de Fe citosólico en forma de LIP, sin embargo, a un mayor contenido de Fe intracelular se observó un menor porcentaje de LIP. Probablemente, este efecto se debe a una mayor movilización de Fe para cubrir las necesidades del desarrollo celular frente a una situación de Fe deficitaria. Es posible que el Fe sea almacenado de forma segura (probablemente en la Ft), de manera que permita una gran incorporación del metal reduciendo la generación de ROS.

Se podría suponer que la incorporación de Fe en la célula daría lugar a una potencial formación de LR^{\bullet} . Sin embargo, los resultados obtenidos mostraron una disminución significativa en la concentración de estado estacionario de LR^{\bullet} cuando se suplementó el medio de cultivo con 60 μM Fe respecto del control. Esto podría indicar que a concentraciones menores de 60 μM Fe el nivel incrementado de LIP por la movilización de Fe genera daño, sin embargo, a 60 μM Fe se genera una "compensación" de contenido de Fe óptimo. Estos resultados difieren de los resultados mostrados para el alga verde de agua dulce *C. vulgaris* donde el valor del contenido de LR^{\bullet} para el cultivo control fue significativamente menor respecto del suplementado con estos niveles de Fe (Estevez et al. 2001a). También se ha observado que el contenido del LR^{\bullet} en otras especies de microalgas como *Navicula sp.* es coincidente con los datos obtenidos para *C. vulgaris* en fase log de crecimiento (Malanga & Puntarulo, 2012). La diferencia entre los resultados hallados en este trabajo y los observados por otros autores, pueden deberse a las reacciones en condiciones fisiológicas que conducen a la generación de ROS, propia para cada

especie. El análisis del contenido de LR• es importante por el hecho que la reacción de las ROS con los LR• es uno de los mecanismos principales de daño celular y depende del grado de fluidez de la membrana, que a su vez, se encuentra relacionado con el grado de saturación de la doble capa lipídica (Halliwell & Gutteridge, 1999). La generación intracelular de ROS no implica necesariamente toxicidad, pero se llega a una condición de estrés oxidativo cuando la formación de ROS excede la capacidad de la defensa antioxidante o modifica la señalización redox afectando la funcionalidad de la célula (Häubner et al. 2014). En este sentido, los resultados preliminares del sistema de defensa antioxidante en medio lipofílico mostraron que los cultivos suplementados con 60 μM Fe, presenta el menor contenido de antioxidantes lipídicos con respecto a los cultivos controles. Si bien es necesario completar dichos estudios, esta tendencia explicaría que la disminución del contenido de LR• para este cultivo expuesto a altas concentraciones de Fe se debería a un consumo incrementado de estos antioxidantes liposolubles en las células. Sin embargo, este control celular endógeno no puede ser eficientemente mantenido frente al aumento sostenido en la exposición de Fe. Así, frente a una suplementación con 100 μM Fe el contenido de LR• retoma el valor determinado a 12 μM Fe. En estudios futuros sería interesante evaluar la actividad de las defensas antioxidantes enzimáticas para completar el escenario oxidativo y evaluar otros mecanismos de defensa celular ante condiciones de estrés oxidativo.

4.3. Efectos de los cambios de salinidad sobre los microcosmos

El estudio de microcosmos implicó la evaluación de las condiciones oxidativas en las comunidades fitoplanctónicas antárticas provenientes de la Caleta Potter en la Isla 25 de Mayo en la Península Antártica. El crecimiento de las comunidades que se determinó en base al recuento celular, mostró la misma tendencia registrada en los cultivos de diatomeas en condiciones de laboratorio. Puntualmente, en los microcosmos estudiados, se observa que la fase log de crecimiento es la más vulnerable ante la disminución de la salinidad en el medio ya que las disminuciones en el recuento celular fueron significativas. Estos resultados evidencian que condiciones ambientales adversas podrían tener un efecto negativo sobre el crecimiento de esta comunidad algal. Un aumento en la duración de la fase de latencia y los menores recuentos celulares determinados en la fase estacionaria pueden adjudicarse a una dificultad en la adaptación de estos microorganismos a las condiciones de estrés osmótico. El estrés osmótico inhibe la tasa de crecimiento del fitoplancton (Aizdaicher & Markina, 2010). El análisis del crecimiento en función del contenido de Chla presenta el mismo comportamiento cinético que el evaluado por recuento celular. Se puede ver que las condiciones del medio de cultivo afectan directamente el crecimiento de la comunidad antártica estudiada en el microcosmos. Otros autores han informado previamente que cambios en la salinidad puede

influenciar fuertemente la Fn en el fitoplancton antártico (Palmisano et al. 1987; Ralph et al. 2005; Ralph et al. 2007). Por otra parte, estudios en algas rojas presentes en estuarios de áreas tropicales y subtropicales, mostraron que se necesita un período de 2-4 días de adaptación para el crecimiento en condiciones de salinidad disminuida (Lapointe et al. 1984; Yarish Edwards & Casey, 1979). En el caso de los microcosmos antárticos analizados en esta tesis, la cinética de crecimiento y la producción de biomasa presentan un comportamiento equivalente durante el desarrollo del experimento. La productividad primaria analizada según la μ instantánea, muestra que el período que necesita la comunidad expuesta a condiciones de baja salinidad para crecer es mucho mayor, en comparación con los datos obtenidos en los cultivos en condiciones control. A 30 psu, la velocidad se incrementa significativamente hacia el final del período estudiado (día 8). Por lo tanto, los resultados de este trabajo de tesis sugieren que en la fase log de crecimiento las condiciones del medio afectan directamente el crecimiento y que durante este proceso se requiere de mayor tiempo de adaptación por parte de la comunidad en estas condiciones de salinidad disminuida.

Al analizar los cambios en la composición de los microcosmos, un punto interesante que se destaca es el reemplazo de las diatomeas grandes céntricas por las pennadas pequeñas en condiciones de salinidad disminuida ya que estas especies presentan una reducción del 91% con respecto al total del fitoplancton después de 8 días de exposición. Por ejemplo, *Fragilariopsis cylindrus*, una de las diatomeas pennadas pequeñas, incrementó su abundancia relativa al final del experimento en condiciones de menor salinidad (datos no mostrados). Estos resultados son una respuesta específica a los cambios en la salinidad para estas especies (Karaeva & Jafarova, 1993; Aizdaicher & Markina 2010; Piquet et al. 2011). Estudios a campo mostraron la prevalencia de estas especies de pequeñas diatomeas bajo condiciones de baja salinidad (Hernando et al. 2015). Estos resultados de tesis son consistentes con los hallados por Li et al. (2009) que encontraron que el picoplancton pequeño se incrementó mientras que las células grandes decrecieron bajo condiciones de dilución por derretimiento de hielo y descarga de ríos en el Océano Ártico. La respuesta de tolerancia a cambios de salinidad en el medio de cultivo también se ha observado en otros sistemas fotosintéticos. En algunas especies de plantas, el estrés osmótico puede modificar factores de transcripción, y conducir a la expresión temprana de respuesta de activadores transcripcionales que desencadenan la activación de genes efectores de tolerancia al estrés (Zhu, 2002).

El fitoplancton y las macroalgas de las zonas costeras cumplen un papel fundamental como fuente de energía para organismos herbívoros planctónicos y bentónicos (Iken et al. 1997; Amsler et al. 2005). En macroalgas, la salinidad es uno de los factores primarios responsables de la restricción del crecimiento y desarrollo en las zonas de estuarios (Jahnke & White, 2003; Parida & Das, 2005).

Los resultados obtenidos muestran que el cambio en la salinidad del medio tiene un gran efecto, disminuyendo significativamente la Fn de esta comunidad. Estudios previos de otros autores señalaron que los cambios en la salinidad tienen

gran influencia sobre la Fn del fitoplancton antártico (Palmisano et al. 1987; Ralph et al. 2005; Ralph et al. 2007). La respuesta observada en este trabajo puede estar asociada con la disminución en la eficiencia de absorción de energía lumínica por el PSII en condiciones hipoosmóticas como se mostró previamente (Radchenko & Il'yash, 2006). Estos autores describieron además las respuestas especies-específicas frente a estrés hipotónico de diferentes magnitudes y la posible presencia de mecanismos especies-específicos de aclimatación osmótica. Como se mencionó, al finalizar el ensayo, en condiciones de salinidad disminuida, las diatomeas pequeñas pennadas dominaron el microcosmos, en particular la *Fragilariopsis cylindrus/nana* que presentan una Fn relativamente constante en ambientes sometidos a salinidad variable (Petrou et al. 2011). Esta observación podría explicar la buena adaptación de estas especies a condiciones de baja salinidad en el medio en los microcosmos.

La R en el fitoplancton expuesto a condiciones de baja salinidad, mostró un aumento significativo respecto del control en los primeros días de ensayo. El aumento temprano de la R puede estar asociado con una situación intracelular de estrés inducida por la disminución de la salinidad. En función de los resultados obtenidos en microcosmos con salinidad disminuida, el aumento de la R y disminución de la Fn, podrían estar asociados con cambios en el tamaño celular de las especies durante el experimento. Estas observaciones coinciden con datos de otros autores quienes describen que el fitoplancton de mayor tamaño puede sostener las tasas de producción y biomasa altas, en comparación con las células pequeñas (Cermeño et al. 2005; Marañón et al. 2007).

