



**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL  
FACULTAD DE BIOQUÍMICA Y CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**Tesis presentada para obtener el grado de  
Doctora en Ciencias Biológicas**

**Título:**

**Impacto de xenobióticos y comunicadores químicos sobre  
algunos procesos biológicos en organismos del zooplancton.**

María Florencia Gutierrez

Director: Prof. M.Sc. Juan Cesar Paggi  
Co- Directora: Prof. Dra. Ana María Gagneten

Lugar de trabajo:

Instituto Nacional de Limnología (CONICET- UNL).  
Ciudad Universitaria, (3000) Santa Fe, Argentina.

Santa Fe, 2012

*A Ignacio, mi compañero de ruta,  
mi sostén y mi amor.*

*A mis padres, quienes me enseñaron a  
amar la vida.*

*A mi hermana, por su apoyo  
incondicional.*

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco en primera instancia, a la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas (UNL), sede del Doctorado en Ciencias Biológicas, por ser la institución que me recibió y me brindó el apoyo necesario para el logro de la Tesis. Gracias también por las facilidades prestadas y la buena predisposición para los trámites, presentación de informes y consultas.

Al Instituto Nacional de Limnología (CONICET- UNL), por abrirme las puertas desde un primer momento para realizar mi Tesis, facilitarme las instalaciones, el equipamiento y gran parte de los materiales que utilicé para los trabajos. El mismo, además, constituyó un ámbito de enriquecimiento intelectual, de adquisición de habilidades prácticas, de consolidación de grupos de trabajo y motivador de la actividad científica como un medio activo y apasionante de resolver problemas e interpretar la realidad.

A la Universidad Nacional del Litoral, que mediante el financiamiento de dos proyectos CAI+D permitió acceder a parte del equipamiento, insumos y servicios para la realización de la presente Tesis.

- Proyecto CAI+D 2006 Título: "Evaluación de la acumulación de metales pesados en crustáceos mediante biomarcadores y microscopía electrónica de barrido". Directora: Prof. Msc. Ana María Gagneten. Facultad de Humanidades y Ciencias (UNL).
- Proyecto CAI+D 2009 Título: "Respuestas fisiológicas y ecológicas de crustáceos a la contaminación por metales pesados en el río Paraná Medio". Directora: Prof. Dra. Ana María Gagneten. Facultad de Humanidades y Ciencias (UNL).

A la Secretaría de Estado de Ciencia, Tecnología e Innovación de la Provincia de Santa Fe que nos ha permitido acceder a los Proyectos Provincia, subsidiando también parte de nuestro trabajo de investigación.

- Proyecto Provincia 2011. Título: "Aplicación de bioindicadores tempranos para la detección de contaminación acuática en la Provincia de Santa Fe". Directora: Dra. Ana María Gagneten.
- Proyecto Provincia 2011. Título: "Biodiversidad y factores que la gobiernan en el Paraná Medio: Un análisis para su conservación" Directora: Dra. Melina Devercelli.

Sin dudas, los principales agradecimientos personales son para mis directores, Juan Cesar Paggi y Ana María Gagneten, mis padres intelectuales. Gracias por las críticas, los retos, la rigurosidad científica y las numerosas correcciones que me ayudaron a mejorar mi trabajo y a construir una actitud crítica e inquieta, lo que considero la adquisición más valiosa de este período, tanto para mi carrera como para mi vida personal. En este sentido, gracias por mostrarme el valor del compromiso social del científico.

Particularmente, agradezco de Juan Paggi la confianza y la oportunidad que me brindó para trabajar en lo que me gusta, la paciencia para explicarme aquello que no comprendía, la humildad para transmitir tanto conocimiento, el buen humor

permanente y su calidez, todo lo que refleja su grandeza como investigador y ser humano.

Igual gratitud me merece Ana Gagneten, quien desde la carrera de grado me acompaña casi con actitud maternal, alentándome en los momentos difíciles y compartiendo con alegría los logros alcanzados. Gracias por la confianza, el esfuerzo y el apoyo constante para mejorar mi formación, que manifiestan su admirable vocación y compromiso con la docencia.

A mi amiga y compañera del laboratorio, la Dra. Florencia Rojas Molina, por brindarme su apoyo, su ayuda y transmitirme con sencillez su experiencia y conocimientos para mejorar y fortalecer los míos. Agradezco y valoro mucho su paciencia, las correcciones críticas del primer manuscrito, y especialmente su amistad.

A las Dras. Susana José de Paggi y Melina Devercelli, por alentarme en cada una de las instancias de mi beca y transmitirme sus experiencias de los trabajos de campo que, en numerosas ocasiones, fueron realmente muy valiosas para interpretar mis propios resultados experimentales.

A mis compañeras y amigas del INALI y la FHUC: Marcela Montagna, Paola Pave, Debora Carballo y Luciana Regaldo, con las que intercambiamos experiencias de trabajo, consultas, conocimientos y bibliografía. Gracias por compartir conmigo su trabajo.

A todos aquéllos colegas, compañeros y técnicos del INALI y la FHUC que de una u otra forma me brindaron su apoyo, conocimientos, experiencias, o simplemente compartieron conmigo horas de su trabajo o dispersión. Sin dudas esos momentos enriquecen, reconfortan y hacen sentir a las personas más cercanas.

Finalmente agradezco a mi familia, por estar siempre; por su interés, sus palabras de aliento, el apoyo incondicional y el cariño que me ayudan a ser feliz.

## INDICE GENERAL

<b>Publicaciones y comunicaciones</b>	5
<b>Índice de Tablas</b>	7
<b>Índice de Figuras</b>	8
<b>Abreviaturas</b>	12
<b>1. RESUMEN</b>	
1.1. Español	13
1.2. Inglés	15
<b>2. INTRODUCCIÓN</b>	
2.1. Contexto ambiental y ecotoxicología	17
2.2. Microcrustáceos zooplanctónicos	23
2.3. La comunicación química interespecífica en la relación depredador-presa	34
<b>2.4. Hipótesis</b>	39
<b>2.5. Objetivos</b>	39
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	
<b>3.1. Ensayos agudos</b>	41
3.1.1. Recolección y selección de las especies	41
3.1.2. Tóxicos y medios de cultivo	45
3.1.3. Cultivo y mantenimiento de los organismos	47
3.1.4. Procedimiento experimental	48
3.1.5. Análisis estadísticos	49
<b>3.2. Ensayos de ciclo de vida</b>	49
<b>3.2.1. Efecto de comunicadores químicos de peces sobre el ciclo de vida de <i>Notodiaptomus conifer</i></b>	49
Selección y cultivo de los organismos	50

Medio control y medio acondicionado con el comunicador químico de peces (“agua de peces”)	51
Procedimiento experimental	51
Análisis estadísticos	52
<b>3.2.2. Impacto del cromo y cobre sobre el ciclo de vida de <i>N. conifer</i></b>	53
Selección y cultivo de los organismos	53
Procedimiento experimental	53
Análisis estadísticos	55
<b>3.2.3. Impacto del cromo, cobre y endosulfán (formulado) sobre el ciclo de vida de <i>Pseudosida variabilis</i></b>	56
Selección y cultivo de los organismos	56
Procedimiento experimental	56
Análisis estadísticos	57
<b>3.3. Ensayos de comportamiento</b>	58
3.3.1. Selección y cultivo de los organismos	59
3.3.2. Medio control y medio acondicionado con el comunicador químico de peces (“agua de peces”)	60
3.3.3. Tóxicos	60
3.3.4. Mezclas	61
<b>3.3.5. Comportamiento de escape</b>	61
Diseño experimental	61
Análisis estadísticos	63
<b>3.3.6. Migración vertical diaria (MVD)</b>	64
Diseño experimental	64
Análisis estadísticos	66
<b>4. RESULTADOS</b>	
<b>4.1. Ensayos agudos</b>	68

<b>4. 2. Ensayos de ciclo de vida</b>	70
4.2.1. Efecto de comunicadores químicos de peces sobre el ciclo de vida de <i>N. conifer</i>	70
4.2.2. Impacto del cromo y cobre sobre el ciclo de vida de <i>N. conifer</i>	74
4.2.3. Impacto del cromo, cobre y endosulfán (formulado) sobre el ciclo de vida de <i>P. variabilis</i>	80
<b>4.3. Ensayos de comportamiento</b>	83
4.3.1. Comportamiento de escape (patrones normales y en presencia de comunicadores químicos, tóxicos y mezclas)	83
4.3.2. Migración vertical diaria (MVD) (patrones normales y en presencia de comunicadores químicos, tóxicos y mezclas)	95
<b>5. DISCUSIÓN</b>	
<b>5.1. Toxicidad aguda del cobre, cromo y endosulfán</b>	119
<b>5. 2. Efecto de xenobióticos y comunicadores químicos sobre el ciclo de vida</b>	122
5.2.1. Efecto de comunicadores químicos de peces sobre el ciclo de vida de <i>N. conifer</i>	122
5.2.2. Impacto del cromo y cobre sobre el ciclo de vida de <i>N. conifer</i>	126
5.2.3. Impacto del cromo, cobre y endosulfán (formulado) sobre el ciclo de vida de <i>P. variabilis</i>	129
<b>5.3. Ensayos de comportamiento</b>	134
5.3.1. Patrones normales	134
5.3.2. Efecto del agua de peces (AP) sobre el escape	136
5.3.3. Efecto del agua de peces (AP) sobre la MVD	136
5.3.4. Efecto de los xenobióticos sobre el escape	138
5.3.5. Efecto de los xenobióticos sobre la MVD	141
5.3.6. Efecto de las mezclas (comunicadores químicos de peces y xenobióticos) sobre ambos comportamientos (escape y MVD)	144

**6. CONCLUSIONES**

6.1. Toxicidad aguda	149
6.2. Ciclo de vida del copépodo <i>N. conifer</i> y del cladócero <i>P. variabilis</i>	149
6.3. Comportamiento	150

**7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

154



**La presente Tesis dio lugar a las siguientes publicaciones y presentaciones a reuniones científicas:**

**Publicaciones científicas en revistas indexadas:**

- Gutierrez M.F., Paggi J.C., Gagneten A.M. 2010. "Fish infochemicals alter life cycle and growth of a calanoid copepod". *Journal of Plankton Research*, 32 (1): 47-55. ISSN 0142-7873.
- Gutierrez M.F., Gagneten A.M., Paggi J.C. 2010. "Acute and chronic toxicity of copper and chromium to the freshwater calanoid copepod *Notodiaptomus conifer* (SARS)". *Water Air and Soil Pollution* 213: 275-286. ISSN 0049-6979.
- Gutierrez M.F., Gagneten A.M., Paggi J.C. 2011. "Exposure to sublethal chromium and endosulfan alter the diel vertical migration (DVM) in freshwater zooplanktonic crustaceans". *Ecotoxicology* 21(1):37-47. ISSN 0963-9292.
- Gutierrez M.F., Gagneten A.M., Paggi J.C. 2011. "Microcrustaceans escape behavior as an early bioindicator of copper, chromium and endosulfan toxicity". *Ecotoxicology* 21 (2): 428-438 ISSN 0963-9292.
- Gutierrez M.F., Gagneten A.M., Paggi J.C. 2011. "Biological and populational effects of copper, chromium and a pesticide with endosulfan on a littoral cladocera". *Fresenius Environmental Bulletin* (en impresión), ISSN: 10184619.
- Gutierrez M.F., Gagneten A.M., Paggi J.C. 2011. "Behavioural plasticity in four microcrustacean zooplankton species exposed to fish kairomones". *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology* 44(5): 289-303. ISSN: 1023-6244.

**Artículo de divulgación:**

- Gutierrez, M.F. 2010. "Interacciones biológicas: El rol de la comunicación química entre peces y microcrustáceos." *Biológica. Naturaleza, Conservación y Sociedad*, 12:93-96, ISSN 1851-6033.

**Comunicaciones en reuniones científicas nacionales e internacionales:**

- Gutierrez, M.F., Gagneten, A.M. y Paggi, J.C. "Ensayo comparativo de la toxicidad aguda de tres metales pesados sobre un copépodo endémico Neotropical: *Notodiaptomus conifer* (Sars)". XV Congreso Argentino de Toxicología (ATA). Neuquén, Argentina. 26-28/09/2007.
- Gutierrez, M.F., Gagneten, A.M. y Paggi, J.C. "Análisis de algunos aspectos del ciclo de vida de *Notodiaptomus conifer* Sars, 1901 (COPEPODA, CALANOIDA) bajo condiciones experimentales." 73º Reunión de comunicaciones científicas de la Asociación Nacional de Ciencias Naturales del Litoral. Facultad de Humanidades y Ciencias. UNL. Santa Fe. 20/05/2008.
- Gutierrez, M.F., Gagneten, A.M. y Paggi, J.C. "Evaluación de la Toxicidad crónica

del cobre sobre *Notodiaptomus conifer* (Sars, 1901). 74° Reunión de Comunicaciones Científicas. INALI-UNL. Santa Fe. 18/11/2008.

- Gutierrez, M.F., Gagneten, A.M. y Paggi, J.C. “Influencia del Cromo sobre el ciclo de vida de *Notodiaptomus conifer* (Crustacea, Copepoda) Sars 1901: Análisis preliminar. II Congreso Argentino de la Sociedad de Toxicología y Química Ambiental (SETAC). Mar del Plata, Argentina. 26-28/11/ 2008.
- Gutierrez, M.F., Gagneten, A.M. y Paggi, J.C. “Toxicidad aguda del Cromo, Cobre y Plomo sobre *Notodiaptomus incompositus* BRIAN (Crustacea, Copepoda).” II Congreso Argentino de la Sociedad de Toxicología y Química Ambiental (SETAC) Mar del Plata, Argentina. 26-28/11/ 2008.
- Gutierrez, M.F., Gagneten, A.M. y Paggi, J.C. “Evaluación de la toxicidad del cobre y cromo sobre el ciclo de vida del cladóceros litoral *Pseudosida variabilis*.” IX Congreso de la Sociedad de Química y Toxicología Ambiental (SETAC LA) y II Congreso Peruano de Ecotoxicología y Química Ambiental (SETAC PERU). Lima, Santiago de Surco. 05-09/10/2009.
- Gutierrez, M.F., Paggi, J.C. y Gagneten, A.M. “Respuestas de los copépodos de agua dulce ante la presencia de comunicadores químicos de peces”. X Jornadas de Ciencias Naturales del Litoral -II Reunión Argentina de Ciencias Naturales. Instituto Nacional de Limnología (INALI-UNL-CONICET) y Facultad de Humanidades y Ciencias (FHUC-UNL). Santa Fe, Argentina. 18-21/10/2009.
- Gutierrez, M.F., Paggi, J.C. y Gagneten, A.M. “Incidencia de la talla y la afinidad filogenética sobre la toxicidad aguda de cobre, cromo y endosulfán en microcrustáceos zooplanctónicos”. III Congreso argentino de la Sociedad de Toxicología y Química Ambiental (SETAC) “Ecotoxicología: reflexiones en el año del Bicentenario”. Facultad de Humanidades y Ciencias. UNL. Santa Fe. 12-14/05/2010.
- Gutierrez, M.F., Gagneten A.M. y Paggi J.C. “Efectos tóxicos de los metales sobre microcrustáceos planctónicos de agua dulce: Análisis revisivo.” 75° Reunión de Comunicaciones Científicas de la Asociación de Ciencias Naturales del Litoral. Instituto Nacional de Limnología (CONICET- UNL), Santa Fe. 23/06/2010.
- Gutierrez, M.F., Gagneten, A.M. y Paggi, J.C. “Análisis comparativo de indicadores de toxicidad crónica sobre el cladóceros ctenópodo *Pseudosida variabilis*, con especial énfasis en el parámetro r”. IV Reunión Binacional de Ecología, XXIV Reunión Argentina de Ecología y XVII Reunión de la Sociedad de Ecología de Chile. Interacción, Espacio, Tiempo. Buenos Aires, Argentina. 8-13/08/2010.
- Gutierrez, M.F., Gagneten, A.M. y Paggi, J.C. “Alteraciones por cromo y endosulfán en la migración vertical diaria (MVD) del zooplancton de agua dulce”. X Congreso de la Sociedad de Química y Toxicología ambiental de Latinoamérica (SETAC LA). Cumaná, Venezuela 11-15/08/2011.

