



ARTÍCULO DE INVESTIGACIÓN

Degradación fotoquímica del carbono orgánico disuelto: Producción de peróxido de hidrógeno y efectos potenciales sobre el plancton en el Canal Beagle (Tierra del Fuego)

Photochemical degradation of dissolved organic carbon: Hydrogen peroxide production and potential effects on plankton in the Beagle Channel (Tierra del Fuego)

MARCELO HERNANDO^{1,2}, GUSTAVO FERREYRA³ & GABRIELA MALANGA^{4,*}

¹Comisión Nacional de Energía Atómica, Dpto. Radiobiología, Av. Gral Paz 1499 (B1650), Buenos Aires, Argentina

²Facultad de Medicina, Universidad de Morón, Cabildo 134 (1708), Bs As, Argentina

³Institut de Sciences de la Mer de Rimouski, Université du Québec à Rimouski, 310 allée des Ursulines, Canada

⁴Fisicoquímica-PRALIB, FFyB, UBA CONICET

*Autor correspondiente: gmalanga@ffyb.uba.ar

RESUMEN

Se analizó la producción de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en función de la dosis de radiación solar en aguas del Canal Beagle, en la desembocadura del Río Lapataia, Ushuaia (Tierra del Fuego, Argentina). El estudio se realizó entre Octubre y Noviembre de 2004. Durante dicho período se produce anualmente una disminución en la concentración del ozono estratosférico, lo que ocasiona un aumento en las dosis de radiación ultravioleta B (RUVB, 280-320 nm) incidente en la superficie de la tierra, en relación al resto de las longitudes de onda del espectro solar (radiación ultravioleta A [RUVa, 320-400 nm] y radiación visible [RVis, 400-700 nm]). Se observaron diferencias significativas en la foto-oxidación del carbono orgánico disuelto (COD) cuando se comparó la exposición a toda la radiación solar contra la exposición a longitudes de onda mayores a 295 nm y a 320 nm. Este tipo de respuesta correspondió a la exposición a dosis mayores de 21 kJ m^{-2} de RUVB. La foto-producción en aguas del Canal Beagle tiene niveles bajos (concentración máxima de H_2O_2 promedio observada luego de la exposición a la radiación solar de 40 nM) probablemente debido a las bajas concentraciones de COD determinadas, a su baja reactividad o ambas razones. Esto explica la ausencia de potencial daño oxidativo en el plancton de la zona expuesto a las concentraciones máximas de H_2O_2 observadas.

Palabras clave: COD, fitoplancton, ozono, peróxido de hidrógeno, RUVB.

ABSTRACT

The production of hydrogen peroxide (H_2O_2) based on solar radiation was analyzed in waters of the Beagle Channel at the mouth of the Lapataia River, Ushuaia, Tierra del Fuego. Between October and November 2004, we incubated the samples in coincidence with the spring stratospheric ozone depletion, which regularly produces an increase in the doses of ultraviolet radiation B (RUVB, 280-320 nm). Significant differences were observed in the photo-oxidation of dissolved organic carbon (COD) comparing the exposure to the total solar radiation against the exposure to > 295 nm and to > 320 nm wavelengths. Such effect was observed with RUVB doses higher than 21 kJ m^{-2} . No biological degradation was observed in absence of sunlight. It was determined a maximum H_2O_2 concentration of 40 nM in average after exposure to the solar radiation, regardless of the dose received. The photo-production of H_2O_2 in waters of the Beagle Channel showed low levels, probably due to the low COD concentrations, to its weak reactivity, or to both. Considering that only high concentrations of H_2O_2 induce oxidative damage, we failed to find potential oxidative effects on the studied plankton communities from the Beagle Channel when were exposed to the highest H_2O_2 concentrations previously observed.

Key words: COD, hydrogen peroxide, ozone, phytoplankton, RUVB.

INTRODUCCIÓN

El peróxido de hidrógeno (H_2O_2) es un compuesto que puede ser encontrado en la superficie de los océanos en concentraciones

de 10-100 nM (Moore et al. 1993; Petasne & Zika 1997; Hanson et al. 2001). Las fuentes principales del mismo en los ambientes marinos son la producción fotoquímica in situ (Cooper et al. 1988; Wong & Wong, 2001), la deposición

atmosférica (Abele et al. 1999; Hanson et al. 2001) y la producción biológica (Palenik & Morel 1988; Hanson et al. 2001; Steigenberger et al. 2010). Sin embargo, la producción fotoquímica es la fuente más importante en ambientes con fuertes aportes de carbono orgánico disuelto (COD), debido a una serie de reacciones que tienen lugar entre este último y la radiación ultravioleta (RUV 280-400 nm), y en particular con la radiación ultravioleta B (RUVB, 280-320 nm). La relación entre la longitud de onda y la formación de H_2O_2 está asociada con la absorbancia de la luz por las sustancias orgánicas presentes en el agua (Sikorski & Zika 1993). Dicha absorbancia es mayor en las regiones del RUVB, decrece en la región de la radiación ultravioleta A (RUVA, 320-400 nm) y es menor a longitudes de onda mayores (> 400 nm) (Yocis et al. 2000). Este tipo de proceso puede influenciar significativamente los ambientes acuáticos. Cooper et al. (1988) encontraron una correlación positiva entre la tasa de acumulación de H_2O_2 y el COD presente en superficie y sub-superficialmente irradiando agua de mar con luz solar, utilizando tubos de cuarzo. Sin embargo, hasta el presente se han realizado pocos estudios para evaluar la producción in situ de H_2O_2 . Los datos de concentración de H_2O_2 en el Océano Atlántico son escasos (Gerringa et al. 2004). Lean et al. (1994) estudiando dos lagos, determinaron que la distribución del H_2O_2 en la columna de agua dependía de: i) la mayor producción cerca de la superficie (generalmente menos de 1 metro) debido a una menor atenuación de la RUV, ii) la mezcla en la columna de agua en función de la velocidad del viento y iii) la actividad microbiana, que provoca su degradación.

El H_2O_2 tiene una vida relativamente larga ($t_{1/2} = 4-24$ h) (Lean et al. 1994). Las concentraciones de H_2O_2 en el medio acuático podrían afectar a los ecosistemas marinos indirectamente al modificar la especiación de los metales traza. Croot et al. (2005) estudiaron el efecto de oxidación del Fe (II) por H_2O_2 en el marco de un estudio a meso-escala de enriquecimiento de Fe en el frente Polar (Antártida) y demostraron que la oxidación del mismo puede ser transferida rápidamente hacia una forma no disponible para el fitoplancton (Sarhou et al. 1997). Esto afecta su disponibilidad biológica y/o toxicidad

influyendo a los organismos (King & Farlow, 2000). Por otro lado, altas concentraciones de H_2O_2 pueden producir efectos deletéreos en sistemas biológicos, causando por ejemplo, daño oxidativo en las membranas celulares (Yu 1994; Sue Goo Rhee et al. 2010), mutagénesis y blanqueamiento de la clorofila (Chen et al. 2006).

Los múltiples efectos biológicos de la RUVB pueden ser directos o indirectos. El efecto directo de un aumento de la RUVB como consecuencia de la disminución del ozono estratosférico ha sido determinado sobre el fitoplancton marino antártico y subantártico (Hernando et al. 1999; 2002; 2011a). Por otro lado, sus efectos se hacen notar regularmente sobre el extremo austral de América del Sur (Orce et al. 2001). La RUV también puede tener efectos indirectos en ecosistemas acuáticos a través de la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS, sigla en inglés), lo que podría conducir a una situación de estrés oxidativo al exceder la capacidad antioxidante de diversos organismos (Foyer et al. 1994; Yocis et al. 2000).