Por otra parte, la R es una de las actividades metabólicas que generan subproductos muy reactivos tales como las ROS. En este sentido, las respuestas fisiológicas (Fn y R) y bioquímicas de las algas sometidas a estrés osmótico, están relacionadas entre sí según los estudios realizados en el presente trabajo de Tesis. De acuerdo a los resultados obtenidos, los cultivos a 30 psu mostraron una velocidad de oxidación de DCFH-DA significativamente mayor en los días 1, 4 y 6. Estos resultados coinciden con la disminución de la Fn, el incremento de la R y con el aumento del metabolismo ya que las algas están en la fase de mayor crecimiento. El aumento de la velocidad de oxidación de la DCFH-DA en los cultivos con salinidad disminuida podría estar asociado a la generación de las ROS en los cloroplastos que pueden dañar al fotosistema PSII afectando de esta manera la Fn. En particular se genera una gran cantidad de O_2^{\bullet} (Asada & Takahashi, 1987; Asada, 1994; Asada, 1999). Cuando la producción de este radical es muy elevada y supera el sistema de defensa antioxidante las consecuencias son el daño al PSII y al proceso de fijación de carbono (Asada & Takahashi, 1987; Asada, 1994). Por otra parte, el aumento del contenido de TBARS observado en este sistema por estrés osmótico sugiere un aumento de la peroxidación de los ácidos poliinsaturados presentes en las membranas biológicas que podría ocasionar una alteración en la estructura de las mismas. En este sentido, Radchenko & Il'yash (2006), describieron para el alga *Thalassiosira weissflogii* que la disminución en la abundancia en el primer día de exposición a baja salinidad está relacionada con la pérdida de la integridad de la

membrana, que no permitiría el control de la liberación de sustancias específicas para disminuir la presión de turgencia. Es importante señalar que el aumento de los TBARS se corresponde con la respuesta observada a nivel de Fn y oxidación de DCFH-DA. Por lo tanto, todas estas observaciones señalan la incidencia del estrés por baja salinidad a nivel oxidativo. Por otra parte, el análisis de la condición oxidativa en los microcosmos controles en función del tiempo, muestra que la velocidad de oxidación de DCFH-DA y fundamentalmente el contenido de TBARS, se incrementa en la fase lag y log, respectivamente, en comparación con el día inicial del estudio. Estos parámetros están acompañados por el aumento significativo del contenido de los antioxidantes α -T y β -C a lo largo del estudio. El aumento de los antioxidantes liposolubles podría deberse a un incremento de su producción para controlar los efectos oxidativos del crecimiento en los organismos presentes en el microcosmos. Asimismo, el contenido de α -T y β -C presente en la comunidad de los microcosmos estudiados, aumenta en condiciones de salinidad disminuida (30 psu) comparado con los experimentos controles. Los antioxidantes liposolubles son moléculas capaces de prevenir la formación o inhibir la peroxidación lipídica. En organismos fotosintéticos, algunos carotenoides son capaces de captar la luz como función adicional, mientras que otros son atrapadores específicos de ROS generados por la sobreexcitación de energía en el aparato fotosintético (Asada & Takahashi, 1987; Halliwell & Gutteridge, 1999; Demmig-Adams & Adams, 1993). Los carotenoides también pueden disipar el exceso de energía a través del ciclo de la xantofila (Asada & Takahashi, 1987; Krinsky, 1989; Halliwell & Gutteridge, 1999). La disminución del contenido de las ROS al finalizar el experimento en el cultivo con salinidad disminuida, estaría relacionada con la respuesta protectora asociada al aumento de los antioxidantes lipídicos. Adicionalmente, este resultado muestra que la comprensión de la respuesta adaptativa de las algas al estrés por salinidad es muy importante puesto que el tiempo de recuperación requerido difiere entre especies individuales de algas y depende del grado de estrés por salinidad al que están sometidas (Radchenko & Il'yash 2006). Los resultados obtenidos en estos estudios de microcosmos en condiciones de baja salinidad muestran, además, una incidencia sobre la comunidad fitoplanctónica a través del reemplazo de especies de diatomeas grandes céntricas por especies más pequeñas probablemente asociada a cambios en las condiciones oxidativas intracelulares y fisiológicas. En este sentido, las células grandes son las responsables de la mayoría de la exportación de carbono biogénico hacia la profundidad del océano y a niveles tróficos más elevados lo que tiene importantes implicancias biogeoquímicas (Legendre & Rassoulzadegan, 1996). A modo de resumen, la Figura 42 esquematiza los posibles cambios que pueden producirse a largo plazo sobre la biota por el aporte de agua dulce en las costas del Océano Sur debido al derretimiento de los glaciares, que afectan directamente el metabolismo oxidativo intracelular y generan finalmente cambios especie-específicos.

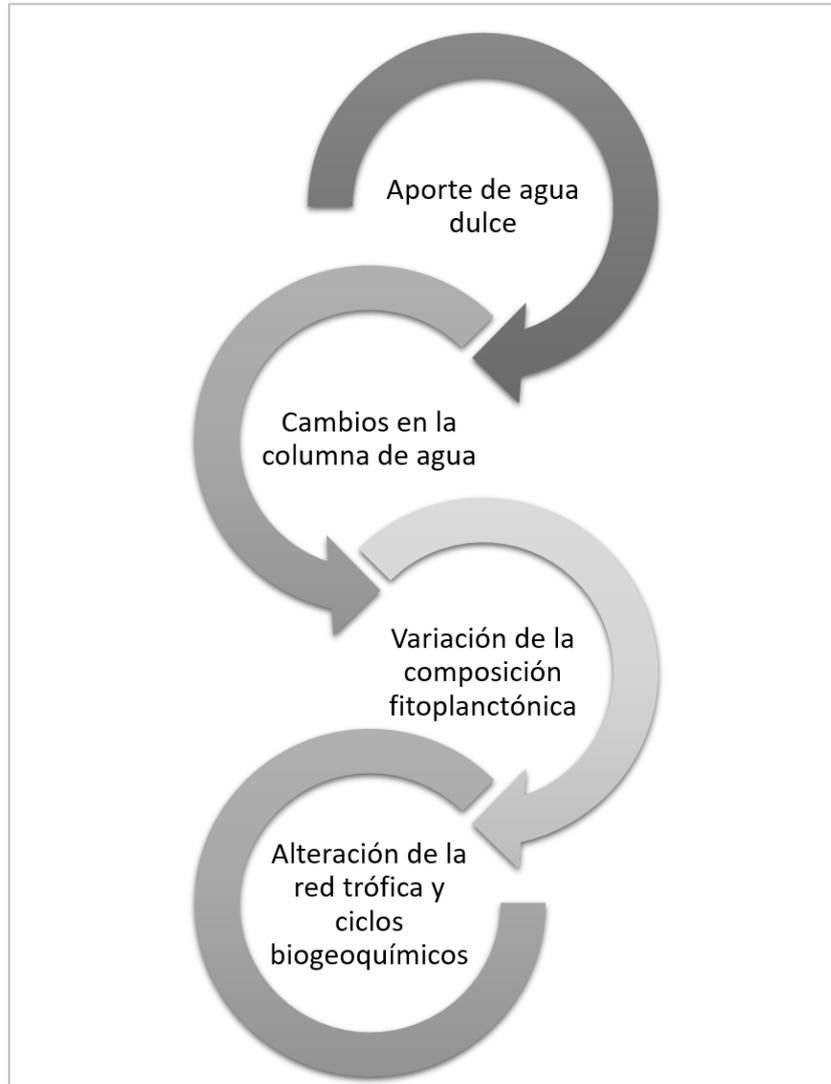


Figura 42. Cambios biológicos y ambientales modulados por el incremento del ingreso de agua dulce al mar disparados por efectos de estrés oxidativo en las comunidades fitoplanctónicas.

4.4. Efectos de la disminución de la salinidad sobre los parámetros oxidativos en una comunidad algal antártica *in situ*

El análisis de los parámetros oxidativos de las comunidades algales estudiadas *in situ* muestra el estado oxidativo generado ante cambios en el medio ambiente donde se desarrollan. La velocidad de oxidación de la DCFH-DA resultó menor en el sitio E1 (sitio cercano al glaciar) respecto al sitio E2 (sitio alejado del glaciar). El ensayo que se basa en la oxidación de la molécula no fluorescente de DCFH-DA para la detección de varias ROS en el medio biológico (McDowell et al.

2013), fue pensada para ser un indicador especial de H_2O_2 . Sin embargo, se ha demostrado que esta molécula es oxidable por otras ROS incluyendo el $O_2^{\bullet-}$, OH^{\bullet} , peróxilos, alcoxilos, hidroperóxidos y $OONO^-$ que son productos metabólicos normales (Halliwell & Gutteridge, 2007). Como ya se indicó, las ROS son responsables por la degradación de la clorofila y el decrecimiento de la actividad del PSII en la antena fotosintética del fitoplancton (Saison et al. 2010). Por otra parte, el parámetro que estima el daño oxidativo en lípidos (contenido de TBARS) mostró el mismo comportamiento que la velocidad de oxidación de DCFH-DA ante importantes contribuciones de agua dulce. Estos resultados sugerirían que bajo una condición de disminución de salinidad se reduce el estrés en las comunidades microalgales. Sin embargo, el estudio del contenido de antioxidantes liposolubles tales como el α -T y el β -C indica que, en condiciones de estrés por disminución de la salinidad, la zona cercana al glaciar presentó un contenido de antioxidantes liposolubles mayor al obtenido en la zona más alejada (E2). Esto indica que el aporte significativo de agua dulce y su consecuente disminución de la salinidad del medio, induce la generación de antioxidantes liposolubles que protegerían eficientemente a la comunidad estudiada de manera que no se incrementan los marcadores de daño oxidativo (TBARS). Resultados similares fueron publicados previamente por Ranga Rao et al. (2007) en su trabajo empleando la microalga verde *Botryococcus braunii* en el cual estudiaron el efecto de la salinidad sobre el crecimiento y otros parámetros fisiológicos. El incremento de α -T como respuesta protectora ante condiciones de estrés también se observó en otras microalgas verdes de agua dulce y ambientes templados (*C. vulgaris*) expuestas a mayores concentraciones de Fe y radiación UV-B (Estevez et al. 2001b). Puntualmente en este estudio se observó que el contenido de α -T es mayor cuando se compara con el contenido de β -C en la comunidad microalgal *in situ*. El α -T podría ser considerado el principal responsable de la protección celular frente al daño oxidativo a nivel lipídico.

