



Universidad Austral de Chile  
Facultad de Ciencias  
Escuela de Ciencias

**Profesor Patrocinante:**

Dr. Iván Gómez O.  
Instituto de Biología Marina  
Facultad de Ciencias

**Profesor Co-Patrocinante:**

Dra. Susan Hess F.  
Instituto de Química  
Facultad de Ciencias

**“PIGMENTOS FOTOSINTÉTICOS EN LA COLUMNA DE AGUA DETERMINADOS  
MEDIANTE TÉCNICAS ESPECTROSCÓPICAS Y CROMATOGRÁFICAS (HPLC-RP):  
VARIABILIDAD ESPACIO-TEMPORAL Y EFECTOS DE RADIACIÓN UV”**

Tesis de Grado presentada como  
parte de los requisitos para optar  
al grado de Licenciado en Ciencias  
Biológicas.

**CONSTANZA DANIELA ROSAS RIEDEL**

**VALDIVIA-CHILE**

**2007**

*Dedicado a mis papás  
Patricio y Eliana, por  
enseñarme que no  
existen imposibles.....*

## Agradecimientos

En primer lugar agradezco a mis dos profesores patrocinantes y co-patrocinantes, Dr. Iván Gómez Ocampo, del Instituto de Biología Marina, quien me acogió con mucho entusiasmo y amabilidad en su Instituto, brindándome siempre un gran apoyo y tiempo para resolver mis inquietudes. A la Dra. Susan Hess, del Instituto de Química, gracias por el apoyo, consejos y dedicación para lograr esta tesis. Además por tratar de que sea un poco más química que bióloga.

Agradezco de igual manera a Marcela, del Instituto de Biología Marina, quien siempre con una gran disponibilidad me facilitó los medios y demostró preocupación hacia este trabajo. Y a mis compañeras del laboratorio: Francisca y Karina por ayudarme cuando lo necesité, y a la Anita por enseñarme a utilizar el equipo de HPLC.

También merecen mi agradecimiento, el Profesor Juan Carlos Paredes del Instituto de Química, Paz y Jina del Instituto de Biología Marina, quienes me facilitaron laboratorios y materiales para el desarrollo de la presente Tesis. Gracias a todos por su tiempo y conocimientos entregados. Y a todas las personas que trabajan en el Instituto de Biología Marina, en especial a Alex y Oriana.

A mis papás Patricio y Eliana por hacer de mí la persona que soy, por apoyarme en todos los caminos que he tomado en mi vida. A ti papá por mostrarme e inculcarme el sentido de la responsabilidad en cada uno de tus actos. A ti mamá por ser mi amiga y compañera por ayudarme a levantar en momentos difíciles. Gracias papis sin su apoyo ninguno de mis sueños se hubiesen realizado. A mi hermana Priscila por estar conmigo siempre y compartir grandes e innumerables momentos de felicidad.

Te agradezco a ti Felipe, por ser mi compañero que me ayuda en mis días más complicados, te agradezco por entregarme tu amor, conocimientos y tener siempre una palabra de apoyo.

Para finalizar agradezco, al proyecto FONDECYT 1050552, a través del Prof. Robert Stead, que ha permitido el financiamiento de esta tesis.

## ÍNDICE

	Pág.
Índice	I
Índice de figuras	IV
Índice de tablas	IX
Abreviaturas	XII
1.-RESUMEN	01
1.1.-SUMMARY	03
2.- INTRODUCCIÓN	05
2.1. Aspectos generales de los pigmentos fotosintéticos	05
2.1.1. Estructuras de los pigmentos fotosintéticos	06
2.1.1.1 Clorofilas	06
2.1.1.2. Carotenoides	08
2.1.1.3. Ficobiliproteínas	09
2.2. Pigmentos fotosintéticos en la columna de agua	11
2.2.1. Dinámica espacial y temporal de los pigmentos	12
2.2.2. Técnica para la determinación de pigmentos fotosintéticos	13
2.3. Efecto de la radiación solar sobre los pigmentos fotosintéticos	14
2.3.1. El espectro de radiación solar incidente	14
2.3.2. Penetración de la radiación UV-B en la columna de agua	15
2.3.3. Efecto de la radiación UV-B en los ecosistemas acuáticos	16
2.3.4. Efecto de la radiación UV sobre los pigmentos fotosintéticos	18
2.4. Comunidades de algas	18
2.4.1. Fitoplancton	19
2.4.2. Macroalgas	20
2.5. La situación en los ambientes costeros del Sur de Chile	21

2.6. Hipótesis de Trabajo	22
2.7. Objetivo General	22
2.8. Objetivos Específicos	22
3.- MATERIALES Y MÉTODOS	24
3.1. Área de estudio y recolección de muestras	24
3.2. Diseño experimental exposición a radiación UV	25
3.3. Análisis químico	27
3.3.1. Extracción y partición de pigmentos fotosintéticos	27
3.3.1.1. Clorofilas y carotenoides	27
3.3.1.2. Productos de degradación de la clorofila	28
3.3.1.3. Ficobilinas	28
3.3.2. Cuantificación de los pigmentos fotosintéticos por espectrofotometría	29
3.3.2.1. Clorofila y feopigmentos	30
3.3.2.2. Clorofila <i>a</i> , <i>b</i> , <i>c</i> y carotenoides	31
3.3.2.3. Ficobilinas	32
3.3.3 Determinación de pigmentos fotosintéticos por HPLC de fase reversa	33
3.3.3.1. Reactivos empleados en análisis de pigmentos fotosintéticos	35
3.3.3.2. Determinación de clorofilas y carotenos	36
3.3.3.3. Identificación y calibración y cuantificación de pigmentos fotosintéticos	37
3.3.3.3.1. $\beta$ -caroteno	37
3.3.3.3.2. Clorofila <i>a</i> y <i>b</i>	37
3.4. Estudios fisiológicos	38
3.4.1. Medición de la fluorescencia de clorofilas del fotosistema II	38
3.4.1.1 Rendimiento Cuántico Máximo ( $F_v/F_m$ )	39
3.4.1.2 Tasa de transporte de electrones (ETR)	40
3.5. Análisis estadísticos	41

4.- RESULTADOS	42
4.1. Variación estacional y en profundidad de pigmentos fotosintéticos en muestras de Fitoplancton de la zona de Coihuín	42
4.1.1. Caracterización de las condiciones oceanográficas	42
4.1.2. Espectrofotometría	43
4.1.2.1. Clorofila "a" y feopigmentos	43
4.1.2.2. Clorofila a, b, c y carotenoides	48
4.1.3. HPLC	52
4.1.3.1. Identificación, calibración de los pigmentos fotosintéticos por RP- HPLC	52
4.1.3.2. Análisis pigmentos fotosintéticos en muestras de Fitoplancton	56
4.2. Efecto de la radiación UV sobre los pigmentos fotosintéticos de macroalgas de la zona de Niebla.	62
4.2.1. Espectrofotometría	62
4.1.2.1. Clorofila "a" y feopigmentos	62
4.1.2.2. Clorofila a, b, c y carotenoides	69
4.1.2.3. Ficobiliproteínas	76
4.2.2. HPLC	79
4.2.2.1. Pigmentos fotosintéticos en macroalgas	79
4.3. Efecto de la radiación UV sobre la fotosíntesis de macroalgas de la zona de Niebla	89
4.3.1 Rendimiento Cuántico Máximo (Fv/Fm)	89
4.3.2 Tasa de transporte de electrones (ETR)	93
5.- DISCUSIÓN	97
5.1.- CONCLUSIONES	105
6.- BIBLIOGRAFÍA	107

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág
<b>Figura 1.</b> (A) Estructura molecular y (B) espectro de absorción de la molécula de clorofila. Figura extraída y modificada de Strasburger, 1994.	7
<b>Figura 2.</b> (A) Estructura molecular y (B) espectro de absorción de lamolécula de carotenoide. Figura extraída y modificada de Strasburger, 1994	8
<b>Figura 3.</b> (A) Estructura molecular y (B) espectro de absorción de las moléculas de ficobiliproteínas. Figura extraída y modificada de Strasburger, 1994	10
<b>Figura 4.</b> Muestra de Fitoplancton de la zona cercana a Puerto Montt indicando los principales grupos taxonómicos dominantes.	19
<b>Figura 5.</b> Ejemplares de macroalgas utilizados en el estudio: A) <i>Ulva sp.</i> Y B) <i>Gracilaria chilensis</i>	20
<b>Figura 6.</b> Ubicación geográfica de los sitios de colecta de fitoplancton y macroalgas. A) Cohiun (Puerto Montt), B) Playa Chica (Valdivia).	24
<b>Figura 7.</b> Esquema del sistema de incubación termostabilizado, donde se indica la disposición de los tratamientos (lámparas y fitos) utilizados para la exposición de los discos con macroalgas.	26
<b>Figura 8.</b> Espectrofotómetro SCINCO UV/Visible utilizada para la medición de las absorbancias de pigmentos totales (clorofilas, carotenoides y ficobiliproteínas) presentes en microalgas y fitoplancton analizadas. Este equipo emplea dos fuentes diferentes de energía para cubrir el intervalo especificado de longitudes de onda. Una lámpara de arco Deuterio suministra la radiación ultravioleta y una de Tungsteno la radiación visible.	29
<b>Figura 9.</b> Equipo cromatográfico HPLC Hewlett Packard serie 1100 Agilent de fase reversa, utilizando columna Alltech ODS-2 C <sub>18</sub> (250 x 4.60 mm; tamaño de partícula 5μ).	33
<b>Figura 10.</b> Fluorímetro de amplitud modulada PAM 2000 (Walz, Alemania). Instrumento portátil, permite medir la cinética de conversión de energía y parámetros fotoquímicos en el aparato fotosintético in vivo.	38
<b>Figura 11.</b> Cinética de emisión de fluorescencia determinada con el fluorímetro PAM 2000 (Walz, Efeltrich, Alemania). Las flechas negras indican el encendido de la luz de medida. Las flechas negras quebradas indican los pulsos de saturación. Con las flechas rojas se indica el encendido y apagado de la luz actínica y con las lilas el pulso del rojo lejano. Figura extraída de Figueroa & Gómez (2001).	39
<b>Figura 12.</b> Condiciones oceanográficas de la zona de Coihuin (Puerto Montt). A) perfiles de radiación solar (UV-B, UV-A y PAR) en la columna de agua medidos con un espectroradiómetro acuático Ramses a lo largo de un rango de 40 m; B) Perfiles de Chl a, salinidad y temperatura determinados con un CTD en un rango de profundidad de 20 m.	43
<b>Figura 13.</b> Concentraciones de la clorofila a y feopigmentos medidas en extractos fitoplancton,	47

determinada mediante el espectrofotómetro UV/Visible SCINCO en muestras obtenidas por botella Niskin. Profundidad: a) superficie (0-5 m), b) intermedio (5-15 m). Las muestras fueron recolectadas durante las distintas estaciones del año. Los valores son promedio  $n= 3 \pm D.E.$

- Figura 14.** Concentraciones de la clorofila y feopigmentos medidas en extractos de fitoplancton determinadas mediante el espectrofotómetro UV/Visible SCINCO en muestras tomadas en trampas a 70 m de profundidad, siendo recolectadas durante las distintas estaciones del año. Los valores son promedio  $n= 3 \pm D.E.$  47
- Figura 15.** Concentraciones de clorofilas *a*, *b*, *c* y carotenoides medidos en extractos de fitoplancton determinadas mediante el espectrofotómetro UV / Visible SCINCO en, muestras obtenidas por la botella Niskin. Profundidad: a) superficie (0-5 m), b) intermedio (5-15 m). Las muestras fueron recolectadas durante las distintas estaciones del año. Los valores son promedio  $n= 3 \pm D.E.$  51
- Figura 16.** Concentraciones de clorofilas *a*, *b*, *c* y carotenoides medidos en extractos de fitoplancton determinadas mediante el espectrofotómetro UV / Visible SCINCO en muestras tomadas en trampas a 70 m de profundidad, siendo recolectadas durante las distintas estaciones del año. Los valores son promedio  $n= 3 \pm D.E.$  51
- Figura 17.** Cromatogramas de los estándares de los pigmentos fotosintéticos: A)  $\beta$ -caroteno B) Clorofila *a* C) Clorofila *b*, correspondiente a la concentración 50, 4, 2,5 ppm, respectivamente, resuelto en HPLC fase reversa, inyectando 50  $\mu$ L de muestra a un flujo 2,0 mL/min<sup>-1</sup>, controlado por bomba peristáltica cuaternaria a una longitud de 450 nm con detector UV-visible, controlado por bomba peristáltica cuaternaria, a temperatura ambiente y con gradiente de solventes acetonitrilo-metanol-buffer Tris HCL 0,1 M pH 8,0 y metanol-acetato de etilo y corrida isocrática con la última mezcla de solventes. 54
- Figura 18.** Curvas de calibración de los estándares puros de:  $\beta$ -caroteno, clorofila *a* y *b* corridos en HPLC de fase reversa. 55
- Figura 19.** Concentraciones de pigmentos fotosintéticos medidas en extractos de fitoplancton mediante HPLC (Hewlett Packard serie 1100 Agilent) fase reversa, en muestras obtenidas por la botella Niskin. Profundidad en: a) superficie (0-5 m), b) intermedio (5-15 m). Las muestras fueron recolectadas durante las distintas estaciones del año. Los valores son promedio  $n= 3 \pm D.E.$  59
- Figura 20.** Concentraciones de pigmentos fotosintéticos medidas en extractos de fitoplancton mediante HPLC (Hewlett Packard serie 1100 Agilent) fase reversa, en muestras tomadas en trampas a una profundidad de 70 m. Las muestras fueron recolectadas durante las distintas estaciones del año. Los valores son promedio  $n= 3 \pm D.E.$  59
- Figura 21.** Cromatogramas de pigmentos fotosintéticos en extractos de fitoplancton, muestras obtenidas mediante botella Niskin analizados según profundidad y estación del año. A) Primavera; B) Otoño. Resuelto por HPLC (Hewlett Packard serie 1100 Agilent) fase reversa. Volumen de inyección de muestra 50  $\mu$ L a un flujo de 2,0 mL/min<sup>-1</sup>, controlado por una bomba peristáltica cuaternaria, longitud de onda 59

de 450 nm con detector UV-visible, a temperatura ambiente.

- Figura 22:** Cromatogramas de pigmentos fotosintéticos en extractos de fitoplancton, muestras obtenidas mediante trampas a 70 m de profundidad, A) Verano; B) Invierno. Resuelto por HPLC (Hewlett Packard serie 1100 Agilent) fase reversa. Volumen de inyección de muestra 50 $\mu$ L a un flujo de 2,0 mL/min<sup>-1</sup>, controlado por una bomba peristáltica cuaternaria, longitud de onda de 450 nm con detector UV/visible, a temperatura ambiente. 61
- Figura 23.** Concentraciones de clorofila “a” y feopigmentos medidas en extractos macroalga, mediante el espectrofotómetro UV/Visible SCINCO. Las determinaciones fueron realizadas mediante exposición a tratamientos de radiación a distintos tiempo, siendo: A) UV-B y PAR en *Ulva sp.*, B) UV-B y PAR en *Gracilaria chilensis*. Las muestras fueron recolectadas en el mes de Agosto. Los valores son promedio  $n= 3 \pm D.E.$  67
- Figura 24.** Concentraciones de clorofila “a” y feopigmentos medidas en extractos macroalga, mediante el espectrofotómetro UV/Visible SCINCO. Las determinaciones fueron realizadas mediante exposición a tratamientos de radiación a distintos tiempo, siendo: A) UV-B y PAR en *Ulva sp.*, B) UV-B y PAR en *Gracilaria chilensis*. Las muestras fueron recolectadas en el mes de Octubre. Los valores son promedio  $n= 3 \pm D.E.$  68
- Figura 25.** Concentraciones de clorofila *a, b* y carotenoides medidas en extractos macroalga, mediante el espectrofotómetro UV/Visible SCINCO. Las determinaciones fueron realizadas mediante exposición a tratamientos de radiación a distintos tiempo, siendo: A) UV-B y PAR en *Ulva sp.*, B) UV-B y PAR en *Gracilaria chilensis*. Las muestras fueron recolectadas en el mes de Agosto. Los valores son promedio  $n= 3 \pm D.E.$  74
- Figura 26.** Concentraciones de clorofila *a, b* y carotenoides medidas en extractos macroalga, mediante el espectrofotómetro UV/Visible SCINCO. Las determinaciones fueron realizadas mediante exposición a tratamientos de radiación a distintos tiempo, siendo: A) UV-B y PAR en *Ulva sp.*, B) UV-B y PAR en *Gracilaria chilensis*. Las muestras fueron recolectadas en el mes de Octubre. Los valores son promedio  $n= 3 \pm D.E.$  75
- Figura 27.** Concentración de ficoeritrina (R-PE) en extractos de macroalga *Gracilaria chilensis* obtenidas, mediante el espectrofotómetro UV/Visible SCINCO. Las determinaciones fueron realizadas mediante exposición a tratamientos de radiación (UV-B y PAR) a distintos tiempos. A) experimento del mes de Agosto, B) experimento del mes de Octubre. Los valores son promedio  $n= 3 \pm D.E.$  79
- Figura 28.** Concentraciones de pigmentos fotosintéticos medidas en extractos de macroalga, en 30 mg de muestra peso seco, según los tratamientos de radiación. En análisis se realizó mediante HPLC (Hewlett Packard serie 1100 Agilent) fase reversa. A) UV-B y PAR en *Ulva sp.*, B) UV-B y PAR en *Gracilaria chilensis*. Las muestras fueron recolectadas en el mes de Agosto. Los valores son promedio  $n= 3 \pm D.E.$  85
- Figura 29.** Concentraciones de pigmentos fotosintéticos medidas en extractos de macroalga,

- en 30 mg de muestra peso seco, según los tratamientos de radiación. En análisis se realizó mediante HPLC (Hewlett Packard serie 1100 Agilent) fase reversa. A) UV-B y PAR en *Ulva sp.*, B) UV-B y PAR en *Gracilaria chilensis*. Las muestras fueron recolectadas en el mes de Octubre. Los valores son promedio  $n=3 \pm D.E.$  86
- Figura 30.** Cromatogramas de los pigmentos fotosintéticos en extractos de macroalga A) *Ulva sp.* B) *Gracilaria chilensis* recolectadas en el mes de Agosto. Resuelto por HPLC (Hewlett Packard serie 1100 Agilent) fase Reversa. Volumen de inyección de muestra 50  $\mu\text{L}$  a un flujo de 2,0  $\text{mL}/\text{min}^{-1}$ , controlado por una bomba peristáltica cuaternaria, longitud de onda de 450 nm con detector UV-visible, a temperatura ambiente. 87
- Figura 31.** Cromatogramas de los pigmentos fotosintéticos en extractos de macroalga A) *Ulva sp.* B) *Gracilaria chilensis*, recolectadas en el mes de Octubre. Resuelto por HPLC (Hewlett Packard serie 1100 Agilent) fase Reversa. Volumen de inyección de muestra 50  $\mu\text{L}$  a un flujo de 2,0  $\text{mL}/\text{min}^{-1}$ , controlado por una bomba peristáltica cuaternaria, longitud de onda de 450 nm con detector UV-visible, a temperatura ambiente. 88
- Figura 32.** Parámetros de fluorescencia (Fv/Fm: rendimiento cuántico máximo) medidos en extractos de macroalga A) *Ulva sp.* y B) *Gracilaria chilensis*, mediante el fluorímetro de amplitud modulada PAM 2000. Las determinaciones fueron realizadas a través de exposición a radiación a distintos tiempos. Las muestras fueron recolectadas en el mes de Agosto. Los valores son promedio  $n=3 \pm D.E.$  92
- Figura 33.** Parámetros de fluorescencia (Fv/Fm: rendimiento cuántico máximo) medidos en extractos de macroalga A) *Ulva sp.* y B) *Gracilaria chilensis*, mediante el fluorímetro de amplitud modulada PAM 2000. Las determinaciones fueron realizadas a través de exposición a radiación a distintos tiempos. Las muestras fueron recolectadas en el mes de Octubre. Los valores son promedio  $n=3 \pm D.E.$  92
- Figura 34.** Parámetros de fluorescencia ETR (Tasa de transporte de electrones) medidos en extractos de macroalga, mediante el fluorímetro de amplitud modulada PAM 2000. Las determinaciones fueron realizadas mediante exposición a radiación a distintos tiempos, siendo A) *Ulva sp.* tratada con UV-B y PAR B) *Gracilaria chilensis* tratada con UV-B y PAR. Las muestras fueron recolectadas en el mes de Agosto. Los valores son promedio  $n=3$ . 95
- Figura 35.** Parámetros de fluorescencia ETR (Tasa de transporte de electrones) medidos en extractos de macroalga, mediante el fluorímetro de amplitud modulada PAM 2000. Las determinaciones fueron realizadas mediante exposición a radiación a distintos tiempos, siendo A) *Ulva sp.* tratadas con UV-B y PAR B) *Gracilaria chilensis* tratadas con UV-B y PAR. Las muestras fueron recolectadas en el mes de Octubre. Los valores son promedio  $n=3$ . 96

## ÍNDICE DE TABLAS

		Pág.
<b>Tabla 1.</b>	Concentraciones de clorofila (Chl a) y feopigmentos (Pheo) (mg/m <sup>3</sup> ) en extractos fitoplancton, obtenidos por botella Niskin. Estas fueron determinadas según el método de Lorenzen (1967) por medio de espectrofotometría UV/Visible a 665 y 750 nm en los diferentes tiempos de exposición a los tratamientos de radiación. Los valores son promedio $n= 3 \pm$ D.E. Se indican los resultados de un análisis de ANOVA de una vía para diferencias entre estaciones del año. Letras similares indican diferencias significativas ( $p<0,05$ ) según el test de Tukey HSD.	45
<b>Tabla 2.</b>	Concentraciones de clorofila (Chl a) y feopigmentos (Pheo)(mg/m <sup>3</sup> ) en extractos fitoplancton, obtenidos por trampa. Estas fueron determinadas según el método de Lorenzen (1967) por medio de espectrofotometría UV/Visible a 665 y 750 nm en los diferentes tiempos de exposición a los tratamientos de radiación. Los valores son promedio $n= 3 \pm$ D.E. Se indican los resultados de un análisis de ANOVA de una vía para diferencias entre estaciones del año. Letras similares indicandiferencias significativas ( $p<0,05$ ) según el test de Tukey HSD.	46
<b>Tabla 3.</b>	Concentraciones de pigmentos fotosintéticos (mg/m <sup>3</sup> ) en extractos de fitoplancton, obtenidos por botella Niskin. Estas fueron determinadas según el método Strickland & Parson (1972) por medio de espectrofotometría UV/Visible a 480, 510, 630, 647 y 664 nm en los diferentes tiempos de exposición a los tratamientos de radiación. Los valores son promedio $n= 3 \pm$ D.E. Se indican los resultados de un análisis de ANOVA de una vía para diferencias entre estaciones del año. Letras similares indican diferencias significativas ( $p<0,05$ ) según el test de TukeyHSD.	49
<b>Tabla 4.</b>	Concentraciones pigmentos fotosintéticos (mg/m <sup>3</sup> ) en extractos de fitoplancton, obtenidos por trampas. Estas fueron determinadas según el método de Strickland & Parson (1972) por medio de espectrofotometría UV/Visible a 480, 510, 630, 647 y 664 nm en los diferentes tiempos de exposición a los tratamientos de radiación. Los valores son promedio $n= 3 \pm$ D.E. Se indican los resultados de un análisis de ANOVA de una vía para diferencias entre estaciones del año. Letras similares indican diferencias significativas ( $p<0,05$ ) según el test de Tukey HSD.	50
<b>Tabla 5.</b> 53	Tiempos de retención (min) de estándares de pigmentos fotosintéticos analizados en HPLC de fase reversa, provisto columna C <sub>18</sub> , se inyectó un volumen de 50 $\mu$ l de muestra del estándar ( $\beta$ -caroteno, Clorofila a y Clorofila b a concentraciones de: 5, 10, 25, 50; 4, 3, 2, 1; 0,5, 1, 2,5, 5 ppm, respectivamente) a un flujo de 2,0 ml/min . Estos fueron detectados a una longitud de onda de 350 nm con detector UV-visible, a temperatura ambiente y con una gradiente modificada de solventes: a) acetonitrilo metanol-buffer Tris HCL 0,1 M pH 8,0; b) metanol-acetato de etilo. $n= 3$ .	57
<b>Tabla 6.</b>	Concentraciones de pigmentos fotosintéticos (ppm) en extractos de fitoplancton, obtenidos por botella Niskin. Estas fueron analizadas con HPLC fase reversa detectadosa una longitud de onda de 450 nm con un detector UV/visible, a temperatura ambiente y con una gradiente modificada de solventes: a) acetonitrilo–metanol–buffer Tris HCL 0,1 M pH 8,0 b) metanol-acetato de etilo en los diferentes tiempos de exposición a los tratamientos de radiación. Los valores son promedio $n= 3 \pm$ D.E. Se indican los resultados de un análisis de ANOVA de una vía para diferencias entre estaciones del año. Letras similares indican diferencias significativas ( $p<0,05$ ) según el test de Tukey HSD.	57

- Tabla 7.** Concentraciones de pigmentos fotosintéticos (ppm) en extractos de fitoplancton, obtenidos por trampas. Estas fueron analizadas con HPLC fase reversa detectados a una longitud de onda de 450 nm con un detector UV/visible, a temperatura ambiente y con una gradiente modificada de solventes: a) acetonitrilo- metanol - buffer Tris HCL 0,1 M pH 8,0 b) metanol-acetato de etilo en los diferentes tiempos de exposición a los tratamientos de radiación. Los valores son promedio  $n= 3 \pm$  D.E. Se indican los resultados de un análisis de ANOVA de una vía para diferencias entre estaciones del año. Letras similares indican diferencias significativas ( $p<0,05$ ) según el test de Tukey HSD. 58
- Tabla 8a.** Concentraciones de clorofilas y feopigmentos (mg/gPS) en extractos de macroalga *Ulva sp.* tratadas con radiación UV-B y PAR, en el mes de Agosto. Estas fueron determinadas según el método de Lorenzen (1967) por medio de espectrofotometría UV/Visible a 665 y 750 nm en los diferentes tiempos de exposición a los tratamientos de radiación. Los valores son promedio  $n= 3 \pm$  D.E. Se indican los resultados de un análisis de ANOVA de 2 Vías. Letras similares indican diferencias significativas ( $p<0,05$ ) según el test de Tukey HSD. 63
- Tabla 8b.** Concentraciones de clorofilas y feopigmentos (mg/gPS) en extractos de macroalga *Ulva sp.* tratadas con radiación UV-B y PAR, en el mes de Octubre. Estas fueron determinadas según el método de Lorenzen (1967) por medio de espectrofotometría UV/Visible a 665 y 750 nm en los diferentes tiempos de exposición a los tratamientos de radiación. Los valores son promedio  $n= 3 \pm$  D.E. Se indican los resultados de un análisis de ANOVA de 2 Vías. Letras similares indican diferencias significativas ( $p<0,05$ ) según el test de Tukey HSD. 64
- Tabla 9a.** Concentraciones de clorofilas y feopigmentos (mg/gPS) en extractos de macroalga *Gracilaria chilensis* tratadas con radiación UV-B y PAR, en el mes de Agosto. Estas fueron determinadas según el método de Lorenzen (1967) por medio de espectrofotometría UV/Visible a 665 y 750 nm en los diferentes tiempos de exposición a los tratamientos de radiación. Los valores son promedio  $n= 3 \pm$  D.E. Se indican los resultados de un análisis de ANOVA de 2 Vías. Letras similares indican diferencias significativas ( $p<0,05$ ) según el test de Tukey HSD. 65
- Tabla 9b.** Concentraciones de clorofilas y feopigmentos (mg/gPS) en extractos de macroalga *Gracilaria chilensis* tratadas con radiación UV-B y PAR, en el mes de Octubre. Estas fueron determinadas según el método de Lorenzen (1967) por medio de espectrofotometría UV/Visible a 665 y 750 nm en los diferentes tiempos de exposición a los tratamientos de radiación. Los valores son promedio  $n= 3 \pm$  D.E. Se indican los resultados de un análisis de ANOVA de 2 Vías. Letras similares indican diferencias significativas ( $p<0,05$ ) según el test de Tukey HSD. 66
- Tabla 10a.** Concentraciones de pigmentos fotosintéticos (mg/L) en extractos de macroalga *Ulva sp.* tratada con radiación UV-B y PAR, en el mes de Agosto. Estas fueron determinadas según el método Strickland & Parson (1972) por medio de espectrofotometría UV/Visible a 480, 510, 630, 647 y 664 nm en los diferentes tiempos de exposición a los tratamientos de radiación. Los valores son promedio  $n= 3 \pm$  D.E. Se indican los resultados de un análisis de ANOVA de 2 Vías. Letras similares indican diferencias significativas ( $p<0,05$ ) según el test de Tukey HSD. 70
- Tabla 10b.** Concentraciones de pigmentos fotosintéticos (mg/L) en extractos de macroalga *Ulva sp.* tratada con radiación UV-B y PAR, en el mes de Octubre. Estas fueron determinadas según el método Strickland & Parson (1972) por medio de 71

espectrofotometría UV/Visible a 480,510, 630,647 y 664 nm en los diferentes tiempos de exposición a los tratamientos de radiación. Los valores son promedio  $n = 3 \pm D.E.$  Se indican los resultados de un análisis de ANOVA de 2 Vías. Letras similares indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) según el test de Tukey HSD.

- Tabla 11a.** Concentraciones de pigmentos fotosintéticos (mg/L) en extractos de macroalga *Gracilaria chilensis* tratada con radiación UV-B y PAR, en el mes de Agosto. Estas fueron determinadas según el método Strickland & Parson (1972) por medio de espectrofotometría UV/Visible a 480, 510, 630, 647 y 664 nm en los diferentes tiempos de exposición a los tratamientos de radiación. Los valores son promedio  $n = 3 \pm D.E.$  Se indican los resultados de un análisis de ANOVA de 2 Vías. Letras similares indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) según el test de Tukey HSD. 72
- Tabla 11b.** Concentraciones de pigmentos fotosintéticos (mg/L) en extractos de macroalga *Gracilaria chilensis* tratada con radiación UV-B y PAR, en el mes de Octubre. Estas fueron determinadas según el método Strickland & Parson (1972) por medio de espectrofotometría UV/Visible a 480, 510, 630, 647 y 664 nm en los diferentes tiempos de exposición a los tratamientos de radiación. Los valores son promedio  $n = 3 \pm D.E.$  Se indican los resultados de un análisis de ANOVA de 2 Vías. Letras similares indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) según el test de Tukey HSD. 73
- Tabla 12a.** Determinación de la concentración de ficoeritrina (mg/gPS) por el método de Beer & Eschel (1985), en extractos de macroalga *Gracilaria chilensis*, tratadas con radiación UV-B y PAR, en el mes de Agosto, por medio de espectrofotometría UV/Visible a 455, 564 y 592 nm en los diferentes tiempos de exposición a los tratamientos de radiación. Los valores son promedio  $n = 3 \pm D.E.$  Se indican los resultados de un análisis de ANOVA de 2 Vías. Letras similares indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) según el test de Tukey HSD. 77
- Tabla 12b.** Determinación de la concentración de ficoeritrina (mg/gPS) por el método de Beer & Eschel (1985), en extractos de macroalga *Gracilaria chilensis*, tratadas con radiación UV-B y PAR, en el mes de Octubre, por medio de espectrofotometría UV/Visible a 455, 564 y 592 nm en los diferentes tiempos de exposición a los tratamientos de radiación. Los valores son promedio  $n = 3 \pm D.E.$  Se indican los resultados de un análisis de ANOVA de 2 Vías. Letras similares indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) según el test de Tukey HSD. 78
- Tabla 13a.** Concentraciones de pigmentos fotosintéticos (mg/gPS) en extractos de macroalga *Ulva sp.* tratadas con radiación UV-B y PAR, en el mes de Agosto. Estas fueron analizadas con HPLC fase reversa detectados a una longitud de onda de 450 nm con un detector UV/visible, a temperatura ambiente y con una gradiente modificada de solventes: a) acetonitrilo- metanol-buffer Tris HCL 0,1 M pH 8,0 b) metanol - acetato de etilo. Los valores son promedio  $n = 3 \pm D.E.$  Se indican los resultados de un análisis de ANOVA de 2 Vías. Letras similares indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) según el test de Tukey HSD. 81
- Tabla 13b.** Concentraciones de pigmentos fotosintéticos (mg/gPS) en extractos de macroalga *Ulva sp.* tratadas con radiación UV-B y PAR, en el mes de Octubre. Estas fueron analizadas con HPLC fase reversa detectados a una longitud de onda de 450 nm con un detector UV/visible, a temperatura ambiente y con una gradiente modificada de solventes: a) acetonitrilo-metanol-buffer Tris HCL 0,1 M pH 8,0 b) metanol-acetato de etilo. Los valores son promedio  $n = 3 \pm D.E.$  Se indican los resultados de un análisis de ANOVA de 2 Vías. Letras similares indican 82

diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) según el test de Tukey HSD.

- Tabla 14a.** Concentraciones de pigmentos fotosintéticos (mg/gPS) en extractos de macroalga *Gracilaria chilensis* tratadas con radiación UV-B y PAR, en el mes de Agosto. Estas fueron analizadas con HPLC fase reversa detectados a una longitud de onda de 450 nm con un detector UV/Visible, a temperatura ambiente y con una gradiente modificada de solventes: a) acetonitrilo-metanol-buffer Tris HCL 0,1 M pH 8,0 b) metanol-acetato de etilo. Los valores son promedio  $n = 3 \pm$  D.E. Se indican los resultados de análisis de ANOVA de 2 Vías. Letras similares indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) según el test de Tukey HSD. 83
- Tabla 14b.** Concentraciones de pigmentos fotosintéticos (mg/gPS) en extractos de macroalga *Gracilaria chilensis* tratadas con radiación UV-B y PAR, en el mes de Octubre. Estas fueron analizadas con HPLC fase reversa detectados a una longitud de onda de 450nm con un detector UV-visible, a temperatura ambiente y con una gradiente modificada de solventes: a) acetonitrilo-metanol-buffer Tris HCL 0,1 M pH 8,0 b) metanol-acetato de etilo. Los valores son promedio  $n = 3 \pm$  D.E. Se indican los resultados de un análisis de ANOVA de 2 Vías. Letras similares indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) según el test de Tukey HSD. 84
- Tabla 15a.** Efecto de la radiación UV el rendimiento cuántico máximo (Fv/Fm) medidas en extractos de macroalga *Ulva sp.* y *Gracilaria chilensis*. Las determinaciones fueron realizadas mediante exposición a tratamientos de radiación a distintos tiempos, en el mes de Agosto. Los valores son promedio  $n = 3 \pm$  D.E. Se indican los resultados de un análisis de ANOVA de 2 Vías. Letras similares indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) según el test de Tukey HSD. 90
- Tabla 15b.** Efecto de la radiación UV el rendimiento cuántico máximo (Fv/Fm) medidas en extractos de macroalga *Ulva sp.* y *Gracilaria chilensis*. Las determinaciones fueron realizadas mediante exposición a tratamientos de radiación a distintos tiempos, en el mes de Octubre. Los valores son promedio  $n = 3 \pm$  D.E. Se indican los resultados de un análisis de ANOVA de 2 Vías. Letras similares indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) según el test de Tukey HSD. 91
- Tabla 16a.** Efecto de la radiación UV en la tasa de transporte de electrones (ETR) medidas en extractos de macroalga *Ulva sp.* y *Gracilaria chilensis*. Las determinaciones fueron realizadas mediante exposición a tratamientos de radiación a distintos tiempos, en el mes de Agosto. Los valores son promedio  $n = 3$ . Se indican los resultados de un análisis de ANOVA de 2 Vías. 94
- Tabla 16a.** Efecto de la radiación UV en la tasa de transporte de electrones (ETR) medidas en extractos de macroalga *Ulva sp.* y *Gracilaria chilensis*. Las determinaciones fueron realizadas mediante exposición a tratamientos de radiación a distintos tiempos, en el mes de Agosto. Los valores son promedio  $n = 3$ . Se indican los resultados de un análisis de ANOVA de 2 Vías. 94

## LISTA DE ABREVIATURAS

A	Absorptancia
Abs	Absorbancia
ACN	Acetonitrilo
$\beta$ -carot.	$\beta$ -caroteno
AP	Aloficocianina
Chl <i>a</i>	Clorofila <i>a</i>
Chl <i>b</i>	Clorofila <i>b</i>
Chl <i>c</i>	Clorofila <i>c</i>
Chls	Clorofilas
COD	Carbono orgánico disuelto
D	Día
D.E	Desviación estándar
ETR	Tasa de transporte de electrones
F <sub>m</sub>	Fluorescencia máxima o potencial de una planta adaptada a oscuridad
F <sub>o</sub>	Fluorescencia mínima o inicial
F <sub>v</sub>	Fluorescencia variable
F <sub>v</sub> /F <sub>m</sub>	Eficiencia fotoquímica máxima del PSII
g	Gramo
HCL	Ácido clorhídrico
HPLC	“High Performance Liquid Chromatography”, Cromatografía Líquida de Alta Resolución
h	Horas
K <sub>d</sub>	Coeficiente de atenuación
mAU	Mili unidades de absorbancia
m <sup>2</sup>	Metro cuadrado
min	Minuto
mg	Miligramo
mm	Milímetro
nm	Nanómetro
PAM	Flurímetro de amplitud de pulso modulada

PAR	Radiación fotosintéticamente activa
PBP	Ficobiliproteínas
PC	Ficocianina
PE	Ficoeritrina
Pheo	Feopigmentos
PBS	Ficobilisoma
Ppm	Partes por millón
PSI	Fotosistema I
PSII	Fotosistema II
$\Phi$ PSII	Rendimiento cuántico efectivo del PSII
PS	Peso Seco
RP-HPLC	Cromatografía Líquida de Alta Resolución con fase reversa
R-PE	R-Ficoeritrina
SM	Sin muestra
T°	Temperatura
$\mu$ l	Microlitros
$\mu$ m	Micras
UV	Radiación ultravioleta
UV-A	Ultravioleta A
UV-B	Ultravioleta B
UV-C	Ultravioleta C

## 1.- RESUMEN

Las principales fuentes de pigmentos presentes en la columna de agua incluyen al fitoplancton y el aporte de comunidades de algas bentónicas, bacterias fototróficas y plantas acuáticas o macrofitas. Estos pigmentos son degradados tanto en la columna de agua como en su posterior depositación en el sedimento.

El presente estudio tiene por finalidad realizar una aproximación experimental para detectar cambios en la composición pigmentaria a lo largo de la columna de agua, en una plataforma submareal de la zona de Puerto Montt (Coihuín). La variabilidad espacial y temporal se estudió para poder reconocer algunos factores ambientales involucrados en sus fluctuaciones. Otro aspecto principal fue determinar si la radiación UV-B afecta las fuentes de pigmentos en el sistema. Paralelamente se llevó a cabo la medición de la fotosíntesis *in vivo* basada en la determinación de la fluorescencia de clorofila del fotosistema II (PSII), mediante pulsos de amplitud modulada (PAM), siendo medidos el rendimiento cuántico máximo ( $F_v/F_m$ ) y la tasa de transporte de electrones (ETR). Ambos tipos de determinaciones fisiológicas fueron llevadas a cabo en macroalgas previamente expuestas a distintas combinaciones de radiación UV-B, UV-A y visible (PAR) usando lámparas en el laboratorio. En la concentración de los pigmentos fotosintéticos se determinó clorofilas (*a* y *b*), carotenoides ( $\beta$ -caroteno) presentes en las macroalgas *Ulva* sp. y *Gracilaria chilensis* y fitoplancton mediante estudios espectrofotométricos y Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) de Fase Reversa.

En las muestras de fitoplancton las concentraciones de los pigmentos fotosintéticos, clorofila *a*, *b* y  $\beta$ -caroteno, variaron en relación con la profundidad y la estacionalidad, observándose los mayores valores (1,80; 0,94; 12,39 ppm) respectivamente en la capa superficial de la columna en los meses de primavera, disminuyendo hacia el invierno (1,17; 0,22; 4,13 ppm). Por otra parte, a una mayor profundidad se presentaron niveles más altos de concentración (1,07; 0,16; 2,05 ppm) en invierno y una disminución en primavera (0,358; 0,163; 4,563 ppm). Se observó una clara estratificación en algunos meses del año, posiblemente debido a la variación de la termoclina, lo que pudo afectar directamente la distribución de los pigmentos en las masas de agua.

En el caso de las macroalgas *Ulva sp.* y *Gracilaria chilensis* y los efectos de radiación UV, se observó en la medición de ambos parámetros fisiológicos Fv/Fm (27,1 %; 35,7 %) y ETR (46,3 %; 54,4 %) una disminución a mayor tiempo de exposición. Esta disminución podría estar indicando efectos asociados a fotoinhibición crónica, un fenómeno que exhiben las macroalgas en respuesta a un exceso de radiación. En cuanto a los pigmentos fotosintéticos analizados, las concentraciones de clorofila *a* y *b* disminuyeron en relación con la exposición a la radiación UV, lo cual podría estar relacionando con una foto-oxidación de la clorofila o una disminución en su biosíntesis, afectando en mayor proporción a la concentración de la clorofila *b* respecto de la clorofila *a*. En el caso del  $\beta$ -caroteno se observó un aumento en su concentración, surgiendo la síntesis de este pigmento como un mecanismo de protección en respuesta al exceso de radiación UV-B.