Dentro del marco de esta problemática, los objetivos del presente trabajo fueron estudiar la formación de H_2O_2 a partir de la degradación fotoquímica del COD por la RUVB en el Canal Beagle, y evaluar el posible daño oxidativo sobre comunidades planctónicas Sub-Antárticas, considerando el rango natural de concentraciones de H_2O_2 determinadas a partir del objetivo precedente.

MÉTODOS

Diseño experimental

Todos los experimentos fueron realizados en la zona del Canal Beagle, en el Centro Austral de Investigaciones Científicas (CADIC, Ushuaia, 54°52' S, 68°18' W; Figura 1).

Las muestras de agua fueron obtenidas en Bahía Lapataia donde el aporte de materia orgánica debido a la presencia de agua de deshielo es muy importante. Durante el deshielo (Octubre 2004) se evaluaron tres sitios de muestreo: i) zona adyacente a la desembocadura del Río Lapataia, ii) zona intermedia entre el Canal Beagle y la desembocadura de dicho río y iii) en una zona cercana al Canal Beagle saliendo de la Bahía Lapataia (Figura 1). De cada lugar de muestreo se tomaron 20 litros de muestra. Una sub-muestra se utilizó para el análisis de COD y el remanente se congeló a -20 °C. Una vez determinada la zona de mayor concentración de COD se descongeló completamente la muestra correspondiente, asegurando una correcta homogeneización de la misma y se procedió

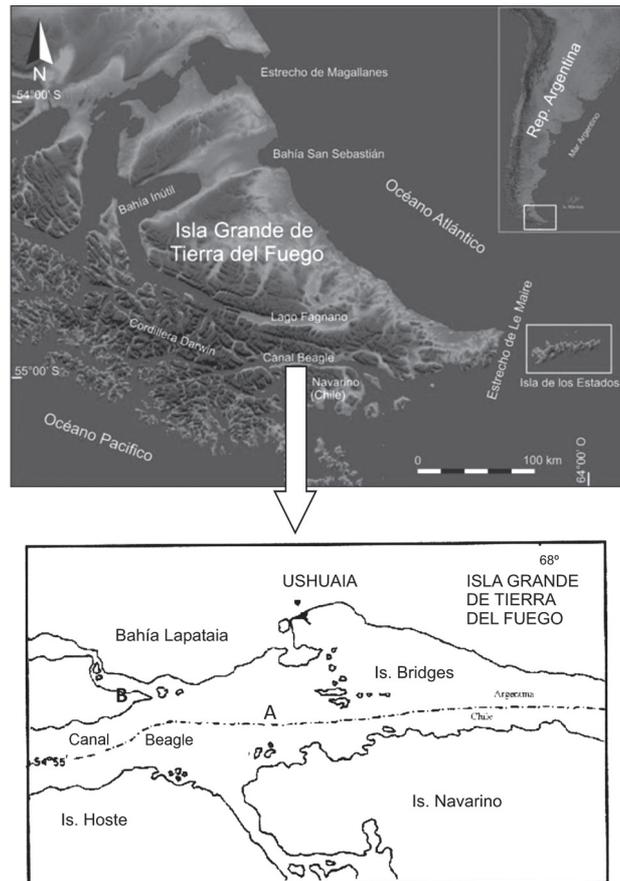


Fig. 1: Sitio de estudio en el Canal Beagle, Tierra del Fuego. (A) zona de toma de muestras de comunidades planctónicas; (B) zona de toma de muestras de agua para la evaluación de foto-producción de H_2O_2 .

Study site in the Beagle Channel, Tierra del Fuego. (A) sampling area of plankton samples; (B) sampling area of water for the H_2O_2 photo-production.

a su procesamiento en el laboratorio. El agua se pre-filtró por filtros de fibra de vidrio Whatman GF/F a los efectos de retirar toda partícula mayor a $0.7 \mu m$ como por ejemplo fitoplancton, gran parte de bacterias y material particulado. Luego, el agua resultante se filtró nuevamente a través de filtros de acetato de celulosa de $0.45 \mu m$ (Millipore HA) para eliminar el bacterioplancton restante. El agua de este último filtrado fue almacenada en recipientes Nalgene de 1000 mL (prelavados con HCl 1N) y mantenida a $-20^\circ C$ hasta el momento de los experimentos. Una de dichas muestras fue nuevamente analizada para determinar la concentración inicial y final (luego de 40 días de almacenamiento) de COD. Con este procedimiento nos aseguramos de que en cada exposición a la luz solar, el agua tuviese la misma concentración de COD y la dosis recibida fuese la única variable analizada en relación con la formación de H_2O_2 .

La concentración de COD en la muestra original fue determinada en el Instituto Nacional de Ciencia Técnica Hídrica (Ezeiza, Bs. As.) por el método de combustión a alta temperatura (Standard Methods Committee 1996).

Con el objetivo de determinar la formación de H_2O_2 se realizaron tres tratamientos por cuadruplicado

exponiendo las muestras de agua filtrada a la radiación solar. Los mismos se describen a continuación:

Tratamiento 1 (agua de mar filtrada expuesta a la totalidad del espectro de la radiación solar $> 280 nm$): las exposiciones se realizaron en tubos cilíndricos de cuarzo de 50 ml (Figura 2).

Tratamiento 2 (agua de mar filtrada expuesta a la radiación solar $> 295 nm$): las exposiciones se realizaron en tubos cilíndricos de Pyrex de 50 ml (Figura 2).

Tratamiento 3 (agua de mar filtrada expuesta a la radiación solar $> 320 nm$): las exposiciones se realizaron en tubos cilíndricos de pyrex de 50 ml. con pre-filtro de Mylar (DuPont, el cual tiene un 50 % de transmisión a $323 nm$) (Figura 2).

En el tratamiento control se colocaron muestras de agua filtrada (como se explicó previamente) en tubos sin exposición a la luz para verificar que el procedimiento de filtración haya sido efectivo en la eliminación de organismos de las muestras de agua utilizadas para las incubaciones. Eventualmente, la presencia de bacterias en el agua incubada para la determinación de H_2O_2 hubiese incorporado un error muy significativo en la interpretación de los resultados. Por otro lado, se

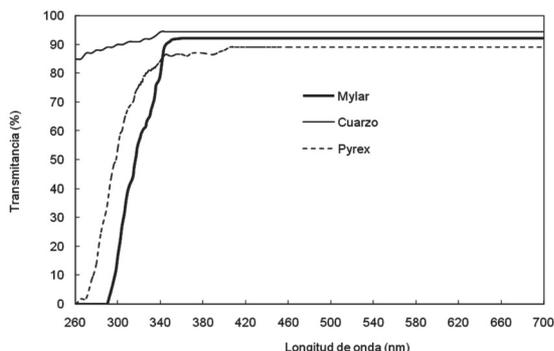


Fig. 2: Características de transmisión de los diferentes filtros utilizados en los experimentos.

Transmission characteristics for long-pass filters used in the experiments.

utilizaron para determinar la concentración inicial de H_2O_2 .

Todas las incubaciones se realizaron en baños de agua con control de temperatura a 10 °C, siendo esta la temperatura promedio del Canal Beagle durante el período de experimentación (Almadoz et al. 2011). El tiempo de incubación fue de tres horas (de 11 a 14 h). Para determinar dicho período de exposición, se evaluó la concentración de H_2O_2 en el agua de mar expuesta a RUVB, durante tiempos de incubación de 30 minutos. La máxima producción se determinó luego de tres horas de incubación; y a partir de dicho período se comenzó a observar la degradación de H_2O_2 con disminución de su concentración.