Como se discutió previamente, el estrés por salinidad tiene efectos sobre una gran variedad de vías metabólicas, como la Fn (Allakhverdiev et al. 2002) y la biosíntesis de membranas lipídicas (Sakamoto & Murata 2002; Singh et al. 2002). También tiene efecto sobre la R a fin de mantener el balance osmótico (Qasim et al. 1972). Las comunidades microalgales estudiadas mostraron que la R puede variar frente a pequeños o grandes aportes de agua dulce. Cuando se produjo el mayor efecto de dilución ($\Delta S=0,40$ psu) R fue considerablemente menor en la zona E1 que se traduce en una disminución del ΔR . Esto significa que la disminución de la R del fitoplancton en la zona más diluida es mayor que en la zona con poco aporte de agua dulce. La relación entre los procesos que ocurren en los cloroplastos y el metabolismo celular en su conjunto también se manifiesta como un efecto en la respiración mitocondrial (Lemaire et al. 1988), como se pudo observar en los resultados fisiológicos de R y Fn obtenidos en los estudios *in situ*. En general, los resultados obtenidos en los experimentos *in situ* son concordantes con los hallados en los estudios realizados en microcosmos. La disminución de la salinidad del medio afectaría significativamente las características fisiológicas de las comunidades

algales presentes en ese ambiente que conducen a cambios en la comunidad fitoplanctónica del ambiente marino antártico.

Tomados en su conjunto, estos datos experimentales dejan de manifiesto que los aportes de los estudios *in situ*, en microcosmos y en laboratorio se complementan y contribuyen a progresar en el entendimiento de un complejo escenario biológico con una dinámica tan compleja como interesante.

5. Conclusiones

1. En estudios en condiciones de laboratorio empleando *Porosira glacialis* se observó un mayor índice daño/protección a nivel lipofílico comparado con cultivos de picoplancton, sugiriendo que la situación de estrés oxidativo no pudo ser adecuadamente controlada, por la disminución de las defensas antioxidantes por el efecto de la generación de los ROS durante el desarrollo celular. El índice daño/protección mostró que a nivel lipofílico, el cultivo de *P. glacialis* es más sensible que el picoplancton frente a una situación de estrés oxidativo exógeno. Los valores del índice oxidativo A^{\bullet}/AH^{\bullet} son comparables con los obtenidos en otras especies provenientes de la misma zona.

2. El contenido de Fe total intracelular aumentó de acuerdo al contenido de Fe en el medio de cultivo. Sin embargo, el contenido de LIP disminuyó lo que sugiere que el Fe intracelular está siendo activamente distribuido para lograr un almacenamiento seguro dentro de la célula. El contenido de LR^{\bullet} en las membranas disminuyó significativamente a concentraciones de 60 μM Fe posiblemente debido al consumo de antioxidantes liposolubles.

3. Una salinidad de 30 psu cambió la composición de la comunidad algal. Las diatomeas pequeñas pennadas al final del período analizado fueron dominantes reemplazando a las diatomeas céntricas grandes, probablemente debido a la mejor adaptación de estas especies en condiciones de baja salinidad en el medio en los microcosmos.

4. En los microcosmos en condiciones de 30 psu de salinidad, se observó una disminución de la Fn y un incremento de la R acompañado de un aumento significativo en la velocidad de oxidación de DCFH-DA, el contenido de TBARS y el contenido de antioxidantes liposolubles en fase logarítmica. Estos efectos indican un aumento del metabolismo celular en estas condiciones comparado con los experimentos controles llevados a cabo a una salinidad de 34 psu. Los estudios realizados sugieren que el estrés osmótico está relacionado con el estrés oxidativo y la estimulación de la generación de ROS.

5. Los resultados en los experimentos *in situ* son concordantes con los hallazgos en microcosmos. El estudio del contenido de antioxidantes liposolubles (α -T y β -C) indican que, en condiciones de estrés, la zona cercana al glaciar (E1) presentó un contenido de antioxidantes liposolubles mayor al obtenido en la zona más alejada (E2). Esto sugiere que el aporte significativo de agua dulce induce la generación de los antioxidantes mencionados. El incremento de α -T como respuesta protectora fue similar al observado en otras especies de microalgas frente diferentes situaciones de estrés. El mayor contenido de α -T frente al contenido de β -C en la comunidad microalgal *in situ* sugiere que el α -T sería el principal responsable en la protección celular frente al daño oxidativo a nivel lipofílico.

6. La disminución de la salinidad del medio afectaría significativamente a las características fisiológicas de las comunidades presentes en ese ambiente que contribuyen a cambios en la comunidad fitoplanctónica del ambiente marino antártico. El estrés oxidativo generado se entiende como uno de los factores que afecta a las comunidades en estudio, sin embargo, no se puede asegurar que esta sea la única y concluyente causa de los cambios registrados.

7. Actualmente, el fenómeno del cambio climático se caracteriza por el aumento de la temperatura atmosférica. El incremento de la temperatura en la zona estudiada genera disminución de la salinidad en zonas costeras y cambios en la composición y concentración de nutrientes en la columna de agua. Se pudo determinar que como la disminución de la salinidad genera un aumento de las ROS se genera una condición de estrés oxidativo intracelular. Esta situación produce disminución de la productividad primaria y aumento de la R en la comunidad fitoplanctónica antártica que probablemente contribuye a la generación de CO₂ atmosférico, lo cual favorece el fenómeno del cambio climático y genera un círculo vicioso. Asimismo, los cambios en las condiciones oxidativas intracelulares en la comunidad fitoplanctónica, estarían asociados a los cambios taxonómicos observados en el sitio de estudio (Figura 43).

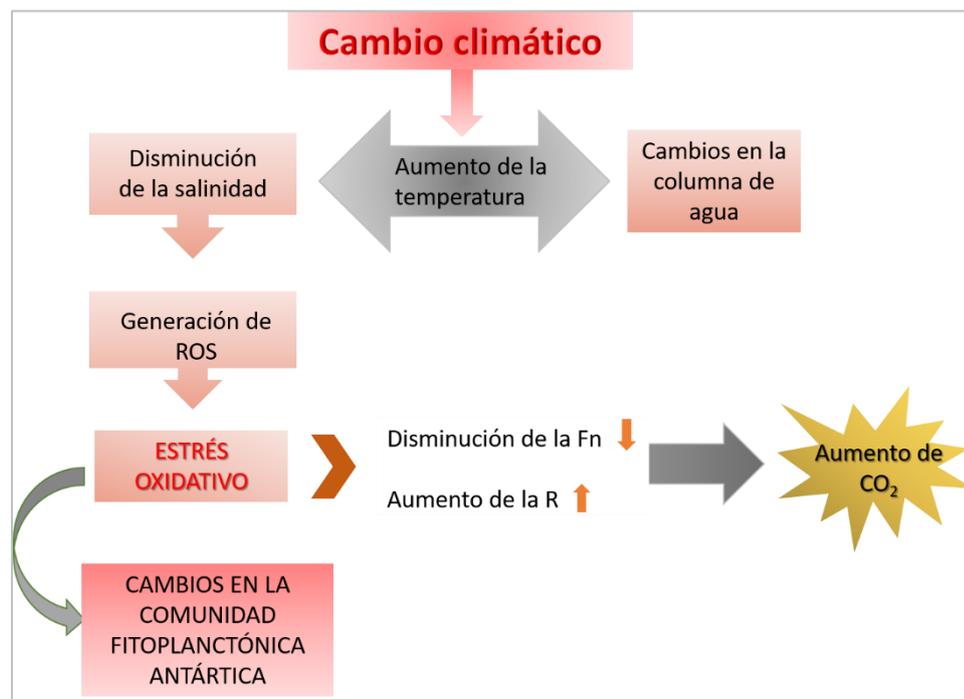


Figura 43. Efecto del cambio climático en la comunidad fitoplanctónica antártica.

8. Una visión integral de los trabajos descriptos permite concluir que los estudios de laboratorio, microcosmos e *in situ* realizados en forma independiente son poco representativos de los cambios ecológicos complejos. Sin embargo, el aporte de

cada uno de ellos es necesario para obtener conclusiones acerca del desarrollo del ambiente que deben ser analizarlos en forma conjunta y complementaria.

6. Bibliografía

ABELE, D., A., Atencio, D., Dick, O., Gonzalez, M., Kriews, S., Meyer, E., Philipp & Il. Stölting; 2008.- Iron, copper and manganese discharge from glacial melting into Potter Cove and metal concentrations in Laternula elliptica shells. Ber. Polarforsch. Meeresforsch. 571:39-46.