## 1.1.- SUMMARY

The principal source of pigments present in the water column includes phytoplankton and the contribution of communities of benthic seaweeds, phototrophic bacteria and aquatic plants or macrophytes. These pigments are degraded both in the water column and in the sediment after deposition.

The goal of the present study was to experimentally detect changes in pigment composition in the water column of a subtidal platform near Puerto Montt (Coihuin). The spatial and temporal variability of photosynthetic pigments was assessed in order to identify some environmental factors involved in such fluctuations. Another main aspect was to determine whether the UV-B radiation affects the levels of pigments. In parallel, alive in measurements of fluorescence of PSII-chlorophyll *a*, by means of a pulse amplitude modulation fluorometer (PAM), were performed. Here, the maximum quantum yield ( $F_v/F_m$ ) and the electron transport rate (ETR) were especially determined. Both types of physiological determinations were carried out in macroalgae previously exposed to a combination of UV-B, UV-A and PAR lamps in the laboratory. The concentration of photosynthetic pigments chlorophylls (*a* and *b*), carotenoids ( $\beta$ -carotene) present in the macroalgae *Ulva sp.* and *Gracilaria chilensis* and phytoplankton were determined using both Spectrophotometry and Reverse Phase High Performance Liquid Chromatography (RP-HPLC).

In phytoplankton, the concentrations of photosynthetic pigments, chlorophyll *a*, *b* and  $\beta$ -carotene, varied in relation to depth and seasonality, with highest values found in surface layers (1.80; 0.94; 12.39 ppm) of the column during spring months, decreasing toward winter (1.17; 0.22; 4.13 ppm). On the other hand, higher concentrations were observed deep (1.07; 0.16; 2.05 ppm) in winter and decreasing in spring (0,358; 0,163; 4,563 ppm). An obvious stratification in some months of the year was observed, possibly due to variations in the thermocline that could affect the distribution of pigments in the water column.

With regards to the macroalgae *Ulva sp.* and *Gracilaria chilensis* and the radiation effects UV, the measurements of both physiological parameters  $F_v/F_m$  (21, 7 %; 35, 7 %) and ETR, indicated a decrease (46, 3 %; 54, 4 %) in relation with the exposure time. This

decrease could be associated to a chronic photoinhibition, a phenomenon exhibited by plants in response to excess solar radiation. In the case of pigments examined, concentrations of Chl *a* and Chl *b* decreased with exposure to UV radiation, which may be related to oxidation of chlorophyll or effects on its biosynthesis. This situation affected more strongly chlorophyll *b* than chlorophyll *a*. In the case of the  $\beta$ -carotene, an increase in the concentration was detected, which could be indicative of a mechanism of photoprotection in response to the excess of UV B radiation.

## 2.- INTRODUCCIÓN

### 2.1. Aspectos generales de los pigmentos fotosintéticos

Los pigmentos fotosintéticos son moléculas con una gran capacidad de absorber de la energía de los fotones y posibilitan la fotosíntesis. Estos pigmentos se organizan en estructuras captadoras de luz denominadas antenas, constituidos por pigmentos unidos a proteínas, las cuales están rodeando a los centros de reacción clorofila *a* (chl *a*) cuya función es transformar la energía fotónica en electroquímica. En relación a la clorofila *a*, existen dos tipos según se trate de organismos fotosintéticos procariotas o eucariotas, bacterioclorofila *a* y clorofila *a* respectivamente y además están acompañados de otros pigmentos accesorios, cuya función es ampliar el espectro de absorción de los pigmentos primarios y además, en el caso de algunos tipos y en ciertas circunstancias, pueden servir como protección frente a la luz excesiva (Barceló, 2001)

Los pigmentos presentes en organismos del fitoplancton incluyen numerosos grupos de compuestos con diversas características físicas y químicas. Fundamentalmente, los pigmentos de las plantas se dividen en 3 grupos: clorofilas (*a*, *b*, *c1*, *c2*, *c3*), carotenoides (carotenos y sus derivados oxigenados conocidos como xantofilas), y ficobiliproteínas (aloficocianinas, ficocianinas, ficoeritrinas) son esenciales para la fotosíntesis. Estos compuestos poseen distintas características, una de las más importantes es la capacidad de absorber luz a distintas longitudes de onda, ya que de esto depende el rango efectivo de acción del pigmento. Por ejemplo las clorofilas absorben en el rango de 430-450 nm y 600-690 nm, los carotenoides entre 400-500 nm y las ficobiliproteínas absorben entre 450-550 nm para la ficoeritrina y 500-640 nm para la ficocianina, estando presentes en células de todos los organismos autotróficos (procariontes y eucariontes), y localizándose en las membranas tilacoidales (Fogg *et al.* 1973; Strasburger, 1994; Barceló, 2001). Como se ha mencionado anteriormente la función primordial de la clorofila es la de absorber energía lumínica, formando parte fundamental de la maquinaria captadora de luz en los tilacoides y además en el caso específico de la clorofila *a*, además forma parte del centro de reacción que inicia, por diferencia de carga por la llegada del "exciton", reacciones Redox que darán origen al

transporte de electrones necesarios para llevar los electrones excitados por los fotones absorbidos hasta sus finales aceptores, las moléculas de NADP oxidado que pasarán a NADPH reducido.

Los pigmentos fotosintéticos se encuentran agrupados en sistemas funcionales denominados fotosistemas. Cada fotosistema consiste, en promedio, de unas 200 moléculas de clorofila y unas 50 moléculas de carotenoides. De todas estas moléculas solo unas pocas, mayoritariamente clorofilas, asociadas con el centro de reacción son capaces de transducir la energía luminosa en energía electroquímica. El resto de pigmentos, también mayoritariamente clorofilas, actúan como captadores de la luz y se denominan moléculas antena. La luz es absorbida por las moléculas antena y se va transfiriendo por resonancia hasta que alcanzan el centro de reacción. Esta transferencia se realiza con una altísima eficacia (Strasburger, 1994; Barceló, 2001).

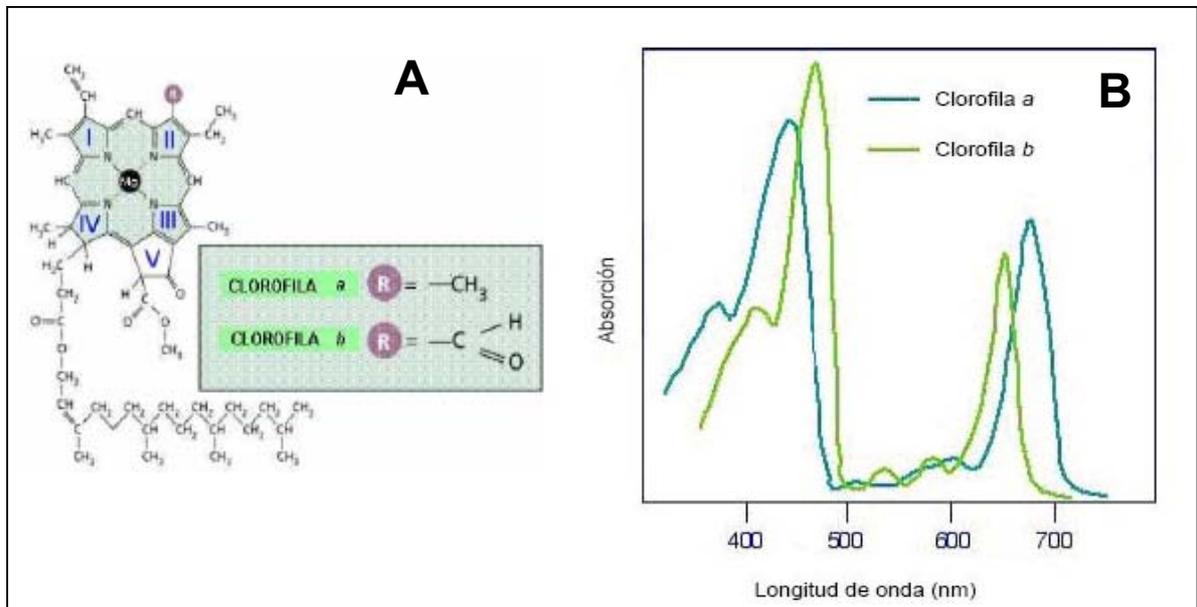
En algas y plantas superiores existen dos tipos de fotosistemas, cada uno con su centro de reacción y su grupo de moléculas antena: el PSI, cuya molécula activa del centro de reacción, un dímero de clorofila *a* especializada, tiene un máximo de absorción a 700 nm ( $P_{700}$ ) y el PSII, cuya molécula activa del centro de reacción, probablemente una molécula de clorofila *a* especializada, tiene un máximo a 680nm ( $P_{680}$ ) (Strasburger, 1994).

### **2.1.1. Estructuras de los pigmentos fotosintéticos:**

#### **2.1.1.1. Clorofilas**

Estos pigmentos que se ubican en las membranas tilacoidales, su color verde se debe a que absorben todas las longitudes de onda de la luz visible excepto el verde-amarillo (fenómeno conocido también como “ventana verde”), el cual es reflejado y percibido por nuestros ojos. Están conformadas por estructuras policíclicas planas estables, formados por cuatro anillos pirrólicos cíclicos con un anillo de ciclopentanona fusionado al pirrol III, donde los cuatro átomos de nitrógeno que poseen estos cuatro anillos están asociados a un átomo de  $Mg^{+2}$ . Además, poseen una cadena terpenoide constituida por el alcohol fitol, esterificado en el cuarto anillo. Este alcohol de 20 átomos de carbono con un doble enlace ( $C_{20}H_{39}OH$ ) confiere a la molécula la característica de ser

altamente hidrofóbica (**Fig. 1 A**) y que le otorga la propiedad de unirse a los dominios apolares de las proteínas que anclan el sistema a la membrana tilacoidal. En los

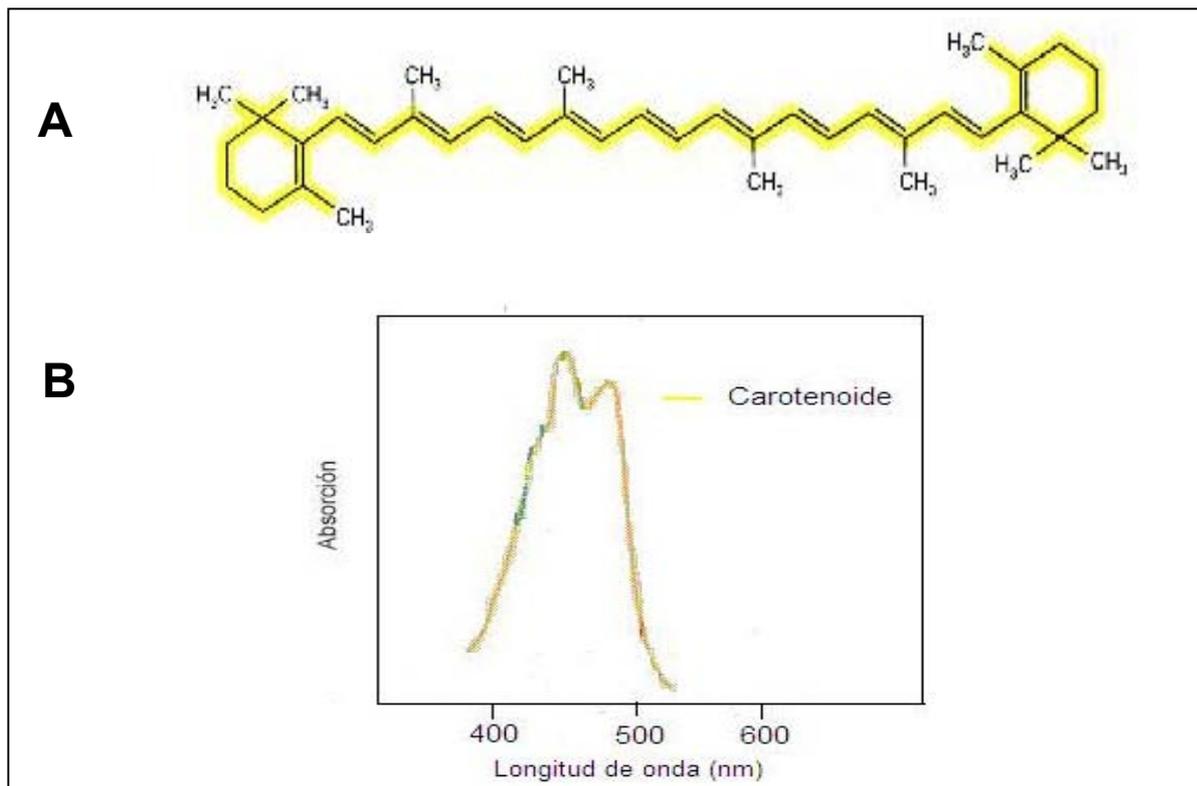


**Figura 1:** (A) Estructura molecular y (B) espectro de absorción de la molécula de clorofila. Figura extraída y modificada de Strasburger, 1994.

cloroplastos se encuentran tanto clorofila *a* como *b*. Si bien las dos son verdes, varían en el grupo unido al anillo pirrólico II, la clorofila *a* presenta un grupo metilo (-CH<sub>3</sub>), mientras que la clorofila *b* presenta un grupo formilo (-CHO). Sus espectros de absorción son suficientemente diferentes como para permitir que los dos pigmentos complementen sus rangos de absorción en la región visible. La mayoría de las plantas contienen el doble de clorofila *a* que clorofila *b* (Stryer, 2002). La gran eficiencia que presentan estas moléculas como fotorreceptores se debe a la presencia alternante de enlaces simples y dobles en su estructura (Andreo, 1984). Las clorofilas difieren en sus espectros de absorción ya que absorben la luz en dos regiones del espectro, cerca de los 400 nm y desde los 600 nm, variando y dependiendo un poco de los diferentes estados de agregación de las moléculas de clorofila o a las proteínas a las cuales estén asociadas (**Fig. 1 B**).

### 2.1.1.2. Carotenoides:

En algas y plantas los carotenoides se encuentran ubicados en los tilacoides de los cloroplastos. Son pigmentos accesorios en la fotosíntesis, captando energía luminosa en regiones del espectro donde la clorofila no absorbe eficientemente, además protegen de la luz intensa que puede dañar la clorofila e inactiva las especies reactivas de oxígeno o directamente el estado triplete de la clorofila (Stryer, 2002).



**Figura 2:** (A) Estructura molecular y (B) espectro de absorción de la molécula de carotenoides. Figura extraída y modificada de Strasburger, 1994.

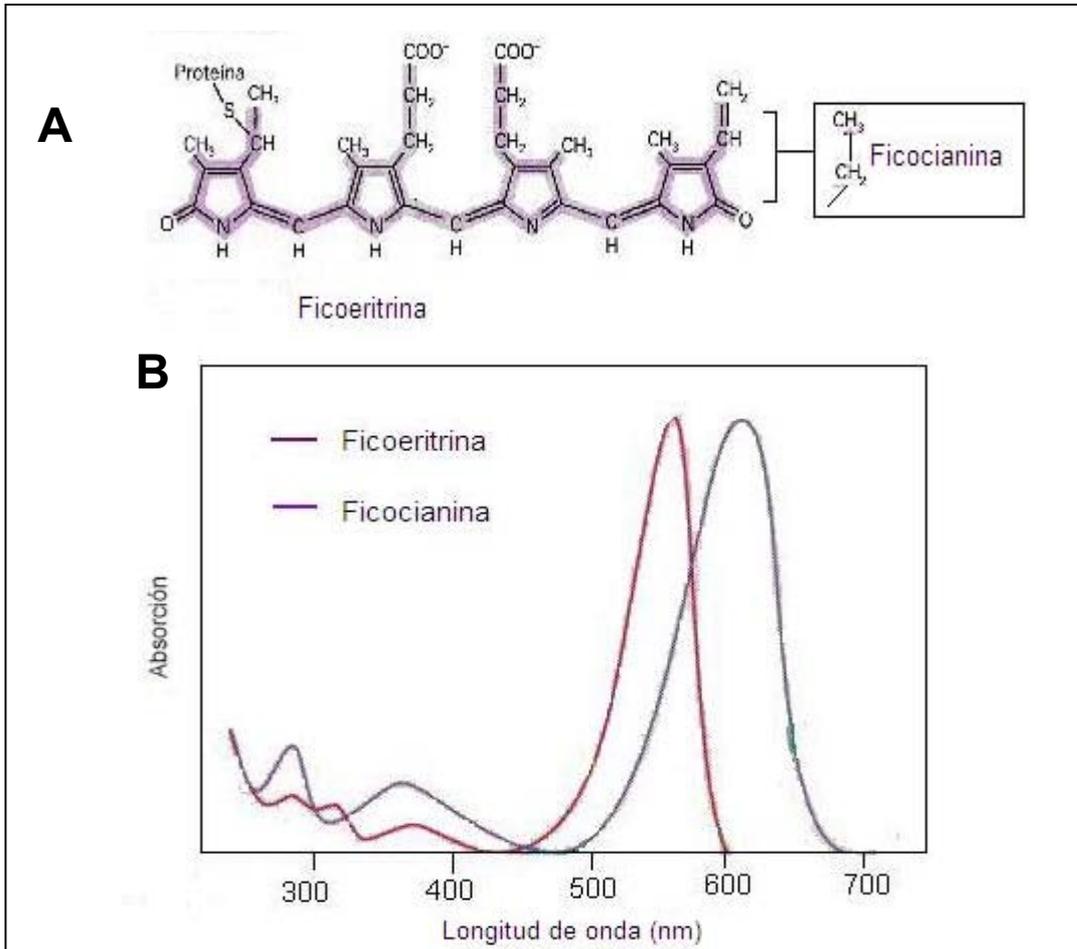
Los carotenoides o carotenos son terpenoides constituidos por largas cadenas poliisoprenoides, presentando dobles enlaces conjugados que poseen en ambos extremos anillos de ciclohexano sustituidos. Debido a la presencia de éstas características son fuertes cromóforos. Cada cromóforo es responsable del espectro de absorción característico y del color de la molécula (Britton & Goodwin 1971; Andreo, 1984; Stryer, 2002). En la larga cadena de hidrocarburos (**Fig. 2 A**), proporciona a estos compuestos la

propiedad de ser insolubles en agua, pero sí solubles en solventes grasos. Se dividen en carotenos que son hidrocarburos insaturados y en xantofilas que son derivados oxigenados de los anteriores. El cuerpo básico de los carotenos está formado por 40 átomos de carbono consistente en 8 unidades de isoprenos. Estas unidades poseen una estructura central en forma de cadena con 14 átomos de carbono y 7 enlaces dobles conjugados además de 4 grupos metilo en forma de cadenas laterales. La cadena central lleva en uno o en los dos extremos un agrupamiento en forma de anillo, además, poseen máximos de absorbancia a longitudes de onda distintas de las clorofilas. Absorben en la gama de 400-500 nm y actúan como moléculas receptoras de luz suplementarias en regiones del espectro en que las clorofilas no tienen absorción, aumentando de esa manera la eficiencia con que las células fotosintetizadoras aceptan la luz (**Fig. 2 B**).

#### 2.1.1.3. Ficobiliproteínas:

La ficocianina (azul) y la ficoeritrina (roja) se encuentran presentes en distintas proporciones en las cianobacterias, las rodofíceas y los criptófitos enmascarando a la clorofila (Strasburger, 1994). Son proteínas fluorescentes que contienen grupos tetrapirrólicos covalentemente unidos a la apoproteína (Glauser, *et al.*, 1992; MacColl, 1998). En cianobacterias y rodofíceas las biliproteínas se encuentran situadas, en forma de gránulos, ficobilisoma, de unos 40 nm, en la superficie del tilacoide, del lado del citoplasma o del estroma (Strasburger, 1994), cuya principal función es la captación y conducción de luz hasta los centros de reacción fotosintéticos (Glazer, 1989). Las ficobiliproteínas se encuentran en el ficobilisoma de acuerdo a sus propiedades de emisión y absorción para lograr una eficiencia cercana al 100% en la conducción de luz (MacColl, 1998). En una misma especie suelen estar presentes los dos tipos de ficobiliproteínas, aunque, en general, predomina una de ellas (Barceló, 2001). La aloficocianina y las ficocianinas A, B, C o R se encuentran en todas las cianobacterias y rodofíceas. La ficoeritrina R o B es el pigmento principal de las Rodofíceas. El cuerpo básico de estas moléculas consiste en cuatro anillos de pirrol unidos entre sí por puentes de metilo, pero en este caso no forman un anillo cerrado como en la clorofila, por lo tanto no hay un átomo metálico en posición central. Los anillos de pirrol llevan en los carbonos 1 y 8 un carbón

por átomo de oxígeno, en 4 y 5 un resto propiónico que a través de sus grupos carboxilos estén unidos el grupo cromóforo a la proteína por medio de enlaces peptídicos (**Fig. 3 A**). Los anillos de pirrol y los puentes de metilo forman un sistema de dobles enlaces conjugados entre átomos de carbono y de nitrógeno.



**Figura 3:** (A) Estructura molecular y (B) espectro de absorción de la molécula de ficobilina.

Figura extraída y modificada de Strasburqer, 1994.

Esta configuración es la responsable del color de estos pigmentos. Absorben intensamente zona variables de entre 480 a 670 nm. La ficocianina tiene su máximo de absorción en los 618 nm, en el caso de la ficoeritrina entre 540 y 570 nm, captando así longitudes de onda poco utilizadas por las clorofilas (**Fig. 3 B**). Su color intenso puede enmascarar el verde de las clorofilas (Barceló, 2001).

Debido a la presencia de ficobiliproteínas, las algas verde-azules y rojas están capacitadas para cubrir con su absorción una parte del espectro de la radiación visible en que la absorción de la clorofila es débil (Strasburger, 1994).

## 2.2. Pigmentos fotosintéticos en la columna de agua

Las principales fuentes de pigmentos presentes en la columna de agua incluyen al fitoplancton y el aporte de comunidades de algas bentónicas (Carpenter *et al.*, 1986; Steinman *et al.*, 1998), bacterias fototróficas (Yacobi *et al.*, 1990; Hurley & Garrison, 1993; Overmann *et al.*, 1993) y plantas acuáticas o macrofitas (Bianchi *et al.*, 1993).

Además el agua y los sedimentos contienen pigmentos asociados al material detrital que puede encontrarse temporalmente suspendido, transportado al ambiente terrestre o a depositarse en el fondo (Carpenter *et al.*, 1988; Leavitt & Carpenter, 1989; Winfree *et al.*, 1997). En todos los casos, los pigmentos se degradan tanto en la columna de agua como en su posterior depositación en el sedimento (Hurley & Armstrong, 1990; Damste & Koopmans, 1997; Hodgson *et al.*, 1998).

Debido a que los pigmentos poseen diferentes características funcionales y de composición en los diferentes grupos de organismos (la distribución de pigmentos accesorios en los grupos de las algas son únicos) (Rowan, 1989; Wright *et al.*, 1991, Bianchi *et al.*, 1997; Schluter & Havskum 1997), ellos han sido usados como biomarcadores debido a su precisión taxonómica (Jeffrey *et al.*, 1997) y también tienen el potencial de representar la producción primaria potencial de la comunidad fototrófica entera. Por lo tanto, la clorofila y carotenoides, pueden ser utilizados taxonómicamente en la identificación directa de clases de fitoplancton, su biomasa, condición y etapa del desarrollo comunitario (Wright & Enden 2000; Mackey *et al.*, 2002). El conocimiento de concentraciones de pigmentos fotosintéticos y fotoprotectores facilita la determinación de las propiedades de absorción de fitoplancton (Wozniak *et al.*, 2000) y la tasa de fotosíntesis en aguas naturales (MacIntyre *et al.*, 2000).

En la actualidad se han encontrado más de 30 formas de clorofilas activas en la fotosíntesis y alrededor 600 carotenoides en cianobacterias, algas y hongos (Liaaen - Jensen & Andrewes, 1985). En el caso del fitoplancton, actualmente más de 50 pigmentos

y sus productos de degradación pueden ser separados en un solo análisis (Wright *et al.*, 1991; Wright & Jeffrey, 1997).

### **2.2.1. Dinámica espacial y temporal de los pigmentos**

La variabilidad espacio-temporal del fitoplancton está determinada por un gran número de variables, entre las que se destacan las características geomorfométricas del área (conformación geográfica y tamaño), circulación y características químicas y físicas de las masas de aguas, ejemplo la luz y la temperatura (Wood, 1967). Debido a la acción de los vientos y las corrientes, existe una dinámica espacial en la columna de agua que dependerá de diferentes características locales ya sea hidrológicas como orográficas. En sistemas de surgencia o en costas con gran dinámica, existe un transporte de nutrientes desde zonas profundas hacia la zona eufótica que tiene consecuencias en la composición de la comunidad fitoplancton (Ahel *et al.*, 1996; Obayashi *et al.*, 2001; Vidussi *et al.*, 2001). Estos cambios y patrones en la composición del fitoplancton pueden ser detectados y evaluados mediante la determinación de los pigmentos fotosintéticos.

En general, sólo una fracción de la producción fototrófica de la columna de agua finalmente termina en la superficie de sedimento. La degradación más extensa de pigmentos ocurre durante su paso por la columna de agua y en el sedimento superficial sobre todo si la luz y el oxígeno están disponibles (Leavitt 1993; Cuddington & Leavitt, 1999). Debido a la alta tasa de degradación de los pigmentos en la columna de agua, la velocidad de hundimiento es de gran importancia en la fracción de pigmentos. Por ejemplo, las diferencias en la velocidad de hundimiento entre diferentes grupos de algas puede afectar la composición de pigmentos en la columna de agua y como consecuencia en el sedimento. Varios mecanismos pueden acelerar la sedimentación: la agregación y coagulación, que aumentan con la biomasa, pueden segregar diferentes velocidades de hundimiento dependiendo del tamaño de las partículas (Kjørboe *et al.*, 1994). Por otro lado, los pigmentos pueden ser modificados por acción del zooplancton herbívoro; Por degradación durante el paso por el tracto digestivo (Cuddington & Leavitt, 1999). Por otro lado el transporte de los pigmentos hacia el fondo se ve favorecido al ir formando parte de

los pellet fecales, los cuales además ayudan a la preservación de los pigmentos retardando la degradación bacteriana en la columna de agua (Leavitt, 1993).

La estacionalidad es otro factor que puede inducir cambios en la composición de los pigmentos en la columna de agua, así como las tasas de transporte y depositación final en el sedimento. La dinámica estacional del fitoplancton en regiones templadas, básicamente esta determinada por la condición de la mezcla o estratificación que presenta la columna de agua, la que puede determinar las variables de temperatura y salinidad. Raymont (1980) y Neshba (1987) detectaron una disminución de las poblaciones fitoplanctónicas en invierno debido a intensificación de la mezcla vertical y a los bajos valores de irradiancia y menor penetración de PAR en la columna de agua. Hacia el final del invierno aumentaría la estratificación debido al calentamiento superficial de las aguas, la que junto al aumento de la intensidad luminosa provocaría el florecimiento primaveral de las microalgas, el cual dependería de la concentración de los nutrientes. Verticalmente estas mismas condiciones hidrográficas afectarían la distribución del fitoplancton.

### **2.2.2. Técnicas para la determinación de pigmentos fotosintéticos**

La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) es una herramienta poderosa para investigar la composición pigmentaria del fitoplancton (Mackey *et al.*, 1996; Jeffrey *et al.*, 1997). Esta técnica es una de las más usadas en los últimos años debido a su sensibilidad, fácil aplicabilidad en determinaciones cuantitativas exactas, a su idoneidad para la separación de especies no volátiles o termolábiles y por su uso en la determinación de sustancias de interés en la industria e investigación (Skoog & Leary, 2001). Esta técnica permite una rápida determinación de carotenoides, clorofilas y sus derivados en ecosistemas acuáticos (Jeffrey *et al.*, 1999), y su utilización para estudiar sedimentos lleva más de 50 años (Fox, 1944; Fox *et al.*, 1944; Vallentyne, 1954, 1956). A menudo las concentraciones de carotenoides y clorofilas son cuantificadas por RP-HPLC (Fase Reversa), que se basa en el principio de separar los distintos pigmentos en base a su polaridad. La idea de emplear el RP-HPLC en estudios ambientales fue introducida por Mantoura & Llewellyn, (1983) ha sido desarrollada por muchos investigadores (Bidigare *et*

*al.*, 1985; Wright *et al.*, 1991; Wright & Jeffrey, 1997; Heukelem & Thomas, 2001; Brotas & Plante-Cuny, 2003; Ston & Kosakowska, 2000; Ston & Kosakowska, 2002).

## **2.3. El efecto de la radiación solar sobre los pigmentos fotosintéticos**

### **2.3.1. El espectro de radiación solar incidente**

Dentro del espectro de radiación solar de importancia biológica en procesos fotobiológicos podemos indentificar tres fracciones: la radiación ultravioleta (UV) correspondiente al 10 % de la radiación incidente, la radiación fotosintéticamente activa (PAR) que comprende longitudes de onda entre 400 y 700 nanómetros (nm) equivale al 40 % y la radiación infrarroja (entre 700-3000 nm) equivalente al 50%. La radiación UV podemos dividirla en: radiación UV-C (< 280 nm), la radiación UV-B, entre 280 - 315 nm, y la radiación UV-A, entre 315 - 400 nm (Holm-Hansen *et al.*, 1993).

La radiación UV-A es débilmente absorbida por el ozono estratosférico, alcanza la superficie terrestre y ocasiona en las plantas diferentes reacciones fotoquímicas (Caldwell 1978; Björn 1999). Mantiene relativamente constante su nivel, no siendo afectada mayormente por factores latitudinales, altitudinales o estacionales (Greenberg *et al.*, 1997), presentado efectos similares a la radiación UV-B pero en dosis unas 1000 veces superior, por lo que proporcionalmente resulta menos perjudicial. La radiación UV-B es absorbida parcialmente por el ozono estratosférico llegando muy atenuada a la superficie terrestre, variando según altitud, latitud, ángulo de incidencia del sol y reflectancia solar de la atmósfera que varía con la presencia de diferentes partículas que provocan su absorción (Farman *et al.*, 1985; Lissy & Sanhueza, 1996; Herman & McKenzie, 1998). Es llamada también Radiación Ultravioleta Biológica ya que es capaz de provocar daños letales en los organismos vegetales, siendo muy peligrosa para la vida en general. Representa sólo el 5% de la radiación UV y el 0.25% de toda la radiación solar, que llega a la superficie de la terrestre, sin embargo tiene alta energía por fotón. Finalmente la radiación UV-C, es altamente energética y extremadamente dañina para todos los seres vivos y en presencia de la cual no sería posible la vida en la Tierra, es totalmente

absorbida por el oxígeno molecular y parcialmente por el ozono atmosférico, de modo que en ningún caso alcanza la superficie terrestre (Madronich, 1992).

La Radiación Fotosintéticamente Activa (conocida por su sigla en inglés PAR) representa la proporción predominante de la radiación solar incidente en la superficie terrestre, y es fundamental para la fotosíntesis. En exceso, la fracción PAR puede afectar a las plantas, las cuales responden a través de diversos mecanismos de fotoprotección, por ejemplo, la fotoinhibición dinámica.

### **2.3.2. Penetración de la radiación solar en la columna de agua**

La radiación solar se atenúa en la columna de agua como resultado de cuatro factores: a) el agua; b) compuestos disueltos (e.g., gelbstoff); c) materia inerte y d) organismos fotosintéticos (material particulado). Por lo tanto, el agua constituye un filtro natural que absorbe la radiación solar en forma diferencial y el coeficiente de absorción aumenta en forma significativa con longitudes de onda mayores que 550 nm (Kirk, 1994). La atenuación de los diferentes componentes del espectro solar en la columna de agua se puede calcular globalmente utilizando el coeficiente de atenuación ( $K_d$ ):

$$K_d = (\ln(E_o) - \ln(E_z)) / z \text{ (m}^{-1}\text{)}$$

Donde  $E_o$  y  $E_z$  es la radiación en la superficie y a la profundidad ( $z$ ) respectivamente. La turbidez y las diferentes características hidrológicas (además de bióticas) determinan que los cuerpos de agua posean diferentes coeficientes de atenuación de la luz. Existen diferentes clasificaciones de los tipos de agua, pero una de las más utilizadas es la de Jerlov (Kirk, 1994). Para los organismos fotosintéticos, tiene muchas implicancias, pues al haber una atenuación de la cantidad de luz, también existe una atenuación en la calidad ya que las diferentes longitudes de onda del espectro PAR se atenúan de manera diferente.

En el caso de la radiación UV-B, por mucho tiempo se consideró que la radiación UV solo podía penetrar en los primeros centímetros de la columna de agua, sin embargo desde los primeros trabajos de Jerlov (1950) se comprobó que esta radiación puede

penetrar varios metros de profundidad. De hecho ahora se sabe que la radiación de UV-B puede alcanzar profundidades ecológicamente significativas (Smith & Baker, 1979; Karentz & Lutze, 1990; Smith *et al.*, 1992; Boelen *et al.*, 1999). La composición y características del material disuelto en el agua puede dar origen a diversos tipos de espectros de absorción que dependen del ambiente, en general las sustancias disueltas tienen un efecto más pronunciado para longitudes de onda cercanas al azul. En el caso del material inorgánico particulado hay que considerar también el efecto de dispersión de la radiación, puesto que este material particulado tiene poca absorción relativa a longitudes altas del espectro visible, pero su absorción crece en forma significativa en la región del ultravioleta. La absorción por parte de pigmentos fotosintéticos (clorofila, carotenoides y ficobiliproteínas) tienen especial influencia en la radiación visible.

### **2.3.3. Efecto de la radiación UV-B en los ecosistemas acuáticos**

Diversos estudios sugieren que la extensión del área que corresponde a la disminución de la capa ozono esta influenciando las condiciones más allá del continente Antártico y alcanza áreas pobladas del Hemisferio Sur (Orce & Helbling, 1997; Huovinen *et al.*, 2006). Por lo tanto, el aumento en el flujo de la radiación UV-B solar en la superficie terrestre (Kerr & McElroy, 1993) ha despertado la preocupación por sus efectos dañinos en la vida, no sólo en ecosistemas terrestres, sino también en los acuáticos, tanto marítimos como de agua dulce (Holm-Hansen *et al.*, 1993; Williamson, 1994; Häder *et al.*, 1995; Gómez & Figueroa, 1998; Villafañe *et al.*, 2003).

La radiación solar es la mayor fuente de energía para la productividad de los ecosistemas acuáticos (Wetzel, 1975), sin embargo, la cantidad y calidad de energía solar, así como los nutrientes y la temperatura, son determinantes de la estructura y procesos de esta (Vollenweider, 1968; Elser, 1990; Sterner *et al.*, 1997). Por lo tanto, los organismos acuáticos en su hábitat pueden ser afectados, directa o indirectamente por cambios en la radiación UV en el medio (Zepp, 1982; Palenik *et al.*, 1991; Arfsten *et al.*, 1996; Scully *et al.*, 1997). Sin embargo, los movimientos activos o pasivos de organismos dentro de la columna de agua causan una fluctuación de su exposición a la radiación UV. Debido a esto en la última década se ha reconocido que existe un potencial riesgo de daños por

niveles altos de radiación solar, evidenciándose que la radiación biológicamente deletérea, es decir, radiación de longitud de onda corta (UV-B, 280-320 nm), ha incrementado debido al adelgazamiento de la capa ozono estratosférico (Cabrera *et al.*, 1995; Madronich, 1992; Kerr & McElroy, 1993). A pesar de que potenciales efectos de la exposición a la radiación UV-B pueden ser muy perjudiciales para la biología de los organismos, el efecto neto de la radiación UV en estos puede ser mitigado por diferentes mecanismos protectores y de reparación (Karentz *et al.*, 1991a; Mitchell & Karentz, 1993; Vincent & Roy, 1993).

Aunque los estudios realizados en organismos acuáticos son menos que los efectuados en vegetales terrestres, se ha detectado que los aumentos en la UV-B incidente tienen varios efectos sobre los organismos marinos: En el caso del fitoplancton se ha determinado que elevadas dosis de UV afectan la reproducción (Häder *et al.*, 1995) y el crecimiento (Holm-Hansen *et al.*, 1993; Häder *et al.*, 1995; Klisch & Häder, 2000), observándose cambios en el aparato fotosintético y en la concentración de pigmentos involucrados en la recepción de luz, producción fotosintética (Helbling *et al.*, 1992) y metabolismo de nitrógeno y carbono (Döhler & Alt, 1989; Sinha *et al.*, 1995). En caso de severo estrés por efecto de radiación UV-B, puede llegar a producir daño de ADN, ARN y muerte celular (Klisch & Häder, 2000; Häder, 2001). En cianobacterias se ha observado una disminución en el crecimiento, desarrollo y respuestas fisiológicas (Sinha & Häder, 1997). En macroalgas la variación diaria de la radiación solar, es uno de los factores determinantes en la variabilidad de las respuestas fotosintéticas y procesos relacionados (Falkowski & Raven, 1997; Figueroa *et al.*, 1997; Bischof *et al.*, 1998; Gómez *et al.*, 1998). Al ser organismos sésiles no poseen las mismas estrategias que el fitoplancton para adaptarse a los cambios de luz. Debido a esto es usual que el exceso de luz repercuta en el aparato fotosintético y en los diferentes procesos que involucran los mecanismos de defensa a los excesos de energía lumínica. Es por ello que gran parte de las macroalgas bentónicas exhiben mecanismos fotoprotectores tales como la fotoinhibición dinámica. A escalas mayores tales efectos pueden configurar cambios en la estructura de las comunidades de macroalgas en los sistemas acuáticos (Bischof *et al.*, 1998; Wiencke *et al.*, 2000).

### **2.3.3. Efecto de la radiación UV sobre los pigmentos fotosintéticos**

Aunque la radiación UV-B esta restringida a los primeros metros de la columna de agua, su acción sobre los organismos tiene consecuencias muy importantes en términos de la concentración y de composición de pigmentos. En consecuencia, tales efectos se reflejaran en el perfil pigmentario a través de toda la columna de agua y en los sedimentos. En general, por efecto de la radiación UV-B, se observa una disminución del contenido de clorofilas y carotenoides en plantas (Ormrod & Hale, 1995). La alta irradiación de UV-B combinada con un bajo nivel de PAR provoca reducción significativa en los contenidos de clorofila, posiblemente, debido a la foto-oxidación de la clorofila por acción de la radiación UV-B o a la inhibición de su biosíntesis. Además, se ha reportado aumento en la relación clorofila *a/b*, debido a que la radiación UV-B afecta mayormente a la clorofila *b* (Kulandaivelu *et al.*, 1996).

En el caso de los carotenoides, se han reportaron incrementos en su contenido de algunas especies vegetales por efecto del aumento de radiación UV-B, donde actúan como filtro natural UV-B evitando el fotoblanqueamiento de la clorofila, y como antioxidante inactivando posibles radicales libres generados por acción del UV-B (Greenberg *et al.*, 1997; Gotz *et al.*, 1999). Los carotenoides, con respecto a las clorofilas, son menos afectados por la radiación UV-B, lo que se explicaría por su rol fotoprotector en el aparato fotosintético (Kulandaivelu *et al.*, 1996).

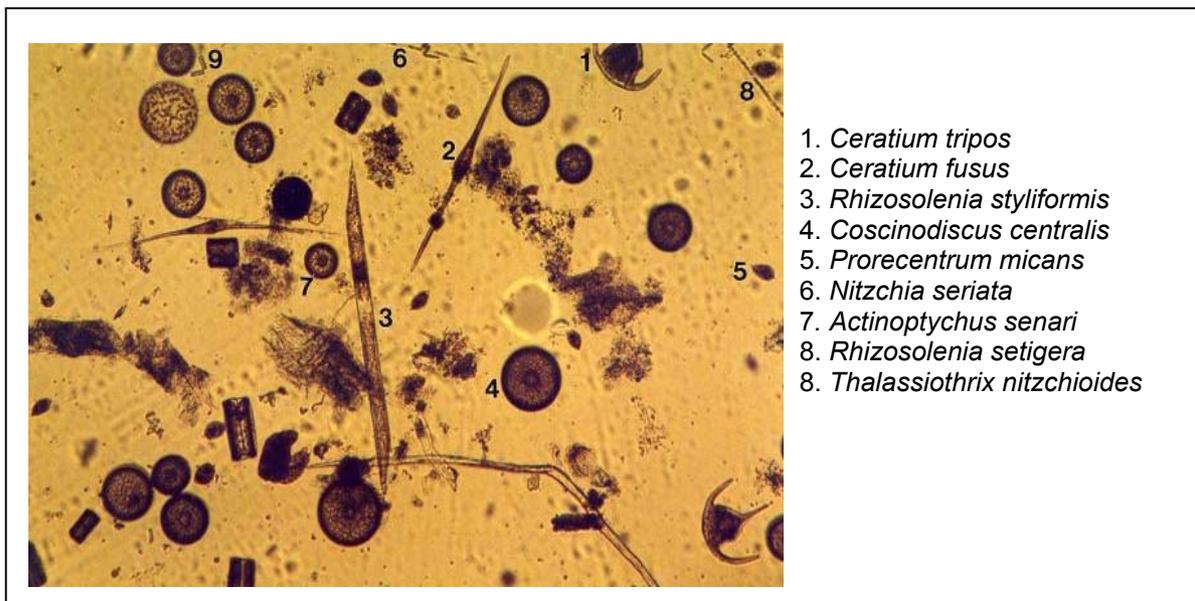
## **2.4. Comunidades de algas**

### **2.4.1. Fitoplancton**

El fitoplancton se encuentra constituido por un conjunto de organismos microscópicos, unicelulares en su mayoría y fotosintéticos, caracterizados por su baja capacidad de movimiento, aunque algunas poseen cierto poder de locomoción, desplazándose mediante flagelos y otros mecanismos. En general, estos organismos son transportadas en forma pasiva por el movimiento de las masas de agua (Alvial & Avaria, 1981, 1982; Muñoz & Alvial, 1986a) siendo distribuidos ampliamente en aguas oceánicas,

costeras, estuarinas y lacustres. Estas microalgas se concentran, principalmente en la parte superior de la columna de agua (zona fótica), donde se favorecen los procesos de fotosíntesis y se constituye en la puerta de entrada de la energía solar a los ecosistemas marinos (Margalef, 1958). Debido a los procesos adaptativos convergentes al medio físico altamente estable y heterogéneo en el que habitan estas microalgas, son consideradas como las principales productores primarios en estos ecosistemas, por cuanto a través de éstas se genera materia orgánica y energía, la que queda disponible para los distintos niveles tróficos. Estas poblaciones fitoplanctónicas sufren fluctuaciones cualitativas y cuantitativas a lo largo del año, evidentes en diferentes escalas espacio-temporales: asociadas a cambios en los factores ambientales, estacionales, entre otros (Currie, 1990).