Medición de la luz solar

La irradiancia solar superficial se midió continuamente con un espectroradiómetro GUV (Biospherical Inc.). Dicho equipo es un radiómetro multicanal con estabilizador de temperatura que registra irradiancias mediante canales de un estrecho ancho de banda (cerca de 10 nm), centrado en aproximadamente 305, 320, 340 y 380 nm, además de RVis (Booth et al. 1994) y programado a una frecuencia de un dato por minuto. Para el cálculo de las dosis experimentales se utilizó la ecuación obtenida por Orce y Helbling (1997).

Determinación H_2O_2

La concentración de H_2O_2 se determinó a través de un método fluorométrico según la técnica descrita por Pamatmat 1990 y modificada por Abele-Oeschger et al. (1997). Esta técnica se basa en la oxidación del pigmento fluorescente escopoletina (6-metil-7 hidroxil-1,2-benzopirano) por el H_2O_2 en una reacción catalizada por una peroxidasa (peroxidasa de rábano, HRP). Así la peroxidasa forma un complejo con el peróxido, tomando de la escopoletina reducida electrones y protones para la reducción del peróxido a agua. La escopoletina oxidada pierde la fluorescencia. Por lo tanto, lo que se determina es la reducción de la misma. Las concentraciones de H_2O_2 determinadas para cada tratamiento en todos los experimentos realizados siempre fueron mayores a 5 nM, valor límite de detección de acuerdo al método utilizado.

Efecto del H_2O_2 en comunidades planctónicas

Para evaluar el estrés oxidativo generado en comunidades planctónicas naturales del Canal Beagle, se determinó la oxidación de 2'7'-diclorofluoresceína diacetato (DCF-DA) (Puntarulo & Cederbaum, 1996). Este índice es una medida directa del contenido de ROS totales celulares (Malanga 2001). Se expusieron tres comunidades en los mismos tubos de cuarzo utilizados en los experimentos de producción de H_2O_2 . Las muestras de plancton fueron extraídas a 1 m de profundidad en la zona central del Canal Beagle (Figura 1) el mismo día de cada experimento (23, 26 de noviembre y 3 de diciembre de 2004). Se trabajó con cuatro tratamientos (por cuadruplicado) exponiendo las muestras a diferentes concentraciones de H_2O_2 , en correspondencia con las concentraciones determinadas previamente mediante las incubaciones con agua de mar filtrada. Dichas concentraciones (tratamientos) fueron 0 (control), 20, 30, 40 y 60 nM H_2O_2 , y fueron preparadas con H_2O_2 30 % v/v (Sigma). Las comunidades fueron expuestas durante 6 horas a todo el espectro de la luz solar natural, a 10 °C en un baño térmico con control de temperatura. Para realizar estas incubaciones, el agua con las comunidades planctónicas fue pre-filtrada por una red Nitex de 300 μ m a los efectos de excluir el mesozooplancton. De esta manera las comunidades expuestas estuvieron expuestas por bacterioplancton, microzooplancton (ambos sin evaluar taxonómicamente) y fitoplancton. Luego de la exposición en cada tratamiento, las comunidades fueron incubadas durante 30 min a 37 °C en un medio de reacción conteniendo DCF-DA 5 mM, solución reguladora Tris-HCl 40 mM pH 7.0, en un volumen final de 1.5 ml (Malanga et al. 2001). Se midió la fluorescencia del sobrenadante (λ_{ex} = 488 nm, λ_{em} = 525 nm) en un espectrofluorómetro Shimadzu (modelo UV-1203). En todos los casos se incluyeron blancos paralelos conteniendo las mezclas de reacción sin el material en estudio.

Análisis estadísticos

Para el análisis estadístico se utilizaron métodos paramétricos de análisis de la varianza (ANOVA) utilizando el programa Statistica versión 5.1. Antes de cada análisis se verificó la homoscedacia utilizando la prueba de Mauchley y la normalidad con la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Los factores utilizados fueron los tratamientos y las dosis de radiación solar. Cuando la interacción fue significativa se utilizó un ANOVA de un factor. Se realizó una prueba de Tukey para determinar las diferencias significativas en cada factor.

RESULTADOS

La acumulación de H_2O_2 fue similar en los diferentes tratamientos (> 280, > 295 y 320 nm) para dosis de RUVB inferiores a ~21-22 kJ m⁻² (F = 1.27, P > 0.05, Figura 3 y Tabla 1). Sin embargo, cuando las dosis experimentales superaron dicho umbral, las diferencias fueron altamente significativas (F = 21.51, P < 0.01) (Tabla 2), siendo la acumulación más elevada aquella observada en las muestras de agua expuestas a la RUVB total y alcanzando valores máximos de ~40 nM H_2O_2 (Figura 3).

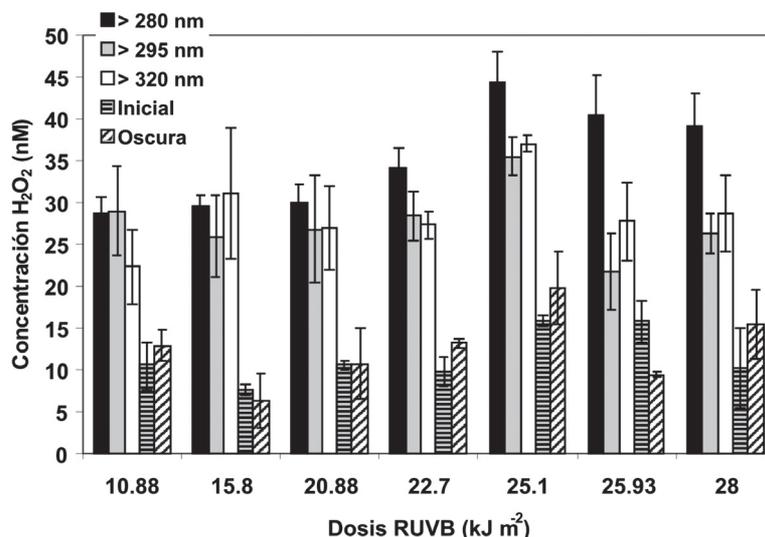


Fig. 3: Concentración de H₂O₂ generada luego de tres horas de exposición de agua de mar a los diferentes tratamientos de luz solar natural. Cada barra representa el promedio con su desvío estándar. Se muestran los tratamientos > 280 nm (color negro), > 295 nm (color gris), > 320 nm (color blanca), concentración al tiempo inicial (color gris con líneas paralelas) y concentración en tratamiento sin exponer a la luz (color blanco con líneas oblicuas).

Concentration of H₂O₂ generated after three hours of seawater exposure to the different sunlight treatments. Each bar represents the average with its standard deviation. See the treatments > 280 nm (black), > 295 nm (gray), > 320 nm (white), concentration at initial time (gray with paralel lines) and concentration in without exposure to ligh treatment (white with diagonal lines).

TABLA 1

Resultado de los análisis de ANOVA al evaluar los resultados de la formación de H₂O₂ en los tres tratamientos de radiación solar en función de las dosis de UVB recibida.

Result of the analysis of ANOVA to evaluate the results of the formation of H₂O₂ in three treatments of solar radiation depending on the dose of UVB received.