ABELE-OESCHGER, D., R., Oeschger & H., Theede; 1994.- Biochemical adaptations of Nereis diversicolor (Polychaeta) to temporarily increased hydrogen peroxide levels in intertidal sandflats. Mar. Ecol. Prog. Ser. 106:101-110.

AHN, I.Y., K.H., Chung & H.J., Choi; 2004.- Influence of glacial runoff on baseline metal accumulation in the Antarctic limpet Nacella concinna from King George Island. Mar. Poll. Bull. 49:119-141.

AHN, I.Y., S.H., Lee, K.T., Kim, J.H., Shim & D.Y., Kim; 1996.- Baseline heavy metal concentrations in the Antarctic clam, Laternula elliptica in Maxwell Bay, King George Island Antarctica. Mar. Poll. Bull. 32:592-598.

AIZDAICHER, N.A. & Z.V., Markina; 2010.- The effect of decrease in salinity on the dynamics of abundance and the cell size of Corethron hystrix (Bacillariophyta) in Laboratory Culture. Ocean Sci. J. 45:1-5.

ALKHATEEB, A.A. & J.R., Connor; 2010.- Review: Nuclear ferritin: A new role for ferritin in cell biology. Biochim. Biophys. Acta.1800:793-797.

ALLAKHVERDIEV, S.I., Y., Nishiyama, S., Miyairi, H., Yamamoto, N., Inagaki, Y., Kanesaki & N., Murata; 2002.- Salt stress inhibits the repair of photodamaged photosystem II by suppressing the transcription and translation of psbA genes in Synechocystis. Plant Physiol. 130:1443-1453.

AMSLER, C.D., K., Iken, J.B., McClintock, M.O., Amsler, K.J., Peters, J.M., Hubbard, F.B., Furrow & B.J., Baker; 2005.- Comprehensive evaluation of the palatability and chemical defenses of subtidal macroalgae from the Antarctic Peninsula. Mar. Ecol. Prog. Ser. 294:141-159.

ANNETT, A.L., S., Lapi, T.J., Ruth & M.T., Maldonado; 2008.- The effects of Cu and Fe availability on the growth and Cu:C ratios of marine diatoms. Limnol. Oceanogr. 53 (6):2451-2461.

APEL, K. & H., Hirt; 2004.- Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. Annu. Rev. Plant Biol. 55:373-399.

AROSIO, P. & S., Levi; 2002.- Ferritin, iron homeostasis, and oxidative damage. Free Radic. Biol. Med. 33:457-463.

ARREDONDO, M. & M.T., Núñez; 2005.- Iron and copper metabolism. Molecular Aspects of Med. 26:313-327.

ASADA, K.; 1994.- Mechanisms for scavenging reactive molecules generated in chloroplasts under light stress. En: Baker, N.R., & Boyer, J.B., (eds.), Photoinhibition of Photosynthesis, BIOS, Oxford, UK, pp.129-142.

ASADA, K.; 1999.- The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. Annu. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol. 50:601-639.

ASADA, K. & M., Takahashi; 1987.- Production and scavenging of active oxygen in photosynthesis. En: Kyle, D.J., Osmond, C.B., & Arntzen C.J., (eds.), Photoinhibition, Elsevier, Amsterdam, pp. 228-287

ATHAR, H.R., A., Khan & M., Ashraf; 2008.- Exogenously applied ascorbic acid alleviates salt-induced oxidative stress in wheat. Env. Exp. Bot. 63:224-231.

AUMONT, O., & L., Bopp; 2006.- Globalizing results from ocean in situ iron fertilization studies. Global Biogeochem. Cycles. 20 (2).

AUST, S.D., L.A., Morehouse & C.E., Thomas; 1985.- Role of metals in oxygen radical reactions. J. Free Rad. Med. 1:3-25.

BAKKER, D.C.E., Y., Bozec, P.D., Nightingale, L., Goldson, M.J., Messias, H.J.W., de Baar, M., Liddicoat, I., Skjelvan, V., Strass & A.J.Watson; 2005.- Iron and mixing affect biological carbon uptake in SOIREE and EisenEx, two Southern Ocean iron fertilisation experiments. Deep Sea Res. Part I: Oceanogr. Res. Pap. 52(6):1001-1019.

BENMOUSSA-DAHMEN, I., H., Chtourou, F., Rezgui, S., Sayadi & A., Dhouib; 2016.- Salinity stress increases lipid, secondary metabolites and enzyme activity in Amphora subtropica and Dunaliella sp. for biodiesel production. Biosours. Tech. 218: 816-825.

BISSON, M.A. & G.O., Kirst; 1995.- Osmotic acclimation and turgor pressure regulation in algae. Naturwissenschaften. 82:461-471.

BORBAT, P.P., A.J., da Costa-Filho, K.A., Earle, J.K., Moscicki & J.H., Freed; 2001.- Electron spin resonance in studies of membranes and proteins. Science. 291:266-269.

BRADFORD, M.M.; 1976.- A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72:248-254.

BRAND, L.E., W.G., Sunda & R.R.L., Guillard; 1983.- Limitation of phytoplankton reproductive rates by zinc, manganese and iron. Limnol. Oceanogr. 28:1182-1198.

BREUER, W., S., Epsztejn & Z.I., Cabantchik; 1995.- Iron acquired from transferrin by K562 cells is delivered into a cytoplasmic pool of cheatable iron (II). J. Biol. Chem. 270:24209-24215.

BRUMBY, P.E. & V., Massey; 1967.- Determination of nonheme iron, total iron and copper. Methods Enzymol. 10:464-472.

BUCCIARELLI, E., S., Blain & P., Tréguer; 2001.- Iron and manganese in the wake of the Kerguelen Islands (Southern Ocean). Mar. Chem. 73:21-36.

BUSSLER, K.O.; 1998.- The decoupling of production and particulate export in the surface ocean. Global Biogeochem Cycles. 12:297-310.

BUETTNER, G.R.; 1993.- The pecking order of free radicals and antioxidants: lipid peroxidation, alpha-tocopherol, and ascorbate. Arch. Biochem. Biophys. 300:535-543.

BUETTNER, G.R. & B.A., Jurkiewicz; 1993.- Ascorbate free radical as a marker of oxidative stress: an EPR study. Free Radic. Biol. Med. 14:49-55.

CARPENTER, S.R.; 1996.- Microcosm experiments have limited relevance for community and ecosystem ecology. Ecology. 77:677-680.

CERMEÑO, P., E., Marañón, J., Rodríguez & E., Fernández; 2005.- Large-sized phytoplankton sustain higher carbon-specific photosynthesis than smaller cells in a coastal eutrophic ecosystem. Mar. Ecol. Prog. Ser. 297:51-60.

CHAKRABORTY, P., T., Acharyya, P.R., Babu & D., Bandyopadhyay; 2011.- Impact of salinity and pH on phytoplankton community in a tropical freshwater system: an investigation with pigment analysis by HPLC. J. Environ. Monit. 13:614-620.

CHEN, M., R.C.H., Dei, W.X., Wang & L., Guo; 2003.- Marine diatom uptake of iron bound with natural colloids of different origins. Mar. Chem. 81:177-189.

CHISHOLM, S.W.; 1992.- Phytoplankton size. En: Falkowski P.W. & Woodhead, A.D, (eds.), Primary Production and Biogeochemical Cycles in the Sea, Springer Science + Business Media, New York, USA, pp. 213-237.

CHOI, C.Y., K.W., An & M.I., An; 2008.- Molecular characterization and mRNA expression of glutathione peroxidase and glutathione S-transferase during osmotic stress in olive flounder (Paralichthys olivaceus). Comp. Biochem. Physiol. A. 149: 330-337.

COLE, G.A.; 1974.- Textbook of Limnology. C.V. Mosby Company, Publishers, Saint Louis.

COOK, A.J., A.J. Fox, D.G., Vaughan & J.G., Ferrigno; 2005.- Retreating Glacier Fronts on the Antarctic Peninsula over the Past Half-Century. Science. 308 (5721): 541-544.

CREITZ, G.I. & F.A., Richards; 1955.- The estimation and characterization of plankton populations by pigment analysis. J. Mar. Res. 14:211.

DARBARI, D., M., Loyevsky, V., Gordeuk, J.A., Kark, O., Castro, S., Rana, V., Apprey & J., Kurantsin-Mills; 2003.- Fluorescence measurements of the labile iron pool of sickle erythrocytes. Blood. 1:357-364.

DAY, W.J.JR., A.C., Hall., M.W., Kemp & A., Yañez Arancibia; 1989.- Estuarine Ecology. John Wiley & Sons, New York.

DAVEY, M. & R.J., Geider; 2001.- Impact of iron limitation on the photosynthetic apparatus of the diatom Chaetoceros muelleri (bacillariophyceae). J. of Phycol. Volume 37(6):987-000.

d'Ischia, M., C., Constantini & G., Prota; 1996.- Lipofuscin-like pigments by autoxidation of polyunsaturated fatty acids in the presence of amine neurotransmitters: the role of malondialdehyde. Biochim. Biophys. Acta. 1290:319-326.