El fitoplancton del área de Coihúin muestran las características de las comunidades de los fiordos nord-patagónicos, con predominancia de diatomeas por sobre dinoflagelados (**Fig. 4**).



**Figura 4.** Muestra de fitoplancton de la zona cercana a Puerto Montt, indicando los principales grupos taxonómicos dominantes.

### 2.4.2. Macroalgas

***Ulva sp.***: conocida como “lechuga de mar”, pertenece a la división Chlorophyta. Presenta talo verde laminar, foliáceo, lobulado, formado por dos capas de células, se encuentra fijado al sustrato por rizoides que crecen como expansiones de las células basales del talo (Hoffmann & Santelices, 1997). Puede llegar a medir 1 m de longitud, de contorno más o menos redondeado, a veces dividido. Es una especie dioica cuyos talos productores de gametos masculinos se distinguen de los productores de gametos femeninos por la tonalidad de los márgenes de la lámina: verde amarillento en los primeros y verde oscuro en los segundos. Habitan en el intermareal, en charcas, rocas o sublitoral hasta 20 m (**Fig. 5A**). Al tolerar salinidades bajas puede encontrarse en estuarios, y también frecuentemente en zonas donde existen aportes nitrogenados. En el país, se ha encontrado entre Tierra del Fuego (Región de ) y Antogasta (Región de Antofagasta), también en el Archipiélago Juan Fernández y las Islas Desventuradas. Es un género cosmopolita.



**Figura 5.** Ejemplares de macroalgas utilizados en el estudio, A) *Ulva sp.*  
B) *Gracilaria chilensis*.

***Gracilaria chilensis***: es una especie endémica de Chile, conocida con el nombre “Pelillo”, perteneciente a la división Rhodophyta (Hoffmann & Santelices, 1997). Es un alga de talos cilíndricos filamentosos, de color pardo rojizo y a veces amarillento, midiendo entre

1 y 2 mm y hasta 2 m de largo, formado por uno o varios ejes alargados, ramificados en forma alternada hasta 1,5 m de largo (**Fig. 5B**). Crece en ambientes protegidos, tanto en la zona intermareal como submareal. En poblaciones naturales del intermareal crecen adheridas, a bolones o rocas asociadas a playas de arena. En el submareal las adheridas a piedras, enterrados en la arena en fondos blandos de estuarios, bahías protegidas y fiordos (Santelices, 1981). Su distribución batimétrica va desde la superficie hasta los 10 m de profundidad, con mayor frecuencia enterrados en la arena. En el país esta especie se distribuye entre Bahía Inglesa, (Región de Atacama), hasta Coyhaique (Región de Aysén).

## **2.5. La situación en los ambientes costeros del Sur de Chile**

Diversos estudios llevados a cabo en el último tiempo (Gómez *et al.*, 2004, 2005; Huovinen *et al.*, 2006, etc.) demuestran que los organismos bentónicos del Sur de Chile son expuestos a condiciones de estrés fisiológico como resultado de la exposición a la radiación solar UV. Esta problemática asociada a sistemas pelágicos de nuestra costa no ha sido estudiado en detalle ni tampoco existe mucha información acerca de la dinámica de los pigmentos y su tasa de deposición en los sedimentos. Tomando en cuenta que en la Bahía de Puerto Montt (Coihuí) se encuentra la plataforma fondos blandos más grande del país, muchas de las interacciones entre la columna de agua y los sedimentos son fundamentales en la ecología de los organismos que allí habitan.

En el presente estudio por lo tanto se realiza una aproximación experimental para detectar cambios en la composición pigmentaria a lo largo de la columna de agua así como en los sedimentos. Se estudió la variabilidad espacial y temporal en orden a reconocer algunos factores ambientales involucrados en sus fluctuaciones. El otro aspecto principal fue determinar si un factor importante como es la radiación UV-B afecta las fuentes de pigmentos en el sistema: Como organismos modelos se utilizó dos especies de macroalgas marinas comunes a esta zona: *Gracilaria chilensis* y *Ulva* sp. Con esta información será posible generar una visión preliminar de la dinámica de los pigmentos en los sistemas de fondos blandos del Sur de Chile y conocer el impacto de la radiación UV sobre los componentes principales que determinan la productividad primaria en esta zona.

## 2.6. Hipótesis

H1: La composición y concentración de pigmentos fotosintéticos en el agua variará en relación con la profundidad y con la estacionalidad.

H2: La radiación ultravioleta (UV) provoca cambios en la composición y cantidad de pigmentos fotosintéticos de macroalgas en relación con la dosis de exposición.

## 2.7. Objetivos generales

a) Conocer la composición espacial y temporal de los pigmentos fotosintéticos en la columna de agua y en una plataforma submareal de la zona de Puerto Montt (Coihuín).

b) Evaluar el efecto de la radiación UV sobre la composición y concentración pigmentaria de algunas macroalgas.

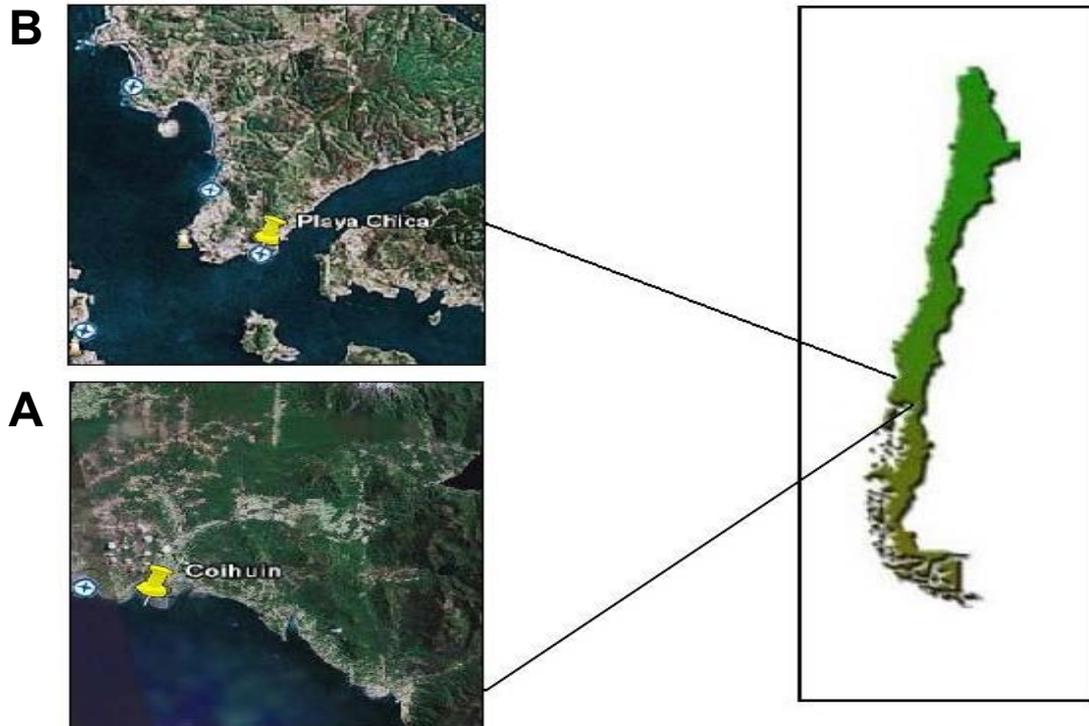
## 2.8. Objetivos específicos

- ❖ Determinar y caracterizar la composición de pigmentos a través de un gradiente de profundidad en la columna de agua a través de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y espectrofotometría.
- ❖ Determinar la composición de pigmentos en algunas algas bentónicas que podrían ser fuente de pigmentos en la columna de agua.
- ❖ Determinar efecto de la radiación UV sobre la composición de los pigmentos fotosintéticos en dos especies de macroalgas.

- ❖ Determinar la concentración de pigmentos fotosintéticos (Clorofilas *a* y *b*, carotenoides, y ficobiliproteínas) en fitoplancton y algunas macroalgas usando métodos espectrofotométricos.

### 3.- MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. Área de estudio y recolección de muestras:



**figura 6.** Ubicación geográfica de los sitios de recolección de fitoplancton y macroalgas. A) Coihuin (Puerto Montt), B) Playa Chica (Valdivia). Extraída de Google.

El lugar de estudio para la toma de muestras de fitoplancton es una extensa área de (22.78 km<sup>2</sup>) en la planicie submareal de Coihuin a 15 km al este de Puerto Montt (41° 31' S; 72° 53' W) (**Fig. 6**). Esta es una zona profunda de depositación de partículas ubicado a 100-270 m de la superficie, siendo un ambiente costero fangoso.

Las condiciones oceanográficas presentes en la zona de Coihuin se determinaron midiendo las variables físico-químicas de la columna de agua, realizando perfiles de radiación solar, Chl *a*, temperatura y salinidad. Estas determinaciones físico-químicas fueron llevadas a cabo el 10 de Enero de 2007, usando un CTD Seacat 19 plus (Seabird Electronics Inc., USA) dotado con fluorómetro. Las condiciones lumínicas fueron

monitoreadas con un espectroradiómetro acuático RAMSES-ACC-UV/Vis (Trios GMBH, Alemania).

La toma de las muestras en la columna de agua se llevó a cabo a diferentes gradientes de profundidad. El agua fue muestreada con una botella tipo Niskin de 5 L (vertical) (Hydro-Bios GmbH). Los volúmenes filtrados para estas muestras variaron entre 1 a 1,5 litros. En el caso de muestras de trampas, estas fueron tomadas a 70 m de profundidad, los volúmenes filtrados variaron entre 250 y 300 ml respectivamente. La toma de las muestras se realizó de forma estacional tanto para las de botella como las de trampas. Una vez finalizado los muestreos, el material fue mantenido en frío (-70 °C) para posterior análisis espectrofotométrico y de HPLC fase reversa (ver adelante). Los muestreos y mediciones fisicoquímicas del agua fueron realizados en la Motonave “Melipulli”, dependiente de la Universidad de Los Lagos.

En paralelo se tomaron muestras de macroalgas bentónicas comunes a la zona de estudio (*Ulva sp.*, *Gracilaria chilensis*) para la posterior caracterización de los pigmentos fotosintéticos presentes en ellas. En este caso las macroalgas fueron recolectadas en la Playa Chica de Niebla, Valdivia (39° 51' S; 73° 23' W) en los meses de agosto y octubre (**Fig. 6**). Las muestras fueron mantenidas en frío (-70°C) para posterior análisis espectrofotométrico y de HPLC fase reversa (ver adelante).

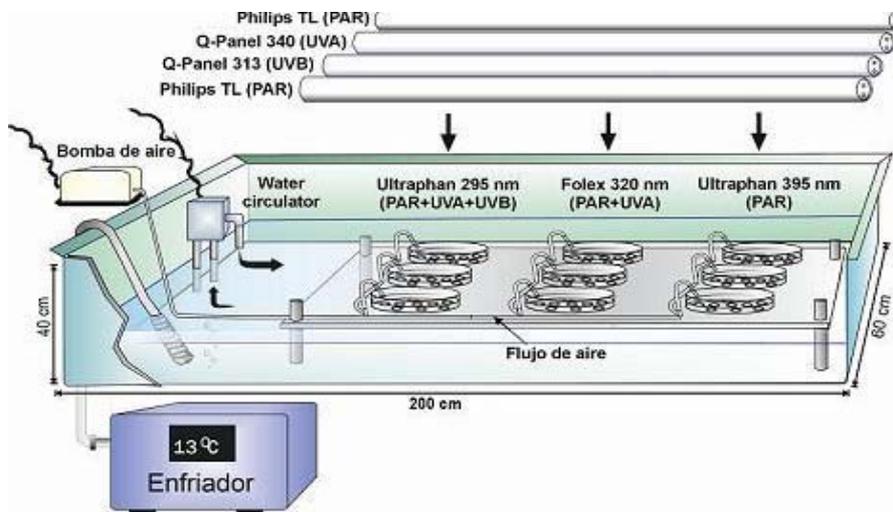
### **3.2. Diseño experimental de exposición a radiación UV**

El desarrollo de los experimentos se realizó en el Instituto de Biología Marina de la Universidad Austral de Chile, donde se procedió a la extracción de pigmentos fotosintéticos obtenidos de las muestras mediante espectrofotometría (ver más adelante). El material preparado con los pigmentos fue trabajado posteriormente para análisis cualitativos y cuantitativos mediante la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) de fase reversa que se llevó a cabo en el Instituto de Química (ver más adelante)

Las macroalgas *Ulva sp.* y *Gracilaria chilensis* fueron transportadas a la sala de acuarios del Instituto de Biología Marina y, mantenidas en estanques cilíndricos de 20 L con agua de mar, a una temperatura entre 13 y 15° C, salinidad de 30 PSU y aireación

constante. Bajo estas condiciones las algas fueron aclimatadas durante un período de 24h antes de realizar las respectivas mediciones fisiológicas.

Las exposiciones a radiación UV se realizaron bajo tres diferentes tratamientos de radiación: a) PAR + UV-A + UV-B (PAB), b) PAR + UV-A (PA) y c) PAR (P), utilizando un set de 2 lámparas (Osram L36w/640) de radiación PAR (Photo-synthetically Active Radiation), una lámpara Q-Panel 313 (USA) que emite radiación centrada en UV-B y una lámpara Q-Panel 340 (USA) que emite radiación centrada en UV-A. Para obtener los diferentes tratamientos se utilizaron filtros que cortan la radiación a diferentes longitudes de onda: Ultraphan 400 que corta la radiación bajo de los 400 nm, excluyendo la radiación UV-B y UV-A, Ultraphan 295 que corta solo UV-C y Folex 320, que corta la radiación bajo los 280 nm (**Fig. 7**).



**Figura. 7.** Esquema del sistema de incubación termostático, donde se indica la disposición de los tratamientos (lámparas y filtros) utilizados para la exposición de los discos con las macroalgas.

Para realizar la incubación de las macroalgas se contó con un baño termostático donde se depositaron las algas en recipientes de plástico transparente con 2L de agua de mar filtrada y aireación constante. Cada recipiente fue cubierto con los distintos tipos de filtros mencionados anteriormente (**Fig. 7**). Estos recipientes fueron incubados a una distancia de 15 cm de las lámparas artificiales a diferentes tiempos (inicial, 6h, 24h, 2 días

y 6 días), con la finalidad de lograr dosis crecientes de exposición. Al final de cada período de exposición se determinó la fluorescencia de clorofila y la tasa de transporte de electrones (ETR). Paralelamente se tomaron muestras a cada tiempo de exposición para la determinación de pigmentos fotosintéticos vía espectrofotómetro y HPLC (ver más adelante).

### **3.3. Análisis químico**

#### **3.3.1. Extracción y partición de pigmentos fotosintéticos**

Los pigmentos fotosintéticos son característicos de los diferentes grupos de algas, por lo tanto, su extracción es distinta. Puesto que presentan sus propias características, no se pueden usar los mismos solventes para extraer los pigmentos presentes en las muestras.

Dentro de las consideraciones metodológicas generales se debe mencionar que clorofilas, carotenoides y biliproteínas son compuestos inestables, por lo que deben ser manejados cuidadosamente, para no alterar sus propiedades químicas. Son isomerizados y oxidados por la luz y el aire, lo cual cambia su composición química y color. La alteración fotoquímica se acelera cuando los pigmentos son adsorbidos en superficies cromatográficas. La presencia de pequeñas cantidades de ácido removerá el magnesio de la clorofila produciendo feofitinas y causará izomerizaciones cis/trans en carotenoides. Los álcalis fuertes pueden romper el grupo fitol de las clorofilas causando alteraciones químicas en algunos carotenoides.

##### **3.3.1.1. Clorofilas y carotenoides**

Las clorofilas y los carotenoides generalmente son moléculas liposolubles y pueden ser extraídas a través de la membrana del tilacoide con solventes orgánicos tales como: acetona, metanol, o DMSO.

**Macroalgas:** Se pesaron 30 mg de muestra para *Ulva* y 60 mg para *Gracilaria*. Para molerlas se utilizó un mortero con arena. Luego la muestra fue introducida en un tubo de

ensayo donde se le agregaron 10 ml de acetona al 90%, para la extracción de los pigmentos. Después de agitar esta mezcla, se dejó reposar los extractos, almacenados herméticamente y mantenidos por 24-48 horas en la oscuridad dentro de un refrigerador a 4 °C.

**Fitoplancton:** Los filtros de microfibra de borosilicato (diámetro de 47 mm, ADVANTEC MFS) que contenían las muestras fueron introducidos en los tubos de ensayos donde se procedió a agregarles 10 ml de acetona al 90%, para la extracción de los pigmentos. Fueron agitados y mantenidos por 24-48 horas en oscuridad dentro de un refrigerador a 4 °C.

#### 3.3.1.2. Productos de degradación de la clorofila:

Los productos de degradación de la clorofila pueden formar una fracción importante del contenido total de pigmentos del fitoplancton que existe en una muestra de agua de mar. Estos productos son el resultado de los procesos de a) digestión del zooplancton que convierten la clorofila en feopigmentos siendo estos: feofitina formada por retiro del átomo de magnesio de una o otra clorofila y feoforbidos que carecen tanto de magnesio como de la cadena de fitol de la molécula de clorofila (Carpenter & Bergquist, 1985) y b) procesos de descomposición originados por las enzimas hidrolíticas del fitoplancton que pueden convertir la clorofila en clorofilida. El coeficiente de absorción de este último pigmento al ser el mismo que el de la clorofila, no puede ser estimado por espectrofotometría. Sin embargo, pueden determinarse los feopigmentos al presentar un espectro de absorción más bajo que la clorofila en la región de los 665nm. Para esto, se mide la extinción a 665 y 750 nm antes y después de la transformación de toda la clorofila de la muestra en feopigmentos.

#### 3.3.1.3. Ficobilinas

Las ficobiliproteínas (PBP) presentes en las algas rojas se extraen de forma íntegra debido al enlace covalente que se establece entre los cromóforos y la fracción apoproteica

del pigmento. Al ser pigmentos solubles en agua, las ficobilinas no son bien extraídas por los solventes orgánicos. Por lo tanto, para su extracción se utilizó Buffer Fosfato de acuerdo al método de Beer & Eschel (1985).

Para la extracción se utilizaron 50 mg peso fresco de la muestra de *Gracilaria*. Colocándose en un mortero con ayuda de arena y N<sub>2</sub> líquido se procede a molerlas. Se introduce al tubo de ensayo donde se le agrega 10 ml de buffer fosfato 0.1M a pH 6.5 mantenidos durante 24-48 horas, en condiciones de oscuridad en un refrigerador a 4 °C (Moon & Dawes, 1976), para extraer los pigmentos.

### **3.3.2. Cuantificación de los pigmentos fotosintéticos por espectrofotometría**

La cuantificación espectrofotométrica de los distintos tipos de pigmentos se basa en la lectura, mediante un espectrofotómetro (**Fig. 8**), de la densidad óptica a las longitudes de onda en las que la absorbancia de luz es máxima para un determinado pigmento. Con el espectrofotómetro se mide la extinción de la luz al atravesar una cubeta en la que se ha



**Figura 8.** Espectrofotómetro SCINCO UV/Visible utilizado para la medición de las absorbancias de pigmentos totales (clorofilas, carotenoides y ficobiliproteínas) presentes en macroalgas y fitoplancton analizadas. Este equipo emplea dos fuentes diferentes de energía para cubrir el intervalo especificado de longitudes de onda. Una lámpara de arco Deuterio suministra la radiación ultravioleta y una de Tungsteno la radiación visible.

colocado un extracto de pigmentos celulares, es decir la intensidad de luz que absorben estos pigmentos a una determinada longitud de onda ( $\lambda$ ), que está directamente relacionada con la concentración de estos pigmentos en el extracto (Ley de Lambert-Bee).

En el extracto se encuentra una mezcla de los pigmentos contenidos en la célula, y por lo tanto las absorbancias de éstos se suman. Mediante una serie de coeficientes se transforman estas densidades ópticas en concentraciones pigmentarias de los diferentes pigmentos (clorofilas y carotenoides principalmente).

#### 3.4.3.1. Clorofila y Feopigmentos:

Macroalgas y Fitoplancton:

1.- Las muestras en los tubos de centrifuga, se introducen en la centrifuga, donde se realiza la separación del extracto / precipitado centrifugando a 3000 rpm durante 10 min.

2.- Posteriormente se llena una cubeta de espectrofotometría con el extracto acetónico. A continuación, se leen las absorbancias 665 y 750 nm (el valor debe ser inferior a 0.015, en caso de que fuera mayor indicaría que hay demasiada materia en suspensión). Después se lava la cubeta con acetona al 90% y se llena de acetona para realizar una lectura para corregir la absorbancia debida al disolvente en cada una de las longitudes de onda (Blanco). Se añaden 2 gotas de ácido clorhídrico (HCL) a la cubeta y se agita bien para degradar los pigmentos, también se les mide la extinción a 665 y 750 nm.

La muestra fue acidificada (pH 2.5) añadiendo 2 gotas de ácido a la cubeta, se agitó y se midió la extinción a 665 y 750 nm. La turbidez de la muestra se corrigió restándole el valor de 750 nm a la extinción obtenida a 665 nm (antes y después). De esta forma se elimina el efecto de la dispersión de la luz por las partículas en suspensión. Para calcular la concentración de clorofila *a* y feopigmentos se utilizaron las ecuaciones de Lorenzen (1967). Los resultados se obtienen en mg/m<sup>3</sup>:

$$\text{Clorofila } a \text{ (mg/ m}^3\text{)} = \frac{[ 26,7 \times (A_{665o} - A_{665a})] \times v \text{ (mL)}}{V \times l}$$

$$\text{Feopigmentos (mg/ m}^3\text{)} = \frac{[26,7 \times (1.7 A_{665a} - A_{665o})] / v \text{ (mL)}}{V \times l}$$

Siendo A la absorbancia leída a la longitud de onda señalada.

donde:         $A_{665a}$  = extinción a 665 nm después de acidificar  
                   $A_{665o}$  = extinción a 665 nm antes de acidificar  
                  V     = volumen de agua filtrado (L)  
                  l     = longitud de la cubeta (cm)  
                  v     = volumen del extracto acetónico en mL

### 3.3.2.2. Clorofila a, b, c y carotenoides:

Fitoplancton y Macroalgas:

1.- Las muestras en los tubos de centrifuga, se introducen en la centrifuga, donde se realiza la separación del extracto/precipitado centrifugando a 3000 rpm durante 10 min.

2.- Seguidamente se llena una cubeta de espectrofotometría con el extracto acetónico. A continuación, se leen las absorbancias 630, 645, 647 y 664 nm para las clorofilas y 480 y 510 nm para los carotenoides.

Para la calcular la concentración de las clorofilas y carotenoides extraídos con acetona al 90 %. Se Utilizó las ecuaciones indicadas en Strickland & Parson (1972)

$$\text{Clorofila } a \text{ (mg/L)} = 11,85 (A_{664}) - 1,54 (A_{647}) - 0,08 (A_{630})$$

$$\text{Clorofila } b \text{ (mg/L)} = 20,03 (A_{647}) - 5,43 (A_{664}) - 2,66 (A_{630})$$

$$\text{Clorofila } c \text{ (mg/L)} = 24,52 (A_{630}) - 1,67 (A_{664}) - 7,60 (A_{647})$$

$$\text{Carotenoides} = 7,6 (A_{480} - 1,49 A_{510})$$

Siendo A la absorbancia leída a la longitud de onda señalada.

Las concentraciones de clorofila y carotenoides fueron transformadas a mg/m<sup>3</sup> a partir de la siguiente fórmula:

$$\text{mg clorofila /m}^3 = \frac{C \times v}{V \times 10}$$

Donde: C= es sustituido por las clorofilas Ca, Cb y Cc  
 v= volumen del extracto acetónico en mL.  
 V = volumen en litros  
 10 = longitud de la cubeta

### 3.3.2.3. Ficobilinas

1.- Las muestras en los tubos de centrifuga, se introducen en la centrifuga, donde se realiza la separación del extracto/precipitado centrifugando a 4500 rpm durante 30 min.

2.- Seguidamente se llena una cubeta de espectrofotometría y se lava con buffer fosfato 0,1 N a pH 6,5, para realizar una lectura para corregir la absorbancia debida al disolvente en cada una de las longitudes de onda (Blanco). A continuación, se leen las absorbancias 455, 564 y 592 nm respectivamente.

A partir de la fracción supernadante, se determina la concentración de PBP espectrofotométricamente por medio de las ecuaciones cromáticas dadas por Beer & Eshel (1985) para las PBP (R-Ficoeritrina, R-PE, y R-Ficocianina, R-PC):

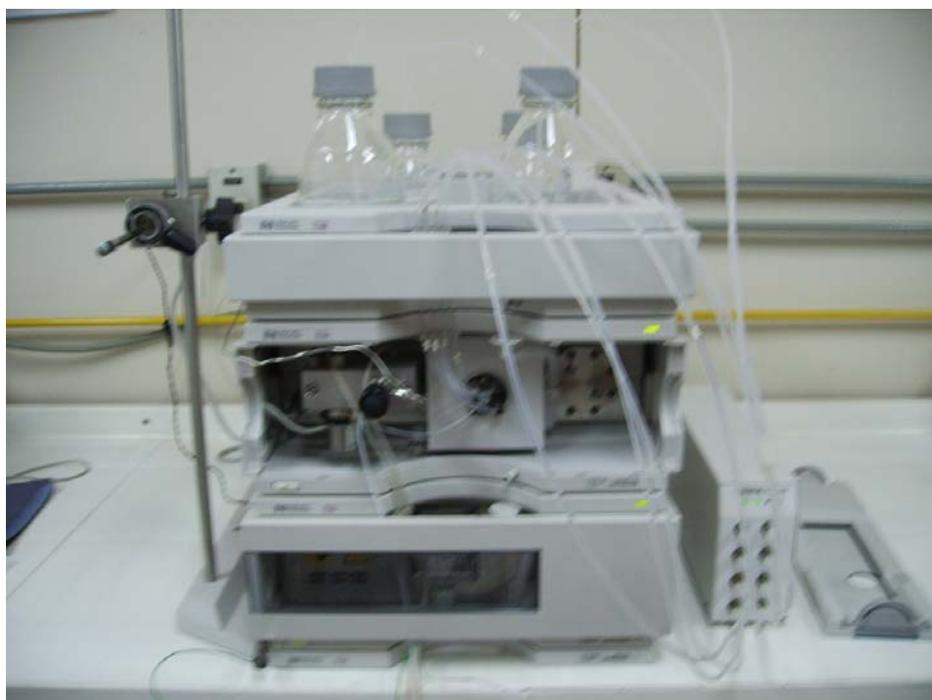
$$\text{R-PE (mg /g}^{-1} \text{ PS)} = \frac{[(A_{564} - A_{592}) - (A_{455} - A_{592})0.2] \times 0.12 \times V \text{ (mL)}}{\text{peso seco (g)}}$$

$$\text{R-PC (mg/ g}^{-1}\text{ PS)} = \frac{[(A_{618}-A_{645})-(A_{592}-A_{645})0.51] \times 0.15 \times V \text{ (mL)}}{\text{peso seco (g)}}$$

Siendo A la absorbancia leída a la longitud de onda señalada.

### 3.3.3. Determinación de pigmentos fotosintéticos por HPLC de fase reversa

La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) permite realizar muy buenas separaciones e identificaciones de componentes o mezclas de componentes en un tiempo relativamente corto, tanto cualitativa como cuantitativamente (**Fig. 9**). Su funcionamiento se basa en una columna cromatográfica, empacada con una fase estacionaria, que permite separar los componentes de una mezcla, la cual es disuelta en una fase móvil o



**Figura 9.** Equipo cromatográfico HPLC Hewlett Packard serie 1100 Agilent de fase reversa, utilizando columna Alltech ODS-2 C<sub>18</sub> (250 x 4.60 mm; tamaño de partícula 5μ).

eluyente, siendo pasada a través de la columna. Generalmente los equipos HPLC presentan un sistema de detección continuo que localiza los analitos presentes en el eluyente midiendo sus propiedades físicas o químicas. El detector de la respuesta a través de un gráfico en función del tiempo, o volumen del eluyente, mostrando una serie de picos llamados cromatograma (Puentes *et. al*, 2004).

En el caso de la cromatografía en fase reversa se caracteriza por presentar una columna cromatográfica con una fase estacionaria no polar (con frecuencia se trata de un hidrocarburo como octilo  $C_8$  y octadecilo  $C_{18}$ ), en conjunto con una fase móvil polar (agua, metanol, acetonitrilo) bombeada a alta presión a través de una columna de acero inoxidable empacada con sílica. Con este método los componentes más polares aparecen primero, y un aumento de la polaridad de la fase móvil provoca un aumento de la elusión, acortando el tiempo de retención (Skoog & Leary, 2001). La interacción de los componentes de la muestra se produce según la polaridad; el componente más polar o que se une débilmente a la fase estacionaria eluye primero con la fase móvil polar (tiempo de retención corto) y, por ende, el componente menos polar o que es retenido fuertemente por la interacción con la fase estacionaria apolar eluye al final (largo tiempo de retención). La retención y la selectividad pueden ser alteradas por cambio de la polaridad de la fase estacionaria o, (más fácilmente) por causa del eluyente. Los métodos de HPLC son particularmente sensibles a pequeños cambios en las condiciones ambientales, incluida la temperatura. En fase reversa, la temperatura influye sobre cuatro magnitudes importantes: solubilidad y tiempo de retención de la muestra, viscosidad de la fase móvil y eficacia de la columna. Es conveniente controlar la temperatura debido a que en algunas columnas la eficiencia puede variar con cambios muy pequeños de temperatura ambiente, del orden de 2-4° C (Yost *et al.*, 1980).

La elusión de los componentes de una muestra puede realizarse de dos maneras: isocráticamente, es decir; una separación que utiliza un solo disolvente, o una mezcla de solventes, pero con una composición constante, o bien, usando una elusión por gradiente de solventes que utiliza dos o más disolventes con polaridad significativamente distinta, variando sus preparaciones en forma programada durante el tiempo de elusión (Skoog & Leary, 2001).

Las ventajas que presenta la cromatografía en fase reversa son variadas:

- ❖ Puede separar muestras de un amplio rango de polaridades.
- ❖ Permite la elección dentro de una amplia variedad de fases estacionarias.
- ❖ Usa fases móviles relativamente económicas.
- ❖ Hay un rápido equilibrio entre la fase móvil y la fase estacionaria.
- ❖ Provee una separación rápida, simple y reproducible (Puentes, 2004):

Las limitaciones que presenta son:

- ❖ Muchas fases unidas a la sílica son estables sólo entre pH 3 y 8.
- ❖ La presencia de grupos silanoles no reactivos en la superficie de la sílica pueden producir colas en los picos, incrementar los tiempos de retención y causar irreproducibilidad en análisis entre columnas.
- ❖ Los mecanismos de retención de fase reversa aún no han sido completamente entendidos (Puentes, 2004).

Basándose en lo anterior, la separación y determinación de los pigmentos fotosintéticos presentes en los extractos de las muestras de macroalgas y columna de agua a analizar, fueron determinadas cualitativa y cuantitativamente mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) en fase reversa (Skoog & Leary, 2001). Para lo cual se utilizó un equipo cromatográfico Hewlett-Packard modelo 1100 Agilent de fase reversa (**Fig. 9**) en una columna Alltech ODS-2 C<sub>18</sub> (250 x 4.60 mm, tamaño de partícula 5 µm).

### 3.3.3.1. Reactivos empleados en análisis de pigmentos fotosintéticos:

#### ○ Para extracción y partición de pigmentos:

Solventes calidad P.A de la firma Merck: Acetona al 90 % y Buffer Fosfato 0,1 N a pH 6,5.

#### ○ Para análisis de pigmentos por HPLC:

Acetonitrilo (Merck), Agua \*, Metanol grado HPLC, Buffer Tris HCL 0,1 M pH 8,0 y Acetato de etilo grado HPLC.

o Estándares:

$\beta$ -caroteno (SIGMA), Clorofila *a* (SIGMA) y Clorofila *b* (SIGMA).

\*El agua usada en HPLC fue agua bidestilada y desionizada, no grado HPLC, la cual fue filtrada al vacío mediante empleo de un Kitasato con filtro mezcla celulosa/éster, con tamaño de poro de 0,2  $\mu\text{m}$  y diámetro 47 mm (Advantec MFS).

3.3.3.2. Determinación de clorofilas y carotenos:

Para la determinación de estos pigmentos fotosintéticos, se introduce un volumen de 50  $\mu\text{l}$  de muestra en el inyector, previamente filtrado con un filtro de nylon (con tamaño de poro de 0,2  $\mu\text{m}$  y diámetro de 25 nm, ADVANTEC MFS) para eliminar las impurezas soluble en el extracto que pudieran dañar la columna, inyectándose a un flujo de 2.0  $\text{mL}/\text{min}^{-1}$ , controladas por una bomba peristáltica cuaternaria, a temperatura ambiente y con una longitud de onda de detección a lo 450 nm utilizando un detector UV-visible. La longitud de onda se eligió de acuerdo a los espectros de absorción de las muestras y estándar medidas en un espectrofotómetro de barrido UV/Visible (SCINCO) y a la comparación de las alturas, separaciones y resoluciones de los peaks que permitieran una buena identificación y cuantificación del  $\beta$ -caroteno y las clorofilas presente en la fase etérea de la muestra en estudio. Una separación eficiente de los componentes, se logró acortando el tiempo de separación, mediante el uso de una gradiente modificada de solventes: Solvente A: acetonitrilo-metanol-buffer Tris HCL 0,1 M pH 8,0 (78:18:4) y solvente B: metanol-acetato de etilo (40:60) y una corrida isocrática de esta última mezcla de solventes.

La mezcla de solvente A y solvente B fueron corrida a través de una gradiente lineal hasta llegar al 100% de metanol-acetato de etilo en un tiempo de 3 minutos, seguido por 5 minutos de una corrida isocrática con metanol-acetato de etilo. Entre cada inyección de muestras la columna fue re-equilibrada, con la primera mezcla de solventes, por un mínimo de 10 minutos, para eliminar los efectos residuales de la mezcla de solventes metanol-acetato de etilo.

### 3.3.3.3. Identificación, calibración y cuantificación de pigmentos fotosintéticos:

#### 3.3.3.3.1. $\beta$ -caroteno:

La identificación del  $\beta$ -caroteno de las muestras de la columna de agua y macroalgas tratadas con radiación UV-B se realizó mediante la comparación de los tiempos de retención de los picos obtenidos para los extractos con los estándares puros de  $\beta$ -caroteno en metanol 100%. Los cromatogramas del estándar y de las muestras fueron obtenidos bajo exactamente la mismas condiciones de temperatura, gradiente y flujo (Ver Resultados **Fig. 17A**).

Para cuantificar la banda identificada como  $\beta$ -caroteno se realizó una curva de calibración con el estándar (Ver Resultados **Fig.18**) a concentraciones conocidas: 1, 5, 10, 25, 50 ppm.

Con las ecuaciones de la recta obtenidas de las curvas de calibración del estándar fue posible obtener la concentración del  $\beta$ -caroteno identificado en cada una de las muestras estudiadas.

A partir de estos datos fue posible identificar y calcular cuantitativamente la concentración del  $\beta$ -caroteno presente en las muestras estudiadas.

#### 3.3.3.3.2. Clorofila *a* y *b*:

La identificación de la clorofila *a* y *b* presentes en las muestras se realizó siguiendo el mismo criterio que en  $\beta$ -caroteno. Los cromatogramas de los estándares de clorofila *a* y *b*, de las muestras se obtuvieron bajo iguales condiciones (Ver resultados **Fig. 17B y 17C**).

Para cuantificar la concentración de las clorofilas *a* y *b* identificados se realizaron curvas de calibración en HPLC de fase reversa con cada uno de los estándares a concentraciones conocidas: Clorofila *a* 1, 2, 3 y 4 ppm y Clorofila *b* 0,5, 1, 2,5 y 5 ppm respectivamente (**Fig.18**).

Con las ecuaciones de la recta obtenidas de las curvas de calibración de los estándares fue posible obtener la concentración de la clorofila *a* y *b* identificados en cada una de las muestras estudiadas.

A partir de estos datos fue posible identificar y calcular cuantitativamente la concentración de la clorofila *a* y *b* presentes en las muestras estudiadas.

### 3.4. Estudios fisiológicos

#### 3.4.1. Medición de la fluorescencia de clorofilas del fotosistema II:

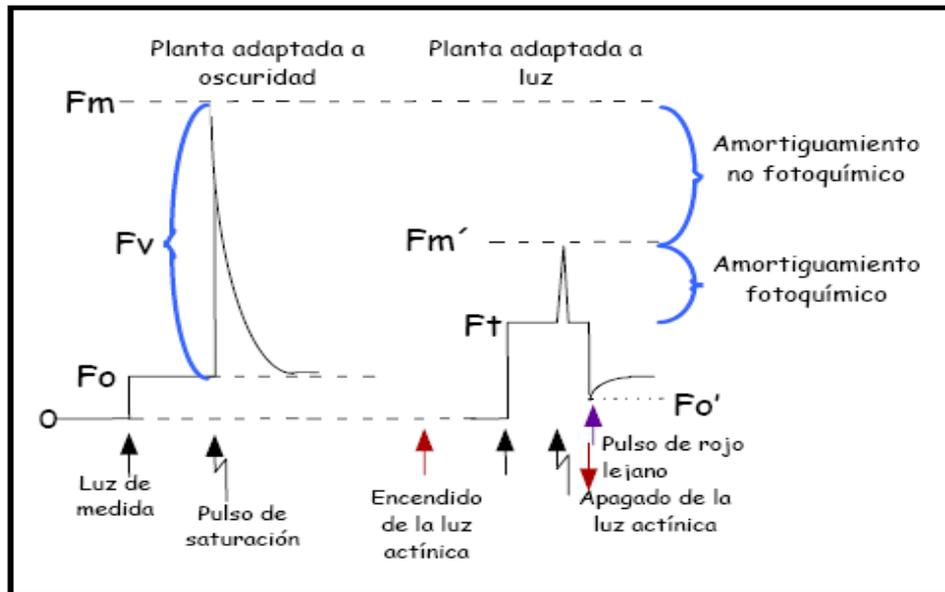
El método se basa en la fluorescencia emitida por las clorofilas, donde se midió la tasa fotosintética (Schreiber *et al.* 1994), utilizando el fluorímetro de amplitud modulada (PAM 2000, Walz, Effeltrich, Alemania) (**Fig. 10**). La fluorescencia se midió a diferentes intervalos de exposición a la radiación (inicial, 6 hrs, 24 hrs, 2 días y 6 días). El parámetro fotosintético utilizado fue el rendimiento cuántico máximo ( $F_v/F_m$ ).



**Figura 10.** Instrumento portátil, PAM 2000. Permite medir la cinética de conversión de energía y parámetros fotoquímicos en el aparato fotosintético *in vivo*.

### 3.4.1.1 Rendimiento Cuántico Máximo ( $F_v/F_m$ )

El rendimiento cuántico máximo representa la eficiencia máxima en los procesos de conversión de la energía fotoquímica de una planta adaptada a oscuridad, es considerado un buen indicador de fotosíntesis, debido a que se encuentra asociado fuertemente a la eficiencia fotosintética medida durante la evolución de  $O_2$  (Figueroa *et al.*, 2003). Este



**Figura 11.** Esquema de la medida de rendimiento cuántico máximo ( $F_v/F_m$ ) y rendimiento cuántico efectivo ( $\Phi_{PSII}$ ). Las flechas negras indican el encendido de la luz de medida. Las flechas negras quebradas indican los pulsos de saturación. Con las flechas rojas se indica el encendido y apagado de la luz actínica y con las lilas el pulso del rojo lejano. Figura extraída de

parámetro corresponde al cociente entre la fluorescencia variable ( $F_v = F_m - F_o$ ) y la fluorescencia de una planta aclimatada a oscuridad ( $F_m$ ). Para su estimación las macroalgas se sometieron por 30 minutos a incubación de oscuridad, en una cámara de polietileno negro, para permitir que todos los centros de reacción se encuentren oxidados (abiertos). Después a través del fluorímetro se les aplicó un pulso de saturación ( $4000-6000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) de luz actínica que produce el máximo nivel de fluorescencia ( $F_m$ ), es cuando todos los centros de reacción se reducen (cerrados). Debido a que en este momento las quinonas se saturan, por lo tanto la energía destinada a procesos

fotoquímicos se hace cero (quenching fotoquímico= 0) y a que el quenching no-fotoquímico (o calor) se retrasa a algunos milisegundos, la totalidad de la energía absorbida es en forma de fluorescencia. Para obtener  $F_v/F_m$  (**Fig. 11**) se necesita entonces la fluorescencia variable ( $F_v$ ) que es la diferencia entre la fluorescencia máxima ( $F_m$ ) y la fluorescencia basal ( $F_o$ ) que se obtiene con una luz de emisión de 650 nm de una planta adaptada a la oscuridad. En el caso de que algas se encuentren adaptadas a la luz se obtiene el rendimiento cuántico efectivo ( $\Phi_{PSII}$ ) que refleja la eficiencia real (estado estacionario) bajo una determinada radiación a diferencia de  $F_v/F_m$  que es una eficiencia potencial (**Fig. 11**).