Dosis UVB (kJ m ⁻²)	F	P
10.88	2.83	0.100
15.80	1.02	0.190
20.88	0.59	0.290
22.70	8.93	0.007
25.10	8.95	0.003
25.93	16.56	0.001
28	13.22	0.002

Asimismo, los resultados mostraron que en ningún caso hubo diferencias significativas entre el tratamiento > 295 nm y las respuestas a las longitudes de onda > 320 nm, mientras que sí las hubo entre el tratamiento > 280 nm y los restantes (Tabla 2). Esto sugiere que sólo la RUVB lejana (280-295 nm) tuvo un efecto importante en la formación de H₂O₂, mientras que el resto de la RUVB, la RUVA y la RVis no contribuyeron a su producción. Por otro lado, a partir de 25 kJ m⁻², no se observó ningún aumento significativo en la acumulación de H₂O₂ a dosis mayores de RUVB en el agua filtrada expuesta a > 280 nm (F = 0.16, P > 0.05, r = 0.16, Figura 3). Las tasas de producción de H₂O₂ correspondientes a las dosis superiores a 25 kJ m⁻² estuvieron dentro de los rangos 11.15-6.88; 7.33-2.41 y 7.68-2.28 nM h⁻¹ para los tratamientos > 280 nm, > 295 nm y > 320 nm, respectivamente. Considerando que no se encontró descomposición ni producción

TABLA 2

Resultados de los análisis de Tukey para determinar las diferencias significativas entre los tratamientos para las dosis experimentales de UVB. Se evaluaron aquellas en las cuales el ANOVA dio significativo ($P < 0.05$). La misma letra indica que no se encontraron diferencias significativas ($P > 0.05$).

Tukey tests to determine the significant differences between treatments for the experimental dose of UVB, re-inspected and those in which the ANOVA gave significant results ($P < 0.05$). The presence of the same letter indicates that no significant differences ($P > 0.05$) were found.

Dosis UVB (kJ m^{-2})	Tratamiento	Promedio	Grupos Homogéneos
22.78	> 280 nm	34.03	a
	> 290 nm	27.25	b
	> 320 nm	28.41	bc
25.1	> 280 nm	44.41	a
	> 290 nm	37.05	b
	> 320 nm	35.44	b
25.93	> 280 nm	44.32	a
	> 290 nm	27.78	b
	> 320 nm	21.73	b
28	> 280 nm	39.06	a
	> 290 nm	28.62	b
	> 320 nm	26.28	b

del H_2O_2 bajo condiciones de oscuridad, la acumulación del compuesto en los diferentes tratamientos se debió fundamentalmente a la exposición del COD a la radiación solar. Por otro lado, estos resultados muestran que el protocolo de filtración utilizado fue adecuado para la eliminación de la totalidad de organismos presentes originalmente en el agua. La concentraciones de COD determinadas en el agua de mar de la Bahía Lapataia, desde la desembocadura del Río Lapataia hasta su desembocadura en el Canal Beagle, estuvieron dentro del rango $1000\text{-}2000 \mu\text{g L}^{-1}$, considerando los 3 puntos de muestreo mencionados y 3 réplicas en cada estación de muestreo. Sin embargo, todos los experimentos de exposición a los distintos espectros de luz solar se realizaron con agua de mar cuya concentración de COD fue de $1500 \mu\text{g L}^{-1}$, proveniente de la zona adyacente a la desembocadura del Río Lapataia. Dicha concentración no se modificó luego del período máximo de almacenamiento (40 días).

En la Figura 4 se muestran los resultados de las exposiciones de las comunidades planctónicas provenientes del Canal Beagle a las diferentes concentraciones de H_2O_2 adicionadas experimentalmente. Al evaluarse la presencia de ROS, no se encontraron diferencias significativas ($P > 0.05$, Tabla 3) entre las diferentes dosis de H_2O_2 al ser contrastadas contra los controles (tanto en ausencia de H_2O_2 como sin el agregado de DCF-DA) en ninguna de las tres comunidades estudiadas. En los dos primeros experimentos (23 y 26/11), que registraron una composición taxonómica del fitoplancton muy similar (Tabla 4), se observó una mayor concentración de ROS. Sin embargo, no se hallaron diferencias estadísticamente significativas en las respuestas a las concentraciones crecientes de H_2O_2 adicionadas ($P > 0.05$, Tabla 3).

La exposición de cada una de las comunidades evaluadas se realizó en condiciones contrastantes de nubosidad, lo que implicó una diferencia en las dosis

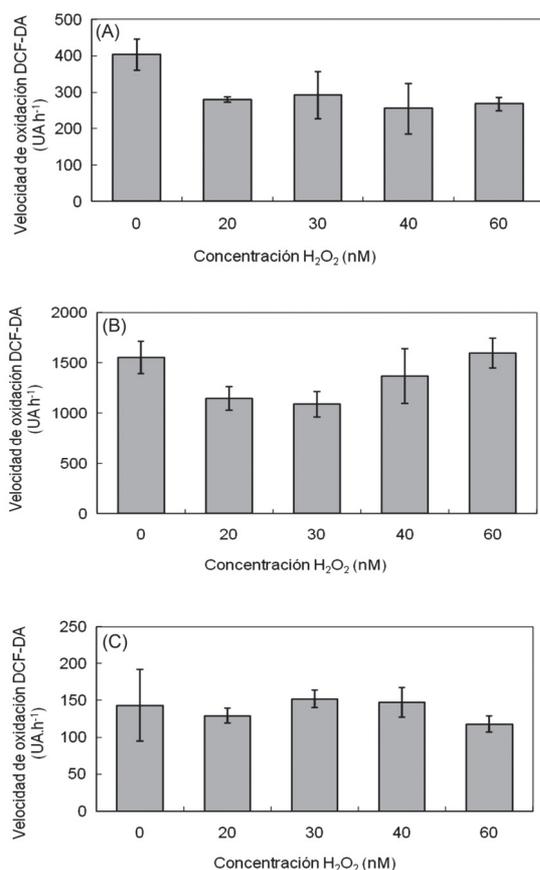


Fig. 4: Velocidad de oxidación de DCF-DA (expresada como Unidades Arbitrarias por hora de exposición) en muestras de las comunidades fitoplanctónicas expuestas a todo el espectro de radiación solar en función de la concentración de H₂O₂ generada experimentalmente en las fechas: (A) 23 noviembre; (B) 26 noviembre y (C) 3 diciembre de 2004. Los valores corresponden al promedio \pm desviación estándar.

Speed of DCF oxidation (expressed as arbitrary units in 1 hour exposure) in samples of phytoplankton communities exposed to the total spectrum of solar radiation as a function of the concentration of H₂O₂ generated experimentally in the following dates: (A) November 23; (B) November 26 and (C) December 3, 2004. Values correspond to the average \pm standard deviation.

experimentales medidas (Tabla 4). Al analizarse la velocidad de oxidación de DCF-DA en función de la dosis de exposición se observó un aumento exponencial en la concentración de ROS a dosis experimentales totales mayores (Figura 5). La composición taxonómica del fitoplancton de las comunidades expuestas fue similar en las tres incubaciones aunque

TABLA 3

Resultados de los ANOVA para determinar las diferencias entre la fluorescencia de DCF-DA comparando dosis de H₂O₂ y el control para cada una de las comunidades expuestas.

ANOVA to determine the differences between the fluorescence of DCF-DA comparing H₂O₂ doses and control for each community exposed.

	F	P
23/11/2004	3.65	0.055
26/11/2004	4.06	0.057
3/12/2004	1.52	0.250

TABLA 4

Dosis experimentales (RUVB+RUVA+RVIs) de las incubaciones de comunidades planctónicas del Canal Beagle.

Experimental doses (RUVB+RUVA+RVIs) of three incubations of planktonic communities of Beagle Channel.

	Dosis experimentales (kJ m ⁻²)
23/11/2004	7546
26/11/2004	11900
3/12/2004	5110

la abundancia de la comunidad del día 3 de diciembre fue menor comparada con las dos comunidades restantes (Tabla 5). El grupo fitoplanctónico predominante en las tres comunidades fue el de fitoflagelados cocoides (entre 60 y 70 %), seguidos por diatomeas (entre 30 y 40 %), con un porcentaje siempre menor al 5 % constituido por dinoflagelados.