DE BAAR, H.J.W. , P. W., Boyd, K.H., Coale, M.R., Landry, A., Tsuda, P., Assmy, D.C.E., Bakker, Y., Bozec, R.T., Barber, M.A., Brzezinski, K.O., Buesseler, M., Boyé, P.L., Croot, F., Gervais, M.Y., Gorbunov, P.J., Harrison, W.T., Hiscock, P., Laan, C., Lancelot, C.S., Law, M., Levasseur, A., Marchetti, F.J., Millero, J. Nishioka, Y. Nojiri, T. van Oijen, U. Riebesell, M.A., Rijkenberg, H., Saito, S., Takeda, K.R., Timmermans, M.J.W., Veldhuis, A.M., Waite & C-S., Wong; 2005.- Synthesis of iron fertilisation experiments: from the iron age to the age of enlightenment. J. Geophys. Res. 110:1-24.

DE BAAR, H.J.W., J.T.M., De Jong, D.C.E., Bakker, B.M., Löscher, C., Veth, U., Bathmann & V., Smetacek; 1995.- Importance of iron for plankton blooms and carbon dioxide drawdown in the Southern Ocean. Nature. 373:412- 415.

DEMMIG-ADAMS, B. & W.W., Adams; 1993.- The xanthophyll cycle. En: Alscher, R.G., & Hess, J.L., (ed.), Antioxidants in Higher Plants, CRC Press, Boca Raton, FL, USA, pp. 59-90.

DEREGIBUS, D., M.L., Quartino, G.L., Campana, F.R., Momo, C., Wiencke & K., Zacher; 2015.- Photosynthetic light requirements and vertical distribution of macroalgae in newly ice-free areas in Potter Cove, South Shetland Islands, Antarctica. Polar Biol. 39(1):153-166.

DESAI, I.;1984.- Vitamin E analysis methods for animal tissues. Methods Enzymol. 105:138-146.

DIERSSEN, H.M., R.C., Smith & M., Vernet; 2002.- Glacial meltwater dynamics in coastal waters West of the Antarctic Peninsula. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 99:1790-1795.

DRING, M.J.; 2006.- Stress Resistance and Disease Resistance in Seaweeds: The Role of Reactive Oxygen Metabolism. Adv. Bot. Res. 43:175-207.

DU LAING, G., F.M.G., Tack & M.G., Verloo; 2003.- Performance of selected destruction methods for the determination of heavy metals in reed plants (Phragmites australis). Anal. Chim. Acta. 497:191-198.

EISENBERG, D. & D., Crothers; 1979.- Biochemical spectroscopy. En: Eisenberg, D., Crothers, D. (eds.), Physical Chemistry with Applications to the Life Sciences. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc., California, pp. 562-645.

EPSZTEJN, S., O., Kaklon, H., Glickstein, B., Breuer & Z.I., Cabantchik; 1997.- Fluorescence analysis of the labile iron pool of mammalian cells. Anal. Biochem. 248: 31-40.

ESPÓSITO, B.P., S.,Epsztejn, W., Breuer & Z.I.,Cabantchik; 2002.- A review of fluorescence methods for assessing labile iron in cells and biological fluids. Anal. Biochem. 304:1-18.

ESTERBAUER, H., P., Eckl & A., Ortmer; 1990.- Possible mutagens derived from lipids and lipid precursors. Mutat. Res. Rev. Genet. Toxicol. 238:223-233.

ESTEVEZ, M.S., G., Malanga & S., Puntarulo; 2001a.- Iron-dependent oxidative stress in Chlorella vulgaris. Plant Sci. 161:9-17.

ESTEVEZ, M.S., G., Malanga, & S., Puntarulo; 2001b.- UV-B effect on Antarctic Chlorella sp. cells. J. Photochem. Photobiol. B. 62(1-2):19-25.

EVSTIGNEEVA, R.P., I.M., Volkov & V.V., Chudinova; 1998.- Vitamin E as a universal antioxidant and stabilizer of biological membranes. Membr. Cell Biol. 12: 151-172.

FALCIATORE, A. & C., Bowler; 2002.- Revealing the molecular secrets of Marine diatoms. Annu. Rev. Plant Biol. 53:109-30.

FALKOWSKI, P.G., R.T., Barber & V., Smetacek; 1998.- Biogeochemical controls and feedbacks on ocean primary production. Science. 281:200-6.

FALKOWSKI, P.G. & J.A., Raven, 2007.- Aquatic Photosynthesis. Princeton University Press, Princeton USA, pp. 483.

FOYER, C. H.; 1993.- Ascorbic Acid. En: Alscher, R.G. & Hess, J.L. (eds.), Antioxidants in Higher Plants CRC Press, Boca Raton, FL, USA, pp. 31-58.

FOYER, C.H., P., Descourvieres & K.J., Kunert; 1994a.- Commissioned Review. Protection against oxygen radicals: an important defence mechanism studied in transgenic plants. Plant, Cell and Environment. 17:507-523.

FOYER, C.H., M., Lelandais, E.A. Edwards & P.M., Mullineaux; 1991.- The role of ascorbate in plants, interactions with photosynthesis and regulatory significance. En: Amer. Soc. of Plant Physiologists, Rockville, MD, 1991, 6:131-144.

FOYER, C.H., M., Lelandais & K.J., Kunert; 1994b.- Photooxidative stress in plants. Physiol. Plant. 92:696-717.

FOYER, C.H. & G., Noctor; 2005.- Redox homeostasis and antioxidant signaling: a metabolic interface between stress perception and physiological responses. Plant Cell. 17:1866-1875.

FRONEMAN, P.W., E.A., Pakhomov & M.G., Balarin; 2004.- Size-fractionated phytoplankton biomass, production and biogenic carbon fixation in the eastern Atlantic sector of the Southern Ocean in late austral summer 1997-1998. Deep-Sea Res. II. 51: 2715-2729.

GRAHAM, L.E. & L.W., Wilcox; 2000.- Introduction to the algae: occurrence, relationships, nutrition, definition, general features. Prentice-Hall, Upper Saddle River, New York, USA, pp. 640.

GALATRO, A., M.B., Aguiar, G., Malanga & S., Puntarulo; 2011.- Oxidative metabolism and antioxidant capacity associated to UV radiation effects in photosynthetic organisms. Res. Trends Photochem. Photobiol. 13:1-11.

GALLEANO, M., L., Aimo & S., Puntarulo; 2002.- Ascorbyl radical/ascorbate ratio in plasma from iron overloaded rats as oxidative stress indicator. Toxicol. Lett. 133:193-201.

GARG, N. & G., Manchanda; 2009.- ROS generation in plants: boon or bane? Plant Biosys. 143:8-96.

GEIDER, R. & J., La Roche; 1994.- The role of iron in phytoplankton photosynthesis and the potential for iron-limitation of primary productivity in the sea. Photosynthesis Res. 39(3):275-301.

GERACITANO, L.A., J.M., Monserrat & A. Bianchini; 2004.- Oxidative stress in Laeonereis acuta (Polychaeta Nereididae): environmental and seasonal effects. Mar. Environ. Res. 58:625-630.

GILL, S.S., N.A., Khan & N.A., Anjum; 2011.- Amelioration of cadmium stress in crop plants by nutrients management: Morphological, physiological and biochemical aspects. Plant Stress. 1:1-23.

GONZÁLEZ, P.M., D., Abele & S., Puntarulo; 2008.- Iron and Radical Content in Mya arenaria. Possible Sources of NO Generation. Aquat. Toxicol. 89:122-128.

GONZÁLEZ, P.M., M.B., Aguiar, G., Malanga, & S., Puntarulo; 2013.- Electronic paramagnetic resonance (EPR) for the study of ascorbyl radical and lipid radicals in marine organisms. Comp. Biochem. and Physiol., Part A. 165:439-447.

GONZÁLEZ, P.M., D., Deregibus, G., Malanga, G.L., Campana, K., Zacher, M.L., Quartino & S., Puntarulo; 2016.- Oxidative balance in macroalgae from Antarctic waters. Possible role of Fe. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. En prensa.

GONZÁLEZ, P.M., G., Malanga & S., Puntarulo; 2015.- Cellular Oxidant/Antioxidant Network: Update on the Environmental Effects Over Marine Organisms. The Open Marine Biol. J. 9:1-13.

GUILLARD, R.R.L.; 1962.- Salt and osmotic balance. En: Lewin, R.A. (ed.), Physiology and Biochemistry of Algae, Academic Press, New York and London pp. 529-540.

GUILLARD, R.R.L.; 1973.- Division rates. En: J.R. Stein (ed.). Handbook of Phycological Methods. Culture Methods and Growth Measurements, Cambridge Univ. Press, Cambridge, pp. 289-313.

HARRISON, P.M. & P., Arosio; 1996.- The ferritins: molecular properties, iron storage function and cellular regulation. Biochim. Biophys. Acta. 1275:161-203.

HALLIWELL, B.; 1987.- Oxidative damage, lipid peroxidation and antioxidant protection in chloroplasts. Chem. Phys. Lipids. 44:327-340.

HALLIWELL, B.; 2006.- Special issue on reactive oxygen species. reactive species and antioxidants. redox biology is a fundamental theme of aerobic life. Plant Physiol. 141(2):312-322.

HALLIWELL, B. & J.M., Gutteridge; 2007.- Free Radicals in Biology and Medicine. Oxford University Press, New York.

HALLIWELL, B. & J.M.C., Gutteridge; 1999.- Free Radicals in Biology and Medicine. Oxford Univ. Press, New York, pp. 936.

HÄUBNER, N., P., Sylvander, K., Vuori & P., Snoeijs; 2014.- Abiotic stress modifies the synthesis of alpha-tocopherol and beta-carotene in phytoplankton species. J. Phycol. 50:753-759.