## Índice de Tablas

<b>Tabla 1:</b> Propiedades fisicoquímicas de agua de red para los ensayos agudos.	47
<b>Tabla 2:</b> Propiedades fisicoquímicas de agua de tanque para los ensayos de ciclo de vida.	51
<b>Tabla 3:</b> Concentraciones efectivas para el 50% de la población (CE <sub>50</sub> , en µg l <sup>-1</sup> ) luego de 24 y 48 horas de exposición a Cu, Cr y endosulfán (formulado) para las especies estudiadas. Se utilizaron los estadios larvarios iniciales (nauplios para el caso de los copépodos y neonatos para el caso de los cladóceros). Las CE <sub>50</sub> están basadas en la inmovilidad de los organismos y ausencia de respuesta luego de ser levemente estimulados. Se muestran los límites de confianza superior e inferior ( $\alpha = 0.05$ ) entre paréntesis y los valores Chi-cuadrado ( $X^2$ ).	70
<b>Tabla 4:</b> Proporción (promedio) del tiempo de desarrollo de cada estadio de copepodito (C1 a C5) en el medio control y las diferentes concentraciones del AP con sus respectivos valores de Chi- cuadrado y p ( $\alpha=0.05$ ).	72
<b>Tabla 5:</b> Proporción de hembras ovígeras, número de huevos por hembras y tiempo de producción del primer saco ovífero en el medio control (0%) y las distintas concentraciones de AP (100; 50; 25; 12,5 y 6,25).	72
<b>Tabla 6:</b> Coeficiente de correlación de Pearson para los parámetros del ciclo de vida de <i>N. conifer</i> , analizados en relación a las concentraciones crecientes de AP (0; 6,25; 12,5; 25; 50 y 100 %).	74
<b>Tabla 7:</b> Parámetros reproductivos de <i>N. conifer</i> en el control y los tratamientos con cobre y cromo.	79
<b>Tabla 8:</b> CENO, CEM y VSC (en µg l <sup>-1</sup> ) calculados para los indicadores de efecto del ciclo de vida de <i>N. conifer</i> .	79
<b>Tabla 9:</b> Valores de la tasa reproductiva neta (Ro), tiempo generacional (T) y la tasa intrínseca de crecimiento natural ( <i>r</i> ) de <i>P. variabilis</i> expuesta a Cu, Cr y endosulfán.	82
<b>Tabla 10:</b> CENO, CEM y VSC (en µg l <sup>-1</sup> ) calculados para los cuatro indicadores de efecto del ciclo de vida de <i>P. variabilis</i> : longevidad, edad de la primera reproducción (EPR), número total de huevos por hembra (huevos/hembra) y tamaño promedio de la camada.	83
<b>Tabla 11:</b> Concentraciones de efecto no observable (CENO) y concentraciones efectivas mínimas (CEM) calculadas a partir del comportamiento de escape para Cr, Cu y endosulfán.	93
<b>Tabla 12:</b> Resultados obtenidos a partir de las comparaciones entre controles y cada tratamiento con Cr y endosulfán para la Profundidad media y Agrupamiento (ANOVA, de dos factores, con medidas repetidas).	109

## Índice de Figuras

- Figura 1:** Modelo de desarrollo *isocronal* propuesto por Uye (1980). La gráfica fue extraída del trabajo de Hart (1990) quien realizó una extensa revisión crítica del modelo mencionado. 27
- Figura 2:** Modelo de desarrollo *equiproporcional* propuesto por Crockett y Mc Laren (1970) y Crockett (1984) para copépodos marinos. Este modelo fue luego retomado por Hart (1990) para organismos de agua dulce. Se observa que, pese a las variaciones térmicas (eje x), las proporciones respecto al tiempo total de desarrollo se mantienen constantes. 28
- Figura 3:** Especies seleccionadas para el desarrollo de la presente tesis. El tamaño de los individuos es proporcional al tamaño de las figuras aquí presentadas. 43
- Figura 4:** Esquema de los segmentos corporales medidos para cladóceros (**a:** *P. variabilis*; **b:** *C. dubia* y *D. magna*) y **c:** copépodos (*N. conifer* y *A. falcifer*). 45
- Figura 5:** Pez zooplanctófago *C. decemmaculatus*. 50
- Figura 6:** Foto y esquema representativo del mecanismo hidráulico para la realización de los experimentos de escape. a) Pistón; b) Tubo de captura de vidrio transparente; c) Recipiente de vidrio donde se colocan los organismos; d) Válvulas manuales para regular el ingreso y salida de agua. 62
- Figura 7:** Foto y esquema representativo del diseño experimental para los ensayos de migración vertical diaria (MVD). A) Tubo de plástico transparente; B) Soporte de hierro; C) Tubos fluorescentes de luz; D) Placa difusora; d1, d2, d3 y d4 representan los cuatro niveles de profundidad (30 cm cada uno). 65
- Figura 8:** Relación concentración- respuesta de las especies estudiadas luego de 24 (-♦-) y 48 (-■-) horas de exposición al Cu, Cr y endosulfán (formulado). La respuesta considerada fue la inmovilidad de los organismos o ausencia de respuesta luego de ser levemente estimulados. **Nc:** *N. conifer*, **Af:** *A. falcifer*, **Pv:** *P. variabilis*, **Cd:** *C. dubia* y **Dm:** *D. magna*. Las barras verticales indican el  $\pm$  SD para las tres réplicas (n=5). 69
- Figura 9:** Tiempo de desarrollo promedio de los nauplios y los copepoditos. (\*) Indica valores de  $p < 0.05$  para el tiempo total de desarrollo. 71
- Figura 10:** Tiempo de desarrollo diferencial de cada estadio de copepodito (de C1 a C5) del medio control y las diferentes concentraciones del AP. (\*) Indica valores de  $p < 0,05$ . 71
- Figura 11:** Longitud promedio de cada estadio de copepodito (de C1 a C5) del grupo control y los sometidos a las distintas concentraciones de AP. (\*) Indica valores de  $p < 0,05$ . 73
- Figura 12:** Relación entre la longitud promedio de pre-muda y post-muda de los copepoditos (de C1 a C6) del medio control y con las distintas concentraciones de AP. Las flechas indican que los valores son significativamente diferentes del 73

control ( $p < 0,05$ ).

**Figura 13:** Tiempo de desarrollo promedio de *N. conifer* expuesto a Cu (a) y Cr (b). Las áreas amarillas refieren al desarrollo de los nauplios y las áreas azules refieren al desarrollo de los copepoditos. (1) Indica que ningún copépodo alcanzó el estado C3. (2) Indica que sólo 3 copépodos alcanzaron el estado adulto. (\*) Indica valores de  $p < 0,05$  para el desarrollo total. 75

**Figura 14:** Relación entre el tiempo de desarrollo y cada concentración de Cu (a) y Cr (b) analizadas. 76

**Figura 15:** Proporción (promedio) de cada estadio larvario analizado (Nauplio a C5) correspondiente al total del tiempo de desarrollo para los organismos del control ( $0 \mu\text{g l}^{-1}$ ), Cu (a) y Cr (b). 77

**Figura 16:** Talla promedio de cada estadio larvario (de Nauplio a C5) para el control ( $0 \mu\text{g l}^{-1}$ ) y los tratamientos con Cu (a) y Cr (b). 78

**Figura 17:** Parámetros reproductivos de *P. variabilis* expuesta a cuatro concentraciones de Cu (paneles izquierdos), Cr (paneles centrales) y endosulfán (paneles derechos). Se muestran los valores promedio y los  $\pm$  SD;  $n=25$ . 81

**Figura 18:** Organismos capturados ( $n^\circ$ ) a lo largo de 50 capturas sucesivas a la VM ( $2,87 \text{ cm s}^{-1}$ ). a) *N. conifer*, b) *A. falcifer*, c) *D. magna*, d) *C. dubia* y e) *P. variabilis*. Las líneas punteadas fueron calculadas a partir de la correlación de Sperman. 84

**Figura 19:** Número promedio de individuos capturados en cada velocidad de captura: VL ( $0,27 \text{ cm s}^{-1}$ ); VM ( $2,87 \text{ cm s}^{-1}$ ) y VR ( $15 \text{ cm s}^{-1}$ ). Las líneas verticales representan el  $\pm$ SD. 85

**Figura 20:** Respuestas de escape de los organismos en presencia del AP a las tres velocidades de captura (VL, VM y VR). El eje X representa el valor del control. Las barras positivas indican que los organismos manifestaron una mayor habilidad de escape que los del control. Por el contrario, las barras negativas indican que los individuos fueron más capturados que los respectivos del control. La longitud de las barras representa la magnitud de las respuestas. Los asteriscos indican que las diferencias fueron estadísticamente significativas (ANODEV;  $p < 0,05$ ). 86

**Figura 21:** Respuestas de escape de las especies estudiadas a los tres tóxicos (Cr, Cu y endosulfán) a las tres velocidades de captura (VL, VM y VR). El eje X representa el valor del control. Las barras positivas indican que los organismos manifestaron una mayor habilidad de escape que los respectivos del control (se escaparon más). Por el contrario, las barras negativas indican que los organismos fueron más capturados que los del control. La longitud de las barras representa la magnitud de la respuesta. Los asteriscos indican que las diferencias fueron estadísticamente significativas (ANODEV;  $p < 0,05$ ). ■ *N.conifer*, ■ *A.falcifer*, ■ *D.magna*, ■ *C.dubia* and ■ *P. variabilis*. 88

**Figura 22:** Número de a) copepodos calanoideos (*N. conifer* y *A. falcifer*), b) 91

cladoceros anomópodos (*D. magna*, *C. dubia*) y c) cladóceros ctenópodos (*P. variabilis*) capturados en cada concentración de Cu y Cr. Los gráficos muestran los valores medios ( $n=100$ , excepto para *P. variabilis* donde  $n=50$ ) para las tres velocidades de captura:  $0,27 \text{ cm s}^{-1}$  (VL);  $2,87 \text{ cm s}^{-1}$  (VM) y  $15 \text{ cm s}^{-1}$  (VR). Los asteriscos indican diferencias significativas respecto a los controles (ANODEV;  $p<0,05$ ).

**Figura 23:** Número de a) copepodos (*N. conifer* y *A. falcifer*), b) cladoceros anomópodos (*D. magna*, *C. dubia*) y c) cladóceros ctenópodos (*P. variabilis*) capturados en cada concentración de endosulfán. Los gráficos muestran los valores medios ( $n=100$ , excepto para *P. variabilis* donde  $n=50$ ) para las tres velocidades de captura:  $0,27 \text{ cm s}^{-1}$  (VL);  $2,87 \text{ cm s}^{-1}$  (VM) y  $15 \text{ cm s}^{-1}$  (VR). Los asteriscos indican diferencias significativas respecto a los controles (ANODEV;  $p<0,05$ ). 92

**Figura 24:** Respuestas de escape *N. conifer* y *C. dubia* a los diferentes tratamientos con: AP, Cr, endosulfán y las respectivas mezclas frente a las tres velocidades de captura (VL, VM y VR). El eje X representa el valor del control. Las barras positivas indican que los organismos manifestaron una mayor habilidad de escape que los del control. Por el contrario, las barras negativas indican que los individuos fueron más capturados que sus respectivos controles. La longitud de las barras representa la magnitud de las respuestas. Los asteriscos indican que las diferencias fueron estadísticamente significativas (ANODEV;  $p<0,05$ ). 95

**Figura 25:** Patrón de migración vertical registrado para cada especie estudiada a lo largo del día. El diagrama representa la proporción de individuos presentes en cada nivel de profundidad a las 00:00; 06:00; 12:00 y 18:00 horas del día. **Nc:** *N. conifer*, **Af:** *A. falcifer*, **Cd:** *C. dubia*; **Pv:** *P. variabilis*; **Dm:** *D. magna*. 96

**Figura 26:** Migración vertical de de cada especie estudiada a lo largo del día. El diagrama representa la proporción de individuos presentes en cada nivel de profundidad a las 00:00; 06:00; 12:00 y 18:00 horas. Las líneas punteadas (.....) representan los grupos del control y las líneas continuas (\_\_\_\_\_) representan los grupos sometidos al AP. Las líneas horizontales representan  $\pm$ SD. **Af:** *A. falcifer*, **Nf:** *N. conifer*, **Pv:** *P. variabilis* y **Cd:** *C. dubia*. 99

**Figura 27:** Profundidad promedio de cada especie en cada observación (00:00; 06:00; 12:00 y 18:00 horas). Las líneas punteadas (.....) representan los grupos del control y las líneas continuas (\_\_\_\_\_) representan los grupos sometidos al AP. Las líneas verticales representan  $\pm$ SD. 101

**Figura 28:** Índice de agrupamiento (Lloyd). Las figuras muestran los valores promedio para cada especie en cada observación (00:00; 06:00; 12:00 y 18:00). A mayores valores de dicho índice, mayor grado de agregación. Las líneas punteadas (.....) representan los grupos del control y las líneas continuas (\_\_\_\_\_) representan los grupos sometidos al AP. Las líneas verticales representan  $\pm$ SD. 102

**Figura 29:** Valores promedio de las distancias de migración recorridas por cada especie en cada tratamiento (control y AP). Los asteriscos indican diferencias 103

significativas respecto al control ( $p < 0,05$ ). Las líneas verticales representan el  $\pm$ SD.