DISCUSIÓN

Carbono orgánico disuelto

Las concentraciones de COD en los sitios de muestreo presentaron un valor mínimo de 1000 y un máximo de 2000 $\mu\text{g L}^{-1}$. Los valores más elevados se registraron en las

TABLA 5

Abundancia (células mL⁻¹) de especies fitoplanctónicas determinadas en cada una de las 3 comunidades expuestas a H₂O₂.

Abundance (cells mL⁻¹) of phytoplankton species determined for each exposed community.

	23-nov	26-nov	3-dic
Diatomeas			
<i>Asterionellopsis glacialis</i>	0	0	17
<i>Chaetoceros</i> spp.	15	15	125
<i>Chaetoceros debilis</i>	0	25	0
<i>Chaetoceros socialis</i>	0	0	40
<i>Thalassiosira</i> spp.	4	46	23
<i>Leptocylindrus minimus</i>	27	9	0
<i>Nitzschia</i> spp.	2	0	0
<i>Nitzschia</i> cf. <i>longissima</i>	0	6	0
<i>Pseudonitzschia</i> cf. <i>fraudulenta</i>	0	19	0
<i>Thalassiosira</i> cf. <i>mendiolana</i>	220	65	6
<i>Rhizosolenia</i> spp.	0	59	38
Fitoflagelados			
Fitoflagelados cocoides	537	558	336
Dinoflagelados			
<i>Alexandrium ostenfeldii</i>	8	9	2
<i>Ceratium lineatum</i>	0	4	0
<i>Protoperidinium</i> sp.	2	0	6
<i>Dinophysis acuminata</i>	0	2	0
<i>Prorocentrum micans</i>	0	6	0
<i>Protoperidinium</i> spp.	0	6	0
Células totales (mL ⁻¹)	814	827	593

cercanías de la desembocadura del Río Lapataia, probablemente debido a una menor dilución de estos compuestos presentes en el agua de deshielo. Dichos valores son mayores a los observados en los ríos Seno Ballena, Bote y Puerto Cutter, todos ellos afluentes del Estrecho de Magallanes donde fueron determinados entre 300 y 400 µg L⁻¹ durante muestreos realizados también en primavera (Rivera et al. 2007). Contrastando con esto último, en la Península Antártica Abele et al. (1999) hallaron valores similares a los del presente estudio (~1400 µg L⁻¹). En comparación, nuestros resultados representan

aproximadamente la mitad de la concentración máxima observada en el Río Mississippi, con valores entre 1000 y 4000 µg L⁻¹ (Trefry et al. 1994; Cai & Lohrenz 2007). Varios trabajos muestran que la foto-oxidación es el mecanismo más importante en la producción de H₂O₂ a partir de COD. Comparando este proceso de foto-oxidación con la degradación microbiana, Opsahl & Benner (1998) demostraron que en controles oscuros luego de 10 días de incubación se eliminaba un 21 % de este compuesto. La pérdida de COD en los controles de experimentos de degradación microbiana fueron tan sólo de 10 % en un experimento de 51

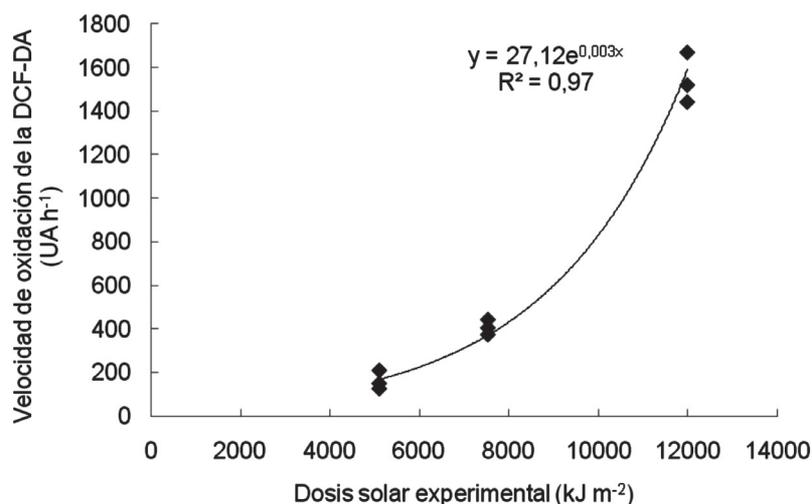


Fig. 5: Velocidad de oxidación de DCF (expresada como Unidades Arbitrarias por hora de exposición) en muestras de las comunidades fitoplanctónicas expuestas a todo el espectro de radiación solar en función de las dosis experimentales recibidas.

Speed of DCF oxidation (expressed as arbitrary units in 1 hour exposure) in samples of phytoplankton communities exposed to the total spectrum of solar radiation as a function of exposure doses.

días utilizando agua del estuario de Satilla River (Moran et al. 2000). Considerando lo expuesto, la degradación microbiana es claramente menos importante que la foto-oxidación en aguas superficiales con días soleados. Así, la tasa de foto-degradación en dos situaciones experimentales fue tres a cinco veces mayor que la tasa de degradación microbiana (Hernes & Benner 2003).

Exposición experimental del agua de Canal de Beagle a la RUVB

Las concentraciones iniciales de H₂O₂ determinadas para cada tratamiento en todos los experimentos realizados con aguas del Canal Beagle fueron mayores a 5 nM. No se observaron cambios significativos con respecto a las incubaciones en oscuridad, lo que sugiere que no hubo descomposición biológica de este compuesto. Normalmente en oscuridad se producen una serie de reacciones químicas que destruyen el H₂O₂ en tiempos de una hora en la costa de océanos altamente productivos y se necesitan más de cinco días para su descomposición en océanos oligotróficos (Yuan & Shiller 2005). En estos trabajos se observó una gran variabilidad en la tasa de

desintegración, la cual es probablemente originada a partir de peroxidasas y catalasas producidas en la membrana plasmática del plancton y disueltas posteriormente en la columna de agua (Moffett & Zafiriou 1999). Nuestros resultados muestran que el filtrado inicial del agua evitó el pasaje de microorganismos, y por lo tanto los efectos observados corresponden solamente a los factores estudiados, es decir el COD y la radiación solar.

Los valores máximos de H₂O₂ evaluados en nuestros experimentos (60 nM) así como la máxima foto-producción obtenida del ambiente natural (40 nM) son menores a los registrados en ambientes costeros antárticos y distintas zonas del Océano Atlántico. El valor promedio de H₂O₂ en la columna de agua de Caleta Potter (Antártida) fue de aproximadamente 240 nM en superficie y de 140 nM a 5 m de profundidad (Abele et al. 1999). Weller & Schrems (1993) midieron concentraciones desde 150 nM a 30° N en el Océano Atlántico hasta 100 nM a 30° S. En nuestro estudio no se encontró ninguna relación ($P > 0.05$, $r = 0.03$) al evaluar las concentraciones de H₂O₂ producidas en función de las dosis con longitudes de onda mayores a 295 nm (Figura 3). Estos resultados

concuerdan con un estudio realizado en Antártida en tres estaciones de muestreo donde la producción de H_2O_2 decreció rápidamente con el incremento de la longitud de onda y más del 90 % de la fotoreactividad se produjo a longitudes de onda menores a 320 nm (Yocis et al. 2000). Abele-Oeschger et al. (1997) mostraron que los fotones en la longitud de onda de la RUVB exhiben entre 1000 y 10000 veces mayor eficiencia para la foto-producción de H_2O_2 comparado con la longitud de 550 nm en la región de RVis. Sin embargo, nuestros resultados difieren de los de Abele-Oeschger et al. (1997) en que la mayor tasa de producción de H_2O_2 se produjo esencialmente dentro del rango de la RUVB lejana (longitudes de onda < 295 nm). En nuestros resultados no hubo diferencias entre la RUVB cercana (295-320 nm) y el resto de las longitudes de onda (> 320 nm), si bien en todos los casos hubo un aumento significativo de estas con respecto a los valores iniciales. Por otro lado, las tasas de producción de H_2O_2 debidas a la RUVB en nuestros experimentos fueron mucho menores que las observadas por los autores mencionados (11.15-6.88 nM h⁻¹ en el Canal Beagle contra ~110 nM h⁻¹ en Caleta Potter). Esto puede explicarse por una menor reactividad del COD en la región subantártica, así como también por el hecho de que los experimentos en Antártida se llevaron a cabo durante el período de mínimo espesor de la capa de ozono estratosférico, con el consecuente aumento de la exposición a la RUVB en la región.