#### 3.4.1.2 Tasa de transporte de electrones (ETR):

Este parámetro representa la estimación del tránsito de electrones a través de los diferentes componentes del aparato fotosintético en los tilacoides. El ETR en general, es un buen indicador de la tasa de fotosíntesis en algas. Fue estimado utilizando curvas de Fotosíntesis vs. Irradiancia ( $P-I$ ), mediante la exposición de las macroalgas a intensidades crecientes ( $1-400 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) de radiación visible PAR, proporcionada por una lámpara LED integrada en el instrumento PAM 2000. El ETR se midió a distintos intervalos de exposición a la radiación (inicial, 6 h, 24 h, 48 h y 6 d). ETR fue calculado relacionando el rendimiento cuántico efectivo ( $\Phi_{PSII}$ ), que corresponde a la fluorescencia de una planta no adaptada a la oscuridad, y la intensidad de radiación PAR de acuerdo a la siguiente fórmula modificada a partir de Schreiber *et al.*, (1994):

$$\text{ETR} = \Phi_{PSII} * E_{\text{PAR}} * A * C.$$

Donde, E es la intensidad de la luz actínica, A es la absorptancia de las macroalgas y C que relaciona la absorción de la radiación por partes de los fotosistemas que varía según la especie de macroalga, para las algas verdes y rojas estos valores han sido estimados 0,5 y 0,15 respectivamente. La absorptancia (A), que es la fracción que queda de la sustracción de la luz transmitida y reflejada por una muestra, fue medida colocando una porción del talo sobre la superficie de un sensor cuántico Licor-190, conectado a un

radiómetro Licor-250 (Li-Cor Inc., USA) (Gómez *et al.*, 2004). Fue calculada mediante la fórmula modificada descrita por Mercado *et al.*, (1996):

$$A = (I_0 - I_t) * I_0^{-1}$$

Donde,  $I_0$  es la intensidad de PAR incidente y  $I_t$  es la intensidad de PAR transmitida una vez que ha atravesado la muestra de alga.

### 3.5. Análisis estadísticos

Los resultados obtenidos de las concentraciones de los pigmentos fotosintéticos,  $F_v/F_m$  y ETR se realizaron análisis estadísticos por separados con el programa computacional Statistica 6.0 (StatSoft, Inc., USA). Se realizaron análisis de varianza (ANOVA) de dos vías, considerando las siguientes variables: tratamiento y tiempo de exposición para ambos grupos de macroalgas; los parámetros de fluorescencia y cuantificación de clorofila *a*, clorofila *b* y  $\beta$ -caroteno por HPLC determinación de los pigmentos por medio del espectrofotómetro UV-visible, en las especies de macroalgas. En cuanto a la determinación de los pigmentos presentes en las muestras de fitoplancton se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía. Con el Test de Tukey se establecieron las diferencias entre los promedios, considerando como diferencias significativas un  $P \leq 0,05$  (\*).

## 4.- RESULTADOS

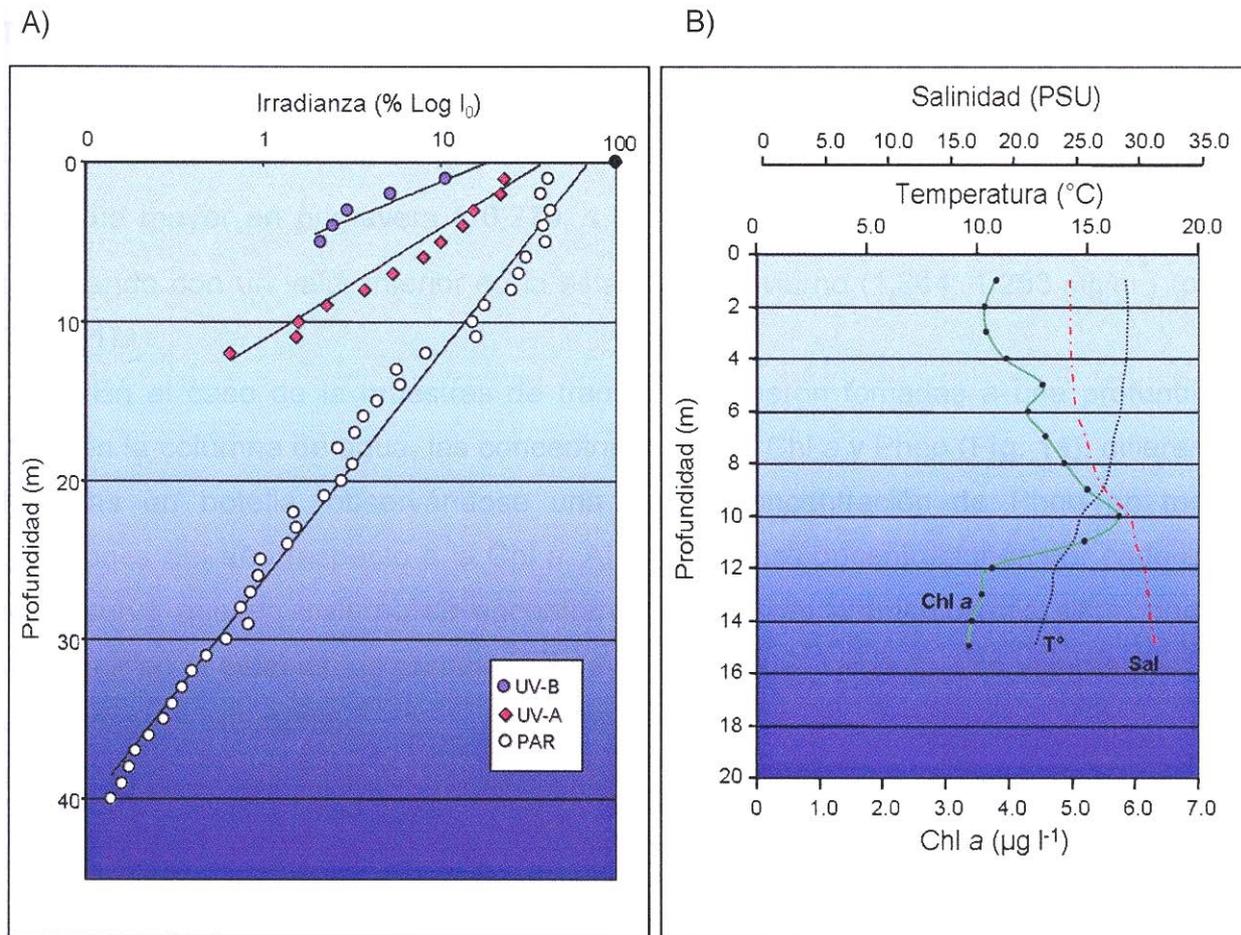
### 4.1. Variación estacional y en profundidad de pigmentos fotosintéticos en muestras de Fitoplancton de la zona de Coihuin.

#### 4.1.1. Caracterización de las condiciones oceanográficas

En general, se conoce que la radiación solar en el medio acuático sufre constantes variaciones espacio-temporales en calidad y cantidad. Mediante la realización de los perfiles de radiación solar en la columna de agua de esta zona, se observó que en un día soleado de verano, la penetración de la radiación PAR llega hasta profundidades cercanas a los 40 m. En el caso de la radiación UV-A y UV-B quedó en evidencia que estas longitudes de onda son atenuadas por la columna de agua a profundidades de 12 y 5 m, respectivamente (**Fig. 12 A**).

En cuanto a la concentración de la clorofila *a*, se observó un patrón vertical a través de la columna de agua, variando desde  $4,0 \mu\text{g l}^{-1}$  en la superficie hasta un máximo de  $5,7 \mu\text{g l}^{-1}$  alrededor de los 10 m. A mayor profundidad la concentración de Chl *a* disminuyó a  $3,3 \mu\text{g l}^{-1}$ . (**Fig. 12 B**).

Las condiciones térmicas y salinas observadas para la plataforma submareal de la zona de Coihuin, mostraron comportamientos opuestos. La temperatura a nivel superficial fue de alrededor de  $15 \text{ }^\circ\text{C}$ , disminuyendo a una profundidad de 10 m a  $12 \text{ }^\circ\text{C}$ . En el caso de la salinidad cercana a la superficie, los valores fueron cercanos a 25 PSU, aumentando a una profundidad de 10 m donde la salinidad llegó a los 30 PSU (**Fig. 12 B**).



**Fig. 12.** Condiciones oceanográficas de la zona de Coihuin (Puerto Montt). A) perfiles de radiación solar (UV-B, UV-A y PAR) en la columna de agua medidos con un espectroradiómetro acuático Ramses a lo largo de un rango de 40 m; B) Perfiles de Chl a, salinidad y temperatura determinados con un CTD en un rango de profundidad de 20 m.)

#### 4.1.2. Espectrofotometría

##### 4.1.2.1. Clorofila a y feopigmentos:

El patrón de fluctuaciones estacionales para la concentración de clorofila a (Chl a) y feopigmentos (Pheo) en la columna de agua fue similar (**Fig. 13**). Las muestras tomadas con la botella Niskin a distintas profundidades donde se encontraron los máximos de clorofila se analizaron de acuerdo al siguiente rango de profundidades; superficie (0-5 m) e intermedio (5–15 m). Las concentraciones de Chl a y Pheo en la superficie mostraron los

valores promedio más altos en primavera (5,473; 1,401 mg/m<sup>3</sup>) ( $p < 0.05$ , ANOVA, test Tukey HSD; **Tabla 1**), para luego disminuir en verano, terminando con menor concentración en otoño (3,026; 2,144 mg/m<sup>3</sup>). En general existe una mayor la cantidad de Chl *a* respecto a Pheo. La concentración de Chl *a* y Pheo en la columna intermedia de agua fue mayor en primavera (10,279; 1,840 mg/m<sup>3</sup>), disminuyendo en verano y otoño, terminando con un valor inferior en la estación de invierno (1,844; 1,253 mg/m<sup>3</sup>) ( $p < 0.05$ ; **Tabla 1**).

En el caso de la muestras de trampa que fueron tomadas a una profundidad de 70 m en la columna de agua, las concentraciones de Chl *a* y Pheo (**Fig. 14**), difieren de las tomadas en botella, observándose una mayor concentración de Pheo en todas las estaciones del año respecto a la Chl *a*. Al analizar las concentraciones por cada estación se observó que en invierno se encontraron los valores promedio más altos, para luego disminuir en la estación de primavera y verano ( $p < 0.05$ ; **Tabla 2**). Los valores más bajo se determinaron en otoño.

**Tabla 1.** Concentraciones de clorofila (Chl a) y feopigmentos (Pheo) ( $\text{mg/m}^3$ ) en extractos fitoplancton obtenidos con botella Niskin. Estas fueron determinadas según el método de Lorenzen (1967) por medio de espectrofotometría UV/Visible a 665 y 750 nm en los diferentes tiempos de exposición a los tratamientos de radiación. Los valores son promedio  $n= 3 \pm \text{D.E.}$  Se indican los resultados de un análisis de ANOVA de una vía para diferencias entre estaciones del año. Letras similares indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) según el test de Tukey HSD.

Estación del año	Profundidad	Concentración Pigmento ( $\text{mg/m}^3$ )	
		Chl a	Pheo
Invierno	Superficie	SM	SM
	Intermedio	1,844 $\pm$ 1,128	1,253 $\pm$ 1,052a
Primavera	Superficie	5,473 $\pm$ 0,407	1,401 $\pm$ 0,786
	Intermedio	10,279 $\pm$ 4,175	1,840 $\pm$ 0,958 c
Verano	Superficie	2,491 $\pm$ 0,616	1,432 $\pm$ 0,853 a,b
	Intermedio	6,635 $\pm$ 0,687	4,273 $\pm$ 0,533
Otoño	Superficie	3,026 $\pm$ 1,480	2,144 $\pm$ 1,068b,c
	Intermedio	1,179 $\pm$ 0,775	0,814 $\pm$ 0,613
<b>ANOVA</b>			
Mean SS	Superficie	0,00467	0,00198
	Intermedio	0,00018	0,01623
Mean SS Error	Superficie	0,00018	0,00531
	Intermedio	0,00666	0,02840
F <sub>(2,6)</sub>	Superficie	1,28	0,111
F <sub>(3,23)</sub>	Intermedio	0,20	4,38
p-level	Superficie	p<0,89NS	p<0,05*
	Intermedio	p<0,001***	p<0,89NS

Chl a: Clorofila a; Pheo: Feopigmentos; SM: Sin muestra

\*P < 0,05; \*\*P < 0,01; \*\*\*P < 0,001 (NS) valores no significativos, P > 0,05

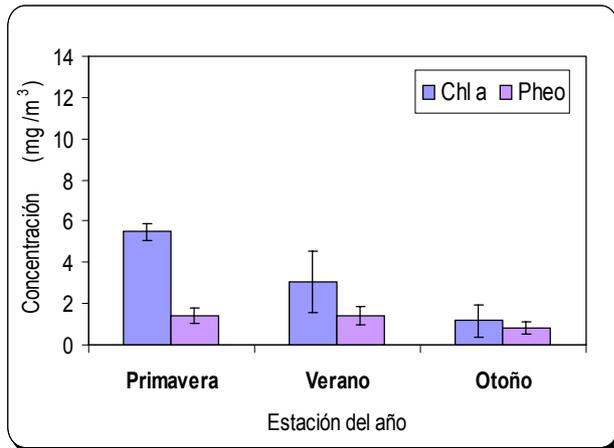
**Tabla 2.** Concentraciones de clorofila (Chl *a*) y feopigmentos (Pheo) ( $\text{mg/m}^3$ ) en extractos de fitoplancton, obtenidos por trampa. Estas fueron determinadas según el método de Lorenzen (1967) por medio de espectrofotometría UV/Visible a 665 y 750 nm en los diferentes tiempos de exposición a los tratamientos de radiación. Los valores son promedio  $n= 3 \pm \text{D.E.}$  Se indican los resultados de un análisis de ANOVA de una vía para diferencias entre estaciones del año. Letras similares indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) según el test de Tukey HSD.

Estación del año	Profundidad	Concentración Pigmento ( $\text{mg/m}^3$ )	
		Chl <i>a</i>	Pheo
Invierno	70 m	34,858 $\pm$ 14,013	79,432 $\pm$ 30,894
Primavera	70 m	14,943 $\pm$ 2,599	25,147 $\pm$ 4,195
Verano	70 m	6,600 $\pm$ 1,085	21,853 $\pm$ 7,079
Otoño	70 m	5,102 $\pm$ 1,457	13,088 $\pm$ 3,459
<b>ANOVA</b>			
Mean SS		0,00005	0,00008
Mean SS Error		0,976NS	0,948NS
F <sub>(3,29)</sub>		0,07	0,12
p-level		$p < 0,001^{***}$	$p < 0,001^{***}$

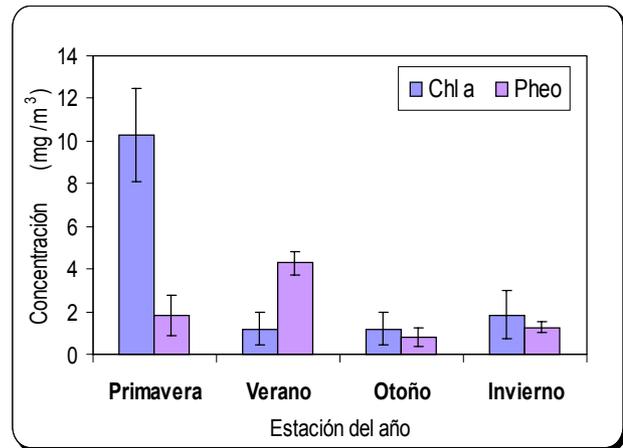
Chl *a*: Clorofila *a*; Pheo: Feopigmentos

\* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ ; \*\*\* $P < 0,001$  (NS) valores no significativos,  $P > 0,05$

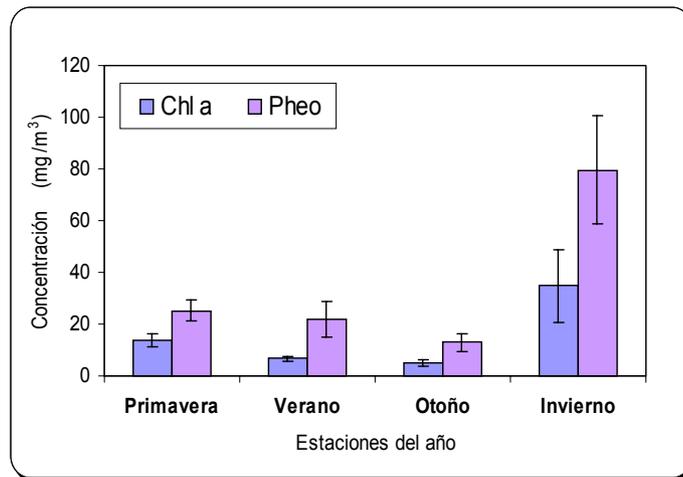
A)



B)



**Figura 13.** Concentraciones de la clorofila *a* y feopigmentos medidas en extractos de fitoplancton, determinada mediante el espectrofotómetro UV/Visible SCINCO en muestras obtenidas por botella Niskin. Profundidad: a) superficie (0-5 m), b) intermedio (5-15 m). Las muestras fueron recolectadas durante las distintas estaciones del año. Los valores son promedio  $n = 3 \pm D.E.$



**Figura 14.** Concentraciones de la clorofila *a* y feopigmentos medidas en extractos de fitoplancton determinadas mediante el espectrofotómetro UV/Visible SCINCO en muestras tomadas en trampas a 70 m de profundidad, siendo recolectadas durante las distintas estaciones del año. Los valores son promedio  $n = 3 \pm D.E.$

#### 4.1.1.2. Clorofila a, b, c y carotenoides:

Las concentraciones obtenidas para los distintos pigmentos fotosintéticos como la clorofila *a* (Chl *a*), clorofila *b* (Chl *b*), clorofila *c* (Chl *c*) y carotenoides, se observó un comportamiento similar en las concentraciones de estos pigmentos, presentando variaciones a través del ciclo estacional en la columna de agua (**Fig. 15**). Las concentraciones registradas para los distintos pigmentos fotosintéticos encontrados en la superficie muestran la misma tendencia tanto para Chl *a*, Chl *b*, Chl *c* y carotenoides, siendo en la estación de primavera los valores promedio más altos en general (0,650; 0,028; 0,154; 0,163 mg/m<sup>3</sup>), aunque en verano se obtuvieron las concentraciones más altas, para luego disminuir en otoño (0,289; 0,032; 0,052; 0,098 mg/m<sup>3</sup>) ( $p < 0.05$ , ANOVA, test Tukey HSD; **Tabla 3**).

Las concentraciones de los pigmentos fotosintéticos; Chl *a*, Chl *b*, Chl *c* y carotenoides presentes en el intermedio de la columna, se observó que en primavera se obtuvieron los valores promedio más altos (1,227; 0,095; 0,330; 0,340 mg/m<sup>3</sup>), para luego disminuir en verano y otoño, terminando con una menor concentración en invierno (0,319; 0,057; 0,093; 0,114 mg/m<sup>3</sup>). Cabe destacar que la Chl *a* presenta una mayor concentración respecto a los demás pigmentos presentes en la columna de agua. En el caso de las muestras de trampa tomadas a la profundidad de 70 m las concentraciones de los pigmentos encontrados (**Fig. 16**). Para la Chl *a*, Chl *b*, Chl *c* y carotenoides en invierno (6,78; 5,122; 4,142; 3,126 mg/m<sup>3</sup>) se observaron los valores promedio más altos, disminuyendo en la primavera y el verano, terminando con una concentración menor en la estación de otoño (1,811; 0,324; 0,057; 0,132 mg/m<sup>3</sup>) respectivamente ( $p < 0.05$ ; **Tabla 4**).

**Tabla 3.** Concentraciones de pigmentos fotosintéticos ( $\text{mg/m}^3$ ) en extractos de fitoplancton obtenidos por botella Niskin. Estas fueron determinadas según el método Strickland & Parson (1972) por medio de espectrofotometría UV/Visible a 480, 510, 630, 647 y 664 nm en los diferentes tiempos de exposición a los tratamientos de radiación. Los valores son promedio  $n=3 \pm \text{D.E.}$  Se indican los resultados de un análisis de ANOVA de una vía para diferencias entre estaciones del año. Letras similares indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) según el test de Tukey HSD.

Estación del año	Profundidad	Concentración Pigmento ( $\text{mg/m}^3$ )			
		Chl a	Chl b	Chl c	Carot.
Invierno	Superficie	SM	SM	SM	SM
	Intermedio	0,319 $\pm$ 0,141a	0,057 $\pm$ 0,057 a	0,093 $\pm$ 0,071	0,114 $\pm$ 0,073a
Primavera	Superficie	0,650 $\pm$ 0,006d,e	0,028 $\pm$ 0,017d	0,154 $\pm$ 0,030	0,163 $\pm$ 0,015
	Intermedio	1,227 $\pm$ 0,294a,b	0,095 $\pm$ 0,086 a,b	0,330 $\pm$ 0,092	0,340 $\pm$ 0,187 a,b
Verano	Superficie	1,217 $\pm$ 0,188e	0,271 $\pm$ 0,188d	0,135 $\pm$ 0,086	0,291 $\pm$ 0,137
	Intermedio	0,392 $\pm$ 0,009	0,089 $\pm$ 0,017	0,182 $\pm$ 0,027	0,053 $\pm$ 0,032
Otoño	Superficie	0,289 $\pm$ 0,036c	0,032 $\pm$ 0,005	0,052 $\pm$ 0,020	0,098 $\pm$ 0,025
	Intermedio	0,319 $\pm$ 0,110b	0,057 $\pm$ 0,034b	0,029 $\pm$ 0,046	0,078 $\pm$ 0,054b

#### ANOVA

Mean SS	Superficie	0,000175	0,00090	0,000153	0,000166
	Intermedio	0,00834	0,00024	0,00210	0,00153
Mean SS Error	Superficie	0,000061	0,00039	0,00033	0,000081
	Intermedio	0,00482	0,00121	0,00898	0,00135
F <sub>(2,6)</sub>	Superficie	8,7	7,0	14	6,2
F <sub>(3,23)</sub>	Intermedio	13,28	5	16,4	8,7
p-level	Superficie	$p < 0,001^{***}$	$p < 0,001^{***}$	$p < 0,001^{***}$	$p < 0,01^{***}$
	Intermedio	$p < 0,001^{***}$	$p < 0,001^{***}$	$p < 0,001^{***}$	$p < 0,001^{***}$

Chl a: Clorofila a; Chl b: Clorofila b; Chl c: Clorofila c; Carot.: Carotenoides; SM: Sin muestra

\*P < 0,05; \*\*P < 0,01; \*\*\*P < 0,001 (NS) valores no significativos, P < 0,05

**Tabla 4.** Concentraciones pigmentos fotosintéticos ( $\text{mg/m}^3$ ) en extractos fitoplancton, obtenidos por trampas. Estas fueron determinadas según el método de Strickland & Parson (1972) por medio de espectrofotometría UV/Visible a 480, 510, 630, 647 y 664 nm en los diferentes tiempos de exposición a los tratamientos de radiación. Los valores son promedio  $n= 3 \pm \text{D.E.}$  Se indican los resultados de un análisis de ANOVA de una vía para diferencias entre estaciones del año. Letras similares indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) según el test de Tukey HSD.

Estación del año	Profundidad	Concentración Pigmento ( $\text{mg/m}^3$ )			
		Chl a	Chl b	Chl c	Carot.
Invierno	70 m	6,78 $\pm$ 1,699a	5,122 $\pm$ 1,897 a	4,142 $\pm$ 1,897a	3,126 $\pm$ 1,706 a,c
Primavera	70 m	2,90 $\pm$ 1,226a, b	0,615 $\pm$ 0,332 a, b	0,786 $\pm$ 0,567a, b	0,423 $\pm$ 0,097 a, b
Verano	70 m	1,801 $\pm$ 0,324	0,345 $\pm$ 0,204	0,034 $\pm$ 0,125	0,220 $\pm$ 0,191c
Otoño	70 m	1,811 $\pm$ 0,310 b	0,324 $\pm$ 0,173 b	0,057 $\pm$ 0,016 b	0,1321 $\pm$ 0,092 b

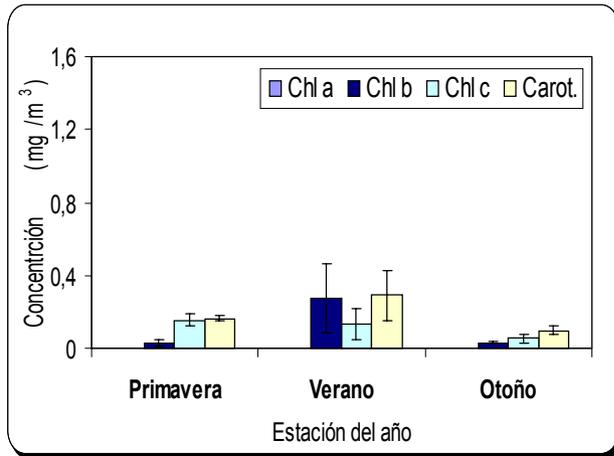
#### ANOVA

Mean SS	0,02673	0,05083	0,03793	0,02466
Mean SS error	0,01563	0,03031	0,03131	0,00662
F <sub>(3,29)</sub>	16,53	16,23	11,71	36
p-level	p<0,001***	p<0,001***	p<0,001***	p<0,001***

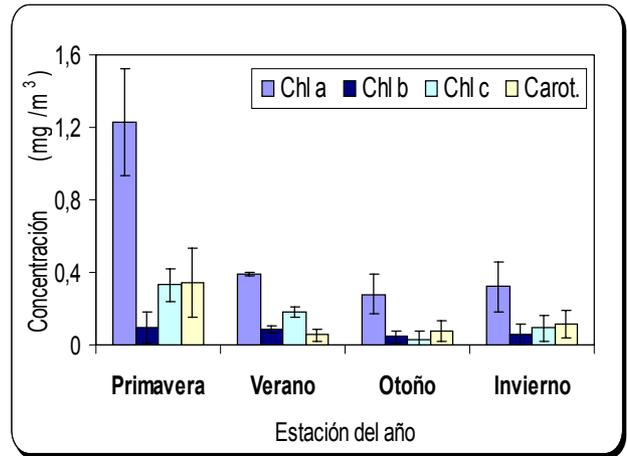
Chl a: Clorofila a; Chl b: Clorofila b; Chl c: Clorofila c; Carot.: Carotenoides

\*P < 0,05; \*\*P < 0,01; \*\*\*P < 0,001 (NS) valores no significativos, P < 0,05

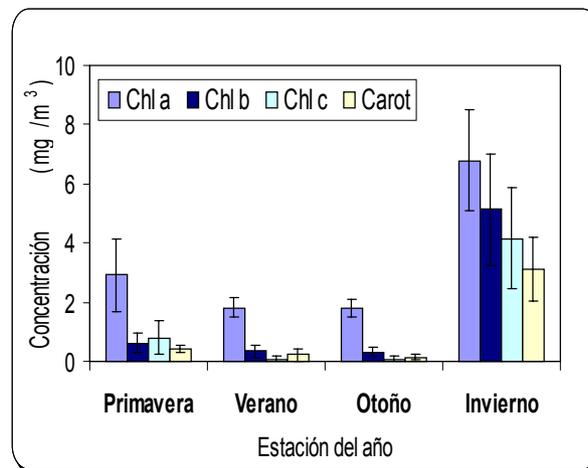
A)



B)



**Figura 15.** Concentraciones de clorofilas *a*, *b*, *c* y carotenoides medidos en extractos de fitoplancton determinadas mediante el espectrofotómetro UV/Visible SCINCO en muestras obtenidas por la botella Niskisin. Profundidad: A) superficie (0-5 m), B) intermedio (5-15 m). Las muestras fueron recolectadas durante las distintas estaciones del año. Los valores son promedio  $n= 3 \pm D.E.$



**Figura 16.** Concentraciones de clorofilas *a*, *b*, *c* y carotenoides medidos en extractos de fitoplancton determinadas mediante el espectrofotómetro UV/Visible SCINCO en muestras tomadas en trampas a 70 m de profundidad, siendo recolectadas durante las distintas estaciones del año. Los valores son promedio  $n= 3 \pm D.E.$

### 4.1.3. HPLC

#### 4.1.3.1. Identificación, calibración de los pigmentos fotosintéticos por RP-HPLC:

Con el tiempo de retención apreciado en los cromatograma de los distintos estándares de los pigmentos fotosintéticos analizados:  $\beta$ -caroteno, Clorofila *a* y *b* (**Fig. 17**) obtenidos mediante la técnica de HPLC fase reversa, se procedió a la identificación de estos pigmentos presentes en los extractos de muestras de fitoplancton, obtenidas en la columna de agua a distintas profundidades en las diferentes estaciones del año. En el caso de las macroalgas (*Ulva sp.* y *Gracilaria chilensis*) fueron expuestas diferentes dosis de radiación. Se realizó una comparación de los tiempos de retención entre los distintos estándares de los pigmentos (**Tabla 5**) y las muestras de fitoplancton y las macroalgas. Los cromatogramas obtenidos de los estándares y de las muestras fueron realizados bajo las mismas condiciones de temperatura, gradiente y flujo (Ver Resultados **Fig. 21-22; 30-31**).

La cuantificación de la concentración de los pigmentos fotosintéticos identificados se realizó mediante las curvas de calibración obtenidas por HPLC-fase reversa, con cada uno de los distintos estándares a concentraciones conocidas:  $\beta$ -caroteno (5, 10, 25, 50, 100 ppm), Clorofila *a* (1, 2, 3, 4 ppm) y Clorofila *b* (1, 2, 5, 5 ppm) respectivamente. (**Fig. 18**).

Las ecuaciones de la recta obtenida para cada uno de los estándares de los distintos pigmentos fotosintéticos fueron las siguientes:

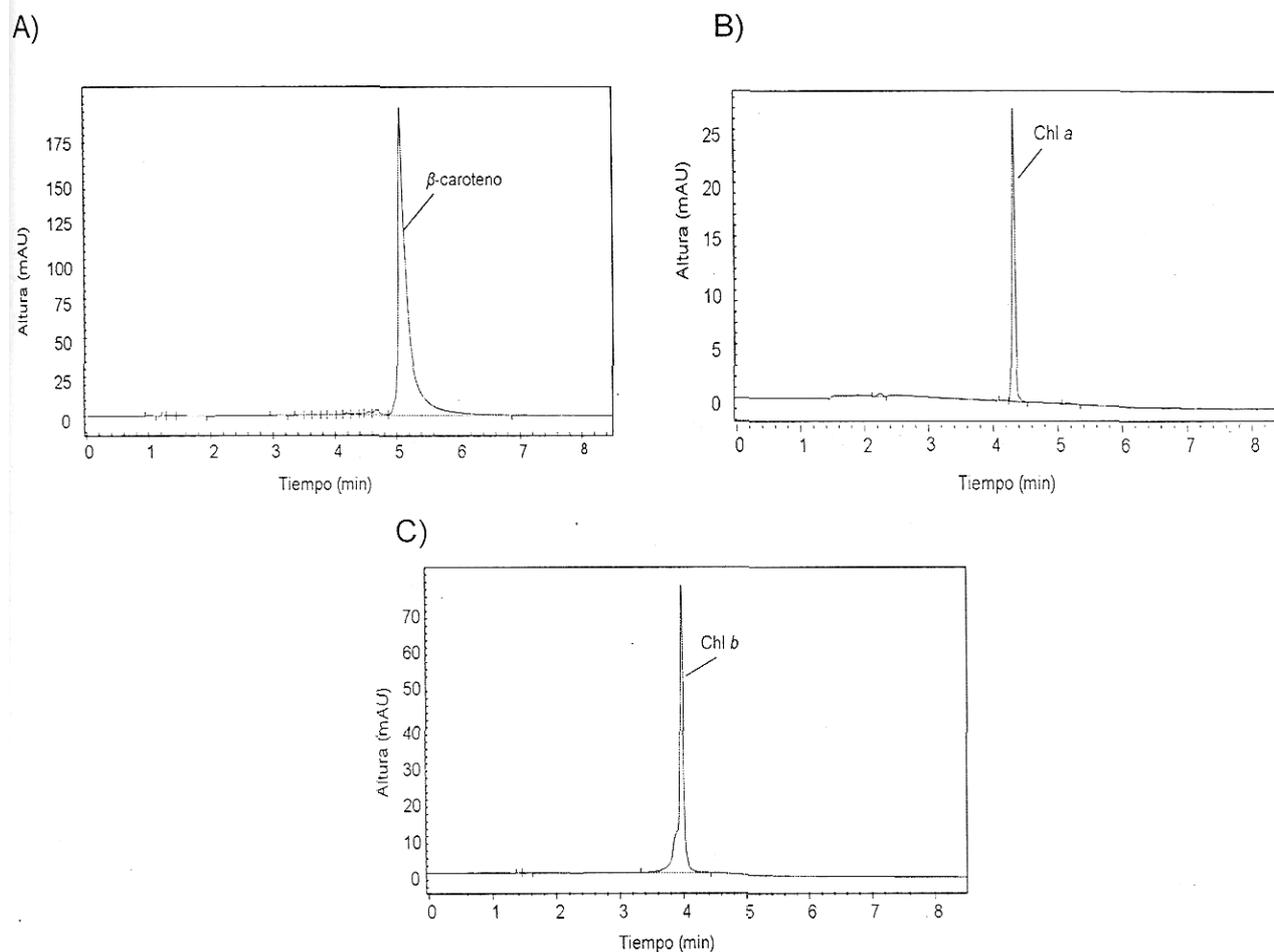
$$\begin{array}{lll} \beta\text{-caroteno} & Y = 1,3461 + 1,7394 & r^2 = 0,9979 \\ \text{Clorofila } a & Y = 6,7077 - 0,4897 & r^2 = 0,9989 \\ \text{Clorofila } b & Y = 17,623 - 0,1202 & r^2 = 0,9952 \end{array}$$

Donde "Y" corresponde a la altura peak del identificado en el cromatograma, y "X" a la concentración del estándar en ppm.

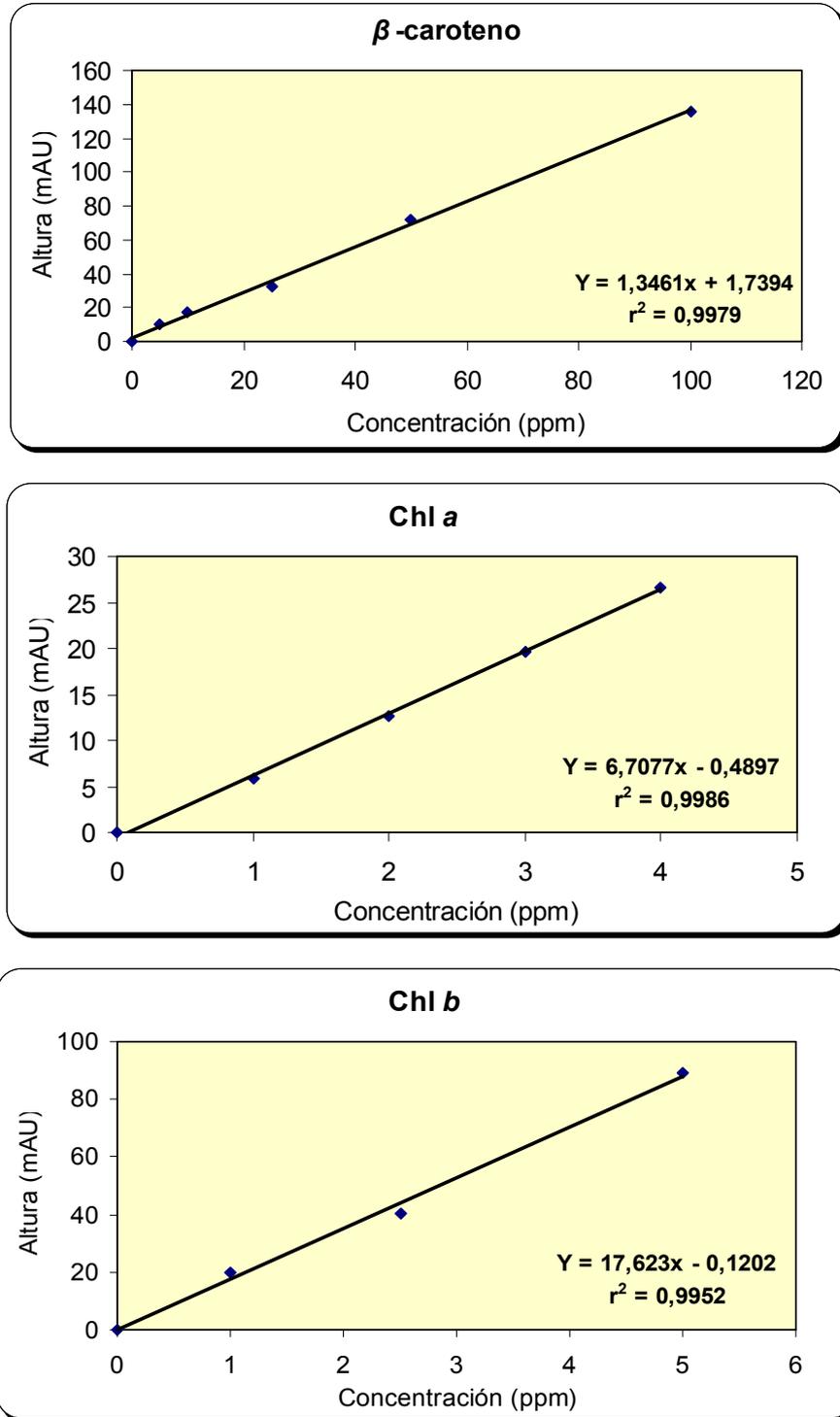
Mediante de estos datos fue posible identificar cada uno de los distintos pigmentos fotosintéticos presentes tanto en las muestras de fitoplancton y macroalgas estudiadas. Además de calcular cuantitativamente la concentración de los distintos pigmentos:  $\beta$ -caroteno, Clorofila *a* y Clorofila *b*.

**Tabla 5.** Tiempos de retención (min) de estándares de pigmentos fotosintéticos analizados en HPLC de fase reversa, provisto columna  $C_{18}$ , se inyectó un volumen de 50  $\mu$ l de muestra del estándar ( $\beta$ -caroteno, Clorofila *a* y Clorofila *b* a concentraciones de: 5, 10, 25, 50; 4, 3, 2, 1; 0,5, 1, 2,5, 5 ppm, respectivamente) a un flujo de 2,0  $\text{ml}/\text{min}^{-1}$ . Estos fueron detectados a una longitud de onda de 450 nm con detector UV-Visible, a temperatura ambiente y con una gradiente modificada de solventes: a) acetonitrilo-metanol-buffer Tris HCL 0,1 M pH 8,0; b) metanol-acetato de etilo. n= 3.

<b>Estándar</b>	<b>Tiempo de retención (min)</b>
<b><math>\beta</math>-caroteno</b>	5,083
<b>Clorofila <i>a</i></b>	4,245
<b>Clorofila <i>b</i></b>	3,836



**Figura 17.** Cromatogramas de los estándares de los pigmentos fotosintéticos: A)  $\beta$ -caroteno B) Clorofila a C) Clorofila b, correspondiente a la concentración 50, 4, 2,5 ppm, respectivamente, resuelto en HPLC fase reversa, inyectando 50  $\mu$ L de muestra a un flujo 2,0 mL/min<sup>-1</sup>, controlado por bomba peristáltica cuaternaria a una longitud de 450 nm con detector UV-visible, controlado por bomba peristáltica cuaternaria, a temperatura ambiente y con gradiente de solventes acetonitrilo-metanol-buffer Tris HCL 0,1 M pH 8,0 y metanol-acetato de etilo y corrida isocrática con la última mezcla de solventes.



**Figura 18.** Curvas de calibración de los estándares puros de:  $\beta$ -caroteno, clorofila a y b corridos en HPLC de fase reversa.