**Figura 30 (a y b):** Migración vertical de de cada especie estudiada a lo largo del día. El diagrama representa la proporción de individuos presentes en cada nivel de profundidad a las 00:00; 06:00; 12:00 y 18:00 horas. Las líneas punteadas (-----) representan los controles y las líneas continuas (\_\_\_\_\_) representan los tratamientos con Cr (a) y endosulfán (b). En ambos casos los símbolos blancos ( $\square$ ) representan las concentraciones tóxicas bajas y los negros ( $\bullet$ ), las concentraciones altas. **Nc:** *N. conifer*, **Af:** *A. falcifer*, **Cd:** *C. dubia*, **Pv:** *P. variabilis*, **Dm:** *D. magna*. 103

**Figura 31:** Profundidad promedio de cada especie en cada observación (00:00; 06:00; 12:00 y 18:00 horas). Los gráficos de la izquierda muestran la comparación entre control (-----) y los tratamientos con cromo (\_\_\_\_\_), los gráficos de la derecha muestran la comparación entre el control (-----) y los tratamientos con endosulfán (\_\_\_\_). En ambos casos, los símbolos blancos ( $\square$ ) representan las menores concentraciones y los símbolos negros ( $\bullet$ ) representan las mayores concentraciones. **Nc:** *N. conifer*, **Af:** *A. falcifer*, **Cd:** *C. dubia*, **Pv:** *P. variabilis*, **Dm:** *D. magna*. 108

**Figura 32:** Índice de agrupamiento (Lloyd). Las figuras muestran los valores promedio para cada especie en cada observación (00:00; 06:00; 12:00 y 18:00). Los gráficos de la izquierda muestran la comparación entre control (-----) y los tratamientos con cromo (\_\_\_\_\_), los gráficos de la derecha muestran la comparación entre el control (-----) y los tratamientos con endosulfán (\_\_\_\_). En ambos casos, los símbolos blancos ( $\square$ ) representan las menores concentraciones y los símbolos negros ( $\bullet$ ) representan las mayores concentraciones. **Nc)** *N. conifer*, **Af)** *A. falcifer*, **Cd)** *C. dubia*, **Pv)** *P. variabilis*, **Dm)** *D. magna*. 110

**Figura 33:** Migración vertical diaria de *N. conifer* del control y expuesto a las mezclas Cr+AP (paneles superiores), En+AP (paneles inferiores) y a los respectivos tratamientos adicionados individualmente (AP, Cr y endosulfán). Se muestra el porcentaje de individuos promedio en cada nivel de profundidad y cada horario del día observado (00:00; 06:00; 12:00 y 18:00). 113

**Figura 34:** Migración vertical diaria de *C. dubia* del control y expuesta a las mezclas Cr+AP (paneles superiores), En+AP (paneles inferiores) y a los respectivos tratamientos adicionados individualmente (AP, Cr y endosulfán). Se muestra el porcentaje de individuos promedio en cada nivel de profundidad y cada horario del día observado (00:00; 06:00; 12:00 y 18:00). 114

**Figura 35:** Profundidad promedio de *N. conifer* y *C. dubia* del control, AP, los tratamientos con Cr, endosulfán y las mezclas (Cr+AP y En+AP) en cada horario del día observado (00:00; 06:00; 12:00 y 18:00). 116

**Figura 36:** Índice de agrupamiento (Lloyd) de *N. conifer* y *C. dubia* del control, AP, los tratamientos con Cr, endosulfán y las mezclas (Cr+AP y En+AP). Los gráficos muestran los valores promedio en cada horario del día observado (00:00; 06:00; 12:00 y 18:00). 118

## ABREVIATURAS

Af: *Argyrodiaptomus falcifer*

ANODEV: siglas en inglés del análisis de la devianza (“Analysis of deviance”)

ANOVA<sub>mr</sub>: análisis de la varianza (“Analysis of variance”), con medidas repetidas

ANOVA: siglas en inglés del análisis de la varianza (“Analysis of variance”)

AP: Agua de peces

AT: Agua de tanque

C: Copepodito

Cd: *Ceriodaphnia dubia*

CE<sub>50</sub>: Concentración efectiva para el 50% de la población

CEM: Concentración efectiva mínima

CENO: Concentración de efectos no observables

Cr: Cromo

Cr+AP: Mezcla del cromo y agua de peces

Cu: Cobre

Dm: *Daphnia magna*

DPE: Desarrollo post embrionario

En+AP: Mezcla de endosulfán (formulado) y agua de peces

EPR: Edad de la primera reproducción

IC: Intervalo de confianza

MVD: Migración vertical diaria

N: Nauplio

Nc: *Notodiptomus conifer*

Pv: *Pseudosida variabilis*

SD: siglas en inglés de la desviación estándar (“Standard desvest”)

VL: Velocidad de captura lenta

VM: Velocidad de captura media

VR: Velocidad de captura rápida

VSC: Valor subcrónico



## 1.1. RESUMEN

La necesidad de obtener herramientas metodológicas adecuadas y representativas que permitan medir el impacto de los xenobióticos y el efecto de ciertos estresantes naturales, como son los comunicadores químicos (*infoquímicos*) indicadores de depredación sobre los integrantes del zooplancton, promovió el desarrollo de la presente tesis.

Dado que el comportamiento representa una respuesta integrada y de relevancia ecológica para los organismos frente a diversas situaciones ambientales, se ha considerado un parámetro de potencial significancia, tanto para estudios ecológicos como ecotoxicológicos. Este parámetro permitiría reconocer respuestas rápidas y no destructivas a diversos estresantes y estimar posibles consecuencias poblacionales a largo plazo.

Partiendo de estas premisas, se propuso la hipótesis de que los contaminantes y los *infoquímicos* indicadores de depredación son capaces de modificar el comportamiento de los microcrustáceos del zooplancton, y que dichas modificaciones constituyen biomarcadores sensibles y tempranos.

Para ello se realizaron numerosos trabajos experimentales bajo condiciones controladas de laboratorio utilizando tres especies de cladóceros (*Daphnia magna*, *Ceriodaphnia dubia*, *Pseudosida variabilis*) y dos de copépodos (*Argyrodiaptomus falcifer* y *Notodiptomus conifer*). Los experimentos se realizaron en tres etapas que comprendieron ensayos de toxicidad aguda, de ciclo de vida y de comportamiento. Para estos últimos se diseñaron dispositivos específicos que permitieron evaluar la migración vertical diaria (MVD) y la capacidad de escape de los organismos mencionados. En ambos casos se realizaron numerosos experimentos previos que permitieron definir los patrones “normales” de comportamiento. Posteriormente se analizaron las respectivas respuestas ante la presencia de diferentes concentraciones de metales (cromo y cobre), un insecticida comercial (cuyo componente activo es el endosulfán) e *infoquímicos* de un pez zooplanctófago, *Cnesterodon decemmaculatus*.

Los resultados demostraron que los organismos estudiados son sensibles a los *infoquímicos*. Esto se observó en la gran plasticidad fenotípica registrada en el ciclo de vida del copépodo *N. conifer* y en las modificaciones etológicas de las cinco especies, luego de la exposición al medio con dichos comunicadores.

Considerando los efectos de los xenobióticos, en general los parámetros reproductivos constituyeron los indicadores de efecto más sensibles en los estudios de ciclo de vida. Sin embargo, las alteraciones en la habilidad de escape y los movimientos migratorios resultaron ser mejores biomarcadores de los contaminantes utilizados, permitiendo detectar el impacto a concentraciones menores que las que generaron respuestas negativas tanto en los ensayos agudos como en los crónicos.

Dada la importancia del comportamiento en la distribución y éxito evolutivo de los organismos en la naturaleza, las posibles alteraciones en dicho parámetro podrían generar serias consecuencias negativas, no sólo para el zooplancton sino también para los eslabones tróficos vinculados a ellos.

Finalmente, la elevada sensibilidad de *N. conifer* y *P. variabilis* (al compararlas con otros microcrustáceos utilizados en estudios ecotoxicológicos) y su gran representatividad de los ambientes neotropicales, permiten sugerirlas como especies muy adecuadas para futuros trabajos en esta línea de investigación.

## 1.2. ABSTRACT

The need to obtain adequate and representative tools to the measurement of the impacts of xenobiotics and natural stressors, such as some chemical communicators (*infochemicals*) on zooplankton species, promoted the development of the present thesis.

Taking into account that behaviour constitutes an integral response of the organisms, of ecological relevancy to different environmental situations, it has been considered a parameter of potential significance to both ecological and ecotoxicological studies. This parameter would allow to recognize rapid and non destructive responses to several stressors and to estimate possible populational consequences in a long term.

The aforementioned premises allowed us to hypothesize that pollutants and the infochemicals indicating predation are able to modify zooplankton microcrustaceans behaviour, and that those modifications constitute sensible and earlier biomarkers.

In order to test this hypothesis, numerous experimental works under laboratory controlled conditions were done with three cladoceran (*Daphnia magna*, *Ceriodaphnia dubia* and *Pseudosida variabilis*) and two copepod (*Argyrodiaptomus falcifer* and *Notodiptomus conifer*) species. The experiments required three successive steps: acute, life cycle and behavioural assays. To the last one, two specific devices were designed in order to evaluate the organisms' diel vertical migration (DVM) and their ability to escape from a catching tube. In all cases several preliminary experiments were done in order to define the "normal" patterns of each behaviour. Then, the responses to different concentrations of metals (chromium and copper), an insecticide (with endosulfan as active ingredient) and the infochemicals from a zooplanktivorous fish (*Cnesterodon decemmaculatus*) were analyzed.

Results showed that the studied organisms are sensitive to infochemicals. It was observed on the high phenotypic plasticity throughout the entire life cycle of the copepod *N. conifer* and in the ethological modifications of the five studied species, after the expositions to the mentioned communicators.

On the other hand, the reproductive parameters were the most sensitive indicators of xenobiotic effects in life cycle experiments. However, the alterations in the ability to escape and in the DVM resulted better biomarkers, allowing to detect

the impact at lower concentrations than those which promoted negative responses in both acute and chronic assays.

Taking into account that behaviour is one of the most important trait of the organisms life history, which promotes their distribution and evolutive success, a posible alteration on this parameter would generate serious consequences not only to zooplankton species but also to the organisms of other associated throphic levels.

Finally, due to the high sensitivity of *N. conifer* and *P. variabilis*, and their high representativity in neotropical environments, it is suggested that they would be the most appropriate species to future studies in this investigation line.

## 2. INTRODUCCIÓN

### 2.1. Contexto ambiental y ecotoxicología

Los ecosistemas de agua dulce, componen sólo el 2,6 % del total de agua distribuida en el mundo (Kalf, 2002). Estos ambientes constituyen un recurso vital para los seres humanos y para el conjunto de organismos que viven en o asociados a ellos. Sin embargo, desde el inicio de los procesos de industrialización y la profundización de las actividades agropecuarias, la contaminación química se ha incrementado de manera vertiginosa, generando en las últimas décadas preocupantes riesgos para la salud humana y ambiental.

En este contexto, a todos aquellos compuestos o sustancias abióticas sintetizadas artificialmente por el hombre, o cuya concentración en el ambiente supera los valores naturales como consecuencia de las actividades antropogénicas, se las han denominado, en sentido amplio, *xenobióticos* (Repetto, 1995).

A partir del reconocimiento de los riesgos generados por dichos compuestos y la necesidad de evaluar los efectos negativos a mediano y largo plazo, surge la ecotoxicología como rama interdisciplinaria entre la ecología y la toxicología, entre otras. Su principal objetivo refiere al estudio de los efectos tóxicos de los químicos y otros agentes antropogénicos sobre el ecosistema. A fin de cuantificar las concentraciones de estos agentes y predecir los posibles daños a corto y largo plazo, inicialmente se emplearon métodos analíticos puramente químicos, que permiten la identificación y cuantificación individual de sustancias. Como indicadores de fenómenos globales de alteración ambiental (ej. eutrofización) se utilizaron mediciones simples de la demanda biológica de oxígeno, sólidos suspendidos, amonio, entre otros (Hynes, 1978). Sin embargo, investigaciones sucesivas permitieron reconocer que tales métodos no mostraban resultados suficientemente representativos de la problemática ambiental, debido al reconocimiento de la existencia de contaminantes cada vez más diversificados y de reacciones negativas a concentraciones más bajas que las esperables. A partir de entonces, la búsqueda de herramientas metodológicas adecuadas, sea por su representatividad de los procesos naturales, por su sensibilidad o facilidad de empleo, constituye uno de los principales lineamientos de la ecotoxicología actual (Rand y Petrocelli, 1985).

Al presente, la exposición de organismos vivos a potenciales agentes nocivos y la evaluación in campo de alteraciones fisiológicas o poblacionales conforman las

metodologías más utilizadas para establecer la magnitud de los daños. La ventaja de emplear “organismos tests” adecuados reside básicamente en su sensibilidad, ya que otorga la posibilidad de reconocer alteraciones a niveles de contaminación muy bajos, pero significativos para el ecosistema, y que no son detectables mediante los métodos químicos tradicionales.

Cabe mencionar, sin embargo, que la mera exposición de los organismos a los tóxicos a fin de evaluar sus respuestas y predecir los daños a largo plazo o establecer niveles guía para la protección de la biota, también ha sido cuestionada (Heugens y col 2001). Esto se debe a que los resultados de tales exposiciones, a nivel de laboratorio, no siempre pueden ser extrapoladas en forma directa a niveles de organización biológica más altos y difícilmente permiten establecer interpretaciones acordes a la realidad.

En este sentido, es sabido que los xenobióticos son capaces de ejercer su efecto tóxico mediante varios procesos: los directos, que causan la desaparición selectiva de las especies más sensibles y los procesos indirectos que generan interrupciones de las interacciones bióticas o incrementan la vulnerabilidad de las especies a estresantes naturales, tales como variaciones estacionales y depredadores (Hanazato 1998, 2001).

En conjunto, la necesidad de ajustar diseños experimentales existentes y proponer nuevas herramientas metodológicas adecuadas desde el punto de vista ecotoxicológico, constituyen la principal justificación del desarrollo de la presente tesis.

A los efectos directos derivados de la contaminación, normalmente se los ubica en dos grandes grupos (Kalf, 2002): agudos o letales, es decir aquellos cuya acción implica la muerte de los organismos afectados, y crónicos o subletales. En los organismos acuáticos los efectos crónicos frecuentemente implican alteraciones globales a nivel sistémico que resultan en modificaciones biológicas, fisiológicas o morfológicas.