En nuestros experimentos no se encontró descomposición de H_2O_2 bajo condiciones de oscuridad y se observa una regresión significativa entre la producción de H_2O_2 y la dosis de RUVB hasta alcanzar los 25 kJ m⁻². Estos resultados sugieren que la concentración de peróxido de hidrógeno máxima observada indica la producción potencial en función de la dosis recibida de la luz solar.

Efecto de H_2O_2 sobre el plancton subantártico

El empleo de la DCF-DA como indicador de la producción de ROS fue descripto inicialmente para la detección de H_2O_2 generado por sistemas enzimáticos *in vitro* (Le Bel et al. 1990). Nuestros resultados son consistentes con estudios previos empleando esta metodología. Así, Collén & Davison

(1997) mostraron que la macroalga *Fucus evanescens* expuesta a exceso de luz, aumenta la oxidación DCF-DA por la presencia de ROS generados durante el metabolismo fotosintético por inhibición en el Fotosistema I. Se ha demostrado que los ROS son responsables del deterioro de la clorofila y el decrecimiento en la actividad del Fotosistema II en la antena fotosintética (PSII) del fitoplancton (Saison et al. 2010, Hernando 2011b). También se ha demostrado que los ROS producen inhibición del crecimiento de las diatomeas (Hernando 2011a).

En nuestros experimentos no se encontraron diferencias significativas ($P > 0.05$, Tabla 3) en la formación de ROS para las diferentes dosis de H_2O_2 consideradas. Estos resultados sugieren que las concentraciones experimentales, las cuales se encontraban dentro del rango de las observaciones realizadas sobre foto-oxidación del COD, fueron lo suficientemente bajas como para no producir un daño oxidativo en el corto plazo en comunidades planctónicas de ambientes Subantárticos. Abele et al. (1999) hallaron valores tan altos como 290 nM con valores máximos de 1.45 μ M durante los períodos de nevadas en la Península Antártica. Por otro lado, estos autores observaron la presencia de densas poblaciones de diatomeas de las especies *Nitzschia cylindrus*, *N. curta* y *N. kerguelensis* en hielo marino con concentraciones de H_2O_2 de aproximadamente 600 nM. Sin embargo, no encontraron densidades significativas de las diatomeas mencionadas cuando las concentraciones de peróxido fueron de aproximadamente 1 μ M. En trabajos realizados con comunidades dulceacuícolas, Matthijs et al. (2012) determinaron que con concentraciones de 60 μ M se eliminaron cianobacterias de la especie *Planktothrix agardhii* pero las poblaciones de clorofitas, crisofitas o criptofitas no fueron dañadas significativamente. Drábková et al. (2007) encontraron que se necesitan concentraciones de aproximadamente 120 μ M de H_2O_2 para producir efectos en diatomeas de lagos. La composición taxonómica del fitoplancton de las comunidades del Canal Beagle expuestas en nuestros experimentos, estuvieron compuestas mayoritariamente por un alto porcentaje de fitoflagelados cocoides (60-70 %) y un porcentaje menor de diatomeas (25-35 %). Dentro de este último

grupo, los géneros *Thalassiosira* y *Chaetoceros* fueron los más abundantes aunque el género *Nitzschia*, también estuvo presente (Tabla 5). Considerando los antecedentes mencionados en relación al daño oxidativo y los distintos grupos fitoplanctónicos, la composición taxonómica de las comunidades presentes en nuestros experimentos podría explicar la ausencia de ROS.

En relación con situaciones de protección celular y nuestros resultados experimentales, incrementos moderados en ROS en un período definido pueden ejercer la regulación de la expresión génica con respuestas citoprotectoras (Dröge 2002). Así, diferentes tejidos podrían estar protegidos contra eventos nocivos (Das & Das 2008). De esta manera se podría explicar la razón por la cual en las comunidades planctónicas expuestas en las dos primeras fechas, la concentración de ROS fue mayor en el tratamiento control ($P > 0.05$, Tabla 3), comparado con las menores concentraciones adicionadas de H_2O_2 . Esto podría indicar una producción adicional de H_2O_2 en el tratamiento control debido a las elevadas dosis de RUV recibidas que fueron mayores que en la comunidad expuesta el 3 de diciembre (Tabla 4). Por otro lado, el contenido in situ de COD en el agua donde se encontraban ambas comunidades pudo ser mayor. Estas concentraciones in situ de COD en las muestras control (sin agregado de H_2O_2) no fueron determinadas en nuestros experimentos. Así, un aumento en la concentración de ROS en las menores dosis incubadas en adición al posible H_2O_2 generado in situ, podría haber disparado la expresión génica de mecanismos protectores del daño en los grupos planctónicos expuestos, disminuyendo la concentración de ROS luego de seis horas de incubación. Considerando que los ROS son citotóxicos, las células han desarrollado defensas antioxidantes que degradan H_2O_2 u otros compuestos tóxicos del oxígeno. Cuando la concentración de ROS supera la capacidad antioxidante se produce el estrés oxidativo que lleva a serios daños celulares. Sin embargo, si la concentración no es elevada, los ROS actúan como segundos mensajeros en la transducción y regulación genética (Hensley 2000). Hernando et al. (2005) han demostrado una rápida respuesta antioxidante en fitoflagelados aislados de comunidades fitoplanctónicas provenientes

del Canal Beagle. Considerando que las tres comunidades expuestas en el presente trabajo estaban compuestas por un alto porcentaje de dicho grupo, es altamente probable que las bajas concentraciones de ROS observadas se deban a su inactivación por los sistemas biológicos. Por otro lado, Malanga (2001) demostró una respuesta antioxidante en el término de tres horas de exposición a RUVB en cultivos unialgales de *Thalassiosira* sp. provenientes del Canal Beagle (un grupo cuya abundancia osciló entre el 8 y 15 % en las comunidades expuestas en el presente trabajo, Tabla 5).

Se ha demostrado que la RUV es muy efectiva en inducir la peroxidación de lípidos de membranas biológicas (Hideg & Vass, 1996), ácidos grasos poliinsaturados (Yamashoji et al. 1979) y fosfolípidos (Pelle et al. 1990). Para microalgas provenientes del Canal Beagle, Hernando et al. (2011b) han mostrado que la exposición de cultivos unialgales a la RUVB estimula la generación de ROS.

En relación al bacterioplancton, Hernández et al. (2002), trabajando con monocultivos aislados de Caleta Potter, Antártida, demostraron la ausencia de efectos del H_2O_2 con un rango de incubaciones comprendido entre 0.5 y 50 μM evaluando pérdida de viabilidad en dos cepas aisladas en la zona. Estos resultados evidencian que, en relación al bacterioplancton, la ausencia de concentraciones significativas de ROS en nuestras comunidades planctónicas también puede explicarse debido a una baja concentración de H_2O_2 (60 nM fue la máxima concentración evaluada).