#### 4.1.3.2. Análisis pigmentos fotosintéticos en muestras de fitoplancton:

En las muestras de fitoplancton analizadas mediante RP-HPLC, a través de los cromatogramas (**Fig. 21-22**) se determinó la presencia de clorofila *a* (Chl *a*), clorofila *b* (Chl *b*) y  $\beta$ -caroteno. Además se observó que la estacionalidad se encuentra relacionada en la variación de la concentración de estos distintos pigmentos fotosintéticos. En el caso de las muestras tomadas con la botella Niskin, se apreció una mayor concentración de  $\beta$ -caroteno en la estación de primavera - verano tanto en la superficie (0–5 m) como en el intermedio (5-15 m) de la columna de agua, siendo mayor en ésta, para luego disminuir en forma considerable en la estación de invierno (**Fig. 19**). Para la Chl *a* se evidenció una mayor concentración respecto a la Chl *b*, siguiendo la misma tendencia del  $\beta$ -caroteno, con un aumento en las estaciones de primavera-verano, disminuyendo en forma paulatina durante el otoño e invierno como se evidencia en la (p < 0.05, ANOVA, test Tukey HSD; **Tabla 6**).

En las muestras de trampas a 70 m de profundidad dentro de la columna de agua se determinó una mayor concentración en la Chl *a* durante invierno, disminuyendo en primavera y verano para terminar con un mínimo de concentración en otoño (**Fig. 20**). Por otro lado, la Chl *b* presentó una menor concentración en relación a la Chl *a*, siguiendo la misma tendencia en todas las estaciones del año al igual que la Chl *a* (p < 0,05; **Tabla 7**). En el caso del  $\beta$ -caroteno se apreció una mayor concentración en las estaciones de primavera-verano, disminuyendo de forma considerable en otoño e invierno.

**Tabla 6.** Concentraciones de pigmentos fotosintéticos (ppm) en extractos de fitoplancton, obtenidos por botella Niskin. Estas fueron analizadas con HPLC fase reversa detectados a una longitud de onda de 450 nm con un detector UV-visible, a temperatura ambiente y con una gradiente modificada de solventes: a) acetonitrilo-metanol-buffer Tris HCL 0,1 M pH 8,0; b) metanol-acetato de etilo en los diferentes tiempos de exposición a los tratamientos de radiación. Los valores son promedio  $n= 3 \pm$  D.E. Se indican los resultados de un análisis de ANOVA de una vía para diferencias entre estaciones del año. Letras similares indican diferencias significativas ( $p<0,05$ ) según el test de Tukey HSD.

Estación del año	Profundidad	Concentración Pigmento (ppm)		
		Chl <i>a</i>	Chl <i>b</i>	$\beta$ -carot.
Invierno	Superficie	SM	SM	SM
	Intermedio	1,078 $\pm$ 0,030 a	0,164 $\pm$ 0,027 a	2,059 $\pm$ 0,365
Primavera	Superficie	1,804 $\pm$ 0,009	0,940 $\pm$ 0,005	12,395 $\pm$ 0,984
	Intermedio	1,604 $\pm$ a,b	0,568 $\pm$ a,b	16,532 $\pm$
Verano	Superficie	1,313 $\pm$ 0,064	0,720 $\pm$ 0,017	8,680 $\pm$ 0,343
	Intermedio	1,437 $\pm$ 0,050	0,287 $\pm$ 0,032	9,727 $\pm$ 0,229
Otoño	Superficie	1,179 $\pm$ 0,034	0,221 $\pm$ 0,025	4,131 $\pm$ 0,895
	Intermedio	1,046 $\pm$ 0,013 b	0,101 $\pm$ 0,015 b	4,371 $\pm$ 0,492

#### ANOVA

Mean SS	Superficie	0,00212	0,00708	0,012141
	Intermedio	0,00153	0,00373	0,12415
Mean SS Error	Superficie	0,00008	0,00076	0,000515
	Intermedio	0,00109	0,00223	0,01937
F <sub>(2,6)</sub>	Superficie	79	85	70,69
F <sub>(3,23)</sub>	Intermedio	10,7	12,8	49,14
p-level	Superficie	$p<0,001^{***}$	$p<0,001^{***}$	$p<0,001^{***}$
	Intermedio	$p<0,001^{***}$	$p<0,001^{***}$	$p<0,001^{***}$

Chl *a*: Clorofila *a*; Chl *b*: Clorofila *b*;  $\beta$ -carot.:  $\beta$ -carot eno; SM: Sin muestra

\*P < 0,05; \*\*P < 0,01; \*\*\*P < 0,001 (NS) valores no significativos, P > 0,05

**Tabla 7.** Concentraciones de pigmentos fotosintéticos (ppm) en extractos de fitoplancton, obtenidos por trampas. Estas fueron analizadas con HPLC fase reversa detectados a una longitud de onda de 450 nm con un detector UV-visible, a temperatura ambiente y con una gradiente modificada de solventes: a) acetonitrilo-metanol-buffer Tris HCL 0,1 M pH 8,0; b) metanol-acetato de etilo en los diferentes tiempos de exposición a los tratamientos de radiación. Los valores son promedio  $n= 3 \pm$  D.E. Se indican los resultados de un análisis de ANOVA de una vía para diferencias entre estaciones del año. Letras similares indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) según el test de Tukey HSD.

Estación del año	Profundidad	Concentración Pigmento (ppm)		
		Chl <i>a</i>	Chl <i>b</i>	$\beta$ -carot
Invierno	70 m	0,627 $\pm$ 0,078 a,c	0,349 $\pm$ 0,040 a,c	1,475 $\pm$ 1,317 a,c
Primavera	70 m	0,358 $\pm$ 0,068 a,b	0,163 $\pm$ 0,015 a,b	4,563 $\pm$ 1,342 a,b
Verano	70 m	0,198 $\pm$ 0,032 c	0,042 $\pm$ 0,015 c	4,459 $\pm$ 0,551 c
Otoño	70 m	0,134 $\pm$ 0,230 b	0,040 $\pm$ 0,223 b	1,662 $\pm$ 0,622 b

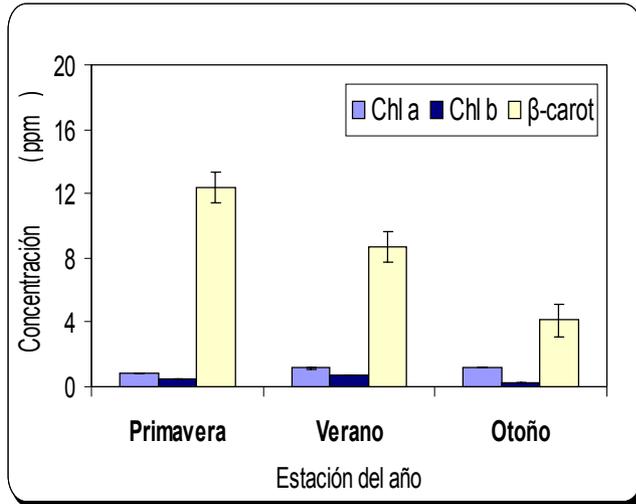
#### ANOVA

Mean SS	0,00211	0,00215	0,02041
Mean SS Error	0,00166	0,00092	0,01792
F <sub>(3,29)</sub>	12,3	22,7	11,01
p-level	$p < 0,001^{***}$	$p < 0,001^{***}$	$p < 0,001^{***}$

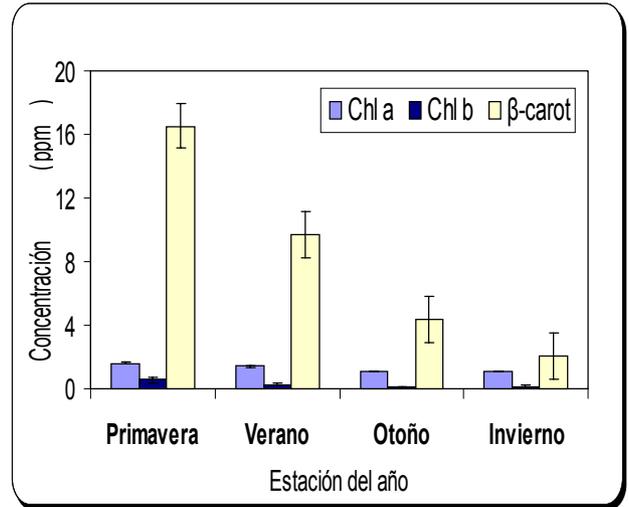
Chl *a*: Clorofila *a*; Chl *b*: Clorofila *b*;  $\beta$ -carot.:  $\beta$ -carot eno

\*P < 0,05; \*\*P < 0,01; \*\*\*P < 0,001 (NS) valores no significativos, P < 0,05

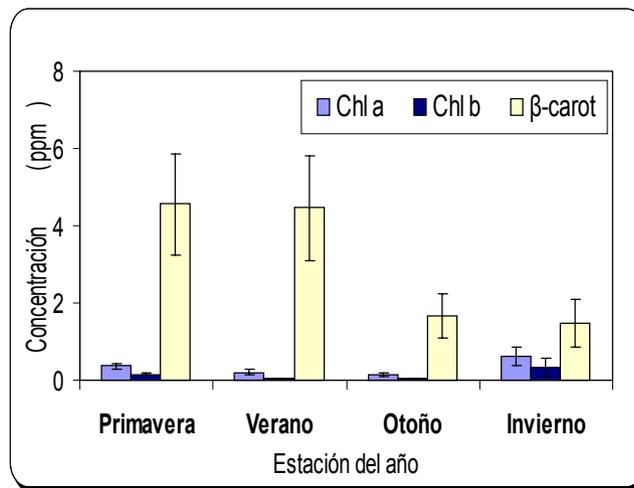
A)



B)

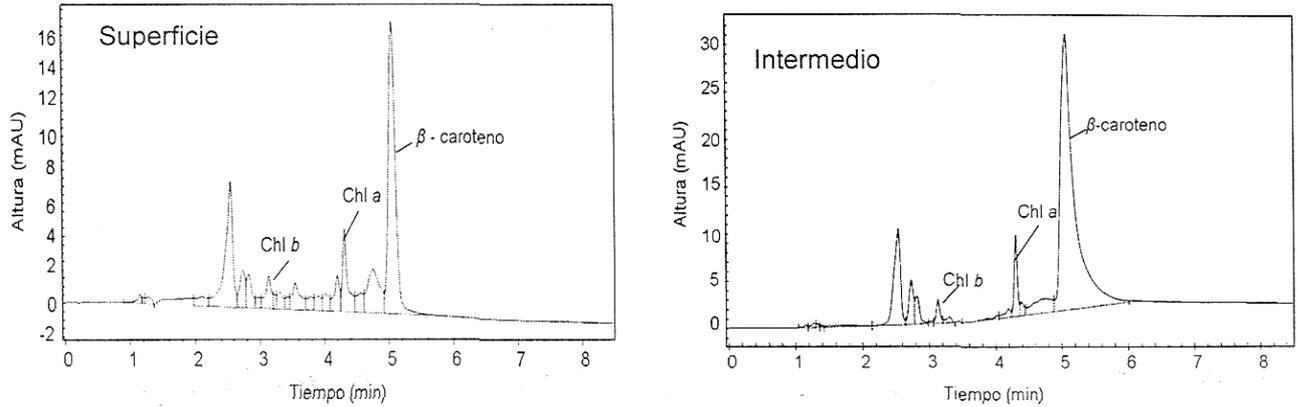


**Figura 19.** Concentraciones de pigmentos fotosintéticos medidas en extractos de fitoplancton mediante HPLC (Hewlett Packard serie 1100 Agilent) fase reversa, en muestras obtenidas por la botella Niskin. Profundidad en: A) superficie (0-5 m), B) intermedio (5-15 m). Las muestras fueron recolectadas durante las distintas estaciones del año. Los valores son promedio  $n = 3 \pm D.E.$

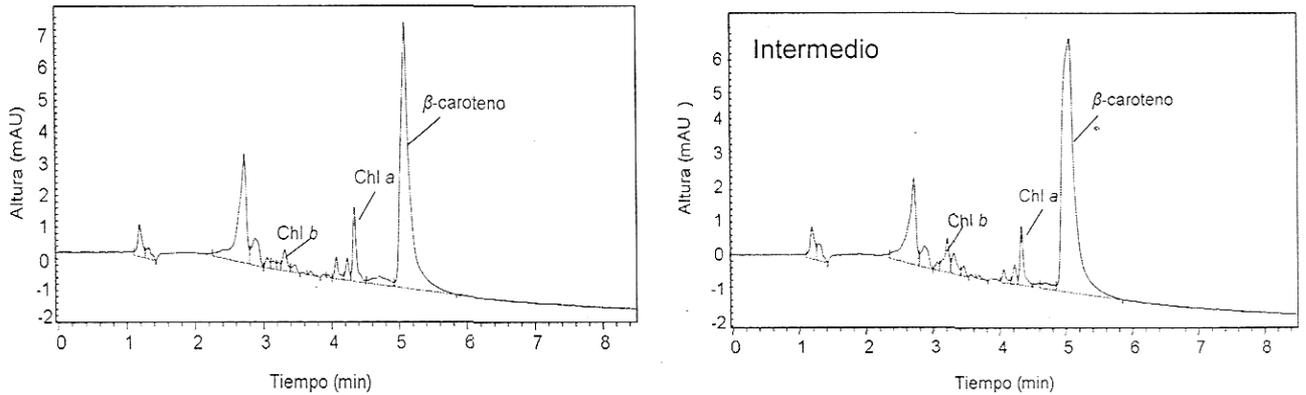


**Figura 20.** Concentraciones de pigmentos fotosintéticos medidas en extractos de fitoplancton mediante HPLC (Hewlett Packard serie 1100 Agilent) fase reversa, en muestras tomadas en trampas a una profundidad de 70 m. Las muestras fueron recolectadas durante las distintas estaciones del año. Los valores son promedio  $n = 3 \pm D.E.$

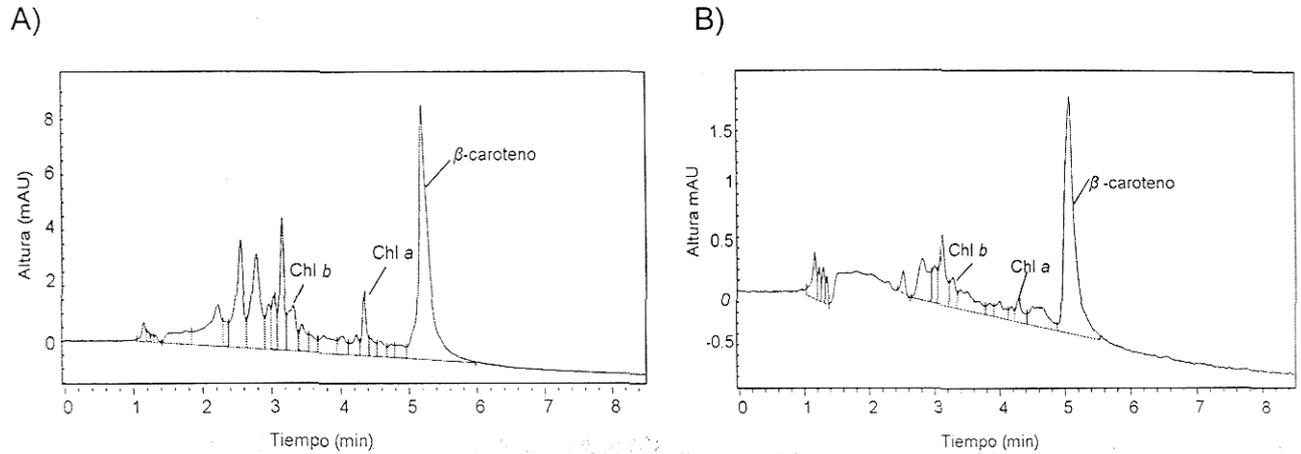
A)



B)



**Figura 21.** Cromatogramas de pigmentos fotosintéticos en extractos de fitoplancton, muestras obtenidas mediante botella Niskin analizados según profundidad y estación del año. A) Primavera; B) Otoño. Resuelto por HPLC (Hewlett Packard serie 1100 Agilent) fase reversa. Volumen de inyección de muestra 50  $\mu$ l a un flujo de 2,0 mL/min<sup>-1</sup>, controlado por una bomba peristáltica cuaternaria, longitud de onda de 450 nm con detector UV-visible, a temperatura ambiente.



**Figura 22:** Cromatogramas de pigmentos fotosintéticos en extractos de fitoplancton, muestras obtenidas mediante trampas a 70 m de profundidad, A) Primavera; B) Otoño. Resuelto por HPLC (Hewlett Packard serie 1100 Agilent) fase reversa. Volumen de inyección de muestra 50  $\mu\text{l}$  a un flujo de  $2,0 \text{ mL/min}^{-1}$ , controlado por una bomba peristáltica cuaternaria, longitud de onda de 450 nm con detector UV-visible, a temperatura ambiente.

## **4.2. Efecto de la radiación UV sobre los pigmentos fotosintéticos de macroalgas de la zona de Niebla.**

### **4.2.1. Espectrofotometría**

#### **4.2.1.1. Clorofila a y feopigmentos:**

Las concentraciones determinadas mediante el espectrofotómetro UV/visible (SCINCO) para la clorofila a (Chl a) y feopigmentos (Pheo). Se observó en el experimento del mes de Agosto los valores más altos en la macroalga *Ulva sp.* tanto en la concentración de Chl a y Pheo con (0,512 mg/gPS) (0,267 mg/gPS) en relación a *Gracilaria chilensis* con (0,095 mg/gPS) (0,029 mg/gPS), siendo ambas macroalgas tratadas con exposición a radiación ( $p < 0.05$ , ANOVA, test Tukey HSD; **Tabla 8a-9a**). Sin embargo, a las 24 h la Chl a aumento su concentración, no así los feopigmentos que disminuyeron (**Fig. 23**), al término del período de exposición a la radiación, se observó que las concentraciones de Chl a y Pheo tanto para el tratamiento UV-B como el PAR, disminuyeron en ambas macroalgas. En el caso del experimento realizado en Octubre se apreció el mismo comportamiento de la concentraciones de Chl a y Pheo, siendo estas mayores que las del mes de Agosto. Al inicio presentaron las Chl a y Pheo valores de (1,918 mg/gPS) (0,267 mg/gPS) para *Ulva* y *Gracilaria* (2,838 mg/gPS) (1,270 mg/gPS) respectivamente (**Fig. 24**). En *Ulva* se evidenció un aumento de la cantidad de Chl a a las 24 h, disminuyendo paulatinamente hasta el sexto día de exposición a la radiación en ambos tratamientos, la concentración de los Pheo al igual que la Chl a siguieron el mismo comportamiento. En el caso de *Gracilaria* se observó una tendencia similar en la variación de la concentración de Chl a y Pheo, siendo menor en relación a *Ulva* ( $p < 0,05$ ; **Tabla 8b-9b**).

**Tabla 8a.** Concentraciones de clorofilas y feopigmentos (mg/gPS) en extractos de macroalga *Ulva* sp. tratadas con radiación UV-B y PAR, en el mes de Agosto. Estas fueron determinadas según el método de Lorenzen (1967) por medio de espectrofotometría UV/Visible a 665 y 750 nm en los diferentes tiempos de exposición a los tratamientos de radiación. Los valores son promedio  $n= 3 \pm$  D.E. Se indican los resultados de un análisis de ANOVA de 2 Vías. Letras similares indican diferencias significativas ( $p<0,05$ ) según el test de Tukey HSD.

Estación	Tratamiento	Tiempo	Concentración Pigmento (mg/gPS)	
			Chl a	Pheo
Agosto	UV-B	Inicial	0,512± 0,040	0,267± 0,047
		6 h	0,382± 0,315	0,542± 0,230
		24 h	0,725± 0,176	0,225± 0,015
		48 h	0,454± 0,253	0,108± 0,011
		6 d	0,464± 0,256	0,104± 0,051
	PAR	Inicial	0,512± 0,040	0,267± 0,047
		6 h	0,757± 0,146	0,194± 0,032
		24 h	0,929± 0,224	0,110± 0,069
		48 h	0,735± 0,052	0,137± 0,020
		6 d	0,494± 0,247	0,103± 0,053

ANOVA 2 VÍAS	Pigmentos	Tratamiento	Tiempo	Trat *Tiempo
Mean SS	Chl a	0,00036	0,00050	0,0013
	Pheo	0,0050	0,00013	0,00115
F (1,20)	Chl a	6,2	2,2	0,6
	Pheo	6,2	2,2	0,6
p-level	Chl a			
	Pheo	p<0,001***	p<0,001***	p<0,001***

Chl a: Clorofila a; Pheo: Feopigmentos

\*P < 0,05; \*\*P < 0,01; \*\*\*P < 0,001 (NS) valores no significativos, P > 0,05

**Tabla 8b.** Concentraciones de clorofilas y feopigmentos (mg/gPS) en extractos de macroalga *Ulva* sp. tratadas con radiación UV-B y PAR, en el mes de Octubre. Estas fueron determinadas según el método de Lorenzen (1967) por medio de espectrofotometría UV/Visible a 665 y 750 nm en los diferentes tiempos de exposición a los tratamientos de radiación. Los valores son promedio  $n= 3 \pm$  D.E. Se indican los resultados de un análisis de ANOVA de 2 Vías. Letras similares indican diferencias significativas ( $p<0,05$ ) según el test de Tukey HSD.

Estación del año	Tratamiento	Tiempo	Concentración Pigmento (mg/gPS)	
			Chl a	Pheo
Octubre	UV-B	Inicial	1,918± 0,100	0,267 ±0,047
		6 h	1,227± 0,620	0,542± 0,230
		24 h	2,024± 1,236	0,225± 0,015
		48 h	0,784± 0,079	0,108± 0,011
		6 d	0,708± 0,204	0,104± 0,051
	PAR	Inicial	1,918± 0,400a	0,267± 0,047a
		6 h	1,773± 0,224	0,194± 0,032
		24 h	1,207± 0,347	0,110± 0,069
		48 h	0,748± 0,079	0,137± 0,020
		6 d	1,352± 0,143a	0,103± 0,053a
<b>ANOVA 2 VÍAS</b>				
Mean SS	Chl a	0,00001	0,00013	0,00129
	Pheo	0,00486	0,00129	0,00288
F <sub>(1,4)</sub>	Chl a	0,1	8,4	2,2
	Pheo	0,1	8,4	2,2
p-level	Chl a	p<0,001***	p<0,001***	p<0,001***
	Pheo	p<0,001***	p<0,001***	p<0,001***

Chl a: Clorofila a; Pheo: Feopigmentos

\*P < 0,05; \*\*P < 0,01; \*\*\*P < 0,001 (NS) valores no significativos, P > 0,05

**Tabla 9a.** Concentraciones de clorofilas y feopigmentos (mg/gPS) en extractos de macroalga *Gracilaria chilensis* tratadas con radiación UV-B y PAR, en el mes de Agosto. Estas fueron determinadas según el método de Lorenzen (1967) por medio de espectrofotometría UV/Visible a 665 y 750 nm en los diferentes tiempos de exposición a los tratamientos de radiación. Los valores son promedio  $n= 3 \pm$  D.E. Se indican los resultados de un análisis de ANOVA de 2 Vías. Letras similares indican diferencias significativas ( $p<0,05$ ) según el test de Tukey HSD.

Experimento	Tratamiento	Tiempo exposición	Concentración Pigmento (mg/gPS)	
			Chl a	Pheo
Agosto	UV-B	Inicial	0,095± 0,043a	0,029 ± 0,017a
		6 h	0,128± 0,049	0,009± 0,001
		24 h	0,169± 0,031	0,021± 0,018
		48 h	0,217± 0,045a	0,018± 0,017 a
		6 d	0,177± 0,019	0,006± 0,002
	PAR	Inicial	0,095± 0,043a,b	0,029 ± 0,017a,b
		6 h	0,287± 0,082	0,011± 0,002
		24 h	0,219± 0,027	0,009± 0,001
		48 h	0,212± 0,036b	0,002 ± 0,006b
		6 d	0,184± 0,019a	0,026 ± 0,018a
<b>ANOVA 2 VÍAS</b>				
Mean SS	Chl a	0,00008	0,00030	0,00016
	Pheo	0,00008	0,00030	0,00016
F (1,20)	Chl a	9	9	5
	Pheo	9	9	5
p-level	Chl a	$p<0,001^{***}$	$p<0,001^{***}$	$p<0,001^{***}$
	Pheo	$p<0,001^{***}$	$p<0,001^{***}$	$p<0,001^{***}$

Chl a: Clorofila a; Pheo: Feopigmentos

\*P < 0,05; \*\*P < 0,01; \*\*\*P < 0,001 (NS) valores no significativos, P > 0,05

**Tabla 9b.** Concentraciones de clorofila *a* y feopigmentos (mg/gPS) en extractos de macroalga *Gracilaria chilensis* tratadas con radiación UV-B y PAR, en el mes de Octubre. Estas fueron determinadas según el método de Lorenzen (1967) por medio de espectrofotometría UV/Visible a 665 y 750 nm en los diferentes tiempos de exposición a los tratamientos de radiación. Los valores son promedio  $n= 3 \pm$  D.E. Se indican los resultados de un análisis de ANOVA de 2 Vías. Letras similares indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) según el test de Tukey HSD.

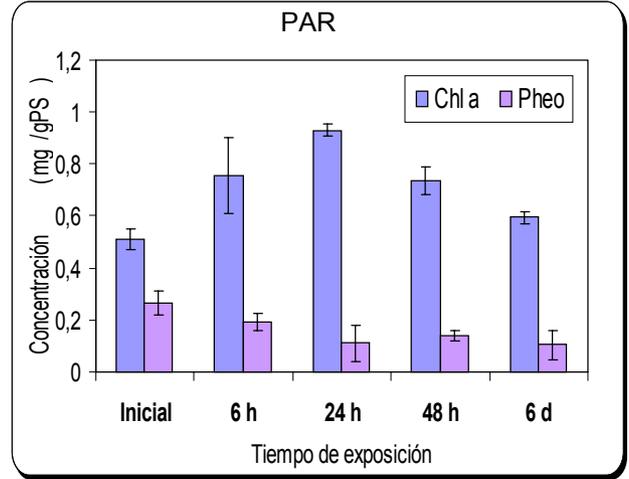
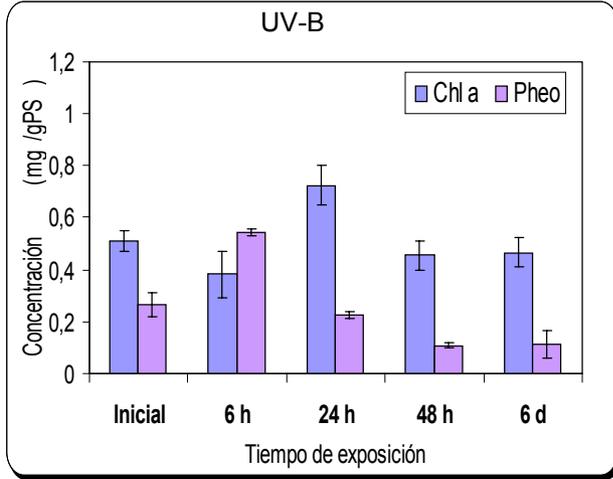
Experimento	Tratamiento	Tiempo exposición	Concentración Pigmento (mg/gPS)	
			Chl <i>a</i>	Pheo
Octubre	UV-B	Inicial	0,162± 0,011a	0,092± 0,020a
		6 h	0,191± 0,014	0,092± 0,016
		24 h	0,205± 0,020	0,062± 0,022
		48 h	0,169± 0,049	0,060± 0,038
		6 d	0,114± 0,011a	0,014 ± 0,011a
	PAR	Inicial	0,162± 0,011	0,092± 0,020
		6 h	0,170± 0,071	0,069± 0,087
		24 h	0,250± 0,250	0,064± 0,037
		48 h	0,230± 0,250	0,048± 0,030
		6 d	0,234± 0,234	0,021± 0,006

ANOVA 2 VÍAS	Pigmentos	Tratamiento	Tiempo	Trat * Tiempo
Mean SS	Chl <i>a</i>	0,00008	0,00020	0,00039
	Pheo	0,00008	0,00020	0,00039
F (1,20) 4,20	Chl <i>a</i>	16	10	18
	Pheo	16	10	18
p-level	Chl <i>a</i>	$p < 0,001^{***}$	$p < 0,001^{***}$	$p < 0,001^{***}$
	Pheo	$p < 0,001^{***}$	$p < 0,001^{***}$	$p < 0,001^{***}$

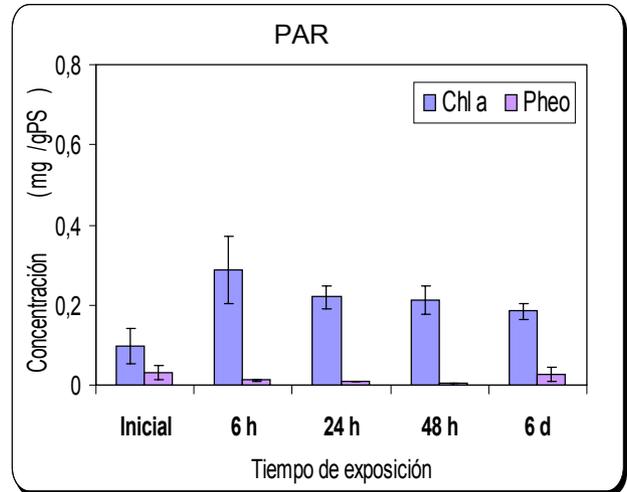
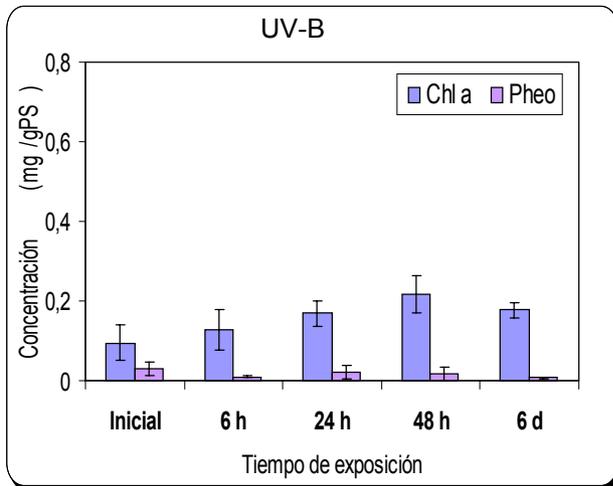
Chl *a*: Clorofila *a*; Pheo: Feopigmentos

\*P < 0,05; \*\*P < 0,01; \*\*\*P < 0,001 (NS) valores no significativos, P > 0,05

A)

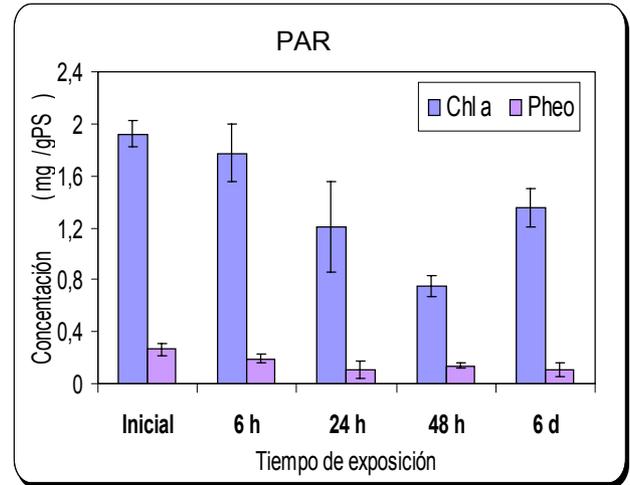
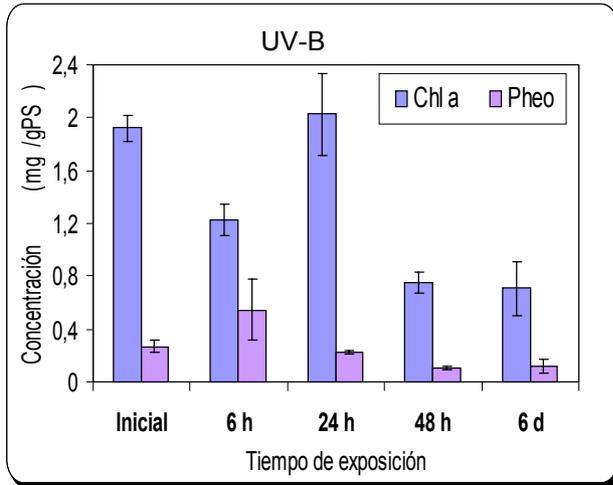


B)

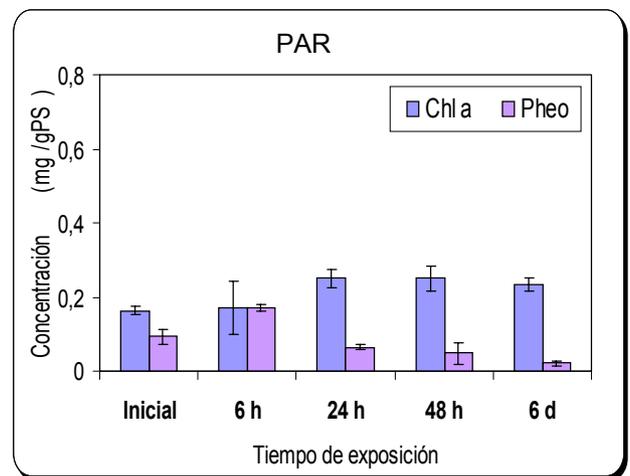
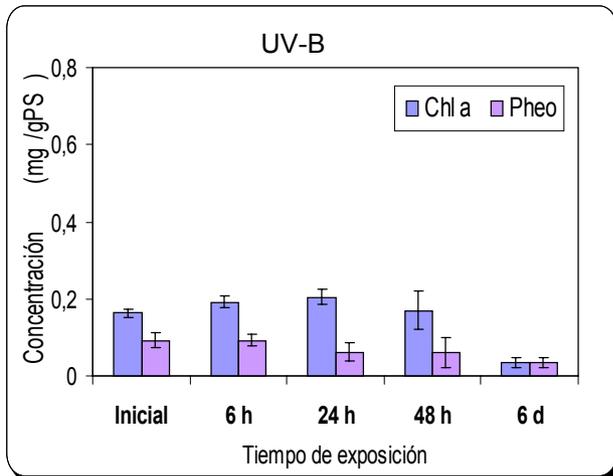


**Figura 23.** Concentraciones de clorofila a y feopigmentos medidas en extractos de macroalga, mediante el espectrofotómetro UV/Visible SCINCO. Las determinaciones fueron realizadas mediante exposición a tratamientos de radiación a distintos tiempo, siendo: A) UV-B y PAR en *Ulva sp.*, B) UV-B y PAR en *Gracilaria chilensis*. Las muestras fueron recolectadas en el mes de Agosto. Los valores son promedio  $n=3 \pm D.E.$

A)



B)



**Figura 24.** Concentraciones de clorofila a y feopigmentos medidas en extractos de macroalga, mediante el espectrofotómetro UV/Visible SCINCO. Las determinaciones fueron realizadas mediante exposición a tratamientos de radiación a distintos tiempo, siendo: A) UV-B y PAR en *Ulva sp.*, B) UV-B y PAR en *Gracilaria chilensis*. Las muestras fueron recolectadas en el mes de Octubre. Los valores son promedio  $n= 3 \pm D.E.$

#### 4.2.1.2. Clorofila a, b y carotenoides:

Las concentraciones obtenidas mediante el espectrofotómetro UV/visible (SCINCO) para los distintos pigmentos: clorofila *a* (Chl *a*), clorofila *b* (Chl *b*), y carotenoides. Se evidenció que las concentraciones de estos pigmentos variaron respecto al tiempo de exposición a la radiación que se les aplicó. En el experimento realizado en el mes de Agosto, la Chl *a* al inicio con un valor de (2,099 mg/L) presentó una mayor concentración *Ulva sp.* en relación a *Gracilaria chilensis* (0,703 mg/L), disminuyendo paulatinamente hasta el término de la exposición a la radiación (**Fig. 25**). La Chl *b* solo se presentó en la especie *Ulva* al ser esta una Chlorophyta, observándose una menor cantidad si se compara con la Chl *a*. Los carotenoides en *Ulva* presentaron un aumento a las 24 h (0,797 mg/L) de exposición, para luego disminuir gradualmente hasta el sexto día de exposición, manteniendo su concentración similar durante todo el período de exposición a la radiación. En el caso de *Gracilaria* los carotenoides no se evidenciaron grandes cambios en su concentración en los diferentes tiempos de exposición a la radiación. Este patrón se presentó en todos los pigmentos para ambos tratamientos tanto UV-B como PAR ( $p < 0.05$ , ANOVA, test Tukey HSD; **Tabla 10a-11a**). En el caso del experimento realizado en el mes de Octubre bajo las mismas condiciones del realizado en Agosto, quedo en evidencia una mayor concentración de los distintos pigmentos analizados en las dos especies de macroalgas, respecto al experimento realizado en Agosto. La cantidad de los pigmentos en *Ulva* tanto Chl *a*, Chl *b* y carotenoides se comportaron de la misma forma, presentando una mayor concentración al inicio (6,259 mg/L) la que fue disminuyendo gradualmente hasta el término de la exposición tanto en el tratamiento UV-B como PAR (**Fig. 26**). La concentración de la Chl *a* en la especie de *Gracilaria*, fue aumentando desde el inicio hasta las 48 h, para luego disminuir hasta el sexto día de exposición en ambos tratamientos (2,167; 3,047 mg/L) (UV-B y PAR). Los carotenoides no presentaron grandes cambios a medida que se le aumento el tiempo de exposición a la radiación, evidenciándose una concentración constante de este pigmento en ambos tratamientos mencionados anteriormente ( $p < 0,05$ ; **Tabla 10b-11b**).

**Tabla 10a.** Concentraciones de pigmentos fotosintéticos (mg/L) en extractos de macroalga *Ulva* sp. tratadas con radiación UV-B y PAR, en el mes de Agosto. Estas fueron determinadas según el método Strickland & Parson (1972) por medio de espectrofotometría UV/Visible a 480,510, 630, 647 y 664 nm en los diferentes tiempos de exposición a los tratamientos de radiación. Los valores son promedio  $n= 3 \pm$  D.E. Se indican los resultados de un análisis de ANOVA de 2 Vías. Letras similares indican diferencias significativas ( $p<0,05$ ) según el test de Tukey HSD.

Experimento	Tratamiento	Tiempo	Concentración (mg/L)		
			Chl a	Chl b	Carot.
Agosto	UV-B	Inicial	2,099± 0,127 a,b	1,310± 0,060a,b,c	0,740 ± 0,093a
		6 h	0,777± 0,179 <sup>a</sup>	0,377± 0,047 b	0,387± 0,188
		24 h	1,006± 0,093	0,143± 0,070	0,797± 0,157
		48 h	0,974± 0,174	0,208± 0,031 c	0,502± 0,194
		6 d	1,314± 0,121b	0,057± 0,037 a	0,516 ± 0,040a
	PAR	Inicial	2,099± 0,127	1,310± 0,060	0,740± 0,056
		6h	1,233± 0,330	0,072± 0,029	0,794 ± 0,144
		24 h	1,630± 0,162	0,019± 0,017	1,403 ± 0,284a
		48 h	1,423± 0,145	0,023± 0,015	0,903± 0,302
		6 d	1,317± 0,266	0,081± 0,070	0,610 ± 0,137a

ANOVA 2 VÍAS	Pigmentos	Tratamiento	Tiempo	Trat * Tiempo
Mean SS	Chl a	0,00080	0,00260	0,00035
	Chl b	0,00040	0,01071	0,00068
	Carot.	0,00122	0,00143	0,00063
F (1,20), 4,20	Chl a	6,7	5,4	0,7
	Chl b	69	46,1	2,9
	Carot.	27,6	8,1	3,6
p-level	Chl a	p<0,001***	p<0,001***	p<0,001***
	Chl b	p<0,001***	p<0,001***	p<0,001***
	Carot.	p<0,001***	p<0,001***	p<0,001***

Chl a: Clorofila a; Chl b: Clorofila b; Carot: carotenoides

\*P < 0,05; \*\*P < 0,01; \*\*\*P < 0,001 (NS) valores no significativos, P > 0,05

**Tabla 10b.** Concentraciones de pigmentos fotosintéticos (mg/L) en extractos de macroalga *Ulva* sp. tratadas con radiación UV-B y PAR, en el mes de Octubre. Estas fueron determinadas según el método Strickland & Parson (1972) por medio de espectrofotometría UV/Visible a 480,510, 630, 647 y 664 nm en los diferentes tiempos de exposición a los tratamientos de radiación. Los valores son promedio  $n= 3 \pm$  D.E. Se indican los resultados de un análisis de ANOVA de 2 Vías. Letras similares indican diferencias significativas ( $p<0,05$ ) según el test de Tukey HSD.