Sin embargo, estudios recientes demuestran la existencia de efectos tóxicos aún más sutiles que, aunque inicialmente parecen imperceptibles o inocuos, constituyen una fuente de “estrés” para los organismos. Es decir, podrían ser capaces de reducir la eficacia biológica o *fitness darviniano* y generar consecuencias negativas sobre las poblaciones naturales a mayor plazo (Sibly y Calow, 1989). Las alteraciones etológicas constituyen uno de los principales efectos tóxicos sutiles y,

por lo ya mencionado, su estudio e interpretación podría ser una herramienta ecotoxicológica altamente sensible y dotada de relevancia ecológica.

Finalmente, entre los efectos indirectos de la contaminación por xenobióticos, el estudio de posibles interferencias en las comunicaciones químicas intra e interespecífica también constituiría una herramienta metodológica útil. Se podría afirmar además, que sería un adecuado complemento en evaluaciones ambientales, permitiendo arribar a interpretaciones más representativas que la sola exposición individual de los organismos a los tóxicos. Mayores detalles respecto a esta temática se desarrollará al final de esta introducción.

Contextualizando la problemática en Sudamérica, y particularmente en nuestra región, los agroecosistemas representan las áreas más importantes para la economía e industria de las poblaciones rurales y urbanas. Argentina es básicamente un país agroproductor y exportador de materias primas, siendo frecuente usuario de tecnologías desarrolladas mayoritariamente en países industrializados, para mejorar e incrementar la calidad y los niveles de producción.

Sin embargo, las actividades agrícolas y ganaderas, junto con las industriales, curtiembres, elaboradoras de productos lácteos e industrias metalúrgicas, entre otras, constituyen las principales fuentes de contaminación acuática, ya que emplean productos químicos que son desechados deliberadamente, con tratamiento insuficiente o sin previo tratamiento al ambiente.

Desde hace pocos años numerosas investigaciones desarrolladas en el país han informado sobre los serios problemas que la toxicidad de estos productos químicos (tales como ciertos plaguicidas o la persistencia de los metales pesados) vienen causando sobre los ecosistemas (Mann y Bidwell 1999; De Lorenzo y col., 2002; Montagna y Collins, 2004; Jergentz y col., 2005; De la Torre y col., 2005; Gagneten y col., 2007; 2009; Achiorno y col., 2008; Gagneten y Paggi, 2009).

En lo que respecta a las actividades agrícolas, la importación y uso de agentes fitosanitarios y fertilizantes para el mejoramiento de la producción han aumentado significativamente en las últimas décadas. Entre ellos, el endosulfán constituye uno de los principales químicos cuyo empleo como ingrediente activo en numerosos insecticidas-acaricidas comerciales se incrementó con el fuerte crecimiento de la producción de soja (Jergentz y col., 2004).

Este compuesto es un organoclorado del grupo de los ciclodienos, constituido por una mezcla de dos isómeros biológicamente activos ( $\alpha$  y  $\beta$ ), en proporciones que varían entre 2:1 y 7:3, más diferentes metabolitos (Mackay y col., 1997). A este grupo pertenece además el clordano, aldrín, dieldrín, heptacloro, endrín, mirex, y clordecon, entre otros. La mayoría de estos productos ya han sido prohibidos a nivel mundial por los problemas que causan al ambiente y a la salud humana.

En general el endosulfán actúa sobre una gran variedad de insectos y ácaros ingresando vía dérmica u oral, principalmente mediante el bloqueo del GABA-(ácido gamma amino butírico) cerrando los canales de cloro. El GABA es un neurotransmisor inhibitorio del sistema nervioso central que opera mediante una hiperpolarización de la membrana de las células nerviosas incrementando el flujo de cloro hacia su interior. Los síntomas externos en estos organismos incluyen hiperactividad, excitación, convulsiones, etc. (Coats, 1990).

Si bien fue introducido a mediados de los años 50, su empleo se incrementó a partir de la prohibición del DDT (IPCS 1984). Fue clasificado por la Agencia para el Medio Ambiente de Estados Unidos como "1b": altamente peligroso (USEPA 1980). En 2005 se discutió por primera vez la inclusión del endosulfán junto con el lindano en la lista de los 12 Contaminantes Orgánicos Persistentes (COPs) en el Convenio de Estocolmo<sup>1</sup>. En 2007, fue prohibido en la Unión Europea, Filipinas, Camboya, y numerosos países más. Además, se solicitó su inclusión a la lista de los COPs del Convenio de Estocolmo por parte de la Comisión Europea (UNEP/POPS/POPRC.3/5).

Su vida media en el agua varía entre 4 a 800 días según el compuesto empleado (IPCS 1984). En el ambiente se transforma principalmente en sulfato de endosulfán y endosulfán-diol. El primero es el producto degradado en mayor cantidad y cuenta con la misma toxicidad del compuesto original; sin embargo es aún más persistente.

A pesar de su categorización como altamente persistente y la prohibición de su uso en los países más desarrollados, aún se sigue empleando en muchos países en vías de desarrollo, incluyendo el nuestro, debido a su gran efectividad y bajo costo. Sin embargo, como resultado de las lluvias, que lavan las superficies tratadas,

---

<sup>1</sup> El Convenio de Estocolmo es un tratado Internacional integrado por 152 países del mundo. Argentina se incorporó en el año 2001 siendo aprobado por Ley de la Nación N° 26011 y adquiriendo categoría Constitucional en 2004.



o como consecuencia del arrastre por los vientos durante las pulverizaciones, estas sustancias son normalmente transportadas a los ríos, lagunas o aguas subterráneas.

En las formulaciones comerciales de endosulfán pueden encontrarse además diversas sustancias clasificadas como “ingredientes inertes o coadyuvantes” tales como emulsificantes solventes de alcohol, emulsificantes destilados del petróleo, agentes de suspensión, agentes humectantes, etc. Por lo general en los envases de venta al público no se incorpora información relacionada con la composición química y grado de toxicidad que se adicionan a los efectos peligrosos del ingrediente activo.

Al presente, numerosos trabajos demuestran la elevada toxicidad de formulados que contienen endosulfán en diversos representantes de la fauna regional (Lajmanovich y col., 2002; 2005; Jergentz y col., 2004; Montagna y Collins 2007; 2008; Palma y col., 2009; Ballesteros y col., 2009).

Por otra parte, el continuo flujo de desechos industriales y de efluentes domésticos incrementa notoriamente el ingreso de sales metálicas a los cuerpos de agua (Farías y col., 2003). El caso más preocupante para nuestra región lo demuestran investigaciones recientes en varios sistemas asociados al río Salado (Ceresoli y Gagneten, 2003; Zilli y Gagneten, 2004; Gagneten y col., 2007; Gagneten y Paggi, 2009). Estas investigaciones registraron niveles de cromo, cobre y plomo muy por encima de los valores permitidos tanto para el consumo humano como para el mantenimiento de la biota acuática (Secretaría Nacional de Recursos Hídricos 2003; 2005 a y b).

A diferencia de los contaminantes orgánicos, tales como el endosulfán, los metales pesados no se degradan mediante procesos biológicos o químicos naturales y pueden interactuar con otras sustancias formando compuestos aún más tóxicos que los originales.

En lo que respecta al cromo y al cobre, se ha demostrado además que estos metales poseen un gran potencial de bioacumulación a lo largo de las redes tróficas (Gorbi y col., 2004; Gutierrez y col., 2007; Gagneten y col., 2009). Si bien ambos constituyen elementos esenciales en numerosos procesos metabólicos, se tornan altamente tóxicos en concentraciones superiores a los rangos normales, causando consecuencias altamente negativas para los individuos y las poblaciones (Sullivan y col., 1983; Fleming y Trevors, 1989; Walker, 1990).

El cromo es un elemento ampliamente distribuido en la naturaleza. Si bien su forma elemental es muy estable, prácticamente no existe puro, pero se lo puede encontrar en estados de oxidación de -2 a +6. Sin embargo, las formas más frecuentes son las tri (+3) y hexavalentes (+6).

En los tejidos biológicos se lo encuentra en su forma +3, en cuyas concentraciones traza es esencial para el metabolismo de los carbohidratos, lípidos y ciertas proteínas de una gran diversidad de organismos. El cromo hexavalente es más tóxico que el trivalente por su elevado potencial de oxidación que le permite penetrar fácilmente en las membranas biológicas. Una vez ocurrido el ingreso, se reduce inmediatamente a  $\text{Cr}^{+3}$ , no quedando claro si los efectos tóxicos se manifiestan por esta reducción o por su mantenimiento en el interior de las células (Steven y Chapman, 1984)

Las principales fuentes de ingreso a los ecosistemas son los desechos de industrias productoras de acero inoxidable, curtiembres y fábricas de pigmentos para tintas y pinturas, entre otras.

Su toxicidad sobre la biota acuática es altamente dependiente de las características fisicoquímicas del agua tales como la temperatura, pH, salinidad, etc. Sus efectos tóxicos han sido descritos para numerosas especies acuáticas, pero en líneas generales, los microcrustáceos han resultado ser los más sensibles. En este sentido, numerosos trabajos registran sus efectos negativos sobre distintos parámetros biológicos tales como la longevidad, alimentación y reproducción (Spehar y Fiandt, 1986; Wong, 1993, Gagneten, 2006). Adicionalmente, a nivel comunitario, el impacto del cromo fue evaluado intensamente en estudios de mesocosmos, donde se observaron importantes modificaciones en la diversidad, riqueza y densidad del zooplancton (Gagneten, 2002).

Finalmente, dada su elevada toxicidad es frecuentemente utilizado como tóxico de referencia en numerosos tests de toxicidad. Además, su baja potencialidad de adsorción a las paredes de los recipientes o la materia particulada, orgánica o inorgánica, permite el mantenimiento de las concentraciones iniciales durante el período de exposición (Guglielmucci y col., 1981).

El cobre existe en sus dos estados de oxidación más estables en los sistemas acuáticos:  $\text{Cu}^{+1}$  y  $\text{Cu}^{+2}$ . Sin embargo, en el metabolismo, este elemento forma parte de numerosas enzimas que actúan como catalizadoras redox o “carriers” (Flemming y Trevors, 1989). Cuando las concentraciones en el medio superan los niveles

umbrales de tolerancia, este metal se torna muy tóxico. Sin embargo, de la misma manera que el cromo, su toxicidad varía dependiendo principalmente de las condiciones del medio.

Los mecanismos de toxicidad conocidos incluyen interacciones con proteínas, enzimas, ácidos nucleicos y metabolitos, tanto en las paredes celulares como en el interior de las células (Sato y col., 1986). Las principales fuentes antropogénicas de contaminación por cobre incluyen las industrias mineras, refinerías, emisiones domésticas, producción de alguicidas, fungicidas y fertilizantes.

Entre las especies de agua dulce más sensibles, *Daphnia magna* registra un rango de toxicidad aguda entre 1.4 y 70  $\mu\text{g l}^{-1}$  (Winner y Farrel, 1976; Dave, 1984; Bossuyt y col., 2004). Sin embargo en revisiones previas Hodson y col. (1979) encontraron un rango mayor de 5 a 86  $\mu\text{g l}^{-1}$ . Otros estudios más amplios sobre la incidencia del cobre comprenden el relevamiento y análisis de respuestas a nivel comunitario. En esta línea, Havens (1994) realizó estudios de mesocosmos monitoreando durante 14 días los efectos del cobre en la comunidad planctónica. Observó una importante reducción en la biomasa total así como una reducción significativa en el transporte del carbono orgánico a lo largo de la cadena trófica.

En líneas generales, como resultado del uso negligente del endosulfán y la contaminación por sales metálicas de cobre y cromo, los organismos “no blanco” tales como los integrantes del zooplancton son seriamente afectados. La desestabilización de la estructura y dinámica de los ecosistemas acuáticos naturales y la simplificación de las redes tróficas, constituyen las principales consecuencias de la contaminación.

## **2.2. Microcrustáceos zooplanctónicos**

En los ecosistemas acuáticos, el zooplancton constituye uno de los grupos más importantes debido a su participación significativa en la transferencia de materia y energía desde los organismos autótrofos hacia los niveles superiores (De Bernardi y Peters, 1987). Adicionalmente, recientes investigaciones enfatizan su importante rol en los procesos de regeneración de nutrientes, especialmente de fósforo, mediante el consumo de bacterias, protozoos y otros microorganismos acuáticos (Thomaz y col., 2004, Trevisan y Forsberg, 2007; Sinistro, 2010). Este aspecto le otorga un gran protagonismo en el denominado “loop microbiano” (Barnes y Mann,

1991) contribuyendo además significativamente a la producción primaria de los sistemas naturales, principalmente de las regiones templadas (Vrede y Vrede, 2005).

Por otra parte, su capacidad de modificar la calidad del agua mediante el consumo selectivo de algas y su importancia como recurso para la fauna ictícola (Pennak, 1991) los torna un eslabón clave en la estructuración y funcionamiento de las tramas tróficas. En nuestra región constituyen el principal alimento de larvas y juveniles de numerosas especies de peces (*Leporinus obtusidens*, *Hoplias malabaricus*, etc.) y de adultos que poseen dieta zooplanctófaga durante toda su vida (*Astyanax eigenmanniorum*, *Jenynsia lineata lineata*, *Cnesterodon decemmaculatus*, etc.) (Occhi y Oliveros, 1974; Escalante, 1983; Rossi, 1989; Oliveros y Rossi, 1991; Freís y López, 1998; Barros, 2004). Asimismo, existen numerosos invertebrados acuáticos de gran importancia ecológica tales como *Chaoborus sp.*, hemípteros noctonectidos y belostomátidos, odonatos y camarones, cuya dieta depende mayoritariamente de estos organismos (Neil, 1990; González Sagrario y Balseiro, 2010).

Entre los grupos dominantes del zooplancton, los cladóceros, copépodos y rotíferos son los principales componentes. Los dos primeros pertenecen al Phylum Arthropoda y son los comúnmente denominados microcrustáceos. Éstos poseen ciertas características biológicas comunes derivadas de un pasado filogenético relativamente próximo; sin embargo entre ellos existen numerosas particularidades que los diferencian.

En líneas generales, su frecuente presencia tanto en ambientes leníticos como lóticos, cortos tiempos generacionales y elevada sensibilidad a la acción de los tóxicos han motivado su estudio en ecología acuática y su empleo como biomarcadores tanto en estudios ecotoxicológicos como en monitoreos ambientales (Ferdous y Muktadir, 2009).