Conclusiones

Los resultados aquí presentados indican que los cambios en la concentración del ozono estratosférico podrían afectar significativamente la formación fotoquímica de H_2O_2 en aguas Sub-Antárticas. La magnitud de dicho cambio dependerá de la concentración de COD. Sin embargo, otros factores tales como las condiciones meteorológicas (por ejemplo la cobertura de nubes) son también importantes para ser considerados (Neale et al. 1998) ya que éstos podrían atenuar los efectos de la disminución de ozono en la foto-producción de H_2O_2 . Si bien los niveles de RUVB en

condiciones de ozono disminuido pueden ser similares a las registradas en Antártida (Hernando 2011a), la concentración y la tasa de foto-producción de peróxido de hidrógeno determinadas en aguas del Canal Beagle tienen niveles mínimos. Esto podría estar relacionado con las bajas concentraciones de COD determinadas en el período de estudio, con su escasa reactividad o ambas razones. Considerando que sólo elevadas concentraciones de peróxido de hidrógeno inducen una mayor concentración de ROS, no se determinaron potenciales efectos en las comunidades planctónicas evaluadas en el presente estudio para el Canal Beagle. Futuros trabajos deberán incluir la evaluación de parámetros fisiológicos como tasa fotosintética o la tasa de crecimiento, entre otros, con el objetivo de mejorar el conocimiento sobre efectos indirectos del peróxido de hidrógeno tanto en bacterias como en diversos grupos del fitoplancton.

AGRADECIMIENTOS: Esta investigación fue desarrollada con un subsidio otorgado por la Fundación Antorchas al Dr. Marcelo Hernando (Beca para la finalización del doctorado). Agradecemos sinceramente al apoyo recibido por el Sr. Miguel Barbagallo, técnico principal del Centro Austral de Investigaciones Científicas (CADIC-CONICET).

LITERATURA CITADA

- ABELE D, G FERREYRA & I SCHLOSS (1999) H₂O₂ accumulation from photochemical production and atmospheric wet deposition in Antarctic coastal and off-shore waters of Potter Cove, King George Island, South Shetland Islands. *Antarctic Science* 11: 131-139
- ABELE-OESCHGER D, H TUG & R ROTTGERS (1997) Dynamics of UV-driven hydrogen peroxide formation on an intertidal sandflat. *Limnology and Oceanography* 42: 1406-1415.
- ALMANDOZ GO, MP HERNANDO, GA FERREYRA, IR SCHLOSS & ME FERRARIO (2011) Seasonal phytoplankton dynamics in extreme Southern South America (Beagle Channel, Argentina). *Journal of Sea Research* 66: 47-57.
- BOOTH R, T MESTECKINA & JH MORROW (1994) Errors in the reporting of solar spectral irradiance using moderate band-width radiometers and experimental investigation. In *Ocean Optics*, Vol. XII, 13-15 June, 1994, Bergen, Norway (Edited by J. S. Jaffe), pp. 654-663. *Proceedings of SPIE*. Bellingham, Washington, USA.
- CAI WJ & SE LOHRENTZ (2007) Carbon, Nitrogen, and Phosphorus Fluxes from the Mississippi River and the Transformation and Fate of Biological Elements in the River Plume and the Adjacent Margin. In: *Carbon and nutrient fluxes in continental margins: A global synthesis* (K. K. Liu, L. Atkinson, R. Quinones and L. Talaue-McManus, Eds.), Springer-Verlag, NY.
- COOPER WJ, RG ZIKA, RG PETASNE & JMC PLANE (1988) Photochemical formation of H₂O₂ in natural waters exposed to sunlight. *Environmental Science Technology* 22: 1156-1160.
- CROOT PT, P LAANA, J NISHIOKAB, V STRASSC, B CISEWSKIC, M BOYE, KR TIMMERMANS, RG BELLERBY & L GOLDSON (2005) Spatial and temporal distribution of Fe (II) and H₂O₂ during EisenEx, an open ocean mesoscale iron enrichment. *Marine Chemistry* 95: 65-88.
- CHEN XB, XH ZHAO, Y ZHU, YD GONG, LB LI, JP ZHANG & TY KUANG (2006) Hydrogen peroxide-induced chlorophyll a bleaching in the cytochrome b6f complex: A simple and effective assay for stability of the complex in detergent solutions. *Photosynthesis Research* 90: 205-14.
- COLLÉN J & IR DAVISON (1997) *In vivo* measurements of active oxygen production in the brown algae *Fucus evanescens* using 2',7' dichloro-hydrofluorescein diacetate. *Journal of Phycology* 33: 643-648.
- DAS M & DK DAS (2008) Molecular mechanism of preconditioning. *IUBMB Life* 60: 199-203.
- DRÁBKOVÁ M, W ADMIRAAL & M BLAHOŠLAV (2007) Combined exposure to hydrogen peroxide and light-selective effects on cyanobacteria, green algae, and diatoms. *Environmental. Science and Technology* 41: 309-314.
- DRÖGE W (2002) Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological Reviews* 82: 47-95.
- FOYER CH, M LELANDAIS & KUNERT KJ (1994) Photooxidative stress in plants. *Physiologia Plantarum* 92: 696-717.
- GERRINGA LJA, MJA RIJKENBERG, KR TIMMERMANS & AGJ BUA (2004) The influence of solar ultraviolet radiation on the photochemical production of H₂O₂ in the equatorial Atlantic Ocean. *Journal of Sea Research* 51: 3-10
- HANSON AK, NW TIMDALE, MAR ABDEL-MOATI (2001) An Equatorial Pacific rain event: influence on the distribution of iron and hydrogen peroxide in surface waters. *Marine Chemistry* 75: 69-88.
- HENSLEY K, KA TOBINSON, SP GABBITA, S SALSMAN & RA FLOYD (2000) Reactive oxygen species, cell signaling, and cell injury. *Free Radical Biology and Medicine* 28: 1456-62
- HERNANDEZ H, GA FERREYRA & WP MACCORMACK (2002) Effect of solar radiation on two Antarctic marine bacterial Straits. *Polar Biology* 25: 453-459.
- HERNANDO M & N SAN ROMÁN (1999) Preliminary data on chronic effects of ultraviolet radiation on the growth of some phytoplankton species of the Beagle Channel, Argentina. *Scientia Marina* 63: 81-88.
- HERNANDO M, JI CARRETO, M O CARGINAN, G FERRYRA & C GROB (2002) Effects of solar radiation on growth and mycosporine-like amino acids content in an Antarctic diatom. *Polar Biology* 25: 12-20.
- HERNANDO M, G MALANGA & GA FERREYRA (2005) Oxidative stress and antioxidant defenses generated by solar UV in a Subantarctic marine phytoplankton. *Scientia Marina* 69: 287-295.
- HERNANDO M (2011a) Fitoplancton de altas latitudes en condiciones de ozono disminuido. Primera edición. Editorial Académica Española, Alemania.