HERNANDO, M., G., Malanga & G.A., Ferreyra; 2005.- Oxidative stress and antioxidant defences generated by solar UV in a Subantarctic marine phytoflagellate. Sci. Mar. 69:287-295.

HERNANDO, M., I.R., Schloss, G., Malanga, G.O., Almandoz, G.A., Ferreyra, M.B., Aguiar & S., Puntarulo; 2015.- Effects of salinity changes on coastal Antarctic phytoplankton physiology and assemblage composition. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 466:110-119.

HERNANDO, M., I.R., Schloss, G., Malanga, G.O., Almandoz, G.A., Ferreyra & S., Puntarulo; 2013.- Efecto de aguas de deshielo sobre una comunidad fitoplanctónica antártica. En: I Jornada de los Programas Interdisciplinarios de la UBA, CABA, 2013.

HOLLANDER-CZYTKO, H., J., Grabowski, I., Sandorf, K., Weckermann & E.W., Weiler; 2005.- Tocopherol content and activities of tyrosine aminotransferase and cystine lyase in Arabidopsis under stress conditions. J. Plant Physiol. 162:767-770.

HOLM-HANSEN, O. & B., Riemann; 1978.- Chlorophyll a determination: improvements in methodology. Oikos 30:438-447.

HUBEL, C.A., V.E., Kagan, E.R. Kosin, M., McLaughlin & J.M., Roberts; 1997.- Increased ascorbate radical formation and ascorbate depletion in plasma from women with preeclampsia: implications for oxidative stress. Free Radic. Biol. Med. 23:597-609.

HUMMEL, S.G., A.J., Fischer, S.M., Martin, F.Q., Schafer & G.R., Buettner; 2006.- Nitric oxide as a cellular antioxidant: A little goes a long way. Free Radic. Biol. Med. 40:501-506.

HUSTON, M.A.; 1999.- Microcosm experiments have limited relevance for community and ecosystem ecology: synthesis of comments. Ecology 80:1088-1089.

HUTCHINS, D.A., V.M., Franck, M.A., Brzezinski & K.W., Bruland; 1999.- Inducing phytoplankton iron limitation in iron-replete coastal waters with a strong chelating ligand. Limnol. Oceanogr. 44:1009-1018.

IKEN K., E.R., Barrera Oro, M.L., Quartino, R.J., Casaux & T., Brey; 1997.- Grazing by the Antarctic fish Notothenia coriiceps evidence for selective feeding on macroalgae. Antarct. Sci. 9:386-391.

JAHNKE, L.S. & A.L., White; 2003.- Long-term hyposaline and hypersaline stresses produce distinct antioxidant responses in the marine alga Dunaliella tertiolecta. J. Plant Physiol. 160:1193-1202.

JAKUBOWSKI, W. & G., Bartosz; 2000.- 2,7-Dichlorofluorescein oxidation and reactive oxygen species: what does it measure? Cell Biol. Int. 24:757-760.

JICKELLS, T.D., Z.S., An, K.K., Andersen, A.R., Baker, G., Bergametti, N., Brooks, J.J., Cao, P.W., Boyd, R.A., Duce, K.A., Hunter, H., Kawahata, N., Kubilay, J., La Roche, P. S., Liss, N., Mahowald, J.M., Prospero, A.J., Ridgwell, I., Tegen & R., Torres; 2005.- Global Iron Connections Between Desert Dust, Ocean Biogeochemistry and Climate. Science 308:67-71.

JICKELLS, T.D. & L.J., Spokes; 2001.- Atmospheric Iron Inputs to the Oceans. En: Turner, D.R. & Hunter, K. (eds.), The Biogeochemistry of Iron in Seawater, Wiley, Chichester, UK, pp. 85-121.

JOHNSON, K.S.; 2001.- Iron supply and demand in the upper ocean: Is extraterrestrial dust a significant source of bioavailable iron? Global Biogeochem. Cycles. 15(1):61-63.

JONES, D.P.; 2006.- Redefining oxidative stress. Antioxid Redox Signal. 8:1865-1879.

KAKHLON, O. & Z.I., Cabantchik; 2002.- The labile iron pool: characterization, measurement, and participation in cellular processes. Free Radic. Biol. Med. 33:1037-1046.

KAMAL-ELDIN, A. & L.A., Appelqvist; 1996.- The chemistry and antioxidant properties of tocopherols and tocotrienols. Lipids. 31:671-701.

KARAEVA, N.I. & S.K., Jafarova; 1993.- Experimental investigations of euryhaline Bacillariophyta in relation to salinity variations. Algologia 3:97-105.

KELLER, M., A., Sommer, H.O., Pörtner & D., Abele; 2004.- Seasonality of energetic functioning and reactive oxygen species production by mitochondria of the lugworm Arenicola marina, exposed to acute temperature changes. J. Exp. Biol. 207:2529-2538.

KEMP, A.E.S., J., Pike, R.B., Pearce & C.B., Lange; 2000.- The “fall dump”- a new perspective on the role of a “shade flora” in the annual cycle of diatom production and export flux. Deep-Sea Res. 47:2129-2154.

KING, D.W., H.A., Lounsbury & F.J., Millero; 1995.- Rates and mechanism of Fe(II) oxidation at nanomolar total iron concentrations. Environ. Sci. Technol. 29(3):818-824.

KLINKHAMMER, G.P., C.S., Chin, R.A., Keller, A., Dählmann, H., Sahling, G., Sarthou, S., Petersen, F., Smith & C., Wilson; 2001.- Discovery of new hydrothermal vent sites in Bransfield Strait, Antarctica. Earth Planet. Sci. Lett. 193:395-407.

KOLBER, Z.S., R., Barber, H.K., Coale, S.E., Fitzwater, R.M., Greene, K.S., Johnson, S., Lindley & P.G., Falkowski; 1994.- Iron limitation of phytoplankton photosynthesis in the equatorial Pacific Ocean. Nature. 371:145-149.

KOTAKE, Y., T., Tanigawa, M., Tanigawa, I., Ueno, D., Randel Allen & C.S. Lai; 1996.- Continuous monitoring of cellular nitric oxide generation by spin trapping with an iron–dithiocarbamate complex. Biochim. Biophys. Acta. 1289:362-368.

KOZAK, R.G., G., Malanga, A., Caro & S., Puntarulo; 1997.- Ascorbate free radical content in photosynthetic organisms after exposure to ultraviolet-B. Recent. Res. Devel. Plant Physiol. 1:233-239.

KRINSKY, N.I.; 1989.- Antioxidant functions of carotenoids. Free Radic. Biol. Med. 7:617-635.

KRUSZEWSKI, M.; 2003.- Review: Labile iron pool: the main determinant of cellular response to oxidative stress. Mutation Res. 531:81-92.

KUTNINK, M.A., W.C., Hawkes, E.E., Schaus & S.T., Omaye; 1987.- An internal standard method for the unattended high-performance liquid chromatographic analysis of ascorbic acid in blood components. Anal. Biochem. 166:424-430.

LABASQUE, T., C., Chaumery, A., Aminot & G., Kergo; 2004.- Spectrophotometric Winkler determination of dissolved oxygen: re-examination of critical factors and reliability. Mar. Chem. 88:53-60.

LA FONTAINE, S., J.M., Quinn, S.S., Nakamoto, M.D. Page, V. Göhre, J. L., Moseley, J., Kropat & S., Merchant; 2002.- Copper-dependent iron assimilation pathway in the model photosynthetic eukaryote Chlamydomonas reinhardtii. Eukaryot. Cell. 1:736-757.

LAPOINTE, B.E., D.I., Rices & J.M., Lawrence; 1984.- Responses of photosynthesis, respiration, growth and cellular constituents to hypo-osmotic shock in the red alga Gracilaria tikvahiae. Comp. Biochem. Physiol Part A: Physiol. 77(1):127-132.

LEE, R.E., 1999.- Heterokontophyta, Bacillariophyceae. En: Lee, R.E. (ed.), Phycology, Cambridge Univ. Press, Cambridge, UK, pp. 415-58.

LEGENDRE, L. & F., Rassoulzadegan; 1996.- Food-web mediated export of biogenic carbon in oceans. Mar. Ecol. Prog. Ser. 145:179-193.

LEMAIRE, C., E.A., Wollman & P., Bennoun; 1988.- Restoration of Photoautotrophic Growth in a Mutant of Chlamydomonas reinhardtii in Which the Chloroplast atpB Gene of ATP Synthase Has a Deletion: An Example of Mitochondrial Dependent Photosynthesis, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 85:1344-1348.

LI, W.K.W., F.A., Mc Laughlin, C., Lovejoy & E.C., Carmack; 2009.- Smallest algae thrive as the Arctic Ocean freshens. Science. 326:539.

LIONARD, M., K., Muylaert, D., Van Gansbeke & W., Vyverman; 2005.- Influence of changes in salinity and light intensity on growth of phytoplankton communities from the Schelde river and estuary (Belgium/The Netherlands). Hydrobiologia. 540:105-115.

LIU, X.W. & F.J., Millero; 2002.- The solubility of iron in seawater. Mar. Chem. 77(1):43-54.

LIU, F. & S.J., Pang; 2010.- Stress tolerance and antioxidant enzymatic activities in the metabolisms of the reactive oxygen species in two intertidal red algae Grateloupia turuturu and Palmaria palmata. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 382(2):82-87.