Experimento	Tratamiento	Tiempo	Concentración (mg/L)		
			Chl <i>a</i>	Chl <i>b</i>	Carot.
Octubre	UV-B	Inicial	6,259± 0,365	3,232± 0,281	3,076± 0,206
		6 h	5,713± 0,632	3,134± 0,473	2,347± 0,687
		24 h	5,059± 0,302a	3,121± 1,051a	1,830 ± 0,737a
		48 h	2,743 ± 0,277	1,623± 0,274	0,695± 0,051
		6 d	2,215± 0,573a	1,198± 0,104a	1,089± 0,586a
	PAR	Inicial	6,259± 0,365	3,232± 0,281a	3,076± 0,206a
		6h	5,783± 0,632	2,780± 0,367	2,784± 0,201
		24 h	3,335± 0,302a	1,434± 0,105	1,427± 0,137
		48 h	4,049± 0,277	1,912± 0,309	1,689± 0,270
		6 d	1,3751± 0,573a	0,804± 0,354a	0,54 ± 0,115a

ANOVA 2 VÍAS	Pigmentos	Tratamiento	Tiempo	Trat * Tiempo
Mean SS	Chl <i>a</i>	0,00060	0,01848	0,00187
	Chl <i>b</i>	0,00057	0,00848	0,00128
	Carot.	0,00112	0,01116	0,00185
F (1,20), 4,20	Chl <i>a</i>	4,8	30	3,0
	Chl <i>b</i>	7,8	29,0	4,4
	Carot.	22,4	19,2	3,2
p-level	Chl <i>a</i>	p<0,001***	p<0,001***	p<0,001***
	Chl <i>b</i>	p<0,001***	p<0,001***	p<0,001***
	Carot.	p<0,001***	p<0,001***	p<0,001***

Chl *a*: Clorofila a; Chl *b*: Clorofila b; Carot: carotenoides

\*P < 0,05; \*\*P < 0,01; \*\*\*P < 0,001 (NS) valores no significativos, P > 0,05

**Tabla 11a.** Concentraciones de pigmentos fotosintéticos (mg/L) en extractos de macroalga *Gracilaria chilensis* tratadas con radiación UV-B y PAR, en el mes de Agosto. Estas fueron determinadas según el método Strickland & Parson (1972) por medio de espectrofotometría UV/Visible a 480,510, 630, 647 y 664 nm en los diferentes tiempos de exposición a los tratamientos de radiación. Los valores son promedio  $n = 3 \pm D.E.$  Se indican los resultados de un análisis de ANOVA de 2 Vías. Letras similares indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) según el test de Tukey HSD.

Experimento	Tratamiento	Tiempo	Concentración (mg/L)	
			Chl a	Carot.
Agosto	UV-B	Inicial	0,703± 0,116	0,261± 0,085
		6 h	0,773± 0,171	0,319± 0,057
		24 h	1,249± 0,080	0,421± 0,080
		48 h	0,975± 0,087	0,473± 0,127
		6 d	1,177± 0,165	0,416± 0,072
	PAR	Inicial	0,703± 0,216 a	0,261± 0,085a
		6h	1,393± 0,263	0,476± 0,167
		24 h	1,633± 0,169a	0,227± 0,126a
		48 h	1,425± 0,145	0,363± 0,038
		6 d	1,318± 0,261	0,378± 0,054
<b>ANOVA 2 VÍAS</b>	<b>Pigmentos</b>	<b>Tratamiento</b>	<b>Tiempo</b>	<b>Trat * Tiempo</b>
Mean SS	Chl a	0,00068	0,0145	0,00037
	Carot.	0,00103	0,00103	0,00193
F (1,20), 4,20	Chl a	4,9	2,6	0,7
	Carot.	1,06	2,67	2,66
p-level	Chl a	p<0,001***	p<0,001***	p<0,001***
	Carot.	p<0,001***	p<0,001***	p<0,001***

Chl a: Clorofila a; Carot: carotenoides

\*P < 0,05; \*\*P < 0,01; \*\*\*P < 0,001 (NS) valores no significativos, P > 0,05

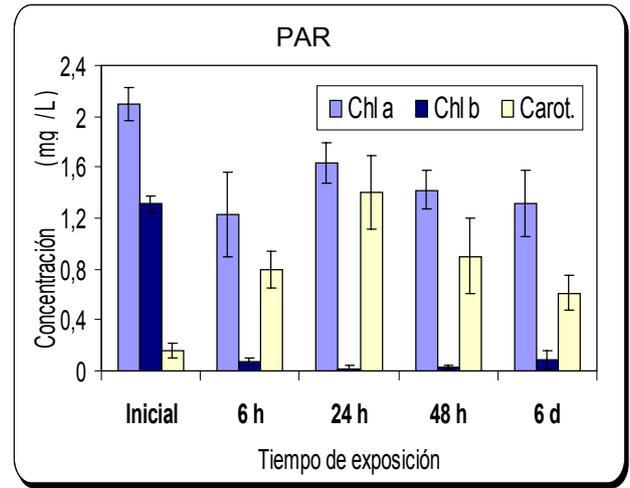
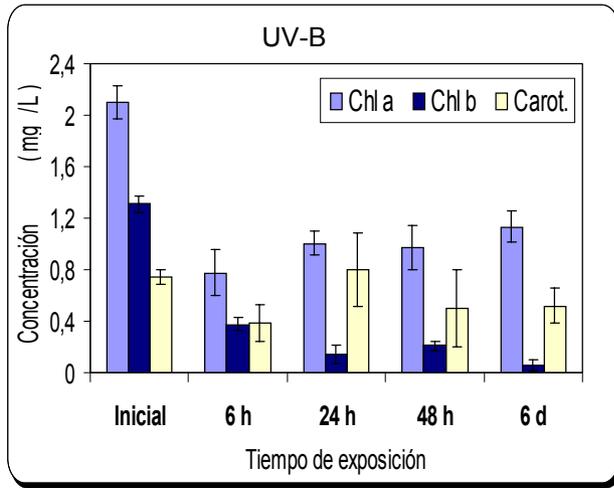
**Tabla 11b.** Concentraciones de pigmentos fotosintéticos (mg/L) en extractos de macroalga *Gracilaria chilensis* tratadas con radiación UV-B y PAR, en el mes de Octubre. Estas fueron determinados según el método Strickland & Parson (1972) por medio de espectrofotometría UV/Visible a 480,510, 630, 647 y 664 nm en los diferentes tiempos de exposición a los tratamientos de radiación. Los valores son promedio  $n = 3 \pm$  D.E. Se indican los resultados de un análisis de ANOVA de 2 Vías. Letras similares indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) según el test de Tukey HSD.

Estación	Tratamiento	Tiempo	Concentración (mg/L)	
			Chl a	Carot.
Octubre	UV-B	Inicial	2,838 $\pm$ 0,084a,b,c	1,270 $\pm$ 0,026 a,b,c
		6 h	3,291 $\pm$ 0,141	1,352 $\pm$ 0,057
		24 h	3,092 $\pm$ 0,276c	1,387 $\pm$ 0,131c
		48 h	3,175 $\pm$ 0,040b	1,445 $\pm$ 0,189b
		6 d	2,167 $\pm$ 0,224a	1,019 $\pm$ 0,053a
	PAR	Inicial	2,938 $\pm$ 0,084a,b,c	1,270 $\pm$ 0,026a,b,c
		6h	2,977 $\pm$ 0,373	1,292 $\pm$ 0,129
		24 h	3,355 $\pm$ 0,354c	1,552 $\pm$ 0,239 c
		48 h	2,855 $\pm$ 0,346b	1,264 $\pm$ 0,076b
		6 d	3,047 $\pm$ 0,296a	1,241 $\pm$ 0,096a
<b>ANOVA 2 VÍAS</b>	<b>Pigmentos</b>	<b>Tratamiento</b>	<b>Tiempo</b>	<b>Trat * Tiempo</b>
Mean SS	Chl a	0,00033	0,00044	0,00046
	Carot.	0,00050	0,00024	0,00010
F (1,20), 4,20	Chl a	2,1	4,3	4,5
	Carot.	1	7	3
p-level	Chl a	p<0,001***	p<0,001***	p<0,001***
	Carot.	p<0,001***	p<0,001***	p<0,001***

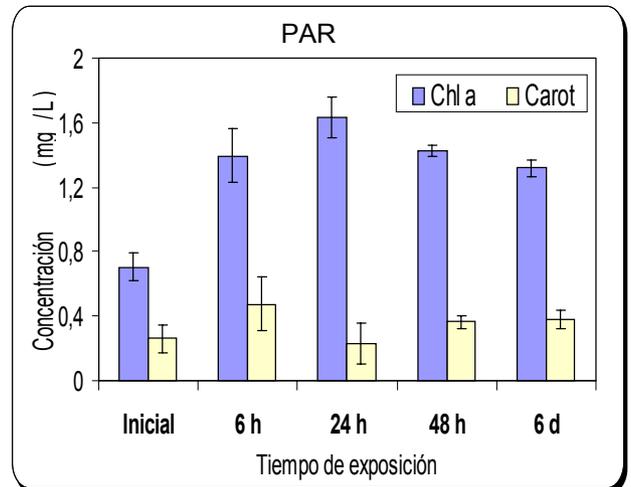
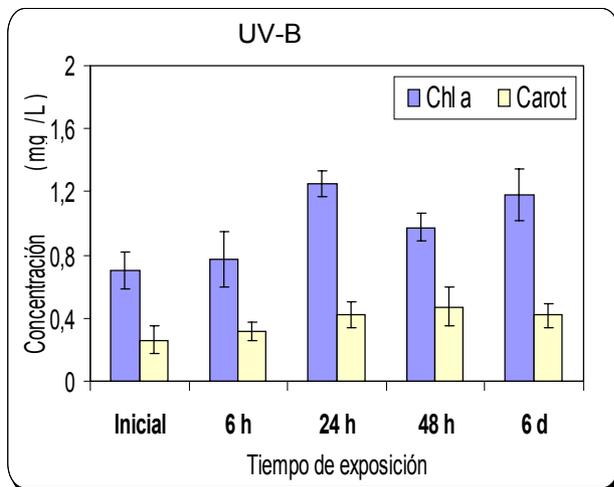
Chl a: Clorofila a; Carot: Carotenoides

\*P < 0,05; \*\*P < 0,01; \*\*\*P < 0,001 (NS) valores no significativos, P > 0,05

A)

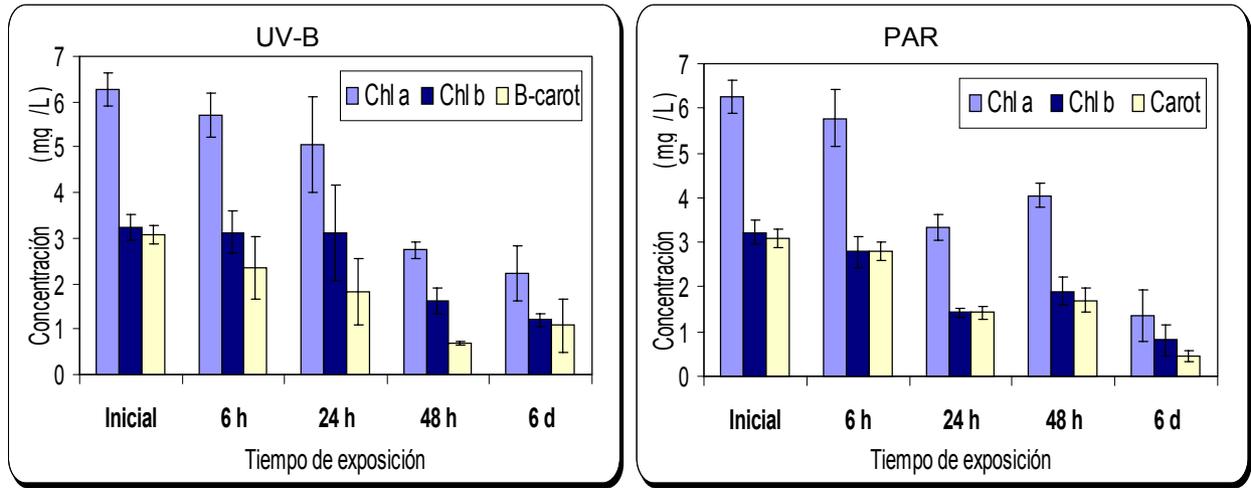


B)

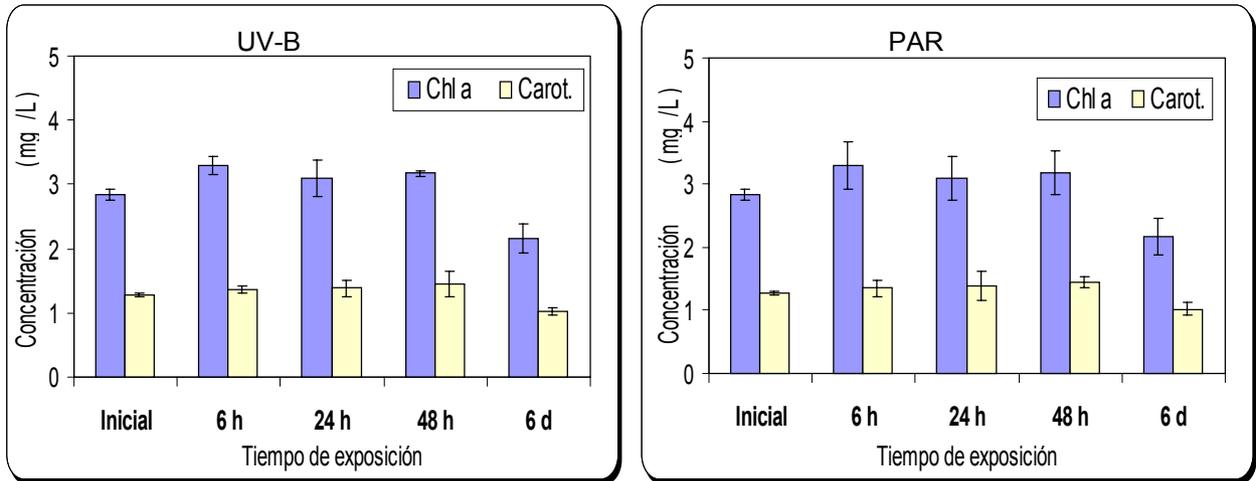


**Figura 25,** Concentraciones de clorofila *a*, *b* y carotenoides medidas en extractos de macroalga, mediante el espectrofotómetro UV/Visible SCINCO. Las determinaciones fueron realizadas mediante exposición a tratamientos de radiación a distintos tiempo, siendo: A) UV-B y PAR en *Ulva sp.*, B) UV-B y PAR en *Gracilaria chilensis*. Las muestras fueron recolectadas en el mes de Agosto. Los valores son promedio  $n=3 \pm D.E.$

A)



B)



**Figura 26.** Concentraciones de clorofila *a*, *b* y carotenoides medidas en extractos de macroalga, mediante el espectrofotómetro UV/Visible SCINCO. Las determinaciones fueron realizadas mediante exposición a tratamientos de radiación a distintos tiempo, siendo: A) UV-B y PAR en *Ulva sp.*, B) UV-B y PAR en *Gracilaria chilensis*. Las muestras fueron recolectadas en el mes de Octubre. Los valores son promedio  $n = 3 \pm D.E.$

#### 4.2.1.3. Ficobiliproteínas:

Las concentraciones obtenidas de las ficobiliproteínas, presentes en la división Rodophyta (algas rojas), donde se analizó la ficoeritrina (R-PE) de la macroalga *Gracilaria chilensis*, la cual fue expuesta a diferentes tratamiento de radiación. Se evidenció en experimento realizado en el mes Agosto la concentración de ficoeritrina en las algas tratadas con UV-B desde el inicio de la exposición disminuyó paulatinamente hasta las 24 h, aumentando a las 48 h de 0,076 a 0,150 mg/gPS, para luego disminuir hasta el 6 d de exposición a la radiación, observándose un aumento de 0,076 a 0,185 mg/gPS de la concentración de la R-PE en las algas irradiadas solo con PAR, a las 48 h, disminuyendo también al 6 d de exposición ( $p < 0.05$ , ANOVA, Tukey HSD test; **Tabla 12a**). Es decir en el tratamiento UV-B aumentó 0,074 veces y con PAR 0,109; se puede decir que hay diferencia entre ambos tratamientos, observándose una disminución drástica de la concentración de la ficoeritrina debido al exceso de UV-B. En el caso del experimento del mes de Octubre realizado bajo las mismas condiciones que el del mes de Agosto (**Fig. 27**). Se evidenció un aumento de la concentración de R-PE desde el inicio de la exposición a la radiación en ambos tratamientos, a las 48 h en el tratamiento UV-B aumento de 0,106 a 1,171 mg/gPS, en cambio en el tratamiento solo con PAR de 0,106 a 0,157 mg/gPS. Al comparar ambos tratamientos de radiación a la que fueron sometidas las algas se observa un mayor aumento en UV-B con 0,065 veces respecto a la irradiación con PAR de 0,051( $p < 0,05$ ; **Tabla 12b**), al 6 d de exposición se evidenció una drástica disminución de la concentración de R-PE en el tratamiento UV-B y un aumento en el tratamiento PAR, concordando con lo observado en el experimento del mes de Agosto.

**Tabla 12a.** Determinación de la concentración de ficoeritrina (mg/gPS) por el método de Beer & Eschel (1985), en extractos de macroalga *Gracilaria chilensis*, tratadas con radiación UV-B y PAR, en el mes de Agosto, por medio de espectrofotometría UV/Visible a 455, 564 y 592 nm en los diferentes tiempos de exposición a los tratamientos de radiación. Los valores son promedio  $n= 3 \pm$  D.E. Se indican los resultados de un análisis de ANOVA de 2 Vías. Letras similares indican diferencias significativas ( $p<0,05$ ) según el test de Tukey HSD.

Experimento	Tratamiento exposición	Tiempo	Concentración Pigmento (mg/gPS) R-PE
Agosto	UV-B	Inicial	0,076 $\pm$ 0,021
		6 h	0,051 $\pm$ 0,019
		24 h	0,038 $\pm$ 0,013
		48 h	0,150 $\pm$ 0,021
		6 d	0,023 $\pm$ 0,009
	PAR	Inicial	0,076 $\pm$ 0,021a,b,c
		6 h	0,183 $\pm$ 0,037a
		24 h	0,186 $\pm$ 0,020b
		48 h	0,185 $\pm$ 0,039c
		6 d	0,126 $\pm$ 0,024
<b>ANOVA 2 VÍAS</b>			
	<b>Tratamiento</b>	<b>Tiempo</b>	<b>Trat * Tiempo</b>
Mean SS	0,00046	0,00028	0,00022
F (1,20), 4,20	56	9	7
p-level	$p<0,001^{***}$	$p<0,001^{***}$	$p<0,001^{***}$

R-PE: R-Ficoeritrina

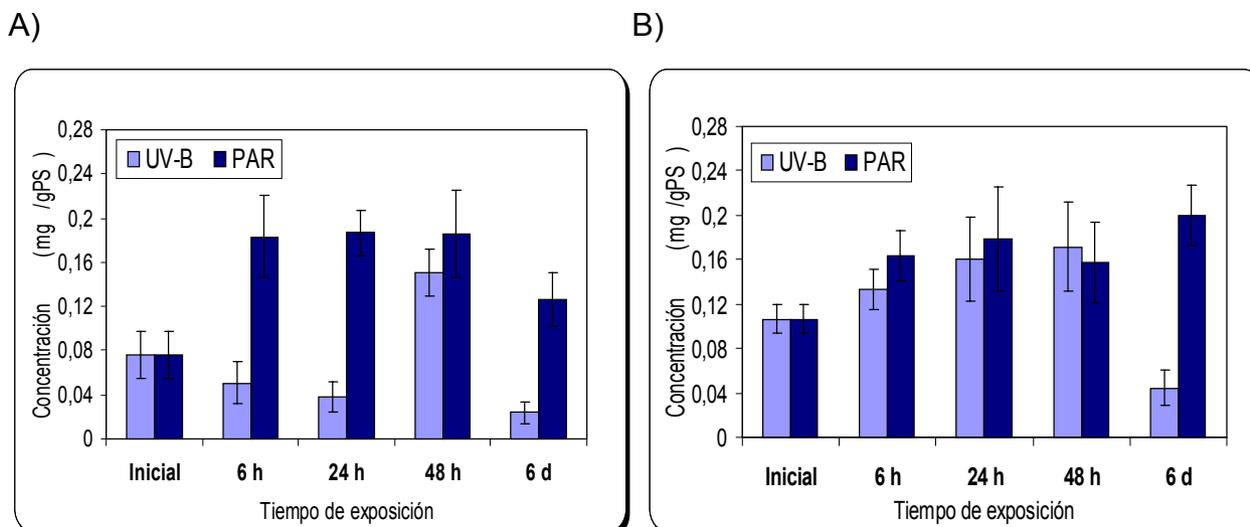
\*P < 0,05; \*\*P < 0,01; \*\*\*P < 0,001\*\*\* (NS) valores no significativos, P > 0,05

**Tabla 12b.** Determinación de la concentración de ficoeritrina (mg/gPS) por el método de Beer & Eschel (1985), en extractos de macroalga *Gracilaria chilensis*, tratadas con radiación UV-B y PAR, en el mes de Octubre, por medio de espectrofotometría UV/Visible a 455, 564 y 592 nm en los diferentes tiempos de exposición a los tratamientos de radiación. Los valores son promedio  $n= 3 \pm$  D.E. Se indican los resultados de un análisis de ANOVA de 2 Vías. Letras similares indican diferencias significativas ( $p<0,05$ ) según el test de Tukey HSD.

Experimento	Tratamiento exposición	Tiempo	Concentración Pigmento (mg/gPS) R-PE
Octubre	UV-B	Inicial	0,106± 0,106
		6 h	0,133± 0,133
		24 h	0,160± 0,160
		48 h	0,171± 0,171
		6 d	0,044± 0,044
	PAR	Inicial	0,106± 0,012
		6 h	0,163± 0,022
		24 h	0,178± 0,047
		48 h	0,157± 0,036
		6 d	0,199± 0,027
<b>ANOVA 2 VÍAS</b>			
	<b>Tratamiento</b>	<b>Tiempo</b>	<b>Trat * Tiempo</b>
Mean SS	0,00048	0,00012	0,00022
F (1,20), 4,20	6	2	4
p-level	$p<0,05^*$	$p<0,05^*$	$p<0,05^*$

R-PE: R- Ficoeritrina

\*P < 0,05; \*\*P < 0,01; \*\*\*P < 0,001 (NS) valores no significativos, P > 0,05



**Figura 27.** Concentraciones de ficoeritrina (R-PE) en extractos de macroalga *Gracilaria chilensis* obtenidas, mediante el espectrofotómetro UV/Visible SCINCO. Las determinaciones fueron realizadas mediante exposición a tratamientos de radiación (UV-B y PAR) a distintos tiempos. A) experimento del mes de Agosto, B) experimento del mes de Octubre. Los valores son promedio  $n = 3 \pm D.E.$

### 4.3.2. HPLC

#### 4.3.2.1. Pigmentos fotosintéticos en las macroalgas:

Las concentraciones obtenidas para los distintos pigmentos fotosintéticos analizados en ambas especies de macroalgas mediante la técnica de RP-HPLC a través de los cromatogramas (**Fig. 30-31**), presentaron una variación según los distintos tiempos de exposición a la radiación. En el experimento realizado en el mes de Agosto se observó los contenidos de Chl *a* al inicio son mayores en la especie de *Ulva sp.* (5,608 mg/gPS) en relación a *Gracilaria chilensis* (0,897 mg/gPS). En el caso de la Chl *b* presente solo en *Ulva* se observó menor concentración con (0,777 mg/gPS) respecto a la Chl *a*. La concentración de  $\beta$ -caroteno es similar en ambas especies (31,983 mg/gPS) (32,268 mg/gPS) para *Ulva* y *Gracilaria* respectivamente, a las pocas horas de exposición mantuvo una concentración similar (**Fig. 28**), para luego aumentar al sexto día de exposición a la radiación en una mayor proporción las muestras tratadas con UV-B en exceso respecto a

aquellas muestras tratadas solo con PAR para la especie *Ulva* (81,656 mg/gPS) (47,206 mg/gPS), en el caso de *Gracilaria* no presentó un aumento considerable respecto a su concentración inicial siendo estas (27,802 mg/gPS) en UV-B y (13,881 mg/gPS) en PAR. Cabe destacar que en la especie de *Ulva* a las 6 h de exposición a la radiación en PAR ocurrió un aumento excesivo en la producción de  $\beta$ -caroteno presentado un valor de (117,592 mg/gPS), lo cual se pudo deber a una fotoaclimatación del alga al exceso de radiación ( $p < 0.05$ , ANOVA, test Tukey HSD; **Tabla 13a-14a**). En el caso del experimento realizado en el mes de Octubre se evidenció lo opuesto al realizado en Agosto, los contenidos de Chl *a* aumentaron en la especie de *Ulva*, siendo (14,445 mg/gPS), en el caso de *Gracilaria* se mantuvo prácticamente igual que en el experimento de agosto con una concentración de (0,874 mg/gPS). La Chl *b* siguió la misma tendencia que la Chl *a* aumentado su contenido en (3,053 mg/gPS) (**Fig. 29**). Respecto al  $\beta$ -caroteno se apreció una mayor concentración al inicio de la exposición a la radiación (12,088 mg/gPS) (6,526 mg/gPS) para ambas microalgas, *Ulva* y *Gracilaria* respectivamente ( $p < 0,05$ ; **Tabla 13a-14b**), el cual fue disminuyendo gradualmente hasta el sexto día, evidenciándose un aumento debido al estrés UV-B respecto a PAR. Se aprecia que la concentración del  $\beta$ -caroteno difiere drásticamente en ambos experimentos.

**Tabla 13a.** Concentraciones de pigmentos fotosintéticos (mg/gPS) en extractos de macroalga *Ulva sp.* tratadas con radiación UV-B y PAR, en el mes de Agosto. Estas fueron analizadas con HPLC fase reversa detectados a una longitud de onda de 450 nm con un detector UV/visible, a temperatura ambiente y con una gradiente modificada de solventes: a) acetonitrilo-metanol-buffer Tris HCL 0,1 M pH 8,0 b) metanol-acetato de etilo. Los valores son promedio  $n= 3 \pm$  D.E. Se indican los resultados de un análisis de ANOVA de 2 Vías. Letras similares indican diferencias significativas ( $p<0,05$ ) según el test de Tukey HSD.

Especie	Tratamiento	Tiempo exposición	Concentración (mg/gPS)		
			Chl <i>a</i>	Chl <i>b</i>	$\beta$ -carot
Agosto	UV-B	Inicial	5,608 $\pm$ 1,171	0,777 $\pm$ 0,185	31,983 $\pm$ 0,262
		6 h	5,021 $\pm$ 1,011	0,787 $\pm$ 0,212	17,143 $\pm$ 1,148
		24 h	6,677 $\pm$ 1,119	0,991 $\pm$ 0,173	22,537 $\pm$ 0,620
		48 h	4,886 $\pm$ 1,114	0,934 $\pm$ 0,344	24,105 $\pm$ 0,792
		6 d	5,152 $\pm$ 0,632	0,780 $\pm$ 0,208	81,656 $\pm$ 9,136
	PAR	Inicial	5,608 $\pm$ 1,171a	0,777 $\pm$ 0,185a	31,983 $\pm$ 0,262
		6 h	6,648 $\pm$ 1,018	0,897 $\pm$ 0,147	117,592 $\pm$ 2,758
		24 h	11,682 $\pm$ 3,238	2,590 $\pm$ 0,705	26,294 $\pm$ 4,230
		48 h	7,626 $\pm$ 0,890	1,270 $\pm$ 0,315	52,244 $\pm$ 3,607
		6 d	6,110 $\pm$ 0,585a	0,288 $\pm$ 0,191a	47,206 $\pm$ 2,812
<b>ANOVA 2 VÍAS</b>					
Mean SS	Chl <i>a</i>	0,00594	0,00901	0,00323	
	Chl <i>b</i>	0,00594	0,00901	0,00323	
	$\beta$ -carot	0,00594	0,00901	0,00323	
F (1,20),4,20	Chl <i>a</i>	17,79	6,75	2,42	
	Chl <i>b</i>	17,79	6,75	2,42	
	$\beta$ -carot	17,79	6,75	2,42	
p-level	Chl <i>a</i>	$p<0,001^{***}$	$p<0,001^{***}$	$p<0,001^{***}$	
	Chl <i>b</i>	$p<0,001^{***}$	$p<0,001^{***}$	$p<0,001^{***}$	
	$\beta$ -carot	$p<0,001^{***}$	$p<0,001^{***}$	$p<0,001^{***}$	

Chl *a*: Clorofila a; Chl *b*: Clorofila b;  $\beta$ -carot:  $\beta$ -caroteno

\*P < 0,05; \*\*P < 0,01; \*\*\*P < 0,001 (NS) valores no significativos, P > 0,05

**Tabla 13b.** Concentraciones de pigmentos fotosintéticos (mg/gPS) en extractos de macroalga *Ulva sp* tratadas con radiación UV-B y PAR, en el mes de Octubre. Estas fueron analizadas con HPLC fase reversa detectados a una longitud de onda de 450 nm con un detector UV/visible, a temperatura ambiente y con una gradiente modificada de solventes: a) acetonitrilo-metanol-buffer Tris HCL 0,1 M pH 8,0 b) metanol-acetato de etilo. Los valores son promedio  $n= 3 \pm$  D.E. Se indican los resultados de un análisis de ANOVA de 2 Vías. Letras similares indican diferencias significativas ( $p<0,05$ ) según el test de Tukey HSD.

Especie	Tratamiento	Tiempo de exposición	Concentración (mg/gPS)		
			Chl a	Chl b	$\beta$ -carot
Octubre	UV-B	Inicial	14,445 $\pm$ 0,971a,b,c	3,053 $\pm$ 0,146a,b,c	12,088 $\pm$ 0,521a
		6 h	15,430 $\pm$ 2,750	2,883 $\pm$ 0,721	12,505 $\pm$ 1,635
		24 h	9,5218 $\pm$ 1,615a	1,266 $\pm$ 0,195a	2,208 $\pm$ 0,199
		48 h	7,0171 $\pm$ 1,219b	0,9482 $\pm$ 0,166b	1,262 $\pm$ 0,018a
		6 d	5,4481 $\pm$ 0,937c	1,1595 $\pm$ 0,581c	2,383 $\pm$ 1,092
	PAR	Inicial	14,445 $\pm$ 0,097a,b,c	3,053 $\pm$ 0,146a,b,c	12,088 $\pm$ 0,521a
		6 h	13,361 $\pm$ 0,860	3,149 $\pm$ 0,073	11,063 $\pm$ 0,476a
		24 h	6,5199 $\pm$ 0,488a	1,337 $\pm$ 0,114 a	4,233 $\pm$ 0,819
		48 h	9,1632 $\pm$ 0,100b	1,951 $\pm$ 0,101b	6,762 $\pm$ 0,936
		6 d	3,8532 $\pm$ 0,842c	0,501 $\pm$ 0,107c	7,245 $\pm$ 0,239

ANOVA 2 VÍAS	Pigmentos	Tratamiento	Tiempo	Trat * Tiempo
Mean SS	Chl a	0,00066	0,04412	0,00275
	Chl b	0,00066	0,04412	0,00275
	$\beta$ -carot	0,00224	0,03188	0,00382
F (1,20),4,20	Chl a	4,5	75,9	4,7
	Chl b	4,9	75,9	4,7
	$\beta$ -carot	2,84	10,10	1,21
p-level	Chl a	$p<0,001^{***}$	$p<0,001^{***}$	$p<0,001^{***}$
	Chl b	$p<0,001^{***}$	$p<0,001^{***}$	$p<0,001^{***}$
	$\beta$ -carot	$p<0,001^{***}$	$p<0,001^{***}$	$p<0,001^{***}$

Chl a: Clorofila a; Chl b: Clorofila b;  $\beta$ -carot:  $\beta$ -caroteno

\*P < 0,05; \*\*P < 0,01; \*\*\*P < 0,001 (NS) valores no significativos, P > 0,05

**Tabla 14a.** Concentraciones de pigmentos fotosintéticos (mg/gPS) en extractos de macroalga *Gracilaria chilensis* tratadas con radiación UV-B y PAR, en el mes de Agosto. Estas fueron analizadas con HPLC fase reversa detectados a una longitud de onda de 450 nm con un detector UV/visible, a temperatura ambiente y con una gradiente modificada de solventes: a) acetonitrilo-metanol-buffer Tris HCL 0,1 M pH 8,0 b) metanol-acetato de etilo. Los valores son promedio  $n= 3 \pm$  D.E. Se indican los resultados de un análisis de ANOVA de 2 Vías. Letras similares indican diferencias significativas ( $p<0,05$ ) según el test de Tukey HSD.

Estación	Tratamiento	Tiempo exposición	Concentración (mg/gPS)	
			Chl a	$\beta$ -carot
Agosto	UV-B	Inicial	0,897 $\pm$ 0,057a,b	32,268 $\pm$ 0,538 a,b
		6 h	0,723 $\pm$ 0,020b	30,675 $\pm$ 1,968b
		24 h	0,824 $\pm$ 0,096	25,496 $\pm$ 2,744
		48 h	1,031 $\pm$ 0,020	15,102 $\pm$ 0,370
		6 d	0,627 $\pm$ 0,033a	27,802 $\pm$ 1,580a
	PAR	Inicial	0,897 $\pm$ 0,057a,b	32,268 $\pm$ 0,538a,b
		6 h	0,745 $\pm$ 0,048	22,221 $\pm$ 2,707b
		24 h	1,020 $\pm$ 0,009	16,316 $\pm$ 0,640
		48 h	1,126 $\pm$ 0,106	15,173 $\pm$ 0,595
		6 d	0,665 $\pm$ 0,107a	13,881 $\pm$ 1,972a

ANOVA 2 VÍAS	Pigmentos	Tratamiento	Tiempo	Trat * Tiempo
Mean SS	Chl a	0,00008	0,00175	0,00008
	$\beta$ -carot	0,00008	0,00175	0,00008
F (1,20),4,20	Chl a	9	47	2
	$\beta$ -carot	9	47	2
p-level	Chl a	p<0,001***	p<0,001***	p<0,001***
	$\beta$ -carot	p<0,001***	p<0,001***	p<0,001***

Chl a: Clorofila a;  $\beta$ -carot:  $\beta$ -caroteno

\*P < 0,05; \*\*P < 0,01; \*\*\*P < 0,001 (NS) valores no significativos, P > 0,05

**Tabla 14b.** Concentraciones de pigmentos fotosintéticos (mg/gPS) en extractos de macroalga *Gracilaria chilensis* tratadas con radiación UV-B y PAR, en el mes de Octubre. Estas fueron analizadas con HPLC fase reversa detectados a una longitud de onda de 450 nm con un detector UV/visible, a temperatura ambiente y con una gradiente modificada de solventes: a) acetonitrilo-metanol-buffer Tris HCL 0,1 M pH 8,0 b) metanol-acetato de etilo. Los valores son promedio  $n= 3 \pm$  D.E. Se indican los resultados de un análisis de ANOVA de 2 Vías. Letras similares indican diferencias significativas ( $p<0,05$ ) según el test de Tukey HSD.

Estación	Tratamiento	Tiempo exposición	Concentración (mg/gPS)	
			Chl a	$\beta$ -carot
Octubre	UV-B	Inicial	0,874 $\pm$ 0,115a,b,c	6,526 $\pm$ 0,263a,b
		6 h	0,574 $\pm$ 0,041	5,230 $\pm$ 0,738
		24 h	0,369 $\pm$ 0,046c	2,393 $\pm$ 0,256
		48 h	0,414 $\pm$ 0,082b	0,940 $\pm$ 0,163b
		6 d	0,157 $\pm$ 0,061a	0,709 $\pm$ 0,046a
	PAR	Inicial	0,874 $\pm$ 0,115a,b	6,526 $\pm$ 0,263a,b
		6 h	0,502 $\pm$ 0,026	1,207 $\pm$ 0,296
		24 h	0,501 $\pm$ 0,026	1,137 $\pm$ 0,100
		48 h	0,416 $\pm$ 0,031b	1,793 $\pm$ 0,319b
		6 d	0,306 $\pm$ 0,014a	4,059 $\pm$ 0,226a

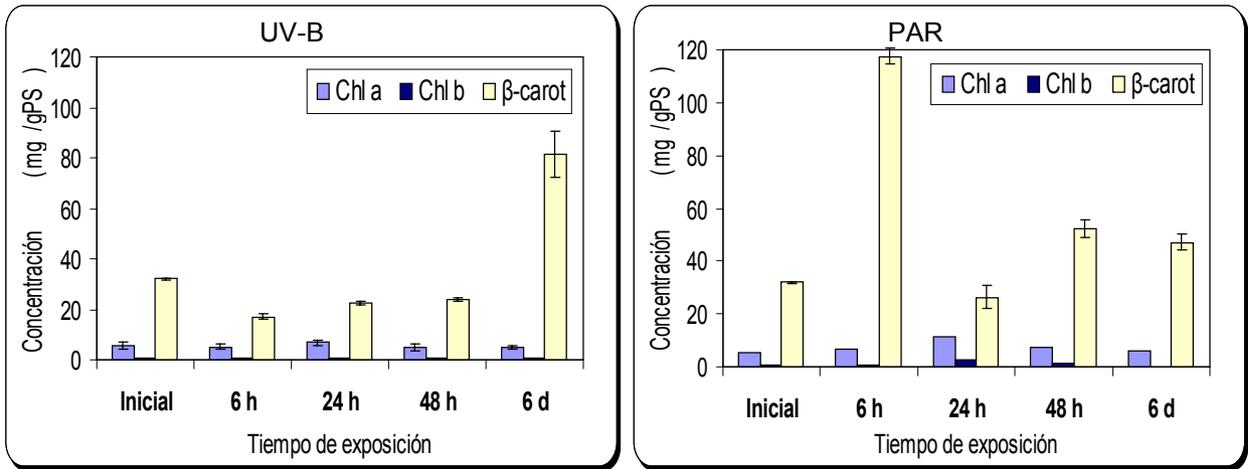
  

ANOVA 2 VÍAS	Pigmentos	Tratamiento	Tiempo	Trat * Tiempo
Mean SS	Chl a	0,00007	0,00202	0,00021
	$\beta$ -carot	0,00007	0,00202	0,00021
F (1,20), 4,20	Chl a	10	72	7
	$\beta$ -carot	10	72	7
p-level	Chl a	p<0,001***	p<0,001***	p<0,001***
	$\beta$ -carot	p<0,001***	p<0,001***	p<0,001***

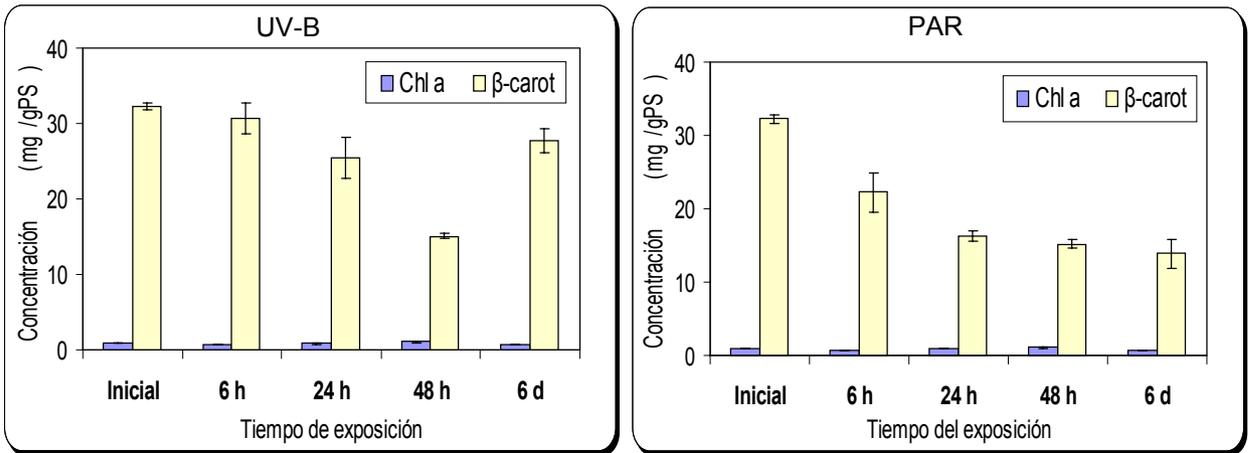
Chl a: Clorofila a;  $\beta$ -carot:  $\beta$ -caroteno.