- HERNANDO M, G MALANGA, S PUNTARULO & G FERREYRA (2011b) Non-enzymatic antioxidant photoprotection against potential UVBR-induced damage in an Antarctic diatom (*Thalassiosira* sp). Latin American Journal of Aquatic Research 39: 397-408.
- HERNES PJ & R BENNER (2003) Photochemical and microbial degradation of dissolved lignin phenols: Implications for the fate of terrigenous dissolved organic matter in marine environments. Journal of Geophysical Research 108: 98-119.
- HIDEG E & I VASS (1996) UV-B induced free radical production in plant leaves and isolated thylakoid membranes. Plant Science 115: 251-260.
- KING DW & R FARLOW (2000) Role of carbonate speciation on the oxidation of Fe (II) by H₂O₂. Marine Chemistry 70: 201-209.
- LEAN DRS, WJ COOPER & FR PICK (1994) Hydrogen peroxide formation and decay in lake waters, p. 207-214. In G.R. Helz et al. (eds), Aquatic and surface photochemistry. Lewis.
- LE BEL CP, SF ALI, M Mc KEE, SC BONDY (1990) Organometal-induced increases in oxygen reactive species: the potential of 2',7'-dichlorofluorescein diacetate as index of neurotoxic damage. Toxicology and Applied Pharmacology 104: 17-24.
- MALANGA G & S PUNTARULO (1995) Oxidative stress and antioxidant content in *Chlorella vulgaris* after exposure to ultraviolet-B radiation. Physiologia Plantarum 94: 672-679.
- MALANGA G (2001) Respuesta oxidante a la radiación ultravioleta en microalgas. Tesis doctoral, Universidad de Buenos Aires, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Buenos Aires.
- MALANGA G, AB JUAREZ, JS ALBERGHERIA, CG VELÉZ & S PUNTARULO (2001) Efecto de la radiación UVB sobre el contenido de ascorbato y radical ascorbilo en algas verdes. En Sustentabilidad de la Biodiversidad, Un problema actual, bases científico-técnicas, teorizaciones y proyecciones (K Alveal & T Antezana eds.) Concepción- Chile, pp. 389-398.
- MATTHIJS HCP, PM VISSER, B REEZE, J MEEUSE, PC SLOT, G WIJN, RE TALENS & J HUISMAN (2012) Selective suppression of harmful cyanobacteria in an entire lake with hydrogen peroxide. Water Research 46: 1460-1472.
- MOFFETT JW & ZAFIRIOU OC (1990) An investigation of hydrogen peroxide chemistry in surface waters of Vineyard Sound with H₂¹⁸O₂ and ¹⁸O₂. Limnology and Oceanography 35: 1221-1229.
- MOORE CA, CT FARMER & RG ZIKA (1993) Influence of the Orinoco River on hydrogen peroxide distribution and production in the eastern Caribbean. Journal of Geophysical Research 98: 2289-2298.
- MORAN MA, WM SHELDON & RG ZEPP (2000) Carbon loss and optical property changes during long-term photochemical and biological degradation of estuarine dissolved organic matter. Limnology Oceanography 45: 1254-1264
- NEALE PJ, RF DAVIS & JJ CULLEN (1998) Interactive effects of ozone depletion and vertical mixing on photosynthesis of Antarctic phytoplankton. Nature 392: 585-589.
- OPSAHL S. & R BENNER (1998) Distribution and cycling of terrigenous dissolved organic matter in the ocean. Nature 386: 480-482.
- ORCE L, N SAN ROMAN, M HERNANDO, J PEDRONI, A ROSALES, L BUITRAGO & A PALADINI (2001) Influencia del agujero de ozono antártico en las dosis de radiación UV/B incidentes en la Argentina. En: IX Congreso Latinoamericano e Ibérico de Meteorología y VIII Congreso Argentino de Meteorología. Libro de Resúmenes: 183
- ORCE L & EW HELBLING (1997) Latitudinal UV-RAR measurements in Argentina: extent of the "ozone hole". Global Planetary Change 15: 113-121.
- PALENIK BP & FMM MOREL (1988) Dark production of H₂O₂ in the Sargasso Sea. Limnology and Oceanography 33: 1606-1611.
- PAMATMAT M.M (1990) Catalase activity: A variable affecting H₂O₂ distribution in Kiel Bight. Meeresforsch 32: 261-275.
- PELLE E, MAES GA, PADULO EK & SMITH WP (1990) An in vitro model to test relative antioxidant potential: Ultraviolet-induced lipid peroxidation in liposomes. Archives of Biochemistry and Biophysics 283: 234-240.
- PETASNE RG & RG ZIKA (1997) Hydrogen peroxide lifetimes in south Florida coastal and offshore waters. Marine Chemistry 56: 215-225.
- PUNTARULO S & AI CEDERBAUM (1996) Role of cytochrome P-450 in the stimulation of microsomal production of reactive oxygen species by ferritin. Biochim. Biochimica et Biophysica Acta 1289: 238-246.
- RIVERA MF, LL BLANCO, M FRANGÓPULOS, M HAMAMÉ, S ROSALES, R TORRES & A VALLE-LEVINSON (2007) Análisis y Diagnóstico de las Principales Características Oceanográficas del Área Marina Costera Protegida Francisco Coloane. Informe final PNUD.
- SAISON C, F PERREAULT, JC DAIGLE, C FORTIN, J CLAVEIRE, M MORIN & R POPOVIC (2010) Effect of core-shell copper oxide nanoparticles on cell culture morphology and photosynthesis (photosystem II energy distribution) in the green alga, *Chlamydomonas reinhardtii*. Aquatic toxicology 96: 109-114.
- SARTHOU G & Col. (1997) Fe and H₂O₂ distributions in the upper water column in the Indian sector of the Southern Ocean. Earth and Planetary Science Letters 147: 83-92.
- SIKORSKI TJ & ZIKA RG (1993) Modeling Mixed-Layer Photochemistry of H₂O₂: Physical and Chemical Modeling of Distribution. Journal of Geophysical Research 98: 2329-2340.
- SIMONTACCHI M, A CARO, CG FRAGA & S PUNTARULO (1993) Oxidative stress affects a-tocopherol content in soybean embryonic axes upon imbibition and following germination. Plant Physiology 103: 949-953.
- STEIGENBERGER S, PJ STATHAM, C VÖLKER & U PASSOW (2010) The role of polysaccharides and diatom exudates in the redox cycling of Fe and the photoproduction of hydrogen peroxide in coastal seawaters. Biogeosciences 7: 109-119.
- SUE GOO RHEE SG, T-S CHANG, W JEONG & D KANG (2010) Methods for detection and measurement of hydrogen peroxide inside and outside of cells. Mol. Cells 29: 539-549.
- TREFRY JH, S METZ, TA NELSEN, RP TROCINE & BJ EADIE (1994) Transport WAKEHAM S & C LEE (1993) Organic geochemistry of particulate organic carbon by the Mississippi River and its fate in the Gulf of Mexico. Estuaries 17: 839-849.

- WELLER R & O SCHREMS (1993) H₂O₂ in the marine troposphere and seawater of the Atlantic Ocean. *Geophysical Research Letters*. 20: 125-128.
- WONG AYL & GTF WONG (2001) The effect of spectral composition on the photochemical production of hydrogen peroxide in lake water. *Terres. Atmospheric and Oceanic Sciences* 12: 695-704.
- YAMASHOJI S, H YOSHIDA & G KAJIMOTO (1979) Photooxidation of linoleic acid by ultraviolet light and effect of superoxide anion quencher. *Agricultural and Biological Chemistry* 43: 1249-1254.
- YOCIS BH, H BRIAN, DJ KIEBER & K MOPPER (2000) Photochemical production of hydrogen peroxide in Antarctic Waters. *Deep-Sea Research I* 47: 1077-1099.
- YU BP (1994) Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiological. Reviews* 74: 139-155.
- YUAN J & AM SHILLER (2005) Distribution of hydrogen peroxide in the northwest Pacific Ocean. *Geochemistry, Geophysics, Geosystems* 6, Q09M02. doi:10.1029/2004GC000908.

Responsabilidad editorial: Horacio Zagarese

Recibido el 2 de junio de 2012; aceptado el 24 de septiembre de 2012