LIU, Y., W.N., Wang, A.L., Wang, J.M., Wang & R.Y., Sun; 2007.- Effects of dietary vitamin E supplementation on antioxidant enzyme activities in Litopenaeus vannamei (Boone, 1931) exposed to acute salinity changes. Aquaculture. 265:351-8.

LIU, Z.-Y., G.-C., Wang & B.-C., Zhou; 2008.- Effect of iron on growth and lipid accumulation in Chlorella vulgaris. Biores. Techn. 99:4717-4722.

LONG, J.C., F., Sommer, M., Allen, S., Lu & S. S., Merchant; 2008.- FER1 and FER2 Encoding Two Ferritin Complexes in Chlamydomonas reinhardtii Chloroplasts Are Regulated by Iron. Genetics. 179(1):137-147.

LU, I-F., M-S., Sung & T-M., Lee; 2006.- Salinity stress and hydrogen peroxide regulation of antioxidant defense system in Ulva fasciata. Mar. Biol. 150:1-15.

MADIGAN, M.T., J.M., Martinko, K.S. Bender, D.H., Buckley & D.A., STAHL; 2015.- Brock. Biología de los Microorganismos (14 Ed.). Pearson, Boston, USA. pp.1200.

MALANGA, G.; 2001.- Respuesta oxidante a la radiación ultravioleta en microalgas. Tesis doctoral, Universidad de Buenos Aires, Argentina, pp.57 .

MALANGA, G., M.B., Aguiar & S., Puntarulo; 2012.- The ascorbyl radical/ascorbate ratio as index of oxidative stress in aquatic organisms. En: Abele, D., Vázquez-Medina, J.P. & Zenteno-Savín, T. (eds.). Oxidative Stress in Aquatic Ecosystems, Willey-Blackwell, West Sussex, Reino Unido, pp. 458.

MALANGA, G., M.S., Estevez, J., Calvo, D., Abele & S., Puntarulo; 2007.- The effect of seasonality on oxidative metabolism in Nacella (Patinigera) magellanica. Comp. Biochem. Physiol. A. 146:551-558.

MALANGA G., A.B., Juarez, J.S., Albergheria, C.G., Veléz y S. Puntarulo; 2001.- Efecto de la radiación UV-B sobre el contenido de ascorbato y radical ascorbilo en algas verdes. En: Alveal, K. & T., Antezana (eds.), Sustentabilidad de la Biodiversidad, Un problema actual, bases científico-técnicas, teorizaciones y proyecciones, Universidad de Concepción, Chile, pp. 389-398.

MALANGA, G., J.M., Oстера & S., Puntarulo; 2015.- Assessment of oxidative balance in the lipo- and hydro-philic cellular environment in biological systems. En: Catalá, A., (ed.), Reactive Oxygen Species, Lipid Peroxidation, Nova Science Publishers, Inc, USA, pp. 43-60.

MALANGA, G., A., Perez, J., Calvo & S., Puntarulo; 2009.- The effect of seasonality on oxidative metabolism in the sea urchin Loxechinus albus. Mar Biol. 156:763-770.

MALANGA, G. & S., Puntarulo; 1995.- Oxidative stress and antioxidant content in Chlorella vulgaris after exposure to ultraviolet-B radiation. Physiol. Plant. 94:672-679.

MALANGA, G. & Puntarulo, S.; 2012.- The use of electron paramagnetic resonance (EPR) in the study of oxidative damage to lipids in aquatic systems. En: Abele, D., T., Zenteno-Savín, & J.P., Vázquez-Medina (eds.), Book on Oxidative Stress in Aquatic Ecosystems, Willey-Blackwell, West Sussex, Reino Unido. pp 448.

MALDONADO, M.T. & N.M., Price; 1999.- Utilization of iron bound to strong organic ligands by plankton communities in the subarctic Pacific Ocean. Deep-sea Res. 46:2447-2473.

MARAÑÓN, E., P., Cermeño, J., Rodríguez, M.V., Zubkov & R.P., Harris; 2007.- Scaling of phytoplankton photosynthesis and cell size in the ocean. Limnol. Oceanogr. 52:2190-2198.

MARTEL, A.E.; 1982.- Chelates of ascorbic acid formation and catalytic properties. En: Sieb, P.A. & Tolbert, B.M. (eds.), Ascorbic acid: Chemistry, Metabolism and Uses, American Chemical Society, Washington DC, pp.153-178.

MARTIN, J.H., 1990.- Glacial-interglacial CO₂ change: the iron hypothesis. Paleoceanogr. 5(1):1-13.

MARTIN, J.H., 1992.- Iron as a limiting factor in oceanic productivity. En: Falkowki P.W. (ed.), Primary Productivity and Biogeochemical Cycles in the Sea, Plenum, New York, USA, pp.123-137.

McDOWELL, R.E., C.D., Amsler, D.A., Dickinson, J.B. McClintock & B.J., Baker; 2013.- Reactive oxygen species and the Antarctic macroalgal wound response. J. Phycol. 50: 71-80.

MILLER, M., G.R., Buettner & S.D., Aust; 1990.- Transition metals as catalysts of "autoxidation" reactions. Free Radic. Biol. Med. 8:95-108.

MILLERO, F.J. & S., Sotolongo; 1989.- The oxidation of Fe(II) with H₂O₂ in seawater. Geochim. Cosmochim. Acta. 53(8):1867-1873.

MILLERO, F.J., S., Sotolongo & M., Izaguirre; 1987.- The oxidation kinetics of Fe(II) in seawater. Geochim. Cosmochim. Acta. 51(4):793-801.

MITTLER, R., 2002.- Oxidative stress, antioxidants, and stress tolerance. Trends Plant Sci. 7:405-410.

MITTLER, R., S.M., Vanderauwera, M., Gollery & F., Van Breusegem; 2004.- Reactive oxygen gene network of plants. Trends Plant Sci. 9:490-498.

MOLINE, M.A., T., Claustre, O., Frazer, O., Schofield & M., Vernet; 2004.- Alteration of the food web along the Antarctic Peninsula in response to a regional warming trend. Global Change Biology. 10(12):1973-1980.

NEALE, P.J. & A., Melis; 1989.- Salinity-stress enhances photoinhibition of photosynthesis in Chlamydomonas reinhardtii. J. Plant Physiol. 134(5):619-622.

NING, X., L., Zilin, G., Zhu & J., Shi; 1996.- Size-fractionated biomass and productivity of phytoplankton and particulate organic carbon in the Southern Ocean. Polar Biol. 16:1-11.

NÚÑEZ, M.T., V., Gallardo, P., Muñoz, V., Tapia, A., Esparza, J., Salazar, & H., Speisky; 2004.- Progressive iron accumulation induces a biphasic change in the glutathione content of neuroblastoma cells. Free Rad. Biol. Med. 37:953-960.

OLGUÍN, H.F., & V.A., Alder; 2011.- Species composition and biogeography of diatoms in antarctic and subantarctic (Argentine shelf) waters (37–76 °S). Deep-Sea Research II. 58:139-152.

PALMISANO, A.C., J.B., Soohoo, R.L., Moe & C.W., Sullivan; 1987.- Sea ice microbial communities. VII. Changes in under-ice spectral irradiance during the development of Antarctic sea ice microalgal communities. Mar. Ecol. Prog. Ser. 35:165-173.

PARIDA, A.K. & A.B., Das; 2005.- Salt tolerance and salinity effects on plants: a review. Ecotoxicol. Environ. Saf. 60(3):324-349.

PETROU, K., M.A., Doblin & P.J., Ralph; 2011.- Heterogeneity in the photoprotective capacity of three Antarctic diatoms during short-term changes in salinity and temperature. Mar. Biol. 158:1029-1041.

PHILIPS, E.J., P., Hansen & T., Velardi; 1992.- Effect of the herbicide diquat on the growth of microalgae and cyanobacteria. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 49(5):750-756.

PIQUET, A., M.T., Henk Bolhuis, M.P., Meredith & A.G.J., Buma; 2011.- Shifts in coastal Antarctic marine microbial communities during and after meltwater-related surface stratification. FEMS Microbiol. Ecol. 1:1-15.

POLLE, A., K., Chakrabarti, W., Schurmann & H., Rennenberg; 1990.- Composition and Properties of Hydrogen Peroxide Decomposing Systems in Extracellular and Total Extracts from Needles of Norway Spruce (Picea abies L., Karst.). Plant Physiol. 94(1):312-319.

PORTER, N.A.; 1986.- Mechanisms for the autoxidation of polyunsaturated lipids. Acc. Chem. Res. 19:268-273.

PORTER, N.A., S.E., Caldwell & K.A., Mills; 1995.- Mechanisms of free radical oxidation of unsaturated lipids. Lipids. 30:2290-2787.

POSPÍŠIL P.; 2009.- Review Production of reactive oxygen species by photosystem II. Biochim Biophys Acta. 1787:1151-1160.

PRICE, N.M. & F.M.M., Morel; 1998.- Biological cycling of iron in the ocean. En: Siegel, A. & Siegel, H. (eds.), Metal Ions in Biological System; Iron Transport and Storage in Microorganisms, Plants, and Animals. Marcel Dekker, New York. pp: 824

PUNTARULO, S., M., Simontacchi, M., Galeano, A., Caro, G., Malanga & R.G., Kozak; 1995.- Effect of oxidative stress on iron reduction rates in biological systems. Ciencia e Culture J. Biol. Assoc. Adv. Sci. 47:402-406.