\*P < 0,05; \*\*P < 0,01; \*\*\*P < 0,001 (NS) valores no significativos, P < 0,05

A)

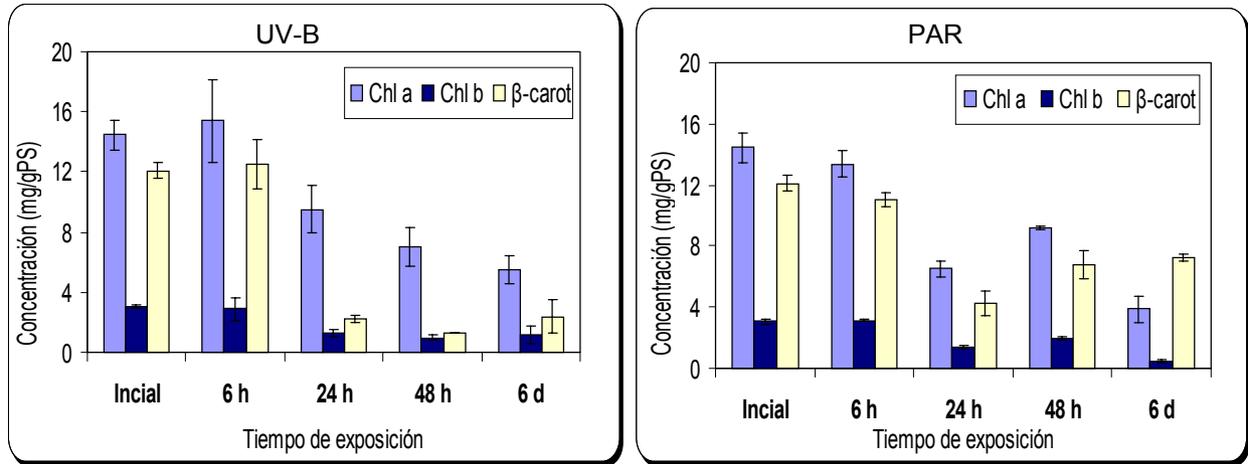


B)

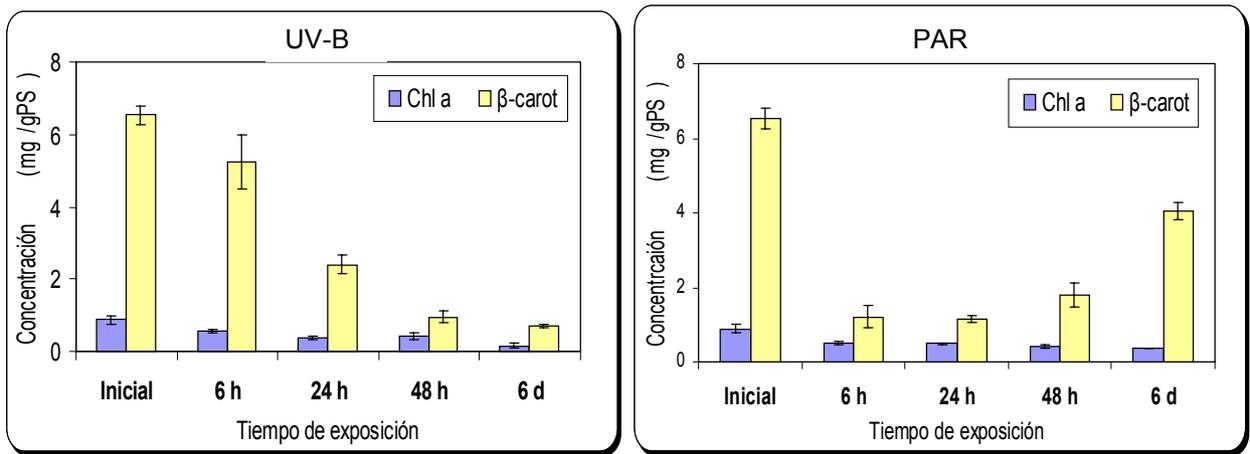


**Figura 28.** Concentraciones de pigmentos fotosintéticos medidas en extractos de macroalga, en 30 mg de muestra peso seco, según los tratamientos de radiación. En análisis se realizó mediante HPLC (Hewlett Packard serie 1100 Agilent) fase reversa. A) UV-B y PAR en *Ulva sp.* B) UV-B y PAR en *Gracilaria chilensis*. Las muestras fueron recolectadas en el mes de Agosto. Los valores son promedio  $n= 3 \pm D.E.$

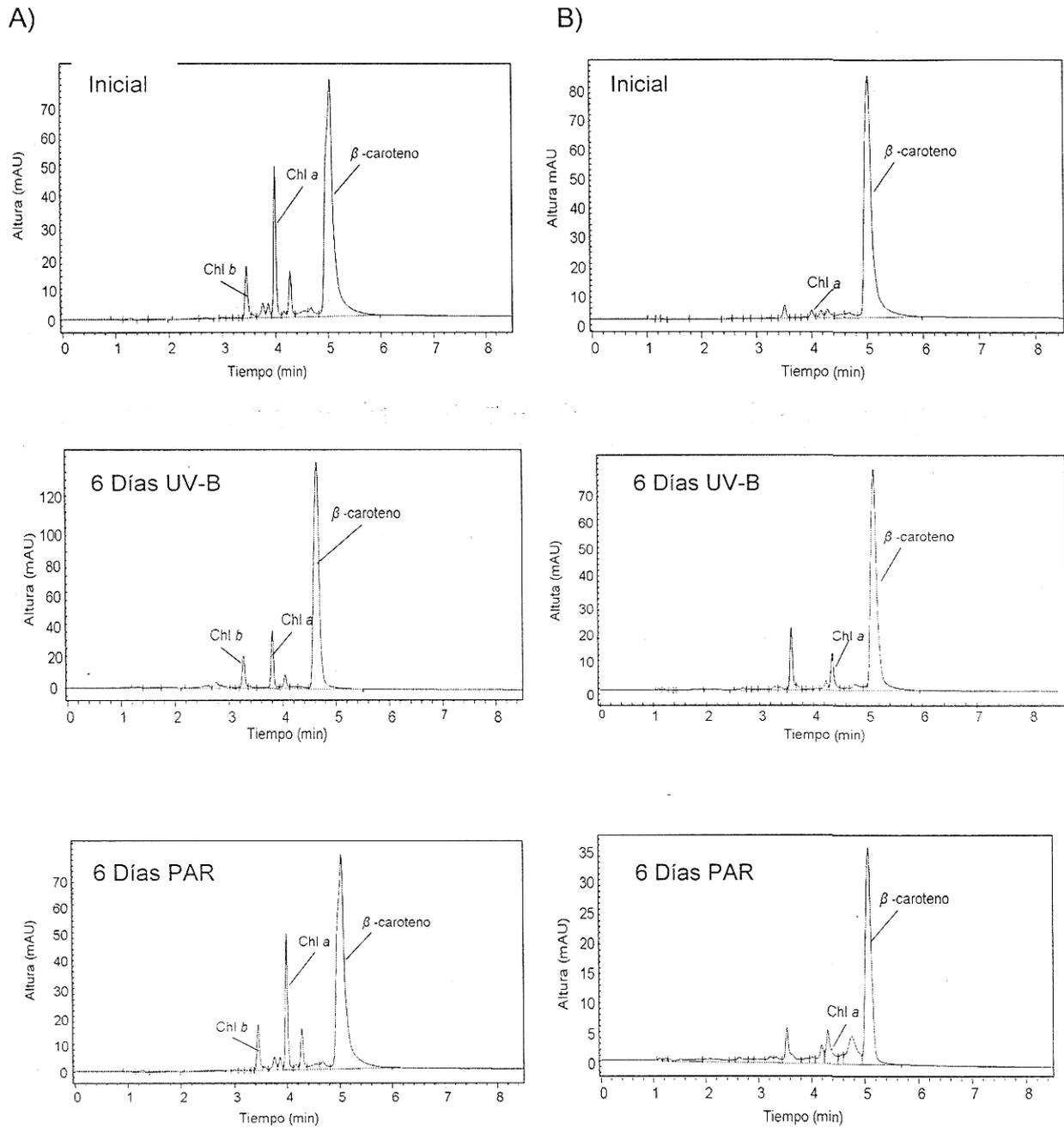
A)



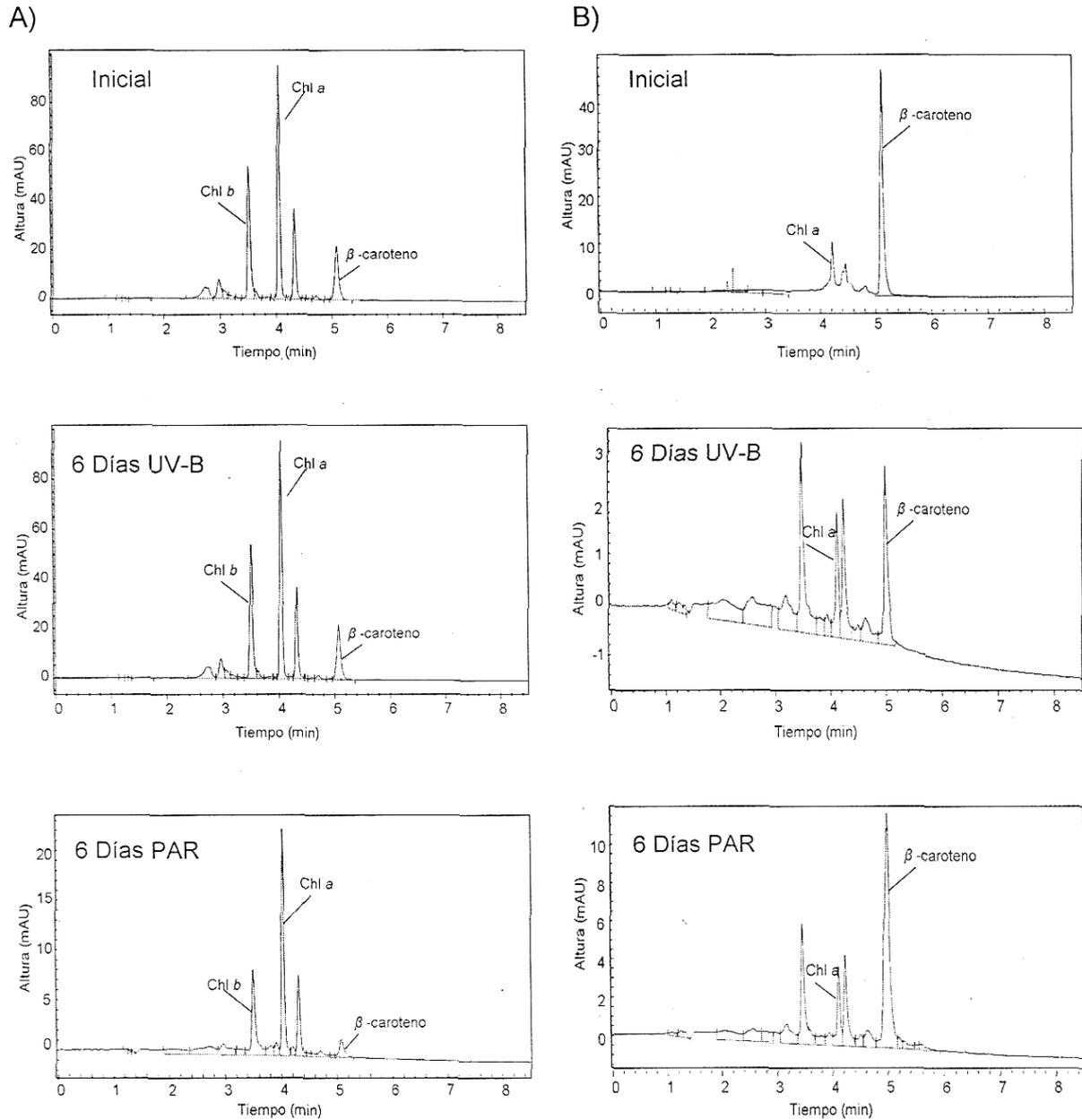
B)



**Figura 29.** Concentraciones de pigmentos fotosintéticos medidas en extractos de macroalga, en 30 mg de muestra peso seco, según los tratamientos de radiación. En análisis se realizó mediante HPLC (Hewlett Packard serie 1100 Agilent) fase reversa. A) UV-B y PAR en *Ulva sp.*, B) UV-B y PAR en *Gracilaria chilensis*. Las muestras fueron recolectadas en el mes de Octubre. Los valores son promedio  $n= 3 \pm D.E.$



**Figura 30.** Cromatogramas de los pigmentos fotosintéticos en extractos de macroalga A) *Ulva sp.* B) *Gracilaria chilensis* en los distintos tiempos de exposición a la radiación, recolectadas en el mes de Agosto. Resuelto por HPLC (Hewlett Packard serie 1100 Agilent) fase Reversa. Volumen de inyección de muestra 50  $\mu\text{l}$  a un flujo de 2,0  $\text{mL}/\text{min}$ <sup>-1</sup>, controlado por una bomba peristáltica cuaternaria, longitud de onda de 450 nm con detector UV-visible, a temperatura ambiente.



**Figura 31.** Cromatogramas de los pigmentos fotosintéticos en extractos de macroalga A) *Ulva* sp. B) *Gracilaria chilensis* en los distintos tiempos de exposición a la radiación, recolectadas en el mes de Octubre. Resuelto por HPLC (Hewlett Packard serie 1100 Agilent) fase Reversa. Volumen de inyección de muestra 50  $\mu$ l a un flujo de 2,0 mL/min<sup>-1</sup>, controlado por una bomba peristáltica cuaternaria, longitud de onda de 450 nm con detector UV-visible, a temperatura ambiente.

### **4.3. Efecto de la radiación UV sobre la fotosíntesis de macroalgas de la zona de Niebla.**

#### **4.3.1 Rendimiento Cuántico Máximo (Fv/Fm):**

Los valores de Fv/Fm obtenidos en las macroalgas *Ulva sp.*, pertenece a la división Chlorophyta y *Gracilaria chilensis* a la Rodophyta, el cual representa la eficiencia fotosintética del alga adaptado a la oscuridad, variaron durante los distintos tiempos de exposición a la radiación en los diferentes tratamientos. Los resultados muestran una mayor sensibilidad al tratamiento UV-B respecto al PAR. En el experimento realizado en el mes de Agosto, fue posible observar una disminución paulatina de este parámetro desde el inicio hasta el sexto día de exposición a radiación, en *Ulva* (**Fig. 32**). En el caso de la *Gracilaria* también ocurre un descenso, partiendo desde el inicio hasta el sexto día a la exposición a radiación, los valores de Fv/Fm sufren un descenso considerable respecto al valor inicial ( $p < 0.05$ , ANOVA, test Tukey HSD; **Tabla 15a**). Adicionalmente se evidenció la presencia de cistocarpos al final del tiempo de exposición a la radiación en ambos tratamientos.

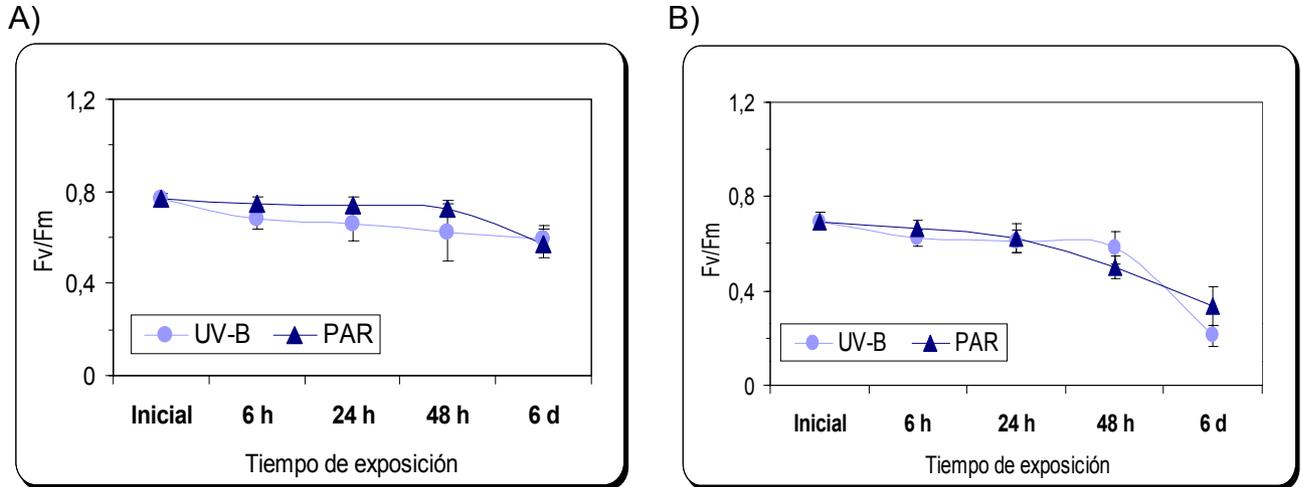
En ambas especies de macroalgas *Ulva* y *Gracilaria* la exposición a la radiación provocó despigmentación, en mayor proporción en *Gracilaria*. En el caso del experimento realizado en el mes de Octubre se apreció la misma tendencia en los valores del rendimiento cuántico máximo, en ambas especies de macroalgas disminuyeron en forma paulatina desde el inicio hasta finalizar el experimento ( $p < 0.05$ , ANOVA, test Tukey HSD; **Tabla 15b**), en el caso de *Gracilaria* ocurrió en mayor proporción respecto a *Ulva*. (**Fig. 33**) Repitiéndose la formación de cistocarpos nuevamente en esta macroalga. Además de la despigmentación en ambas.

**Tabla 15a.** Efecto de la radiación UV el rendimiento cuántico máximo (Fv/Fm) medidos en extractos de macroalga *Ulva sp.* y *Gracilaria chilensis*. Las determinaciones fueron realizadas mediante exposición a tratamientos de radiación a distintos tiempos, en el mes de Agosto. Los valores son promedio  $n= 3 \pm D.E.$  Se indican los resultados de un análisis de ANOVA de 2 Vías. Letras similares indican diferencias significativas ( $p<0,05$ ) según el test de Tukey HSD.

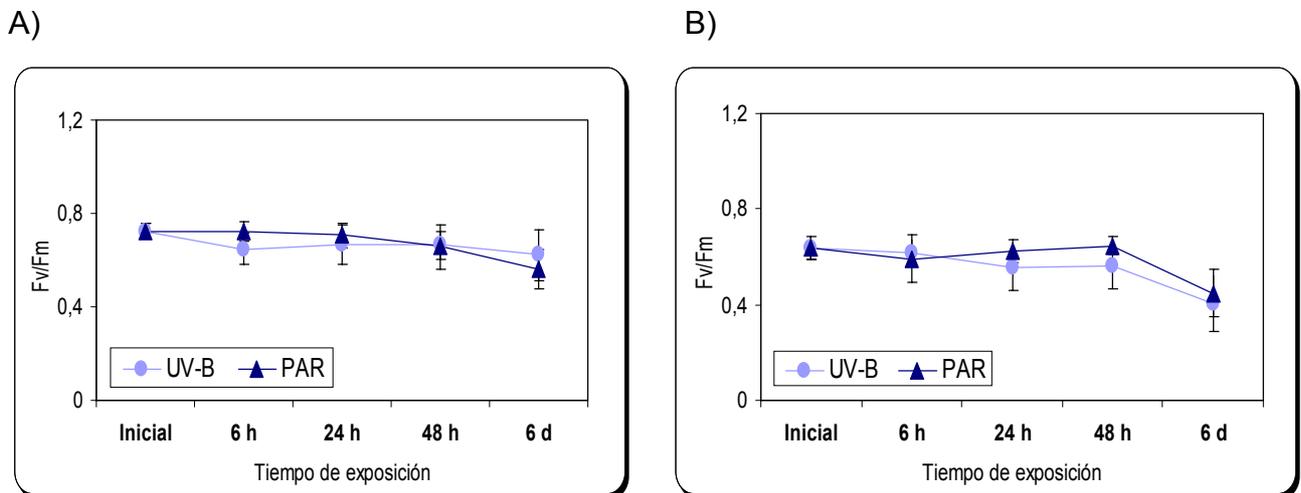
Período	Tratamiento	Tiempo exposición	Fv/Fm	
			<i>Ulva</i>	<i>Gracilaria</i>
Agosto	<b>UV-B</b>	Inicial	0,770± 0,020 a	0,695± 0,039
		6 h	0,683± 0,047	0,624± 0,034
		24 h	0,658± 0,069	0,581± 0,051
		48 h	0,622± 0,125	0,61± 0,067
		6 d	0,592± 0,057a	0,209± 0,043a
	<b>PAR</b>	Inicial	0,770± 0,020a	0,695± 0,039
		6 h	0,748± 0,024	0,664± 0,035
		24 h	0,739± 0,038	0,624± 0,060
		48 h	0,725± 0,036	0,501± 0,047
		6 d	0,572± 0,033a	0,338± 0,081a
<b>ANOVA 2 VÍAS</b>				
Mean SS	<i>Ulva</i>	0,00005	0,00046	0,00004
	<i>Gracilaria</i>	0,00004	0,00461	0,00036
F (1,110), 4,110	<i>Ulva</i>	22	49	5
	<i>Gracilaria</i>	15	42	32
p-level	<i>Ulva</i>	p<0,001***	1<0,001***	1<0,001***
	<i>Gracilaria</i>	p<0,001***	1<0,001***	1<0,001***
*P < 0,05; **P < 0,01; ***P < 0,001		(NS) valores no significativos, P > 0,05		

**Tabla 15b.** Efecto de la radiación UV el rendimiento cuántico máximo (Fv/Fm) medidos en extractos de macroalga *Ulva sp.* y *Gracilaria chilensis*. Las determinaciones fueron realizadas mediante exposición a tratamientos de radiación a distintos tiempos, en el mes de Octubre. Los valores son promedio  $n= 3 \pm$  D.E. Se indican los resultados de un análisis de ANOVA de 2 Vías. Letras similares indican diferencias significativas ( $p<0,05$ ) según el test de Tukey HSD.

Período	Tratamiento	Tiempo exposición	Fv/Fm	
			<i>Ulva</i>	<i>Gracilaria</i>
Octubre	UV-B	Inicial	0,725± 0,033a	0,636± 0,049a
		6 h	0,649± 0,065	0,615± 0,056
		24 h	0,664± 0,083	0,558± 0,093
		48 h	0,665± 0,059	0,559± 0,092
		6 d	0,621± 0,108a	0,405± 0,118a
	PAR	Inicial	0,725± 0,033a	0,636± 0,049a
		6 h	0,723± 0,040	0,591± 0,101
		24 h	0,706± 0,052	0,626± 0,046
		48 h	0,657± 0,094	0,645± 0,037
		6 d	0,559± 0,084a	0,448± 0,099a
<b>ANOVA 2 VÍAS</b>				
Mean SS	<i>Ulva</i>	0,0000	0,00025	0,00011
	<i>Gracilaria</i>	0,00003	0,00084	0,00006
F (1,110), 4,110	<i>Ulva</i>	0	15	6
	<i>Gracilaria</i>	4	29	2
p-level	<i>Ulva</i>	$p<0,001^{***}$	$1<0,001^{***}$	$1<0,001^{***}$
	<i>Gracilaria</i>	$p<0,001^{***}$	$1<0,001^{***}$	$1<0,001^{***}$
*P < 0,05; **P < 0,01; ***P < 0,001		(NS) valores no significativos, P > 0,05		



**Figura 32.** Parámetros de fluorescencia (Fv/Fm: rendimiento cuántico máximo) medidos en extractos de macroalga A) *Ulva sp.* y B) *Gracilaria chilensis*, mediante el fluorímetro de amplitud modulada PAM 2000. Las determinaciones fueron realizadas a través de exposición a radiación a distintos tiempos. Las muestras fueron recolectadas en el mes de Agosto. Los valores son promedio  $n = 3 \pm D.E.$



**Figura 33.** Parámetros de fluorescencia (Fv/Fm: rendimiento cuántico máximo) medidos en extractos de macroalga A) *Ulva sp.* y B) *Gracilaria chilensis*, mediante el fluorímetro de amplitud modulada PAM 2000. Las determinaciones fueron realizadas a través de exposición a radiación a distintos tiempos. Las muestras fueron recolectadas en el mes de Octubre. Los valores son promedio  $n = 3 \pm D.E.$

#### 4.3.2 Tasa de transporte de electrones (ETR):

Los valores obtenidos en términos de la tasa de transporte de electrones en las macroalgas *Ulva sp.* y *Gracilaria chilensis*, que representa el tránsito de los electrones a través de los diferentes componentes del aparato fotosintético, fue determinada utilizando las curvas ETR v/s radiación, como se muestra en las figuras 34-35. Se observó que el ETR varió durante los distintos tiempos de exposición a la radiación entre los diferentes tratamientos, observándose el mismo comportamiento que sufrió el rendimiento cuántico máximo ( $F_v/F_m$ ). Los resultados también muestran una mayor sensibilidad al tratamiento UV-B respecto al PAR. En el experimento realizado en el mes de Agosto, se apreció que ambas especies de macroalgas: *Ulva* y *Gracilaria* exhiben las mayores tasas de transporte de electrones al inicio del experimento, observándose una disminución paulatina de este parámetro ( $p < 0.05$ , ANOVA, test Tukey HSD; **Tabla 16a**) durante las 6 h hasta el sexto día de exposición a radiación (**Fig. 34**), tanto para los tratamientos UV-B y PAR. En el caso del experimento del mes de Octubre, se apreció el mismo comportamiento de este parámetro bajo el efecto de la radiación ( $p < 0,005$ ; **Tabla 16b**) los valores son menores en este mes para ambas macroalgas en relación al realizado en el mes de Agosto, siendo mayor el descenso en *Gracilaria* (**Fig. 35**). Presentado los valores al inicio en relación al sexto día para *Ulva* y *Gracilaria* respectivamente.

**Tabla 16a.** Efecto de la radiación UV en la tasa de transporte de electrones (ETR) medidos en extractos de macroalga *Ulva sp.* y *Gracilaria chilensis*. Las determinaciones fueron realizadas mediante exposición a tratamientos de radiación a distintos tiempos, en el mes de Agosto. Los valores son promedio n= 3. Se indican los resultados de un análisis de ANOVA de 2 Vías. Letras similares indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) según el test de Tukey HSD.

<b>ANOVA 2 VÍAS</b>	<b>Especie</b>	<b>Tratamiento</b>	<b>Tiempo</b>	<b>Trat * Tiempo</b>
Mean SS	<i>Ulva</i>	0,00264	0,07150	0,00213
	<i>Gracilaria</i>	0,00104	0,09726	0,00363
F (1,100), 4, 100	<i>Ulva</i>	0,81	5,48	0,16
	<i>Gracilaria</i>	0,58	13,60	0,51
p-level	<i>Ulva</i>	p<0,05	p<0,001	p<0,956528 NS
	<i>Gracilaria</i>	p<0,001	p<0,001	p<0,05

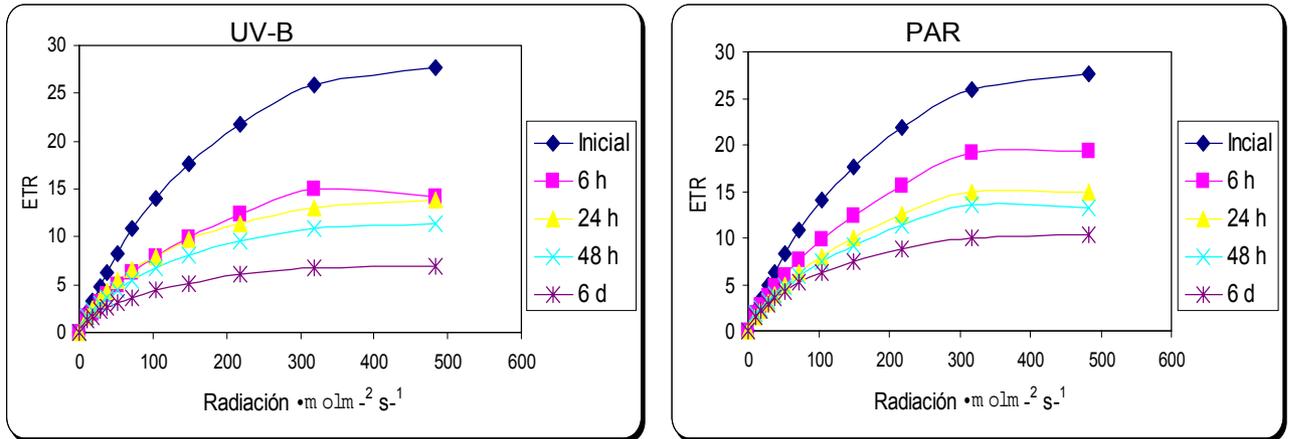
\*P < 0,05; \*\*P < 0,01; \*\*\*P < 0,001 (NS) valores no significativos, P > 0,05

**Tabla 16b.** Efecto de la radiación UV en la tasa de transporte de electrones (ETR) medidos en extractos de macroalga *Ulva sp.* y *Gracilaria chilensis*. Las determinaciones fueron realizadas mediante exposición a tratamientos de radiación a distintos tiempos, en el mes de Octubre. Los valores son promedio. Se indican los resultados de un análisis de ANOVA de 2 Vías. Letras similares indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) según el test de Tukey HSD.

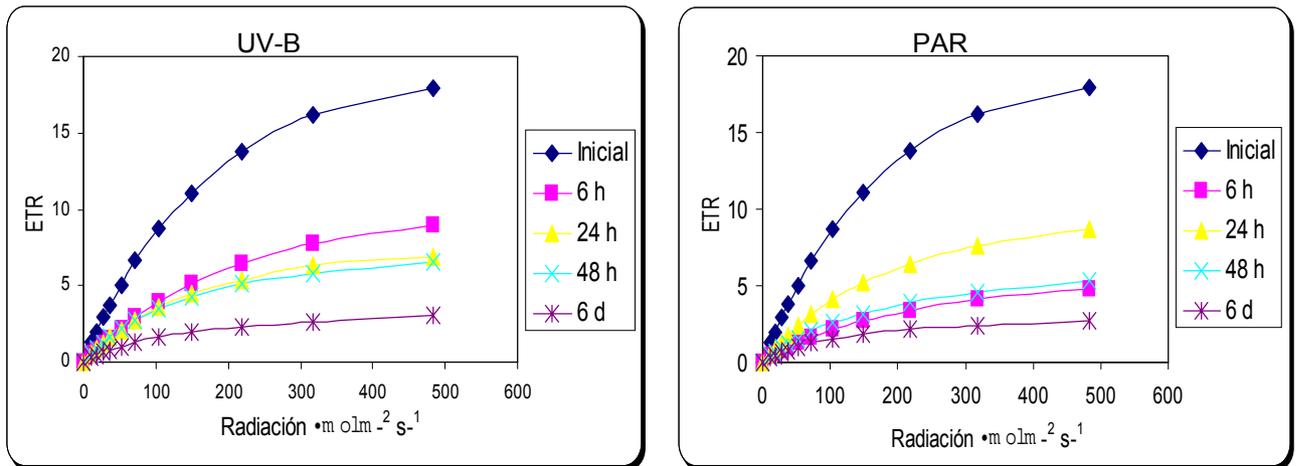
<b>ANOVA 2 VÍAS</b>	<b>Especie</b>	<b>Tratamiento</b>	<b>Tiempo</b>	<b>Trat * Tiempo</b>
Mean SS	<i>Ulva</i>	0,01720	0,02946	0,01290
	<i>Gracilaria</i>	0,00709	0,00809	0,00388
F (1,100), 4,100	<i>Ulva</i>	7,74	3,31	1,45
	<i>Gracilaria</i>	29,8	8,5	4,1
p-level	<i>Ulva</i>	p<0,001***	p<0,01**	p<0,01 **
	<i>Gracilaria</i>	p<0,001***	p<0,001***	p<0,001***

\*P < 0,05; \*\*P < 0,01; \*\*\*P < 0,001 (NS) valores no significativos, P > 0,05

A)

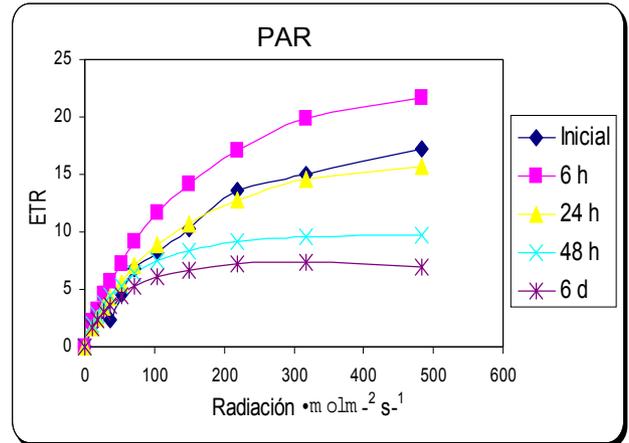
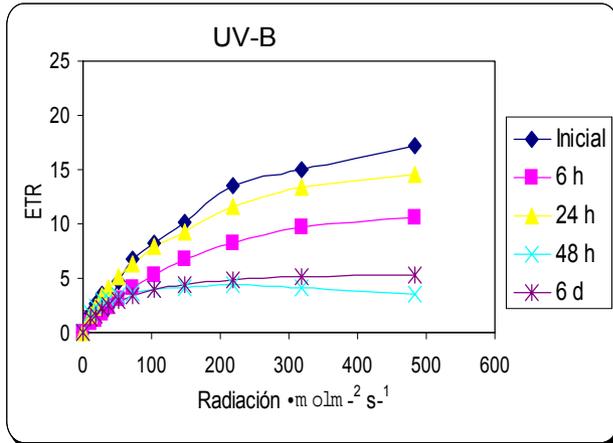


B)

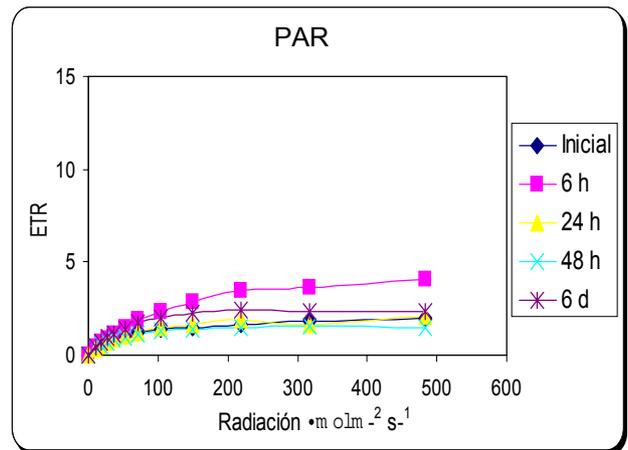
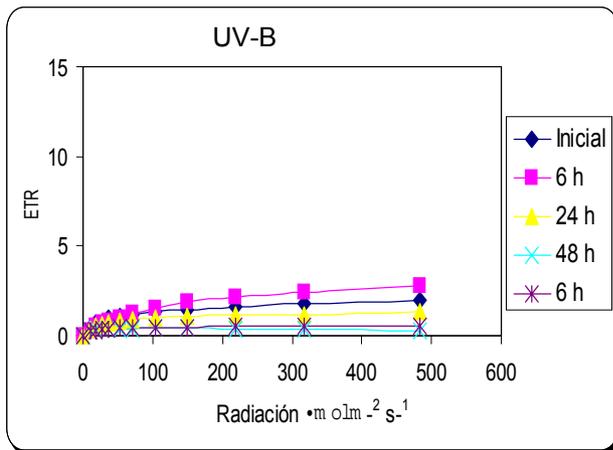


**Figura 34.** Parámetros de fluorescencia ETR (Tasa de transporte de electrones) medidos en extractos de macroalga, mediante el fluorímetro de amplitud modulada PAM 2000. Las determinaciones fueron realizadas mediante exposición a radiación a distintos tiempos, siendo A) *Ulva sp.*, tratada con UV-B y PAR B) *Gracilaria chilensis* tratada con UV-B y PAR. Las muestras fueron recolectadas en el mes de Agosto. Los valores son promedio  $n=3$ .

A)



B)



**Figura 35.** Parámetros de fluorescencia ETR (Tasa de transporte de electrones) medidos en extractos de macroalga, mediante el fluorímetro de amplitud modulada PAM 2000. Las determinaciones fueron realizadas mediante exposición a radiación a distintos tiempos, siendo A) Tratamiento UV-B y PAR en *Ulva sp* B) Tratamiento UV-B y PAR en *Gracilaria chilensis*. Las muestras fueron recolectadas en el mes de Octubre. Los valores son promedio  $n=3$ .

## 5.- DISCUSIÓN

Con la presente tesis se evaluó la composición espacial y temporal de los pigmentos fotosintéticos presente en la columna de agua en la plataforma submareal de la zona de Coihuí (Puerto Montt) y el efecto de la radiación UV sobre la fotosíntesis y comportamiento de los pigmentos en macroalgas bentónicas representantes de dos grupos taxonómicos: *Ulva* sp. (Chlorophyta) y *Gracilaria chilensis* (Rhodophyta).

La dinámica de los pigmentos (clorofilas, carotenoides y ficobiliproteínas) fue analizada mediante técnicas espectrofotométricas (UV-Visible) y cromatográficas (HPLC de fase reversa). Los resultados obtenidos mediante espectrofotometría permitieron realizar un análisis cualitativo de los pigmentos a través de sus respectivas absorbancia. Respecto a los pigmentos fotosintéticos se pudo observar el espectro característico de la familia de los carotenoides con su banda espectral entre los 450 y 480 nm y el de las clorofilas con dos picos máximos entre 422 con 666 nm y 475 con 645 nm, lo cual corresponde a clorofila *a* y *b* respectivamente (Stryer, 2002). Estos espectros de absorción obtenidos sugieren la presencia de determinados pigmentos, incluyendo en el espectro al total de compuestos que absorben en un rango determinado de longitud de onda. Por ello, se realizó la separación e identificación de algunos pigmentos, mediante un análisis cualitativo y cuantitativo por medio de la técnica de HPLC fase reversa.

Las determinaciones de pigmentos en la columna de agua fueron complementadas con estudios sobre el efecto de la radiación UV bajo condiciones de laboratorio sobre pigmentos de algas bentónicas con el de evidenciar posibles cambios que puedan ser extrapolados a la situaciones el ambiente natural. Como una forma de estimar paralelamente el estatus fisiológico, fotosíntesis a través de la fluorescencia de la clorofila del fotosistema II (PSII) fue medida (Henley *et al.*, 1991; Schreiber *et al.*, 1995; Hanelt, 1996; Häder & Figueroa, 1997).

### **5.0.1. Variación estacional y en profundidad de los pigmentos fotosintéticos en muestras de fitoplancton de la zona de Coihuin.**

La dinámica del fitoplancton en los ecosistemas acuáticos se encuentra afectada por interacciones complejas, entre éstos por factores ambientales tales como radiación solar, temperatura, salinidad, nutrientes así como geomorfológicas e hidrológicas del área, entre ellas la conformación geográfica, circulación de las aguas y tasa de renovación (Letelier *et al.* 1993; Ostrovsky & Yacobi 1999; Cardoso & Marques 2004).

En relación con la radiación solar, la columna de agua la atenúa fuertemente, por lo tanto la cantidad de energía recibida en cualquier profundidad depende no sólo de la luminosidad de la superficie, sino que también por la capacidad del cuerpo de agua de absorber e interceptar los fotones, lo cual se estima a través del parámetro denominado coeficiente de atenuación ( $K_d$ ). Los componentes que atenúan la luz en el sistema acuático son el agua, la materia disuelta especialmente el carbono orgánico disuelto (DOC), material particulado (fitoplancton) y varios tipos de detritus (Kirk, 1994). En la zona de Coihuin, los perfiles de radiación solar sub-acuática de un día soleado de verano indican una penetración de la radiación PAR hasta profundidades cercanas a 40 m, mientras la radiación UV-A y UV-B se atenúan a profundidades de 12 y 5 m, respectivamente (Fig. 12).

En general, la radiación solar en el medio acuático sufre constantes variaciones espacio-temporales en calidad y cantidad. En el caso de la radiación fotosintéticamente activa (PAR), variaciones estacionales y locales ocurren, las cuales son debido a nubosidad, la acción de las olas, el grado de turbidez. Aunque normalmente los organismos sufren déficit de luz para realizar fotosíntesis, existen períodos en los cuales ellos son expuestos a altas irradiancias en la superficie, lo cual puede conllevar a procesos de fotoinhibición afectando la abundancia y biomasa en dichas capas (Kirk, 1994).

Las fluctuaciones de las concentraciones de los distintos pigmentos fotosintéticos presentes en la columna de agua en la plataforma submareal de Coihuin (Puerto Montt) experimentaron una variación estacional. Sin embargo, hubo diferencias entre los dos métodos utilizados para cuantificarlos: Por ejemplo, mientras que por el método espectrofotométrico, las clorofilas fueron los pigmentos dominantes, el uso de HPLC

evidenció una predominancia de los carotenoides ( $\beta$ -caroteno). Estas diferencias claramente indican la mayor sensibilidad del método de HPLC para detectar pigmentos absorbiendo en rangos menores a 500 nm.

En el caso de los pigmentos medidos por el método espectrofotométrico, se observó mayores concentraciones de pigmentos en la estación de primavera y menores valores en invierno en las capas superiores de la columna de agua (hasta 15 m). Este patrón coincide con la dinámica estacional del fitoplancton en regiones templadas descrita por Raymont (1980) y Neshba (1987), basándose en la condición de mezcla o estratificación que presenta la columna de agua, condiciones que se pueden determinar a partir de variables de temperatura y salinidad. Los aumentos en las concentraciones de los distintos pigmentos fotosintéticos, lo cual ocurrió similar en cada uno de ellos, se explicaría por aumentos en las condiciones de luminosidad y mayor disponibilidad de nutrientes luego del invierno en la zona. Debido a que la concentración de pigmentos detectada por los diferentes métodos y fórmulas incrementa en función de la luz, estos valores indudablemente pueden ser correlacionados con aumentos en el número de células en la columna de agua más que con incrementos en la concentración de pigmentos por célula. Es interesante identificar que a profundidades entre 5 y 15 m, los valores de feopigmentos pueden llegar a ser mayores que la Chl *a*, sobre todo en verano, cuando una mayor estratificación de la columna de agua. La resolución usando HPLC, indica mayores valores de carotenoides durante primavera, mientras que Chl *a* y *b* varían en menor grado, aunque también significativamente.

Considerando la profundidad, los resultados indicaron que una profundidad de 70 m se observó una mayor concentración de los distintos pigmentos medidos por espectrofotometría durante invierno, presentando un menor valor en el otoño. Estos valores contrastan con los patrones observados en la columna de agua y no se correlacionan con el régimen de sedimentación en la zona. Por un lado, durante invierno tanto la concentración de pigmentos disponible para sedimentar y la tasa de sedimentación son menores, por lo tanto sería esperable encontrar menores concentraciones de pigmentos en este período. Sin embargo, si los valores son calculados en términos de masa, las tendencias se invierten (valores decrecen en invierno) y reflejan

mejor la tendencia esperada. Lo que es claro, es el aumento de los feopigmentos en relación a la Chl *a*, lo cual se acentúa en invierno.

En el caso de los valores medidos usando HPLC, carotenos y chls tienen un comportamiento antagónico: carotenos aumentan en primavera verano, mientras que clorofila *a* y *b* aumentan en invierno. Se podría especular que estas diferencias se pueden deber a diferencias en el grado de descomposición: mientras las clorofilas decrecen en función de un aumento de los feopigmentos, los carotenoides se mantienen estables por mayor tiempo, por lo que pueden ser detectados a mayores profundidades. Alternativamente, un aumento de los carotenoides durante primavera verano podría estar asociada a mecanismos de fotoprotección, ya que estos compuestos absorben bien a rangos de UV (ver adelante).