Desde el punto de vista evolutivo de los microcrustáceos, las particularidades de sus parámetros biológicos, morfología, fisiología, etología y patrones de historia de vida constituyen adaptaciones que permitieron su éxito y perpetuación en los ecosistemas (Paggi, 1995). Algunos de ellos son muy importantes para la interpretación de las diversas estrategias y compensaciones (en términos energéticos) necesarias para enfrentarse y sobrevivir a las diferentes condiciones ambientales (Sibly y Calow, 1989). Sin embargo, se podría afirmar que ciertos atributos son más relevantes que otros, dependiendo del grupo considerado:

En primer lugar, aquellos derivados de la morfología ofrecen características ventajosas tanto para estudios ecológicos como ecotoxicológicos (De Bernardis y Peters, 1987; Mark y Solbé, 1998). La longitud media de los copépodos adultos -sin considerar las sedas furcales- varía alrededor del milímetro, y dos milímetros para los cladóceros. Su pequeño tamaño los torna altamente adecuados para el mantenimiento en laboratorio y estudios experimentales, comparados con otros grupos taxonómicos de mayor talla. Por otra parte, sus diversos apéndices y gran sensibilidad permiten reconocer malformaciones o alteraciones en el desarrollo, sea por causas naturales (tales como parasitismo o regeneración post daño) o antrópicas (como contaminación ambiental). En este sentido, numerosas investigaciones han registrado malformaciones tanto en copépodos (Brylinski, 1984; Fleminger, 1985; Sillett y Stemberger, 1998) como en cladóceros (Shurin y Dodson, 1997; Otha y col., 1998; Kotov y Dumont, 2000; Sinev, 2000).

Entre los parámetros fisiológicos, los mecanismos respiratorios son relativamente similares en ambos grupos, siendo la superficie general del cuerpo la principal mediadora de los intercambios de gases. En el caso de los cladóceros, existen además los epipoditos en los apendices del tronco que serían superficies de intercambio específicas. También se ha propuesto la posibilidad de que intervengan los “órganos nucales” aunque su función específica es aún de discutible naturaleza (Aladin y Potts, 1995). El consumo de oxígeno así como la proporción de hemoglobina en el cuerpo también se encontrarían entre los indicadores fisiológicos más sensibles (Pane y col., 2003; Rathore y Khangarot, 2003).

En cuanto a la alimentación, los cladóceros se caracterizan principalmente por ser herbívoros- detritívoros, y algunos pocos son depredadores. Los copépodos, en cambio, poseen una alimentación más diferenciada siendo algunos grupos filtradores, otros ramoneadores o carnívoros. En general los calanoideos tienen a ser micrófagos y los cyclopoideos macrófagos. El conocimiento de los hábitos alimenticios es particularmente importante cuando se llevan a cabo estudios de laboratorio, ya que la necesidad de realizar cultivos paralelos a ser utilizados como alimento (e.g. para algunas especies de cyclopoideos carnívoros) podría dificultar la tarea. La tasa de filtración es uno de los parámetros más utilizados para medir los efectos de ciertos contaminantes en el metabolismo (Wong, 1993; Sarma y Nandini, 2006).

El desarrollo post embrionario (DPE) de los microcrustáceos es otro de los principales puntos de interés para los ecólogos de ambientes acuáticos. Esto se debe a que su estudio permite no sólo el reconocimiento de los mecanismos de transferencia de materia y energía y la detección de riesgos de contaminación, sino que además contribuye al desarrollo de teorías generales sobre la producción biológica (Downing, 1984 en Hart, 1990).

En ambos grupos (cladóceros y copépodos) los procesos de muda son regulados por ecdisteroides (Chang, 1989) y otros componentes similares a las hormonas juveniles de los insectos (Laufer y Borst, 1988). Sin embargo, en el caso de los cladóceros se asume que las mudas ocurren a edades predeterminadas (Lynch, 1989) y la reproducción es estimulada por el tamaño del animal (Gurney y col., 1990). Los juveniles son idénticos a los adultos y no existe metamorfosis. Los copépodos, en cambio, presentan un ciclo altamente complejo, lo que ha demandado muchos años de estudio y generado importantes controversias entre diferentes autores.

En líneas generales, luego de la eclosión del huevo, el desarrollo de un copépodo incluye once estadios inmaduros y una metamorfosis, de la morfología naupliar (N6) a la morfología de copepodito (C1). Entre los estadios inmaduros, los primeros seis corresponden a una larva activa denominada "nauplio". Cada estadio sucesivo de nauplio (N1, N2, N3, N4, N5, N6) se caracteriza por un creciente desarrollo de los cinco pares de apéndices cefálicos. Los seis restantes estadios inmaduros transcurren luego de una metamorfosis que transforma la larva nauplio en un organismo cuya morfología es similar a la del copépodo adulto. Estos sucesivos estadios se denominan copepoditos (C1, C2, C3, C4 y C5) y la diferenciación principal reside en el desarrollo progresivo de los apéndices locomotores torácicos (5) y aumento general del tamaño corporal.

Pese a que trabajos tempranos de Corkett y Mc Laren (1970) demostraron una notoria diferenciación temporal entre los distintos estadios larvarios en organismos marinos, Miller (1977) y Uye (1988), luego de analizar diversas especies del género *Acartia* y *Pseudocalanus* postularon el modelo de desarrollo *isocronal*, de acuerdo al cual cada estadio larvario posee naturalmente la misma duración temporal (Figura 1).

**Figura 1:** Modelo de desarrollo *isocronal* propuesto por Uye (1980). La gráfica fue extraída del trabajo de Hart (1990) quien realizó una extensa revisión crítica del modelo mencionado.

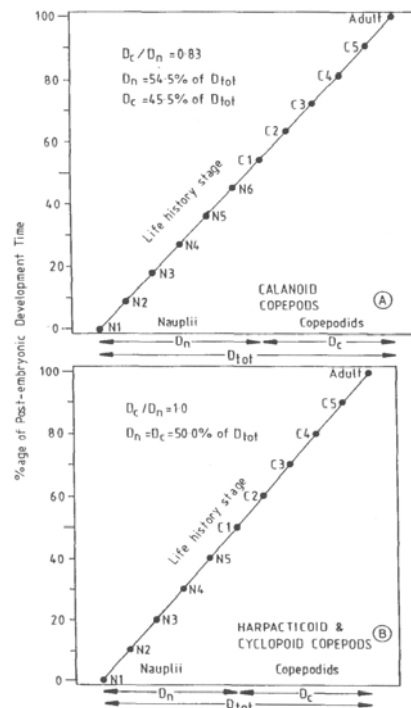
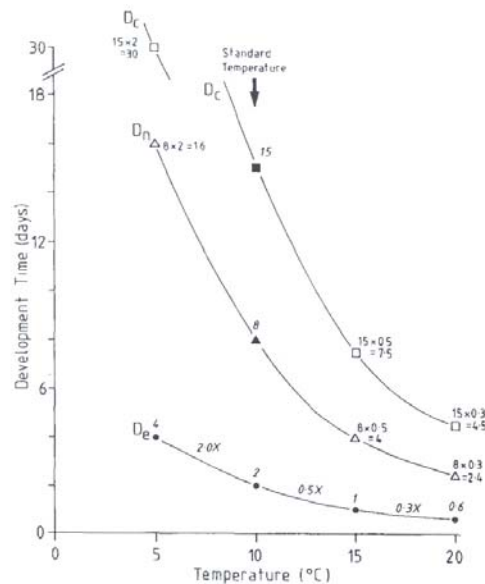


Fig. 1. Isochronal development in a) calanoid copepods and b) harpacticoid and cyclopoid copepods.

Sin embargo, estudios subsiguientes demostraron que tal modelo no se ajustaba a la mayoría de las especies marinas y desarrollaron la idea de *anisocronalidad* (Frost, 1980; Mc Laren y Corkett, 1981; Landry, 1983; Corkett, 1984, entre otros).

Posteriormente, una extensa revisión bibliográfica sobre el DPE de los copépodos tanto marinos como de agua dulce reveló que la *equiproporcionalidad* constituye la regla general (Hart, 1990). Según esta regla, cada estado larvario constituye una proporción fija del tiempo total de desarrollo, aunque no necesariamente idéntica al resto de los estadios (manteniéndose la idea de *anisocronalidad*) y es independiente de factores naturales capaces de influir en el metabolismo, tales como la temperatura o la calidad de alimento (Hart, 1996; 1998;) (Figura 2).

**Figura 2:** Modelo de desarrollo *equiproporcional* propuesto por Crockett y Mc Laren (1970) y Crockett (1984) para copépodos marinos. Este modelo fue luego retomado por Hart (1990) para organismos de agua dulce. Se observa que, pese a las variaciones térmicas (eje x), las proporciones respecto al tiempo total de desarrollo se mantienen constantes.



Como premisa básica de este patrón se asume un cierto rango de tolerancia a las condiciones ambientales, y se consideran casos excepcionales los organismos que poseen estados de diapausa o dormancia (generalmente en los últimos estadios de copepodito). En esta línea, trabajos posteriores corroboran estas afirmaciones mediante modelos matemáticos más complejos (Carlotti y Sciandra, 1989; Van Den Bosch y Wilfried, 1994).

Pese a la relativa complejidad del modelo propuesto, el desarrollo de los copépodos constituye un excelente indicador para evaluar posibles alteraciones frente a diferentes estresantes y otorgar información sobre las respuestas poblacionales (Hutchinson, 2002). En este sentido, Andersen y col. (2001) demostraron que el pasaje de nauplio a copepodito es un indicador efectivo para detectar alteraciones hormonales causadas por contaminantes. Por su parte, Brown y col. (2003a) incorporaron el modelo de desarrollo *equiproporcional* en un test de ciclo de vida para obtener información sobre la toxicidad del lindano. Sin embargo al presente no existen estudios sobre la estabilidad de este patrón en presencia de metales pesados o comunicadores químicos naturales.

La reproducción es otro de los atributos biológicos de mayor consideración en los más rigurosos ensayos de laboratorio. En este sentido, dado que los cladóceros



son partenogenéticos durante la mayor parte del año y en la mayoría de los cuerpos de agua, algunas especies, principalmente del género *Daphnia* han sido estandarizadas y propuestos como organismos apropiados para la realización de ensayos ecotoxicológicos (De Bernardis y Peters, 1987; Mark y Solbé, 1998). La reproducción partenogenética implica la producción de huevos  $2n$ , dando lugar a numerosos hembras de idénticas características genéticas, lo que asegura uniformidad de respuesta. Esta particularidad constituye una ventaja sobre los copépodos, que poseen una reproducción anfigónica compleja y prolongada y carecen consecuentemente de la homogeneidad genética que caracteriza a los cladóceros.

En cuanto a los parámetros reproductivos normalmente utilizados en estudios ecológicos tanto en campo como en laboratorio, la fertilidad (número de huevos por hembra), fecundidad (número de hembras fecundadas) y edad de la primera fecundación son los más empleados (Biesinger y Christensen, 1972; Allan y Daniels, 1982; Chuah y col., 2007; Wang y col., 2009). Por otro lado, se continúan utilizando indicadores de crecimiento poblacional para microcrustáceos desarrollados tempranamente desde el campo de la ecología, tales como la tasa reproductiva neta ( $R_0$ ), el tiempo generacional ( $T$ ) y la tasa intrínseca de incremento poblacional ( $r$ ) (Lotka, 1925; Laughlin, 1965).

Este último estimador ( $r$ ) ha sido muy utilizado como medida del *fitness* (eficacia biológica) desde los trabajos de Birch (1948), siendo considerado un parámetro de gran interés por integrar todos los componentes de la historia de vida de los organismos. Sin embargo, otros autores sostienen que  $r$  no es siempre el más apropiado (Allan, 1976; Janssen y col., 1994), y en esta misma línea varios trabajos sugieren que es poco sensible comparado con el crecimiento o la reproducción (Barbour y col., 1989; Van Straalen y col., 1989; Villaroel y col., 2003).

Considerando el esquema  $r$ - $K$  de estrategias de perpetuación, los copépodos estarían ubicados entre los  $K$  estrategias por su extenso período de desarrollo, su comparativamente modesta tasa intrínseca de crecimiento natural y su sexualidad. Contrariamente, por el gran oportunismo y capacidad partenogenética, los cladóceros serían estrategias  $r$ , coincidiendo en ese sentido con los rotíferos (Allan, 1976).

Finalmente, el comportamiento, (cualquiera sea su naturaleza) representa una respuesta integrada del organismo a diversas situaciones ambientales (Rinderhagen

y col., 2000), razón por la cual durante las últimas décadas numerosos autores lo han considerado un parámetro significativo tanto para estudios ecológicos como ecotoxicológicos (Ohman, 1988; Sharp y Stearns, 1997; Lopez y col., 2004). En este sentido, su estudio permite reconocer respuestas rápidas y no destructivas a gran variedad de estresantes y estimar ciertas consecuencias poblacionales a largo plazo (Ferrando y Andreu, 1993; Wolf y col., 1998).

A modo general, es sabido que el comportamiento es uno de los factores más influyentes en la distribución y éxito evolutivo del zooplancton, particularmente de los microcrustáceos, ya sea por sus implicancias a nivel individual como por las posibles consecuencias en la dinámica de sus poblaciones (Gliwicz, 1994; Vos y col., 2002).

La constitución genética, condiciones fisiológicas e historia de vida de cada organismo constituyen los parámetros sobre los cuales se determina cada comportamiento (De Meester, 1993; De Meester y Pijanowska, 1996). Sin embargo, las condiciones físicas, químicas y biológicas del medio pueden modificar estos patrones, induciendo mecanismos adaptativos flexibles capaces de generar fenotipos muy variables en ambientes diferentes (Hanazato, 2001; Kerfoot y col., 1980; De Meester y col., 1999; Tollrian y Dodson, 1999).

#### *Migración vertical a lo largo del ciclo diario (MVD)*

Un comportamiento ampliamente conocido y muy típico de los organismos plactónicos es el fenómeno de migración vertical a lo largo del ciclo diario (MVD): movimiento vertical de los organismos en la columna de agua, que ocurre tanto en ambientes continentales como marinos (Cohen y Forward, 2002).

La migración vertical diaria (MVD) del zooplancton ha sido caracterizada como la mayor migración animal en términos de biomasa en nuestro planeta (Hays, 2003). Tal es su importancia que durante décadas ha sido objeto de muchas investigaciones e interpretaciones dando lugar a diversas hipótesis acerca de su significado biológico y de los estímulos que la generan. Muchas de ellas tienden a enumerar factores ambientales (Forward, 1988) y respuestas metabólico-demográficas (Ohman, 1990) como las causas próximas de este fenómeno, incluyendo a quienes priorizan la existencia de ritmos endógenos (Enright y Hamner, 1967).

Otras hipótesis enfatizan la evasión a los depredadores como las causas evolutivas últimas (Gliwicz, 1986; Dodson, 1988; Watt y Young, 1994; De Robertis y

col., 2000). Sin embargo, más recientemente han comenzado a tener mayor predicamento aquellas interpretaciones que consideran al proceso de migración vertical como una solución de compromiso en la que intervienen, en diferente grado, las causas antes expuestas (Landry, 1978; Lampert, 1993; 2005; Vitasalo y col., 1998; Stirling y Roff, 2000).