QASIM, S.Z., P.M., Bhattathiri & V.P., Devassy; 1972.- The influence of salinity on the rate of photosynthesis and abundance of some tropical phytoplankton. Mar. Biol. 12:200-206.

RADCHENKO, I.G. & L.V., Il'yash, 2006.- Growth and photosynthetic activity of the diatom Thalassiosira weissflogii under low salinity conditions. Izv. RAN Ser. Biol. 3:306-313.

RALPH, P.J., A., McMinn, K., Ryan & C., Ashworth; 2005.- Short-term effect of temperature on the photokinetics of microalgae from the surface layers of Antarctic pack ice. J. Phycol. 41:763-769.

RALPH, P.J., K.G., Ryan, A., Martin & G., Fenton; 2007.- Melting out of sea ice causes greater photosynthetic stress in algae than freezing in. J. Phycol. 43:948-956.

RANGA RAO, A., C., Dayananda, R., Sarada, T.R., Shamala & G.A., Ravishankar; 2007.- Effect of salinity on growth of green alga Botryococcus braunii and its constituents. Bioresource Techn. 98:560-564.

RIJSTENBIL, J.W.; 2003.- Effects of UV-B radiation and salt stress on growth, pigments and antioxidative defence of the marine diatom Cylindrotheca closterium. Mar. Ecol. Prog. Ser. 254:37-48.

ROBELLO, E., A., Galatro & S., Puntarulo; 2007.- Iron role in oxidative metabolism of soybean axes upon growth. Effect of iron overload. Plant Sci. 172:939-947.

RÜCKAMP M., M., Braun, S., Suckro & N., Blindow; 2011.- Observed glacial changes on the King George Island ice cap, Antarctica, in the last decade. Global Planet Change. 79:99-109.

SABATINI, S.E., ÁB., Juárez, M.R., Eppis, L., Bianchi, C.M., Luquet & M.C., Ríos de Molina; 2009.- Oxidative stress and antioxidant defenses in two green microalgae exposed to copper. Ecotoxicol. Environm. Saf. 72:1200-1206.

SAISON, C., F., Perreault, J.C., Daigle, C., Fortin, J., Claverie, M., Morin & R., Popovic; 2010.- Effect of core-shell copper oxide nanoparticles on cell culture morphology and photosynthesis (photosystem II energy distribution) in the green alga, Chlamydomonas reinhardtii. Aquat. Toxicol. 96:109-111.

SAKAMOTO, A. & N., Murata; 2002.- The role of glycine betaine in the protection of plants from stress: clues from transgenic plants. Plant Cell Environ. 25:163-171.

SANDALIO, L.M. & L.A., del Río; 1988.- Intraorganellar distribution of superoxide dismutase in plant peroisomes (glyoxisomes and leaf peroxisomes). Plant Physiol. 88:1215-1218.

SARVAJEET, S.G. & T., Narendra; 2010.- Review: Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. Plant Physiol. Biochem. 48:909-930.

SARTHOU, G., K.R., Timmermans, Blain S. & P., Tréguer; 2005.- Growth physiology and fate of diatoms in the ocean: a review. J. Sea Res. 53:25-42.

SIES, H.; 1997.- Physiological society symposium: impaired endothelial and smooth muscle cell function in oxidative stress oxidative stress: oxidants and antioxidants. Experimental Physiol. 82:291- 295.

SCHLOSS, I.R., G.A., Ferreyra, O., González, A., Atencio, V.L., Fuentes, G., Tosonotto, G., Mercuri, R., Sahade, M., Tatián & D., Abele; 2008.- Long-term hydrographic conditions and climate trends in Potter Cove. Ber. Polarforsch. Meeresforsch. 571:382-389.

SINGH, K.B., R.C., Foley & L., Onate-Sanchez; 2002.- Transcription factors in plant defence and stress responses. Curr. Opin. Plant Biol. 5:430-436.

SMETACEK, V.; 1999.- Diatoms and the Ocean Carbon Cycle. Protist 150:25-32.

SMETACEK, V.; 2001a.- A watery arms race. Nature. 411:745.

SMETACEK, V.; 2001b.- EisenEx: international team conducts iron experiment in Southern Ocean. US JGOFS Newsletter January. 11-14.

SMETACEK, V., C., Klaas, V.H., Strass, P., Assmy, M., Montresor, B., Cisewski, N., Savoye, A., Webb, F., d'Ovidio, J.M., Arrieta, U., Bathmann, R., Bellerby, G.M., Berg, P., Croot, S., Gonzalez, J., Henjes, G.J., Herndl, L.J., Hoffmann, H., Leach, M., Losch, M.M., Mills, C., Neill, I., Peeken, R., Röttgers, O., Sachs, E., Sauter, M.M., Schmidt, J., Schwarz, A., Terbrüggen & D., Wolf-Gladrow; 2012.- Deep carbon export from a Southern Ocean iron-fertilized diatom Bloom. Nature 487:313-319.

SMIRNOFF, N.; 2005.- Ascorbate, tocopherol and carotenoids: metabolism, pathway engineering and functions. En: Smirnoff N. (ed.), Antioxidants and Reactive Oxygen Species in Plants, Blackwell Publishing Ltd., Oxford, UK, pp. 53-86.

STEIG, E.J., D.P., Schneider, S.D., Rutherford, M.E., Mann, J.C., Comiso & D.T., Shindell; 2009.- Warming of the Antarctic ice-sheet surface since the 1957 International Geophysical Year. Nature. 457:459-462.

STOERMER, E.F. & J.P., SMOL; 2001.- Freshwater diatoms as indicators of environmental change in the High Arctic. En: Stoermer, E.F. & Smol J.P. (eds.), The Diatoms: Applications for the Environmental and Earth Sciences, Cambridge University Press, Cambridge, UK, pp. 227.

TATUR, A., R., Valle & A., Barczuk; 1999.- Discussion on the uniform pattern of holocene tephrochronology in South Shetland Islands, Antarctica. En: Polish Polar Studies, Proceedings of XXVI Polar Symposium, Dubin, 1999, 305-321.

TRENBERTH, K.E., P.D., Jones & P.G., Ambenje; 2007.- WG 1 to the 3rd assessment report of the IPCC. En: Solomon S., Qin D., Manning M., (eds), Climate change 2007: The Physical Science Basis, Cambridge University Press, UK and NY, USA, pp. 19-91.

URI, N., 1961.- Physico-chemical aspects of autoxidation. En: Lundberg, W.O., (ed.), Autoxidation and antioxidants, Interscience, New York, pp. 55-106.

UTERMÖHL, H., 1958.- Zur vervollkommnung der quantitativen phytoplankton-methodik. Mitt. Int. Ver. Theor. Angew. Limnol. 9:1-38.

VAN LEEUWE, M.A., Scharek, R., de Baar, H.J.W., de Jong, J.T.M., Goeyens, L., 1997.- Iron enrichment experiments in the Southern Ocean: physiological responses of plankton communities. Deep-Sea Research II 44, 189-207.

VALAVANIDIS, A., T., Vlahogianni, M., Dassenakis & M. Scoullou; 2006.- Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. Ecotoxicol. Environm. Saf. 64:178-189.

VAUGHAN, D.G.; 2006.- Recent trends in melting conditions on the Antarctic Peninsula and their implications for ice-sheet mass balance and sea level. Arct. Antarct. Alp. Res. 38:147-152.

VAUGHAN, D.G., G.J., Mashall & W.M., Connolley; 2003.- Recent Rapid Regional Climate Warming on the Antarctic Peninsula. Climatic Change. 60(3):243-274.

VERGELY, C., V., Maupoil, G., Clermont, A., Bril & L., Rochette; 2003.- Identification and quantification of free radicals during myocardial ischemia and reperfusion using electron paramagnetic resonance spectroscopy. Arch. Biochem. Biophys. 420:209-216.

VERGELY, C., V., Maupoil, M., Benderitter & L., Rochette; 1998.- Influence of the severity of myocardial ischemia on the intensity of ascorbyl free radical release and on postischemic recovery during reperfusion. Free Radic. Biol. Med. 24:470-479.

VILLAREAL, T.A.; 1989.- Division cycles in the nitrogen-fixing Rhizosolenia (Bacillariophyceae)–Richelia (Nostocaceae) symbiosis. Br. Phycol. J. 24:357-65.

VOLKER, C. & D.A., Wolf-Gladrow; 1999.- Physical limits on iron uptake mediated by siderophores or surface reductases. Mar. Chem. 65: 227-244.

WILHELM FILHO, D., M.A., Torres, T.B., Tribess, R.C., Pedrosa & C.H.L., Soares; 2001.- Influence of season and pollution on the antioxidant defenses of the cichlid fish acará (Geophagus brasiliensis). Braz. J. Med. Biol. Res. 34:719-726.

WORMS, I., D.F., Simon, C.S., Hassler & K.J., Wilkinson; 2006.- Bioavailability of trace metals to aquatic microorganisms: importance of chemical, biological and physical processes on biouptake. Biochimie. 88:1721-1731.

YARISH EDWARDS, C.P. & S., Casey; 1979.- Acclimation responses to salinity of three estuarine red algae from New Jersey. Mar. Biol. 51:289-294.

ZHU, J.K.; 2002.- Salt and drought stress signal transduction in plants. Annu. Rev. Plant Biol. 53:247-273.

ZHU H., H., Ming, G.L., Bannenberg, P., Moldéus & H.G., Shertzer; 1994.- Oxidation pathways for the intracellular probe 2',7'-dichlorofluorescein. Arch. Toxicol. 68:582-587.