### **5.0.2. Efecto de la radiación UV sobre los pigmentos fotosintéticos de macroalgas de la zona de Niebla.**

En las macroalgas existen tres pigmentos fotosintéticos que se encuentran directamente involucrados en el proceso de la fotosíntesis: clorofilas, ficobiliproteínas y carotenoides, organizados en antenas, las cuales están alrededor de los centros de reacción (Chl *a*), cuya función es transformar la energía fotónica en electroquímica (Strasburger, 1994).

El efecto producido por la exposición a la radiación UV-B sobre los pigmentos de macroalgas deben ser analizados usando distintos niveles: a) las diferencias entre los organismos dado por su status taxonómico y por ende la composición intrínseca de sus pigmentos; b) las características morfo-funcionales y ecológicas de ambas especies que están dadas principalmente por su distribución en la zona intermareal y sus morfología y c) las diferencias entre los métodos de medida de los pigmentos.

En general, durante los experimentos de exposición a la radiación UV realizados en el mes de Agosto (invierno) se observó un incremento inicial (hasta las 24h) seguido de una disminución en el contenido de las Chl *a* al final de 6 d. Este patrón se observó en ambas especies, *Ulva sp.* y *Gracilaria chilensis* y en los tratamiento (con y sin UV-B). El incremento inicial podría estar asociado a una aclimatación rápida de los pigmentos que

respondería al cambio de ambiente lumínico desde el natural (altos niveles de radiación solar PAR) al de laboratorio caracterizado normalmente por irradiancias de PAR menos de  $120 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . En *Ulva* en el Mediterráneo, disminuciones en la concentración de clorofilas también han sido demostradas (Figueroa *et al.* 2003). Aparentemente, la disminución en la concentración de Chl *a* y *b* en tanto se podría relacionar con una fotooxidación o bien a una disminución en su biosíntesis, siendo afectada en una mayor proporción la concentración de la Chl *b* respecto de la Chl *a*, lo cual concuerda con lo reportado por Kulandaivelu *et al.* (1996). Se debe indicar, que los feopigmentos fueron mucho más altos en *Ulva* sp. comparado con *Gracilaria chilensis* y durante los meses de invierno (Agosto). A lo largo del período de incubación ellos decrecen de forma más acentuada que las clorofilas. Tales respuestas pueden estar definidas en términos del impacto indirecto de la UV sobre las clorofilas, principalmente sobre proteínas del tilacoide y por las condiciones experimentales: las bajas irradiancias en el laboratorio pudieron inducir procesos de fotoaclimatación (incremento de pigmentos), compensando por disminuciones producto de la radiación UV.

En el caso de los carotenoides, ellos decrecieron en ambos periodos de tiempo (Agosto y Octubre) y usando ambos métodos de análisis (espectrofotometría y RP-HPLC) lo cual difirió de la situación observada en las Chls. Si bien es cierto se ha reconocido que los carotenoides cumplen importantes funciones en las macroalgas como un filtro natural de luz, evitando el fotoblanqueamiento de la clorofila, y como antioxidante inactivando posibles radicales libres generados por acción del exceso UV-B en la membrana fotosintética (Greenberg *et al.* 1997; Gotz *et al.* 1999), los resultados encontrados en las exposiciones a la UV no apoyan esta hipótesis, pues en general los valores disminuyeron.

En el caso de las ficobiliproteínas en *Gracilaria chilensis*, cuya función principal es la captación y conducción de luz hasta los centros de reacción fotosintéticos (Glazer, 1989), los resultados indicaron que luego de un incremento significativo al cabo de 24 h, finalmente al cabo de 6 d, los valores en algas expuestas a UV-B disminuyen significativamente. En el caso de PAR, los valores de ficobiliproteínas no decrecen de forma significativa. Se debe enfatizar que los contenidos de ficoeritrina y ficocianina son altamente variable y por ejemplo pueden ser relacionados con la composición del ficobilisoma, el cual varía de un organismo a otro siendo muy sensible a distintos factores

ambientales, como es el caso de algunos de los filamentos de cianobacteria, que pueden cambiar la composición del ficobilisoma en respuesta a las longitudes de onda frecuentes de la luz en el ambiente, lo que le permite estos organismos utilizar eficazmente la energía ligera disponible de conducir el transporte de electrones fotosintético y la fijación de CO<sub>2</sub> según lo reportado por Grossman *et al.*, (1993).

Por otro lado, cuando se analiza la susceptibilidad diferencial de ambas especies se observó que *Gracilaria chilensis* siempre tuvo menores valores de pigmentos y sus variaciones fueron menores que en el caso de *Ulva*. Los factores explicativos son múltiples, sin embargo, por su ubicación en el mesomareal *Ulva sp.* es un alga muy adaptada a cambiantes condiciones lumínicas y por lo tanto fuertes cambios en las concentraciones de pigmentos son esperables. *Gracilaria chilensis* estudiada aquí, en cambio, constituye una población intermareal de fase gametofítica, no dominante en condiciones naturales (*Gracilaria* principalmente habita en ambientes de fondos blandos), y por lo tanto quizás representa una población marginal menos adaptada al ambiente intermareal y por ello con menor aclimatación potencial de pigmentos.

Tomando en consideración las dosis de radiación UV-B aplicadas (ejemplo 200-400 kJ m<sup>-2</sup> UV-B luego de 24-48 h), las cuales exceden a los niveles medidos en un día de verano en Valdivia (100 kJ m<sup>-2</sup>), las reducciones en pigmentación constituyen situaciones extremas para las algas en condición natural. Sin embargo, dosis a las 12 h (101 kJ m<sup>-2</sup>) son similares a las del ambiente natural y en varios casos se observó disminución de pigmentación a estas dosis. Se debe destacar que estas experiencias sirven de referencia para poder identificar posibles factores actuando sobre los pigmentos y que efectivamente estos disminuyen en presencia de altas dosis de radiación solar. Esto finalmente afectará la composición pigmentaria en la columna de agua.

### **5.0.3. Efecto de la radiación UV sobre la fotosíntesis de macroalgas de la zona de Niebla.**

El rendimiento cuántico máximo (Fv/Fm) fue afectado por la exposición a la radiación UV y PAR en el laboratorio disminuyendo paulatinamente. Estos resultados no son indicativos del fenómeno denominado “fotoinhibición de la fotosíntesis”, ya que la

exposición fue a muy baja irradiancia de PAR (cerca de  $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). El proceso de fotoinhibición que exhiben las algas en respuesta a un exceso de radiación (Figueroa & Gómez, 2001), es un mecanismo fotoprotector caracterizado por una des-excitación del aparato fotosintético, donde se inactiva el fotosistema II (PSII) cuando la radiación PAR excede la capacidad de transportes de electrones (Krause, 1988; Henley *et al.*, 1991; Hanelt, 1998; Anderson *et al.*, 1997). En general, no se encontraron diferencias entre ambos tratamientos ni tampoco entre los dos meses analizados. Estos resultados sugieren que las algas son capaces de aclimatar su maquinaria fotosintética a las crecientes dosis de UV y confirman resultados previos observados en una serie de especies del litoral de Valdivia, donde exposiciones a condiciones naturales de UV en el verano fueron poco efectivas para causar importantes disminuciones del rendimiento cuántico (Gómez *et al.* 2004). Aparentemente la disminución en la fotosíntesis luego de 6 d pudo estar asociada a una adecuación a los bajos niveles de PAR más que a un efecto deletéreo de la radiación UV.

La tasa de transporte de electrones (ETR) fue mayor en *Ulva* sp. que en *Gracilaria chilensis* y en el término de los diferentes tratamientos. Durante los experimentos de Agosto, *Gracilaria chilensis* mostró las mayores disminuciones con respecto al valor medido inicialmente. En el mes de Octubre, el transporte de electrones medido en *Gracilaria* fue bajo, lo cual pudo estar indicando que estas macroalgas presentaban algún grado de estrés crónico, el cual se prolongo durante las exposiciones. En este sentido, los menores valores de ETR en primavera en relación al invierno podrían ser explicados por un mayor amortiguamiento no fotoquímico (asociado a una disipación por calor), debido a que las macroalgas deben adaptarse a altos niveles de luz. Tomando en consideración las diferencias entre ambas especies, resulta interesante observar que los valores de ETR medidos en *Ulva* sp. fueron relativamente constantes entre Agosto y Octubre, lo cual confirma previos estudios realizados por Huovinen *et al.* (2006). Estos autores reportaron que mientras el alga verde *Enteromorpha intestinalis*, que habita el mesomareal, presenta valores constantes de fotosíntesis a lo largo del año, algas como *Macrocystis pyrifera*, cuya distribución se centra en el límite de la zona intermareal.

A diferencia del fitoplancton las macroalgas bentónicas son sésiles y deben adaptarse rápidamente a las variaciones lumínicas que se imponen en el ambiente

intermareal. Además cabe destacar que ambas especies de macroalgas estudiadas pertenecen a diferentes grupos, *Ulva sp.* es una Chlorophyta y *Gracilaria chilensis* es una Rhodophyta, por lo tanto, presentan distintas características y mecanismos para responder a los cambios de factores ambientales. Por ejemplo, *Ulva sp.* se encuentra más expuesta a los efectos de la radiación debido a que crece en roqueríos expuestos al oleaje, no así *Gracilaria chilensis* que crece en ambientes protegidos tanto en la zona intermareal como submareal. Lo cual se puede relacionar con una mayor adaptabilidad a mayores dosis de radiación observada en la especie *Ulva sp.*

En resumen, los resultados de este estudio referentes a la concentración y composición de pigmentos han conducido a una mejor comprensión del comportamiento del fitoplancton en el fraccionamiento superior de la columna, la transformación de fitoplancton en el interior del océano, durante las variaciones espacio-temporales en las diferentes estaciones del año. La condición fisiológica de las macroalgas, respecto a la exposición a diferentes dosis de radiación UV, finalmente tiene implicaciones en los patrones de estrategia de vida y de distribución de las macroalgas, observándose efectos en el contenido de los distintos pigmentos fotosintéticos y la fotosíntesis.

## 5.1.- CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos en esta investigación y bajo las condiciones en que se realizaron los experimentos se puede concluir lo siguiente:

**a)** La estacionalidad y profundidad influyen en las concentraciones de los distintos pigmentos fotosintéticos presentes en la columna de agua, lo cual puede ser relacionada con la variabilidad espacio-temporal experimentada por el fitoplancton, asociadas a la variación de las dosis de radiación PAR y temperatura dentro de la columna.

**b)** La concentración de los distintos pigmentos fotosintéticos en la capa superficial de la columna de agua, tanto en el estrato más superficial (0-5 m) como el intermedio (5-15 m), presentaron mayores concentraciones en la estación de primavera y menores en invierno, lo cual se explica con el término del invierno aumenta la estratificación, por el calentamiento superficial de las aguas, junto con el aumento de la intensidad lumínica (PAR) provoca el florecimiento primaveral del fitoplancton.

**c)** A una mayor profundidad en la columna de agua (70 m) aumenta la concentración de los distintos pigmentos clorofilas (*a*, *b*) y  $\beta$ -caroteno, donde la temperatura influye en forma directa en la distribución de las masas de agua, causando estratificación de las capas de agua, lo cual explicaría una mayor concentración de los pigmentos estudiados.

**d)** Las concentraciones de la clorofila *a* y sus productos de degradación (feopigmentos) dentro de la columna de agua, variaron en profundidad y estacionalidad. En la capa superficial tanto en el estrato más superficial (0-5 m) como el intermedio (5-15 m) se observó una mayor concentración de clorofila *a* respecto a los feopigmentos, debido a una mayor irradiación solar incidente. No así a una mayor profundidad (70 m), donde quedo en evidencia una mayor concentración de feopigmentos.

**e)** En ambas macroalga *Ulva sp.* y *Gracilaria chilensis* las concentraciones de los pigmentos fotosintéticos son afectados por las variaciones de las dosis de radiación a las

que se ven expuestos. Siendo los carotenoides ( $\beta$ -caroteno), respecto a las clorofilas (*a* y *b*), menos afectados a los cambios de radiación UV-B, lo que se encuentra relacionado con su rol fotoprotector en el aparato fotosintético.

**f)** Las concentración de las ficobiliproteínas, en especial en la ficoeritrina presente en la macroalga *Gracilaria chilensis*, fueron fuertemente afectadas por las dosis de radiación UV, confirmando la alta sensibilidad de estos compuestos a las condiciones de luminosidad.

**g)** La intensidad de los tratamientos aplicados (UV-B y PAR) afectan a ambas especies de macroalgas. Sin embargo no se observaron diferencias entre tratamientos con y sin UV-B, lo cual podría ser explicado por las características intermareales de ambas especies.

## 6.- BIBLIOGRAFÍA

- Anderson, J., Park, Y.I. & Chow, W.S.** (1997) Photoinactivation and photoprotection of photosystem II in nature. *Physiologia Plantarum* **100**:214-223.
- Andreo, C.S.**, (1984). Fotosíntesis. Secretaría general de la organización de los estados americanos, programa regional de desarrollo científico y tecnológico.
- Alvial, A., & Avaria, S.** (1981) Proliferación de primavera del fitoplancton en la Bahía de Valparaíso. I. Condiciones meteorológicas y oceanográficas. *Revista Biología Marina*, **17**, 197-227.
- Alvial, A., & Avaria, S.** (1982) Proliferación de primavera del fitoplancton en la Bahía de Valparaíso. II. Dinámica de las comunidades. *Revista Biología Marina*, **18**, 1-56.
- Arfsten, D.P., Schaeffer, D.J., & Mulveny, D.C.** (1996). The effects of near ultraviolet radiation on the toxic effects of polycyclic aromatic hydrocarbons in animals and plants: A review. *Ecotoxicol. Environ. Safety*. **33**: 1-24.
- Barcelo, J.** (2001). Fisiología vegetal. Ediciones Pirámide (Grupo Anaya, S.A). Madrid pp.165-175.
- Beer, S., & Eshel, A.** (1985). Determining phycoerythrin and phycocyanin concentrations in aqueous crude extracts of red algae. *Aust. J. Mar. Freshw. Res.* **36**: 785-792.
- Bianchi, T.S., Findlay, S., & Dawson, R.,** (1993). Organic matter sources in the water column and sediments of the Hudson River estuary: the use of plant pigments as tracers. *Est. Coast. Shelf. Sci.* **36**, 359–376.
- Bianchi, T. S., Kautsky, L., & Argyrou M.,** (1997). Dominant chlorophylls and carotenoids in macroalgae of the Baltic Sea (Baltic Proper): their use as potential biomarkers, *Sarsia*, **82**, 55–62.
- Bidigare, R.R, Kennicutt, II M.C, & Brooks, J.M** (1985) Rapid determination of chlorophylls and their degradation products by high-performance liquid chromatography. *Limnol. Oceanogr.* **30**:432–435.
- Bischof, K., Hanelt, D., & Wiencke, C.** (1998) UV radiation can affect depth-zonation of Antarctic macroalgae. *Mar. Biol.* **131**: 597-605.
- Björn, L.O** (1999). Ultraviolet-B radiation, the ozone layer and ozone depletion. *Stratospheric ozone depletion: the effects of enhanced UV-B radiation on terrestrial ecosystems*. Rozema J (ed). Backhuys Publishers, Leiden, The Netherlands. pp 21-37.

- Boelen, P., Obernosterer, I., Vink, A. A. & Buma, A. G. J. (1999)** Attenuation of biologically effective UV radiation in tropical Atlantic waters measured with a biochemical DNA dosimeter. *Photochem. Photobiol.* **69**: 34-40.
- Britton G & Goodwin TW (1971)**. Biosynthesis of carotenoids. *Methods in Enzymology XIII(C)*: 654-701.
- Brotas, V., & Plante-Cuny, M.R. (2003)**. The use of HPLC pigment analysis to study microphytobenthos communities. *Acta Oecol.* **24** 109-115.
- Cabrera, S., Bozzo, S., & Fuenzalida, .H (1995)**. Variations in UV radiation in Chile. *Journal of Photochem. Photobiol. B: Biol.* **28**:137-142.
- Caldwell, M (1978)**. Ultraviolet radiation and plants. In: *Plant Physiology*. 2a ed. Wadsworth Publishing Company Inc. U.S.A. pp 397-399.
- Cardoso L. & Marques D. (2004)** The influence of hydrodynamics on the spatial and temporal variation of phytoplankton pigments in a large, sub-tropical coastal lake (Brazil). *Braz. Arch. Biol. Technol.* **47**, 587–600.
- Carpenter, S. R. & A. M. Bergquist. (1985)**. Experimental tests of grazing indicators based on chlorophyll a degradation products. *Arch. Hydrobiol.* **102**: 303-317.
- Carpenter, S., M. Elser & Elser, J. (1986)**. Chlorophyll production, degradation and sedimentation: Implications for palaeolimnology. *Limnol. Oceanogr.* **31**: 112–124.
- Cuddington, K., & Leavitt P. R. (1999)**. An individual-based model of pigment flux in lakes: Implications for organic biogeochemistry and paleoecology. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **56**: 1964–1977.
- Currie, D. J. (1990)**. Large-scale variability and interactions among phytoplankton, bacterioplankton, and phosphorous. *Limnol. Oceanogr.*, **35**: 1437-1455.
- Damste, J. S. S. & M. P. Koopmans, 1997**. The fate of carotenoids in sediments: a Review. *Pure Appl. Chem.* **69**: 2067–2074.
- Döhler, G., & M.R. Alt, (1989)**. Assimilation of <sup>15</sup>N-ammonia during irradiance with ultraviolet-B and monochromatic light by *Thalassiosira rotula*, *Compt. Rend., Acad. Sci. Paris, Serie D.*, **308**, 513-518.
- Elser, J.J., Carney, H.J., & Goldman, C.R. (1990)**. The zooplankton-phytoplankton interface in lakes of contrasting trophic status: an experimental comparison. *Hydrobiologia* 200/201: 69-82.
- Falkowski, P., & Raven, J. (1997)** *Aquatic Photosynthesis*. Ed. Blackwell Science. Massachusetts. 335 pp.

- Farman, J., Gardiner, B., & Shanklin, J. (1985).** Large losses of total ozone in Antarctica reveal seasonal ClO<sub>x</sub>/NO<sub>x</sub> interaction. *Nature* **315**:207-210.
- Figueroa, F.L., Salles, S., Aguilera, J., Jiménez, C., Mercado, J., Viñebla, B., Flores-Moya, A., & Altamirano, M (1997)** Effects of solar radiation on photoinhibition and pigmentation in the red alga *Porphyra leucosticta*. *Mar. Ecol. Prog. Ser* **151**: 81-90.
- Figueroa, F. L., & Gómez, I. (2001)** Photosynthetic acclimation to solar UV radiation of marine red algae from the warm-temperate coast of southern Spain: a review. *J. Appl. Phycol.* **13**: 235-248.
- Figueroa, F. L., Escassi, L., Pérez-Rodríguez, E., Korbee, N., Giles, A. D., & Johnsen, G. (2003)** Effects of short-term irradiation on photoinhibition and accumulation of mycosporine-like amino acids in sun and shade species of red algal genus *Porphyra*. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* **69**: 21-30.
- Fogg G. E., Stewart, W.D.P., Fay P., & Walsby A. E. (1973).** The blue- green algae, Acad. Press, New York–London, 459 pp.
- Fox, D. L., (1944).** Biochemical fossils. *Science* **100**: 111–113.
- Fox, D. L., Updegraff, D. M., & Novelli, G. D. (1944).** Carotenoid pigments in the ocean floor. *Arch. Biochem.* **5**: 1–23.
- Glauser, M., Bryant, D.A., Frank, G., Wehrli, E., Rusconi, S.S., Sidler, W., & Zuber, H. (1992)** Phycobilisome structure in the cyanobacteria *M. laminosus* and *Anabaena* sp. PCC7120. *Eur. J. Biochem* **205** (3):907-915.
- Glazer, A.N., (1989).** Light guides. Directional energy transfer in phycobilisomes *J. Biol. Chem.* **264** (1): 1-4
- Gómez, I., & Figueroa, F.L. (1998)** Effects of solar UV stress on chlorophyll fluorescence kinetics of intertidal macroalgae from southern Spain: a case study in *Gelidium* species. *J. Appl. Phycol.* **10**: 285-294.
- Gómez, I, Lopez-Figueroa, F, Ulloa, N., Morales, V, Lovengreen, C, Huovinen, P, & Hess, S. (2004).** Patterns of photosynthesis in 18 species of intertidal macroalgae from southern Chile. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **270**: 103-116.
- Gómez, I., Figueroa, FL., Huovinen, P., Ulloa, & N., Morales, V. (2005)** Photosynthesis of the red alga *Gracilaria chilensis* under natural solar radiation in an estuary in southern Chile. *Aquaculture*, **244** (1-4): 369-382.
- Gotz, T., Windhovel, P & Sandman, G. (1999).** Protection of photosynthesis against ultraviolet-B radiation by carotenoids in transformants of the cyanobacterium *Synechococcus* PCC7942. *Plant Physiol.* **120**: 599-604.

- Greenberg, B.M., Wilson M.J., Huang, X.D., Duxbury, C.L., Gerhardt, K.E., & Gensemer, R.W** (1997). The effects of ultraviolet-B radiation on higher plants. In: *Plants for Environmental Studies* (Edited by Wang W, Gorsuch JW & Hughes JS). *Lewis Publishers, NY*. pp 1-35.
- Grossman, A., Schaefer, M.R., Chiang, G.G. & Collier, J.L.** (1993) The phycobilisome, a light-harvesting complex responsive to environmental conditions. *Microbiol. Rev.* **57**, 725±749.
- Häder, D.-P., Worrest, R. S., Kumar, H. D., & R.C., Smith.** 1995. Effects of increased solar ultraviolet radiation on aquatic ecosystems. *Ambio.* 24:174.
- Häder, D.-P** (1995): Effects of UV radiation on aquatic ecosystems. In: Hagen, U., Harder, D., Jung, H. and Streffer, C.: *Radiation Research 185-195*, Congress Proceedings. Vol. 2: Congress Lectures. Tenth Intern. Congress of Radiation Research, Würzburg, Germany. Aug. 27-Sept. 1, pp. 1053-1056.
- Häder, D.-P. & Figueroa, F.L** (1997): Photoecophysiology of marine macroalgae. *Photochem. Photobiol.* **66**, 1-14.
- Häder, D.-P.** (2001). Adaptation to UV stress in algae. In Rai, L. C. & Gaur, J. P. [Eds.] *Algal Adaptation to Environmental Stresses* Springer, Berlin, pp. 173–202.
- Hanelt D** (1996) Photoinhibition of photosynthesis in marine macroalgae. *Scientia Marina* 60 (Supplement 1): 243-248.
- Hanelt, D** (1998). Capability of dynamics photoinhibition in Arctic macroalgae is related to their depth distribution. *Mar. Biol.* **131**: 361-369.
- Helbling, E.W., Villafañe, V., Ferrario, M., & Holm-Hansen, O.** (1992). Impact of natural ultraviolet radiation on rates of photosynthesis and on specific marine phytoplankton species. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **80**: 89-100.
- Henley, W. J., Levavasseur, G., Franklin, L. A., Lindley, S. T, Ramus, J., & Osmond C. B.** (1991) Diurnal responses of photosynthesis and fluorescence in *Ulva rotundata* acclimated to sun and shade in outdoor culture. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **75**: 19-28.
- Herman, R., & McKenzie, R (1998).** Ultraviolet radiation at the Earth's surface. Scientific Assessment of Ozone World Meteorological Organization, Global Ozone Research and Monitoring Project. UNEP Report 9:9.25-9.32.
- Hodgson, D.A.S., Wright, W., Tyler, P.A., & Davies, N** (1998) Analysis of fossil pigments from algae and bacteria in meromictic Lake Fidler, Tasmania, and its application to lake management. *J.Paleolimnol.* **19**: 1-22.
- Hoffmann, A. & Santelices, B.** (1997) *Flora Marina de Chile Central*. Facultad de Ciencias Biológicas. Ediciones Universidad Católica de Chile 68p, 260p 1ª Edición.

- Holm-Hansen, O., Lubin, D., & Helbling, E.W.** (1993a). Ultraviolet radiation and its effects on organisms in aquatic environments. In: Young, A.R., Björn, L.O., Moan, J. & Nultsch, W. (eds), Environmental UV photobiology. Plenum Press, New York. pp 379-425.
- Holm-Hansen, O., Helbling, E.W., & Lubin, D.** (1993b). Ultraviolet radiation in Antarctica: inhibition of primary production. *Photochem. Photobiol.* **58**: 567-570.
- Huovinen, P., Gómez, I., & Lovengreen, C.** (2006). A five-year study of solar ultraviolet radiation I southern Chile (39° S): potential impact on physiology of coastal marine algae? *Photochem. Photobiol.* **82**: 89-96.
- Hurley, J. P., & Armstrong, D. E.** (1990). Fluxes and transformations of aquatic pigments in Lake Mendota, Wisconsin. *Limnol. Oceanogr.* **35**: 384–398.
- Hurley, J. P. & Garrison, P. J.** (1993) Composition and sedimentation of aquatic pigments associated with deep plankton in lakes. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **50**, 2713-2722.
- Jeffrey, S.W, Mantoura R.F.C, & Wright S.W** (1997). Phytoplankton pigments in oceanography: guidelines to modern methods. UNESCO, Paris
- Jeffrey, S. W., Wright, S. W. & Zapata, M.** (1999). Recent advances in HPLC pigment analysis of phytoplankton. *Mar. Freshwater Res.* **50**: 879–896.
- Jerlov, N.G** (1950) Ultra-violet radiation in the sea. *Nature* **166**: 111–112.
- Karentz, D., & Lutze, L.H.** (1990). Evaluation of biologically harmful ultraviolet radiation in Antarctica with a biological dosimeter designed for aquatic environments, *Limnol. Oceanogr.*, **35**, 549-561.
- Karentz, D., Cleaver, J.E, & Mitchell, D.L.** (1991a.).DNA damage in the Antarctic, *Nature*, 350, 28,
- Kerr, J.B., & McElroy, C.T.** (1993). Evidence for large upward trends of ultraviolet-B radiation linked to ozone depletion. *Science* **262**: 1032-1034.
- Kjørboe, T., Lundsgaard, C., Olesen, M., & Hansen, J.L.S** (1994) Aggregation and sedimentation processes during a spring phytoplankton bloom: A field experiment to test coagulation theory. *J. Mar. Res* **52**:297-323.
- Kirk, J.T.O** (1994) Light and photosynthesis in aquatic ecosystems. Cambridge University Press, United Kingdom.
- Klisch, M., & Häder, D.P** (2000) Mycosporine-like amino acids in the marine dinoflagellate *Gyrodinium dorsum*: induction by ultraviolet irradiation. *J. Photochem. Photobiol* **55**:178-182.

- Krause, G.H.** (1988) Photoinhibition of photosynthesis. An evaluation of damaging And protective mechanisms. *Physiol. Plant* **74**: 566-574.
- Kulandaivelu, G., Lingakumar, K., & Premkumar, A.** (1996). UV-B Radiation. In: Plant Ecophysiology. (ed). Prasad, M. John Wiley and Sons, Inc. India. pp 41-60.
- Leavitt, P.R., & Carpenter, S. R.** (1989) Effects of sediment mixing and benthic algal production on fossil pigment stratigraphies. *J. Paleolimnol.* **2** , 147-158.
- Leavitt, P.R.** (1993). A review of factors that regulate carotenoid and chlorophyll deposition and fossil pigment abundance. *J. Paleolimnol.* **1**: 215–227.
- Letelier, R.M., Bidigare, R.R., Hebel, D.V., Ondrusek, M., Winn, C.D., & Car, D.M** (1993) Temporal variability of phytoplankton community structure based on pigment analysis. *Limnol Oceanogr* **38**:1420-1437.
- Liaaen-Jensen S., & Andrewes, A.G.**, (1985), Analysis of carotenoids and related polyene pigments, [in:] Methods in microbiology, G. Gottschalk (ed.), Acad. Press, New York, London, pp 235–283.
- Lissy, E., & Sanhuesa, E.** (1996). Radiación Solar y Fotoprocesos Atmosféricos. Santiago, Chile.
- Lorenzen, C.J.** (1967). Determination of chlorophyll and phaeopigments by spectrophotometric equations. *Limnol. Oceanogr.* **23**:11 -52.
- MacColl, R.** (1998) Cyanobacterial phycobilisomes. *J. Struct. Biol.* **124**, 311±334.
- Mackey, D.M , Mackey D.j., Higgins H.W., & Wrigth, S.W** (1996).CHEMTAX: A program for estimating class abundante from chemical markers. Application to HPLC measurements phytoplankton. *Mar.Ecol.Prog.Ser.*, **114**: 265-283.
- Mackey, D.J., Blanchot, J., Higgins, W.W., & Neveux, J.,** (2002). Phytoplankton abundances and community structure in the equatorial Pacific. Deep-Sea Research II **49**, 2561–2582.
- MacIntyre, H.L., Kana, T.M., & Geider, R.J** (2000). The effect of water motion on the short-term rates of photosynthesis by marine phytoplankton. *Trends Plant Sci.* **5**: 12-17.
- Madronich, S.** (1992). Implications of recent total atmospheric ozono measurements for biologically active ultraviolet radiation reaching the Earth 's surface. *Geophys.Res.Lett.* **19**, 37-40.
- Mantoura, R.F.C, & Llewellyn, C.A** (1983). The rapid determination of algal chlorophyll and carotenoid pigments and their breakdown products in natural waters by reverse-phase high-performance liquid chromatography. *Anal Chim. Acta* **151**:297–314.

- Mantoura, R.F.C, & Repeta, D.J** (1997) Calibration methods for HPLC. In: Jeffrey SW, Mantoura RFC, Wright SW (eds) *Phytoplankton pigments in oceanography: guidelines to modern methods*. UNESCO, Paris, pp 407–428.
- Margalef, R.** (1958) Temporal succession and spatial heterogeneity in phytoplankton. En: A.A. Buzzati-Traverso. *Perspectives in marine biology*, 323-349. Univ. Calif. Press. Berkeley, Los Angeles, California.
- Mercado, J. M., Jiménez, C. Niell, F. X. & Figueroa, F. L.** (1996) Comparison of methods for measuring light absorption by algae and their application to the estimation of package effect. *Sci. Mar.* **60**: 39-45.
- Mitchell, D.L, & Karentz, D.** (1993) The induction and repair of DNA photodamage in the environment. En: Young AR, LO Björn, J Moan & W Nultsch (eds) *Environmental UV photobiology*: 345-377. Plenum Press, New York, New York, USA.
- Moon, R. W. & Dawes, C. J.** (1976). Pigment changes and photosynthetic rates under selected wavelengths in the growing tips of *Eucheuma isiforme* (C. Agardh) var *denudatum* Cheney during vegetative growth. *Br. Phycol. J.* **11**: 165-174.
- Muñoz, P., & Alvial, A.** (1986a) Proliferación de microalgas: origen, mecanismo e impacto sobre la piscicultura. Universidad de Valparaíso. Valparaíso. 42 pp.
- Neshyba, S.** (1987). *Oceanography: perspectives on fluid earth*. John Wiley and Sons, Nueva York. 506 pp.
- Palenik, B., Price, N.M, & Morel, F.M.M** (1991) Potential effects of UV-B on the chemical environment of marine organisms: a review. *Environ Poll* **70**:117-130.
- Obayashi, Y., Tanoue E., Suzuki K., Handa N., Nojiri Y., & Wong C. S.,** (2001), Spatial and temporal variabilities of phytoplankton community structure in the northern North Pacific as determined by phytoplankton pigments, *Deep Sea Res. I*, **48**, 439–469.
- Orce, L. & Helbling, W.** (1997) Latitudinal UVR-PAR measurements in Argentina: extent of the 'ozone hole'. *Global and Planetary Change.*, **15**: 113-121.
- Ormrod, D., & Hale, B.** (1995). Physiological Responses and crops to Ultraviolet-B radiation stress. In: Pessaraki M (ed). *Handbook of plant and crop physiology*. Marcel Dekker, Inc. U.S.A. pp 761-770.
- Ostrovsky, I., & Yacobi, Y.** (1999) Organic matter and pigments in surface sediments: possible mechanism of their horizontal distributions in a stratified lake. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **56**, 1001–10.
- Puentes, P.** (2004). *Introducción a la Cromatografía de Líquidos de Alto Performance*. Curso para Universidad Austral de Valdivia, Instituto de Farmacia.

- Raymont, J.** (1980). Plankton and productivity in the oceans. Phytoplankton. 2<sup>a</sup> ed. Grant Britian.
- Rowan, K. S.**, (1989). Photosynthetic pigments of algae, Cambridge Univ. Press, Cambridge, 317 pp.
- Santelices, B.** (1989) Algas Marinas de Chile. Facultad de Ciencias Biológicas. Pontificia Universidad Católica de Chile. Santiago, Chile. 382 pp.
- Schluter, L., & Havskum, H.**, (1997), Phytoplankton pigments in relation to carbon content in phytoplankton communities, *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **155**, 55–65.
- Schreiber, U., Schliwa, U., & Bilger, W.** (1986) Continuous recording of photochemical and non-photochemical chlorophyll fluorescence quenching with a new type of modulation fluorometer. *Photosynth. Res.* **10**: 51-62.
- Schreiber, U., Bilger, W., & Neubauer, C.** (1994) Chlorophyll fluorescence as a non-intrusive indicator for rapid assessment of in vivo photosynthesis. *Ecol. Stud.* **100**: 49-70.
- Schreiber, U., Endo, T., Mi H., & Asada K** (1995) Quenching analysis of chlorophyll fluorescence by the saturation pulse method: Particular aspects relating to the study of eukaryotic algae and cyanobacteria. *Plant Cell Physiol* **36**: 873-882.
- Scully, N. M., Vincent, W. F. , Lean, D. S. & Cooper, W. J.** (1997) Implications of ozone depletion for surface water photochemistry: sensitivity of clear lakes, *Aquat. Sci.*, **59**, 20–274.
- Sinha, R. P., Kumar H. D., Kumar A., & Häder, D.-P.** (1995) Effects of UV-B irradiation on growth, survival, pigmentation and nitrogen metabolism enzymes in cyanobacteria. *Acta Protozool.* **34**: 187-192.
- Sinha, R. P., Singh, N., Kumar, A., Kumar, H. D., & Häder, D. P.** (1997). Impacts of ultraviolet-B irradiation on nitrogen-fixing cyanobacteria of rice paddy fields. *J. Plant Physiol.* **150**:188-193.
- Skoog, D.A., & Leary, J.J.** (2001). Análisis instrumental. McGraw-Hill. España, 935 p. 4<sup>a</sup> edición.
- Smith, R. C., & Baker, K. S.** (1979). "Penetration of UV-B and biologically effective dose-rates in natural waters." *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* **29**: 311-323.
- Smith, R. C., Prezelin, B. B., Baker, K. S. , Bidigare, R. R., Boucher, N., Coley, T., Karentz, D., MacIntyre, S., Matlick, H. A., Menzies, D., Ondrusek, M. E., Wan, Z. & Waters, K.** (1992). Ozone depletion: Ultraviolet radiation and phytoplankton biology in Antarctic waters. *Science* **255**: 952-959.
- Steinman, A.D., Havens, K.E., Louda, J.W., Winfree, N.M., & Baker, E.W.**, (1998). Characterization of the photoautotrophic algal and bacterial communities in a large,

- shallow, subtropical lake using HPLC–PDA based pigment analysis, *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, **55**, 206–219.
- Sterner, R.W., Elser, J.J., Fee, E.J Guildford, S.J., & Chrzanowski, T.H.** (1997) The light:nutrient ratio in lakes: the balance of energy and materials affects ecosystem structure and process. *American Naturalist* **150**: 663-684.
- Ston, J., & Kosakowska, A.** (2000). Qualitative and quantitative analysis of Baltic phytoplankton pigments. *Oceanologia*, **42** (4), 449-471.
- Ston, J., Kosakowska, A. M., Łotocka ,E., & Łysiak –Pastusza, K.** (2002) Pigment composition in relation to phytoplankton community structure and nutrient content in the Baltic Sea. *Oceanologia*, **44** (4), 419-437.
- Strasburger, E., Noll, F., Schenck, H., & Schimper, A.** (1994) Fisiología del metabolismo material y energético. 8º ed. En: Tratado de Botánica. (ed) Omega 252:320.
- Strickland, J.D.H., & Parsons, T.R.** (1972). A practical handbook of seawater analysis. *Fish. Res. Board Can. Bull.* 167, 2nd ed. 310pp.
- Stryer, L., Berg, J., & Tymoczko, J.** (2002). Biochemistry. Freeman, NewYork, 974 p. 5ª edición.
- Sverdrup, H.U.** (1953). On conditions for vernal blooming of phytoplankton. *J. Cons. perm. int. Explor. Mer.*, **18**: 287-295.
- Vallentyne, J. R.,** (1954). Biochemical limnology. *Science* **119**: 605–606.
- Vallentyne, J. R.,** (1956). Epiphasic carotenoids in postglacial lake sediments. *Limnol. Oceanogr.* **1**: 252–262.
- Vidussi F., Claustre H., Manca B.B., Luchetta A., Marty J.C.,** (2001), Phytoplankton pigment distribution in relation to upper thermocline circulation in eastern Mediterranean Sea during winter, *J. Geophys. Res.*, **106** (C9), 19939–19956.
- Villafañe, V., Sunfbäck,C., Figueroa, F.L., & Helbling, W.E** (2003) Photosynthesis in the aquatic environment as affected by ultraviolet radiation. En: Helbling EW & H Zagarese (eds) UV effects in aquatic and Ecosystems: 357-397.
- Vincent, W.F., & Roy, S** (1993) Solar ultraviolet-B radiation and aquatic primary production: Damage, protection, and recovery. *Environm Rev* **1**: 1-12.
- Vollenweider, R.A.** (1968). Scientific fundamentals of the eutrophication of lakes and flowing waters, with particular reference to nitrogen and phosphorus as factors in eutrophication. OECD, Paris. Tech. Rpt. DA 5/SCI/68.27. 250 pp.
- Webb, K., & D`Elia, C.** (1980) Nutrient and oxygen redistribution during a spring neap tidal cycle in a temperatura estuarine. *Science*, **207**:983-985.
- Wetzel, R. G.,** (1975). Limnology. Saunders Publ. Co. Philadelphia, 716 pp.

- Winfree, N. M., J. W. Louda, E. W. Baker, A. D. Steinman & K. E. Havens**, (1997). Application of chlorophyll and carotenoid pigments for the chemotaxonomic assessment of seston, periphyton, and cyanobacterial mats of Lake Okeechobee, Florida. *Molec. Mark. Environ. Geochem.* **671**: 77–91.
- Wiencke, C., Gómez, I., Pakker, H., Flores-Moya, A., Altamirano, M., Hanelt, D., Bischof, K., & Figueroa, F.L.** (2000) Impact of UV-radiation on viability, photosynthetic characteristics and DNA of brown algal zoospores: implications for depth zonation. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **197**, 217–229.
- Williamson, C.E., & Zagarese, H.E.** (1994). "Impact of UV-B Radiation on Pelagic Freshwater Ecosystems", *Archiv fuer Hydrobiologie*, Vol. **43**, E. Schweizerbartsche Verlagsbuchhandlung, Stuttgart.
- Wood, E.J.** (1967). Microbiology of oceans and estuarines. Elsevier Oceanography series, Amsterdam. 319 pp.
- Woźniak, B., Dera, J., Ficek, D., Majchrowski, R., Kaczmarek, S., Ostrowska, M., Koblentz-Mishke, O** (2000) Model of the *in vivo* spectral absorption of algal pigments. Part 1. Mathematical apparatus. *Oceanologia* **42** (2), pp. 177-190.
- Wright, S.W, Jeffrey, S.W, Mantoura, R.F.C, Llewellyn, C.A, Bjornland, T., Repeta, D., & Welschmeyer, N.** (1991) Improved HPLC method for the analysis of chlorophylls and carotenoids from marine phytoplankton. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **77**:183–196.
- Wright, S.W., & Jeffrey, S.W** (1997) High-resolution HPLC system for chlorophylls and carotenoids of marine phytoplankton. In: Jeffrey S.W, Mantoura, R.F.C, Wright, S.W (eds) Phytoplankton pigments in oceanography: guidelines to modern methods. UNESCO, Paris, pp 327–342.
- Wright., S.W., & Enden, R.L.** (2000). Phytoplankton community structure and stocks in the eastern Antarctic marginal ice zone (BROKE survey, January-March 1996) determined by CHEMTAX analysis of HPLC pigments signatures. *Deep-Sea Res II* **47**: 2363-2400.
- Yacobi, Y., Eckert, Z.W., Trüper, H. G., & Berman, T** (1990). High Performance Liquid Chromatography detection of phototrophic bacterial pigments in aquatic environments. *Microb. Ecol.* **19**: 127-136.
- Yost, R.W., Ettore L.S., & Conlon, R.D.** (1980). Introducción a la cromatografía líquida práctica. Perkin-Elmer Corporation. Norwalk. USA. pp 29-82.
- Zepp, R.G.**, (1982) Experimental approaches to environmental photochemistry. In: Hutzinger B0 (ed) The handbook of environmental chemistry, Vol 2/PartB. Springer-Verlag, Berlin, p 19-41.