Por otra parte, aunque inicialmente se consideró la MVD como un comportamiento fijado genéticamente, actualmente se considera consecuencia de la plasticidad fenotípica (Ringelberg, 1991; 1999) y el resultado de una selección activa de hábitat (Lampert, 2005). Independientemente de las causas, el consenso general en la literatura científica reside en que pese a los costos energéticos implicados, estos movimientos confieren importantes ventajas metabólicas y demográficas, al tiempo que promueven la coexistencia de diferentes especies y permiten mantener la biodiversidad local (Dini y Carpenter 1991; Jose de Paggi, 1995; Lampert y col., 2003).

Numerosos intentos se han realizado para describir los patrones básicos frente a diferentes condiciones ambientales (Hutchinson, 1967; Zaret y Suffern, 1976; Lampert, 1989); Por ejemplo, el patrón de ascenso nocturno y descenso diurno, propuesto en los trabajos de los mencionados autores, se ha denominado migración inversa, y sus causas últimas han sido estrechamente asociadas a la presencia de depredadores vertebrados. Por otra parte, ante la ausencia de depredadores visuales, los organismos tienden a realizar movimientos directos, con un ascenso diurno y un descenso nocturno a fin de optimizar los recursos tróficos. Finalmente se ha descrito el concepto de “twilight migration” para describir los patrones de dobles ascensos que realizan ciertos dáfnidos. Un ascenso a media noche y otro al amanecer, estos últimos constituirían breves “excursiones de inspección” a fin de comprobar la ausencia de peligro y, de esta manera, seleccionar los niveles de profundidad óptimos. Sin embargo, pese a las descripciones, diversos autores demostraron que finalmente este comportamiento varía de sistema a sistema y entre las especies (De Mester y col., 1999; Tollrian y Dodson, 1999). Pese a ello, es posible inferir que cada patrón de migración permite obtener ventajas en el *fitness*, favoreciendo el desarrollo exitoso y la perpetuación en la naturaleza de las diferentes especies.

Adicionalmente, ha sido demostrado que una alteración en la selección de hábitat y MVD debido a estresantes naturales (intensidad lumínica, eutrofización,

calidad química del agua), podrían ocasionar potencialmente mayor susceptibilidad a cambios ambientales o a la depredación por invertebrados o peces (Gliwicz, 1986; Dodson, 1990; Watt y Young, 1994; Bentkowski y col., 2010). Es razonable pensar, por lo tanto, que el impacto de estresantes antropogénicos tales como metales pesados o plaguicidas, que son nuevos (en términos evolutivos) para los organismos, podrían ser una amenaza adicional dado que sus mecanismos fisiológicos aún no están naturalmente adaptados para compensar los efectos tóxicos (Dawidowicz y col., 1990; Loose y col., 1993). Dada la significancia de este comportamiento, las principales consecuencias a nivel poblacional podrían ser la desaparición local y consecuentemente, alteraciones en la estructura y dinámica de los ecosistemas (Preston y col., 1999).

#### *Mecanismos de escape o huída*

Entre otros comportamientos estudiados en especies marinas y dulceacuícolas, se encuentran los mecanismos de escape o huída (Szlauer, 1964). Pese a que muchos autores enfatizan el importante rol de la habilidad de escape en la historia de vida de los organismos (Lass y Spaak, 2003), aún no se han realizado trabajos para analizar la sensibilidad de este parámetro y sus potencialidades en estudios ecológicos o ecotoxicológicos. Más aún, al presente existe escasa información sobre el significado ecológico de las modificaciones en este comportamiento como consecuencia de la exposición a contaminantes antropogénicos.

Del mismo modo que para la mayoría de los organismos presa, el comportamiento de escape implica dos componentes importantes: la habilidad de percepción y la subsecuente reacción al estímulo (Viitasalo y col., 1998). Para los organismos con estrategias de escape pre-contacto<sup>2</sup>, la percepción ha sido descrita y analizada como una de las principales componentes para el éxito en términos *darwinianos*. Esta habilidad implica la activación de sensores específicos distribuidos sobre la superficie del cuerpo de los organismos. La localización específica de los órganos sensoriales, así como el rango de sensibilidad de los mismos han sido motivo de varias investigaciones (Strickler y Bal 1973; Gill y Crisp 1985). Por otra

---

<sup>2</sup> Las estrategias pre- contacto incluyen aquellas tendientes a disminuir la probabilidad de encuentro con los depredadores (Viitasalo y col. 1998). En general están vinculadas a la velocidad de los organismos implicados, así como de las características de la presa que afectan la distancia de reacción de los depredadores (tamaño, color de contraste, comportamiento, etc.)

parte, la reacción etológica al estímulo percibido depende de una adecuada sincronización entre el sistema nervioso y los músculos de las anténulas y apéndices natatorios, torácicos y caudales.

Desde una perspectiva fisiológica, la combinación de ambas respuestas (percepción y reacción) posee un componente emergente y requiere no sólo un óptimo estado biológico individual sino también implica un costo energético que debe ser compensado con otros caracteres biológicos (Stearns, 1992). Este aspecto conforma la “habilidad de escape” como un posible indicador altamente sensible y, desde un punto de vista ecotoxicológico, de interés intrínseco con consecuencias importantes en comportamientos diarios sincronizados (ejemplo, MVD) y relevantes para las dinámicas poblacionales. Por lo tanto, pese a que la evaluación de las dos habilidades asociadas (percepción y reacción) implican una gran simplificación, esta asociación favorece la obtención de resultados más claros a la vez que permite llevar a cabo análisis cuantitativos. Los mismos podrían ser fácilmente empleados como una herramienta complementaria en estudios ambientales.

En líneas generales, al presente, diversos patrones de comportamiento como la alimentación (Buskey, 1984; Rodgher y col., 2008), fecundación (Maier, 1995; Lonsdale y col., 1998), natación (Dodson y col., 1997; Lopes y col., 2004), evasión (Pijanowska y col., 2006) y migración (Cohen y Fordward, 2005; Dawidowicz y Loose 1992) han sido bien documentados principalmente en especies marinas. Sin embargo, no se han realizado iguales esfuerzos para detectar estos comportamientos en especies dulceacuícolas (Watt y Young, 1994; Peticarrari y col., 2004; Reichwaldt y Stibor 2005).

Por otra parte, si bien en los últimos años se ha puesto empeño en desarrollar medidas sensibles de cambios fisiológicos y bioquímicos que pueden ser utilizados como indicadores tempranos del impacto de los contaminantes (Forbes y Calow, 1997), no se han desarrollado modelos que permitan detectar cambios en el comportamiento, los cuales serían biomarcadores mucho más fáciles de medir y menos costosos que los indicadores bioquímicos.

En este sentido, lograr medir las mínimas variaciones etológicas de manera sencilla sobre estos organismos clave, sería una valiosa herramienta, dotada de relevancia ecológica, para evaluar la toxicidad de sustancias, efluentes y situaciones naturales de estrés ambiental. Asimismo, se sugiere que un mayor entendimiento de las posibles modificaciones de los patrones de comportamiento normal, podría

constituir un aporte de gran significación para la conservación y ecología evolutiva (Hanazato y Dodson, 1993; Hanazato, 1995; Forbes y Calow, 1997).

### **2.3. La comunicación química interespecífica en la relación depredador- presa.**

En los ecosistemas acuáticos, las interacciones depredador-presa juegan un rol clave (Stearns, 1992; Lampert y Sommer, 1997), generando procesos coevolutivos complejos capaces de modificar la distribución espacial y temporal de los organismos y determinar la estructura y dinámica de las tramas tróficas (Ohman 1988; Agrawal, 2001; Jamieson, 2005; Aránguiz-Acuña y col., 2010).

Es sabido que la presencia de un potencial depredador en el ambiente puede causar ciertas respuestas fenotípicas en las presas (Mort, 1986; Dodson, 1989; Ohman, 1988; Pijanowska y Kowlaczewski, 1997; Forward y Rittschof, 2000; Rose y col., 2001; De Meutter y col., 2005; Gliwicz y Maszczyk, 2007). Tales respuestas tienden a incrementar la posibilidad de sobrevivir (modificando su morfología o comportamiento), o maximizar el *fitness* (modificando su historia de vida) (Weider y Pijanowska, 1993). Dado que gran parte de las mismas son inducidas químicamente, mediante la liberación de exudados o secreciones al medio (Dodson 1988; Larsson y Dodson, 1993; Tollrian, 1994), una de las estrategias más favorables para enfrentar la gran vulnerabilidad y escasez de refugio en la columna de agua, es ser capaces de reconocer exitosamente esas “señales de alarma” (Kerfoot y col., 1980). De esta manera, la comunicación química constituye además una de las formas más eficaces para el desarrollo de las llamadas “carreras armamentistas” naturales.

En el campo de la comunicación química entre especies diferentes, se han realizado importantes debates a fin de consensuar la terminología más apropiada para las señales intervinientes. En este sentido, los comunicadores químicos (también llamados infoquímicos o semioquímicos) que involucran relaciones interespecíficas, fueron denominados “aleloquímicos” y se subdividen en alomonas, sinomonas y kairomonas (Vos y col., 2006). Estas últimas son las implicadas en las relaciones depredadores-presas y, pese a ciertas controversias entre diversos autores (Nurdlund y Lewis, 1976; Kusch, 1999 en Lass y Spaak, 2003), se caracterizan por favorecer a quienes las reciben, más que a quienes las segregan.

A partir del conocimiento sobre el importante rol que los comunicadores químicos cumplen en las interacciones biológicas, desde los años 60 numerosos

investigadores se han interesado por conocer la naturaleza química de estos componentes (Gilbert, 1967). Como primera aproximación, estudios tempranos demostraron que en general estas sustancias no poseen especificidad de acción sobre las especies receptoras (Loose y col., 1993; Von Elert y Loose, 1996). Por otra parte, estudios químicos las caracterizaron como componentes de bajo peso molecular (<500 Da), solubles en agua y no proteicas (Tollrian y von Elert, 1994). Más recientemente Boriss y col. (1999) encontraron que el óxido de trimetilamina (TMA), un regulador del volumen celular y estabilizador proteico de la epidermis de los peces degradado por bacterias superficiales, era el compuesto inductor de las respuestas fenotípicas de los organismos (kairomonas)<sup>3</sup>. Sin embargo, trabajos subsecuentes demostraron que los dáfnidos respondían sólo a concentraciones de TMA más elevadas que las existentes en la naturaleza (Pohnert y Von Elert, 2000). Probablemente la naturaleza química de estos “comunicadores” ha sido muy diversificada a lo largo del prolongado proceso de evolución de la vida sobre nuestro planeta. No obstante seguramente todas ellas deben tener en común al menos dos características: la de ser moléculas lo suficientemente pequeñas y livianas como para que sean fácilmente dispersadas, pero también suficientemente complejas como para ser capaces de contener información específica, que las torne distinguibles de las innumerable sustancias disueltas en el agua.

Al presente, dada las ambigüedades anteriormente señaladas y la parcial falta de certeza sobre la naturaleza de estos compuestos, gran parte de los trabajos en esta línea refieren a los comunicadores químicos sencillamente como “exudados” de peces o invertebrados, según sea el caso (Cieri y Stearns, 1999; Rose y col., 2001). En este sentido, para el caso particular de los peces, Forward y Rittschof (1999; 2000) describen estos exudados como el producto de la degradación de los polisacáridos presente en el mucus externo. La constitución química del mucus es un complejo de estructuras proteicas específicas (5% del peso seco) unidas mediante enlaces covalentes a cadenas de polisacáridos (95% del peso seco). Estas cadenas están compuestas por unidades de disacáridos, cuyo peso molecular varía entre 400- 500 Da (rango similar al descrito para las kairomonas).

---

<sup>3</sup> Al presente se sabe que la TMA es un compuesto muy común en la naturaleza, producida en numerosos procesos de degradación (King, 1984). Más aún, esta sustancia también constituye un componente secretado por los mismos organismos del zooplancton y utilizado por sus propias presas como señales de alarma (de Angelis y Lee 1994).

Luego de la detección de las señales de alarma, independientemente de su naturaleza, el “miedo” a ser consumido juega quizás el rol más importante en el desarrollo de los mecanismos etológicos o fisiológicos defensivos (Gliwicz, 1994; De Meester y col., 1999). Sin embargo, ha sido extensamente reportado que estos cambios tienden a ser desencadenados sólo en la medida en que confieren un beneficio que supere los costos energéticos que implica producirlos. Es decir, evolutivamente la probabilidad de manifestar una determinada respuesta etológica ante la presencia de un depredador dependerá del balance entre el riesgo real de ser depredado y el costo energético de defenderse (Tollrian y Harvell, 1999).

Desde una perspectiva teórica (Hutchinson, 1967), es posible suponer que el balance entre costos y beneficios difiere entre los sistemas, y su comprensión es más compleja en organismos de ambiente altamente variables (tales como los cuerpos de agua someros o zonas costeras) que en aquellos que habitan ambientes más estables. Sin embargo, desafortunadamente los trabajos experimentales en este campo de investigación aún son muy escasos.

Al presente, numerosas investigaciones en el campo de las señales químicas naturales describen los efectos de estas sustancias sobre cambios morfológicos (Mort, 1986; Dodson, 1989) y etológicos en especies zooplanctónicas (Macháček, 1991; 1993; de Mester y Weider, 1999; Rose y col., 2001). Sin embargo, aquellas que evalúan las respuestas en forma de cambios en los diversos parámetros del ciclo de vida son incompletas o poco conocidas. Más aún, es importante mencionar que estas investigaciones han sido generalmente llevadas a cabo en cladóceros, particularmente del género *Daphnia*. Por ejemplo, la presencia de comunicadores químicos del pez *Leucaspius delineatus* en el agua puede alterar el tamaño y el tiempo de la primera reproducción de *D. magna* a lo largo de su ciclo de vida (Weider y Pijanowska, 1993) (ver Lass y Spaak, 2003 para una mayor revisión).

Asimismo, pese a la importancia de los copépodos en la fracción animal del plancton, los conocimientos actuales sobre su capacidad de detección y respuesta a las señales químicas, son muy escasos en comparación con los de otros invertebrados acuáticos. Se sabe, por ejemplo, que algunos copépodos reducen su actividad natatoria en presencia de infoquímicos de peces (Cieri y Stearns, 1999) y son capaces de modificar su comportamiento (Ramcharan y Sprules, 1991) o los ciclos migratorios diarios (Hansson, y col., 2007).



Es por ello que los conocimientos sobre los compromisos entre las menos costosas y más efectivas estrategias de defensa de los microcrustáceos de la región, principalmente copépodos, contribuirían ampliamente al conocimiento de las interacciones depredador-presa en general, y a la dinámica de los ecosistemas acuáticos de agua dulce en particular.

Por otra parte, cabe destacar que las sustancias químicas naturales (infoquímicos) pueden interactuar con los contaminantes antropogénicos y otros xenobioticos presentes en el medio, conformando mezclas que influyen en los organismos de diferentes maneras. En este sentido, se han realizado recientes estudios en diversos grupos taxonómicos tales como anfibios (Barry 2010), peces (Smith 1992; Kate y Dill, 1998), quironómidos (Cerbin y col., 2010) y rotíferos (Preston y col., 1999), lo que ha favorecido el desarrollo de una amplia línea de investigación, denominada “info-disrupción”, tendiente a reconocer las posibles alteraciones en la comunicación química entre los organismos debido a la presencia de sustancias antropogénicas y compuestos naturales perjudiciales (Klaschka, 2008; Boyd, 2010).

Entre los organismos zooplanctónicos, los cladóceros, especialmente del género *Daphnia*, constituyen los principales representantes de los trabajos en esta línea. En general, se destacan las experiencias que evalúan alteraciones en las respuestas fenotípicas frente a depredadores invertebrados tales como *Chaoborus* o larvas de insectos (Jansen, 1995; Barry, 1999; Sakamoto y col., 2006; Coors y De Mester, 2008; Collen, 2008) sin embargo, en menor medida, también existen los que profundizan las respuestas frente a depredadores vertebrados, como son los peces (Hanazato, 2001; Bernatowicz y Pijanowska, 2010). Entre las principales respuestas estudiadas se encuentran los cambios morfológicos y estrategias reproductivas durante el ciclo de vida, sin embargo comparativamente aún son escasos los trabajos que analizan respuestas etológicas ante la presencia de múltiples estresantes actuando en forma conjunta.

A modo general, investigaciones tempranas han demostrado mimetismo o “usurpación funcional” de algunos contaminantes orgánicos (plaguicidas) con respecto a ciertos comunicadores químicos, que ejercerían su efecto modificando la morfología de las especies hacia morfos antidepredadores (Hanazato y Dodson, 1993; 1995). Asimismo, se han observado efectos antagónicos, sinérgicos o simplemente aditivos entre ambos componentes (Barry, 1999; Bernatowicz y

Pijanowska, 2010). Sin embargo, pese a su importancia ecológica y realismo, los estudios en esta línea de investigación aún son muy recientes e incompletos.

Retomando los párrafos iniciales de esta introducción -y considerando a los ciclos vitales como verdaderos “compromisos” del organismo entre el *input* de recursos disponibles y sus diferentes actividades o estructuras biológicas-, los costos de enfrentarse a estresantes múltiples pueden modificar seriamente el *fitness darviniano*. Es decir, alterar la eficacia biológica que le permitiría sobrevivir y dejar descendencia para mantener la estabilidad poblacional en el tiempo. En este sentido, el reconocimiento de cómo se modifican los parámetros biológicos más importantes (tales como el comportamiento o el ciclo de vida) frente a estresantes conjuntos, permitiría un importante acercamiento al conocimiento de los mecanismos biológicos reales que operan en condiciones naturales. Al mismo tiempo, posibilitaría vincular disciplinas tales como la toxicología y la ecología acuática, relacionando los conocimientos sobre las interacciones bióticas (depredador-presa, en este caso) con la sensibilidad a los contaminantes antropogénicos y otros componentes químicos naturales.

## 2.4. Hipótesis

- Los comunicadores químicos (kairomonas) y los contaminantes son capaces de modificar el ciclo de vida, el desarrollo y los comportamientos de migración y escape en organismos del zooplancton.
- Los comportamientos de escape y migración constituyen bioindicadores sensibles de la presencia de xenobióticos en el medio.

## 2.5. Objetivos

### *Objetivo general*

- Analizar el efecto de xenobióticos, comunicadores químicos (kairomonas) o algunas combinaciones entre ambos sobre parámetros biológicos de relevancia ecológica de microcrustáceos del zooplancton.

### *Objetivos específicos*

- Analizar el ciclo de vida de un copépodo y un cladóceros representativo de la fauna regional en presencia de xenobióticos y comunicadores químicos (kairomonas).
- Analizar la migración vertical diaria (MVD) y la reacción de escape de especies de cladóceros y copépodos, ante la presencia o ausencia de comunicadores químicos indicadores de depredación a fin de establecer sus patrones naturales de comportamiento.
- Determinar posibles cambios sobre estos patrones de comportamiento ante la presencia de distintas concentraciones de xenobióticos.

Nota: En el plan inicial de la presente tesis se planteó analizar sólo el comportamiento de los organismos zooplanctónicos, el cual incluyó la migración vertical diaria y el escape. Sin embargo, posteriormente se incluyó el análisis de otros parámetros biológicos de relevancia ecológica: el ciclo de vida, reproducción y desarrollo larvario en copépodos. Asimismo, si bien inicialmente se propuso el estudio de los efectos de los comunicadores químicos y xenobióticos por separado, también se incorporó el estudio de los efectos de dos mezclas entre los xenobióticos y las kairomonas. Esto último fue explicitado en el objetivo general.

### **3. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1. Ensayos agudos**

Los ensayos de toxicidad aguda permiten reconocer y evaluar los efectos de los contaminantes sobre los organismos en un período de exposición corto (en invertebrados acuáticos, 24 y 48 horas). Con ellos se busca estimar el rango de concentraciones de la sustancia química a ser analizada que produce una respuesta observable y cuantificable bajo condiciones controladas de laboratorio (Rand y Petrocelli, 1985).

En general, la mortalidad y sobrevivencia son las respuestas indicadoras más utilizadas. En estos casos, como medida estimativa de toxicidad se emplea el valor  $CL_{50}$  (Concentración Letal 50) ó  $LC_{50}$  siendo la concentración que produce el 50 % de mortalidad de los organismos luego de un período definido de exposición. En ciertos casos se emplean respuestas diferentes a la mortalidad, como la inmovilidad y, en ellos, la expresión correcta es  $CE_{50}$  (Concentración Efectiva 50) ó  $EC_{50}$  siendo la concentración efectiva para el 50 % de la población (Walter y col., 1997).

Si bien los ensayos agudos se emplean para determinar los niveles guía (nacionales e internacionales) para la protección de los ecosistemas, los valores obtenidos resultan frecuentemente demasiado altos para ser considerados ambientalmente relevantes (Heugens y col., 2001). En esta tesis, las  $CE_{50}$  fueron calculadas con el fin de obtener información de base sobre la cual determinar las concentraciones subletales que se utilizarían posteriormente en los ensayos de ciclo de vida y etológicos. Además, cabe mencionar que los datos obtenidos en esta tesis constituyen los primeros aportes al conocimiento de la sensibilidad de varias especies nativas a los tóxicos aquí utilizados.

##### *3.1.1. Recolección y selección de las especies*

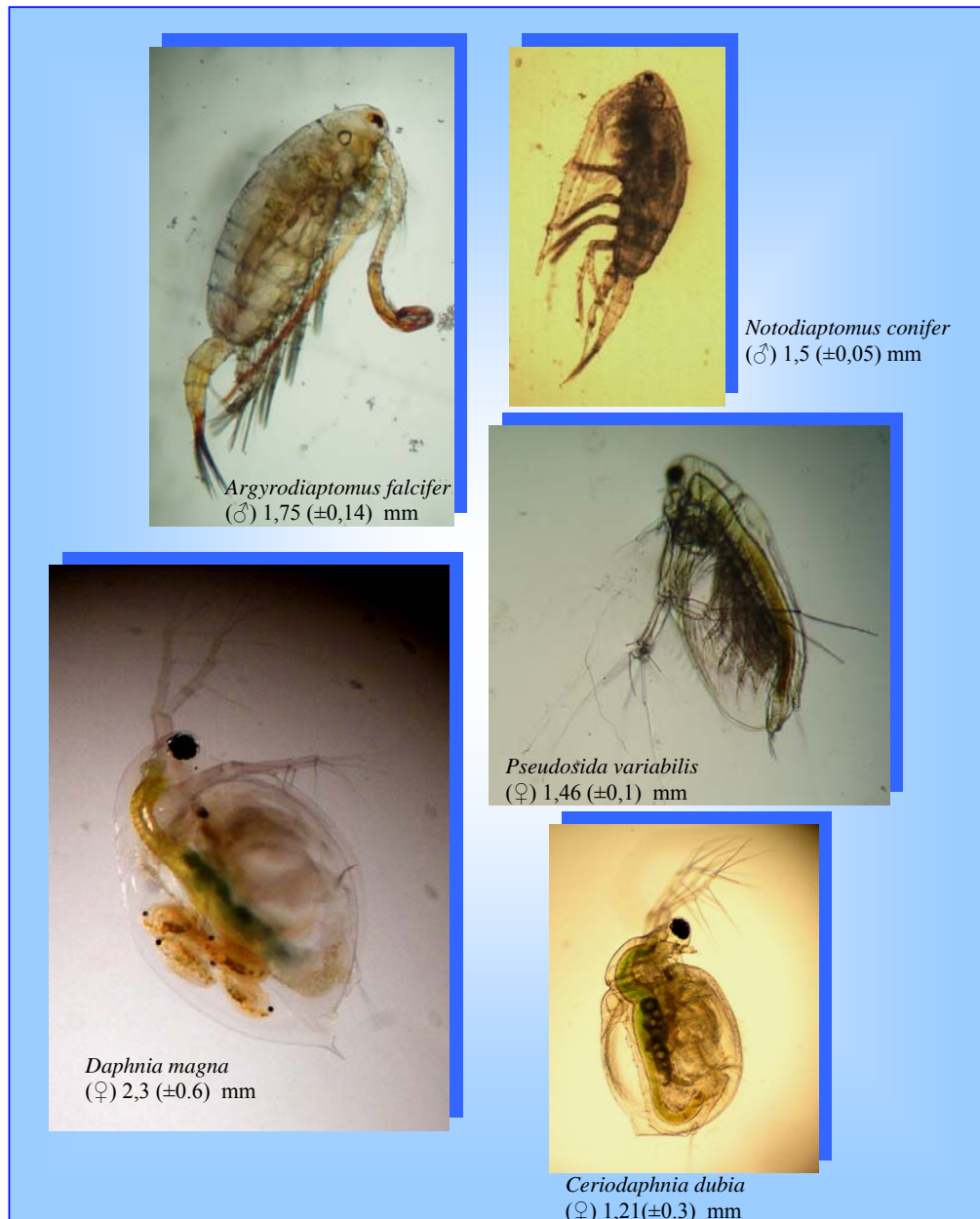
La selección de las especies que se emplearían a lo largo del trabajo implicó la realización de numerosos muestreos en lagunas asociadas a la llanura aluvial del Paraná medio. Tales muestreos se realizaron durante los dos primeros años de la tesis y de manera discontinua. En ellos, los organismos fueron colectados con redes de plancton de 200  $\mu\text{m}$  de apertura de malla y cultivados inicialmente en tanques de 1000 L ubicados al aire libre en el predio del Instituto Nacional de Limnología (CONICET-UNL). Luego de varios días, los organismos fueron transportados al

laboratorio, identificados y mantenidos en condiciones controladas durante varias semanas a fin de verificar su aptitud para el trabajo de laboratorio.

La identificación taxonómica de los organismos se llevó a cabo con microscopio óptico y uso de claves específicas (Lopretto y Tell, 1995; Ringuelet, 1958; Dussart y Frutos, 1986; Wright, 1938; Paggi, 1995, entre otros).

A partir del trabajo de campo previo se seleccionaron numerosas especies, sin embargo, no todas respondieron exitosamente a las condiciones controladas de laboratorio, como fue el caso del género *Diaphanosoma*. Otras especies mantuvieron una variación estacional muy marcada (*Simocephalus spp*; *Argyrodiaptomus denticulatus*, *Notodiaptomus incompositus*), reduciendo su disponibilidad en determinados períodos del año. Finalmente, algunas se mantuvieron presentes durante todo el tiempo de la tesis pero en un número muy escaso (*Moina*). Estas dificultades motivaron la decisión de optar por cinco especies (dos cladóceros y tres copépodos) representativas del zooplancton, diversas en cuanto a su función ecológica, aptas para los cultivos en laboratorio y presentes durante el período necesario para realizar los ensayos (Figura 3). Con excepción de *Daphnia magna*, todas son nativas de la región Neotropical.

**Figura 3:** Especies seleccionadas para el desarrollo de la presente tesis. El tamaño de los individuos es proporcional al tamaño de las fotos aquí presentadas.



A continuación se describen las principales características de las especies seleccionadas:

*Notodiaptomus conifer* (Sars, 1901) pertenece al grupo de los copépodos calanoideos comunes en cuerpos de agua de América del Sur. Si bien su modo de vida es limnético, normalmente se lo encuentra asociado a la vegetación litoral, desarrollando un rol central en las cadenas tróficas (Ringuelet, 1958; Dussart, 1984). Tanto el desarrollo naupliar como varios aspectos de la dinámica poblacional han

sido analizados experimentalmente por autores brasileños (Pires de Gouvea, 1980; Espíndola y Niselli, 1996).

*Argyrodiaptomus falcifer* (Daday, 1905), pertenece al grupo de los calanoideos de hábitos limnéticos, ampliamente distribuidos en cuerpos de agua asociados a la llanura aluvial de los ríos Paraná, Paraguay y Uruguay. Recientemente su posición taxonómica fue revisada, incorporando la descripción de varios aspectos particulares de su morfología (Paggi, 2006). Su gran tamaño y facilidad para el mantenimiento en el laboratorio posibilitaron el desarrollo de importantes trabajos ecotoxicológicos para la región (Gagneten y col., 2009).

El cladóceros *Pseudosida variabilis* (Daday, 1905) es una especie litoral perteneciente al orden Ctenopoda. Si bien los neonatos y juveniles presentan gran dinamismo y elevada actividad natatoria, los adultos son preferentemente sedentarios, permaneciendo la mayor parte del tiempo adheridos a sustratos (raíces, hojas, etc.). Los adultos son relativamente grandes comparados con otros cladóceros. Cabe destacar que a pesar de que los Subórdenes Ctenopoda han tenido una menor diversificación que los Anomopoda, constituyen un importante componente tanto de las comunidades limnéticas como litorales (Paggi, 1998). Si bien al momento de la tesis, no se conocían aspectos de su ciclo de vida, los datos provistos por los trabajos de Freitas y Rocha (2006) sobre *Pseudosida ramosa*, un ctenopodo de distribución y características morfológicas y fisiológicas similares permitieron adquirir una importante referencia sobre su desarrollo y sensibilidad hacia ciertos factores naturales.

*Ceriodaphnia dubia* (Richard 1894) ha sido descrita como especie de distribución prácticamente cosmopolita, etiópica y neotropical (Negrea 1983 en Ruiz y Bahamonde, 1989), siendo común en ecosistemas leníticos (De Graeve y col., 1992, Anderson y Benke, 1994; Ferrari y Ferard, 1996). Posee una baja tolerancia a la contaminación química en comparación con otros invertebrados de agua dulce, elevada fecundidad y facilidad para los cultivos, razones por las cuales su uso ha sido estandarizado para ensayos toxicológicos crónicos (Baudo 1987, Kluttgen y col., 1996). Por otra parte, su amplia distribución permite compararla con resultados obtenidos por otros autores en diversas partes del mundo.

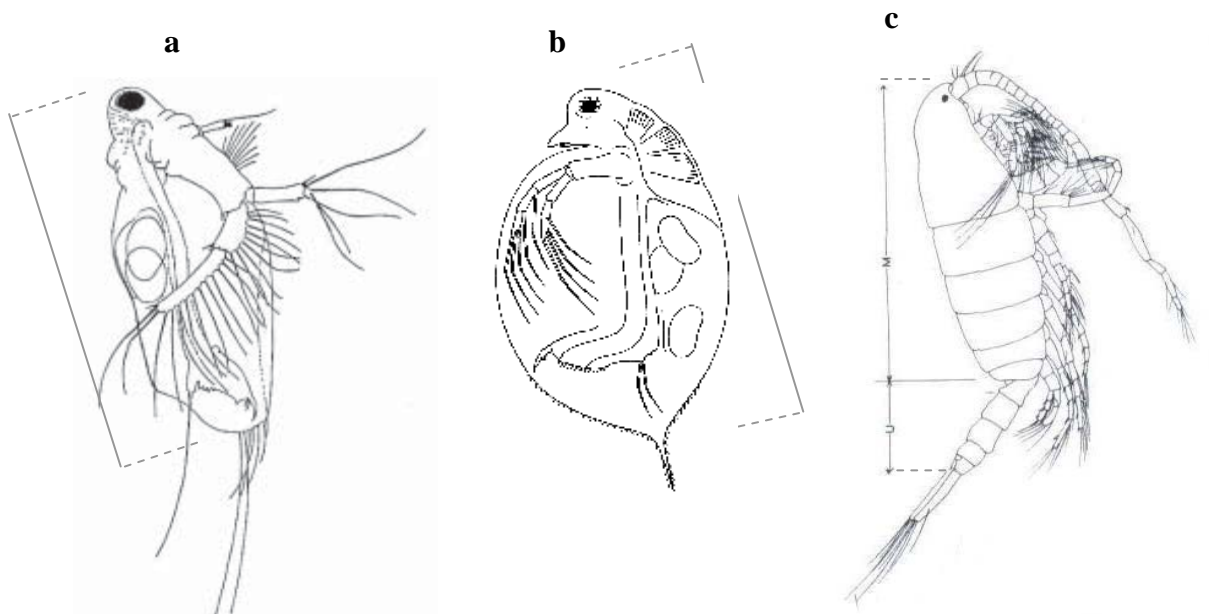
*Daphnia magna* (Straus, 1820) es una especie holártica, típica de cuerpos de agua someros y efímeros (Brooks, 1959). Pese a que su uso en estudios ecotoxicológicos ha sido criticado (Buikema y col., 1982; Baird y col., 1989; Koivisto



y col., 1992) sigue siendo empleada como organismo test en numerosos estudios ambientales por su elevada sensibilidad, facilidad para los cultivos y por la existencia de un vasto conocimiento sobre su biología y ecología (De Bernardis y Peters, 1987; Lampert, 2006). En este trabajo se utilizaron organismos pertenecientes a un cultivo propio del Instituto Nacional de Limnología (CONICET- UNL), permanentemente controlado y mantenido bajo condiciones constantes de laboratorio (temperatura:  $21 \pm 2$  °C; fotoperíodo: 16 h luz: 8 h oscuridad).

La talla media de los cladóceros fue medida desde el extremo superior del caparazón cefálico hasta el extremo inferior del caparazón valvar (Figura 4 a y b). La correspondiente a los copépodos fue medida desde el extremo superior del prosoma hasta el extremo inferior de las furcas (Figura 4 c). En ambos casos se utilizó un micrómetro ocular Nikon 41602.

**Figura 4:** Esquema de los segmentos corporales medidos para cladóceros (**a:** *P. variabilis*; **b:** *C. dubia* y *D. magna*) y copépodos (**c:** *N. conifer* y *A. falcifer*).



### 3.1.2. Tóxicos y medios de cultivo

Las sales metálicas utilizadas en los ensayos ecotoxicológicos fueron sulfato de cobre ( $\text{CuSO}_4$ ) y dicromato de potasio ( $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ). Las soluciones madre de ambos metales fueron preparadas mediante su disolución en agua destilada.

El insecticida empleado fue Zebra Ciagro™ (Ciagro, S.A. Buenos Aires, Argentina), conteniendo 35% del organoclorado endosulfán como ingrediente activo (6, 7, 8, 9, 10, 10-hexacloro-1, 5, 5a, 6, 9, 9a-hexahidro- 6, 9-metano-2, 4, 3, benzodioxantiopin-3-oxido). Para preparar la solución madre final, este producto comercial fue diluido en agua destilada teniendo en cuenta la concentración del ingrediente activo en el formulado.

Las concentraciones analizadas de cada compuesto se prepararon, previamente a cada ensayo, disolviendo concentraciones específicas de las respectivas soluciones madre en agua de red declorada y oxigenada por burbujeo de aire.

Numerosos ensayos preliminares permitieron reconocer que los medios de cultivo estándares para los ensayos de toxicidad (Ej. "medio *Daphnia*") no resultaron igualmente apropiados para todos los organismos. Principalmente existió una importante diferencia en la sensibilidad entre copépodos y cladóceros ya que cada grupo posee requerimientos fisicoquímicos diferentes. Dada la necesidad de emplear un medio que permita comparar adecuadamente la toxicidad aguda entre todas las especies se optó por utilizar agua de red declorada y oxigenada entre 24 y 48 horas previas a su uso, tanto para los controles como para los tratamientos con tóxicos. Los medios artificiales, con elevadas concentraciones de sales y minerales tienden a adsorber los metales o contaminantes orgánicos, alterando las concentraciones reales y muchas veces subestimando los valores de toxicidad obtenidos (Flemming y Trevors, 1989; Castañé y col., 2003).

La Tabla 1 muestra las propiedades fisicoquímicas del agua utilizada, medidas según los Métodos estándares para el examen de agua y aguas residuales (APHA, 2005) en el laboratorio de Química Fina y Aplicada (CDTIS – Fund. VINTEC).

**Tabla 1:** Propiedades fisicoquímicas de agua de red para los ensayos agudos.

Parámetro	Unidades de medida	Valores promedio
pH	UpH	7,7
Oxígeno disuelto	mg l <sup>-1</sup>	6
Bicarbonatos	mg l <sup>-1</sup>	67
Sulfatos	mg l <sup>-1</sup>	25
Cloruros	mg l <sup>-1</sup>	20
Calcio	mg l <sup>-1</sup>	9,9
Potasio	mg l <sup>-1</sup>	2,05
Sodio	mg l <sup>-1</sup>	12,7
Magnesio	mg l <sup>-1</sup>	1,42
Nitratos	mg l <sup>-1</sup>	<0,1
DBO5	mg l <sup>-1</sup>	8
DQO	mg l <sup>-1</sup>	10

### 3.1.3. Cultivo y mantenimiento de los organismos:

El mantenimiento de los organismos seleccionados para los ensayos se llevó a cabo paralelamente en los tanques al aire libre (mencionados en el apartado “Recolección y selección de las especies”) y en el laboratorio bajo condiciones controladas de fotoperíodo (16 h luz: 8 h oscuridad) y temperatura (21°C ± 2). En este último caso, los organismos fueron colocados inicialmente en recipientes de vidrio de 100 ml con agua de los tanques (AT) doblemente filtrada a través de una red monofilamento Nitex de 12 µm de abertura de malla. Posteriormente este medio fue diluido con agua de red declorada y oxigenada por burbujeo de aire en varias etapas a fin de aclimatar lentamente las especies al medio que se emplearía en los ensayos agudos definitivos.

Durante su mantenimiento, los organismos fueron alimentados *ad libitum* con un concentrado de *Chlorella* sp. día por medio. Las algas fueron cultivadas según Borowitzka y Borowitzka (1988) y concentradas por centrifugación (500 rpm durante 7 min).

El concentrado se diluyó con agua destilada y se midió por espectrofotometría hasta obtener una concentración de 1,5 de absorbancia a 650 nm. Para obtener mayor certeza sobre la densidad de algas provistas, se realizó la cuantificación de la concentración obtenida mediante microscopio invertido Wild a 400x, siguiendo la

técnica de Utermöhl (1958). Dicha cuantificación resultó en una densidad de  $3,7 \times 10^3$  cel ml<sup>-1</sup>.

#### *3.1.4. Procedimiento experimental*

Para los ensayos agudos de 48 horas, se utilizó un sistema estático sin renovación (Walter y col., 1997). En todos los casos se prosiguieron los procedimientos delineados por United States Environmental Protection Agency (USEPA 2002) con algunas modificaciones.

El rango de las concentraciones analizadas se determinó considerando valores publicados para otros invertebrados de agua dulce e información obtenida a partir de numerosos ensayos preliminares. En ningún caso se adicionó alimento durante el período del ensayo. La medida considerada fue la inmovilidad y ausencia de respuesta al ser estimulados con una varilla de vidrio.

Para el caso de los copépodos, se determinaron los valores agudos para el primer grupo de estadios larvales (nauplios). Previamente a los ensayos, se seleccionaron aproximadamente 20 hembras ovígeras del cultivo *stock* del laboratorio y se aislaron en recipientes de vidrio con 20 ml del medio control hasta la eclosión de los huevos. Luego de la eclosión, 20 nauplios por concentración fueron seleccionados aleatoriamente con pipeta pasteur adaptada, bajo lupa estereoscópica. Cada nauplio fue colocado en un nuevo recipiente de vidrio conteniendo 10 ml del medio con la concentración preparada. Considerando los controles y las respectivas concentraciones, un total de 120 individuos fueron utilizados para la determinación de las CE<sub>50</sub> de cada tóxico (cobre, cromo y el formulado de endosulfán).

El rango de las concentraciones analizadas de cada tóxico fue: para *N. conifer* entre 10 y 320 µg l<sup>-1</sup> de Cu, 29 y 928 µg l<sup>-1</sup> de Cr, y 0,5 y 16 µg l<sup>-1</sup> de endosulfán. Para el caso de *A. falcifer* los rangos fueron: entre 60 y 304 µg l<sup>-1</sup> de Cu, 30 y 1200 µg l<sup>-1</sup> de Cr y 3 y 48 µg l<sup>-1</sup> de endosulfán.

Para el caso de los cladóceros se utilizó un procedimiento similar al de los copépodos. Previamente a los ensayos, se seleccionaron las hembras ovígeras del cultivo *stock* del laboratorio y se aislaron en recipientes de vidrio de 20 ml en el medio control. Luego de la eclosión de los huevos, se removieron las hembras y los neonatos se aislaron aleatoriamente en recipientes de 10 ml conteniendo el medio control o los tratamientos. Los rangos de cada tóxico analizados fueron: para *P.*

*variabilis* entre 3,12 y 100  $\mu\text{g l}^{-1}$  de Cu, 9,5 y 31,2  $\mu\text{g l}^{-1}$  de Cr y 0,1 y 3,2  $\mu\text{g l}^{-1}$  de endosulfán. Para *C. dubia*: entre 3 y 48  $\mu\text{g l}^{-1}$  de Cu, 20 y 320  $\mu\text{g l}^{-1}$  de Cr y 0,15 y 2,4  $\mu\text{g l}^{-1}$  de endosulfán. Finalmente, para *D. magna* los rangos variaron entre 50 y 800  $\mu\text{g l}^{-1}$  de Cu, 10 y 160  $\mu\text{g l}^{-1}$  de Cr y 2 y 32  $\mu\text{g l}^{-1}$  de endosulfán.

### **3.1.5. Análisis estadísticos**

La sensibilidad de los organismos a cada tóxico se expresó como la concentración en la cual no se perciben movimientos para el 50% de los individuos, luego de 24 y 48 h de exposición ( $\text{CE}_{50}$ ). A fin de estimar estos valores y su intervalo de confianza de 95% (IC;  $\alpha = 0,05$ ), se utilizó el análisis Probit basado en Finney (1971). La validez del modelo para cada grupo de datos se determinó a través de la prueba de  $\chi^2$ .

## **3.2. Ensayos de ciclo de vida**

Los ensayos de ciclo de vida, permiten predecir, a partir de los mecanismos de compensación individuales, los posibles cambios poblacionales ante diversos factores de estrés (Luoma, 1995).

Para estos estudios la USEPA (1979) definió los criterios para la selección de las especies más apropiadas, tales como representatividad ecológica, disponibilidad, adecuación para los cultivos y amplio conocimiento de su biología y ecología. Sin embargo, se podría afirmar que la selección de especies escasamente conocidas o estudiadas, pero ampliamente representativas conferiría desde una perspectiva más general, mayor valor a este tipo de análisis. Por un lado, contribuyendo al conocimiento sobre la biología e historia de vida de tales especies y, por otro, aportando a la base de datos sobre la sensibilidad de las mismas (Buikema y Benfield, 1979).

Considerando estos fundamentos, de las cinco especies empleadas en los ensayos agudos, se seleccionaron dos para el estudio de sus ciclos biológicos ante estresantes químicos antrópicos (xenobióticos) y naturales (infoquímicos): un copépodo (*N. conifer*) y un cladóceros (*P. variabilis*).

### **3.2.1. Efecto de comunicadores químicos de peces (*kairomonas*) sobre el ciclo de vida de *N. conifer***

Para evaluar los posibles efectos de comunicadores químicos de peces (*kairomonas*) sobre el ciclo de vida del copépodo se consideraron los siguientes parámetros: a-tiempo total de desarrollo de los nauplios, b-duración de cada estadio de copepodito, c-duración total del período larval, d-porcentaje de hembras ovígeras, e-tiempo de formación del primer saco ovífero, f-número total de huevos por hembra y g-crecimiento.

#### *Selección y cultivo de los organismos*

De la misma manera que para los ensayos agudos, los copépodos *N. conifer* fueron colectados de los tanques de cultivo exteriores del Instituto Nacional de Limnología (CONICET, UNL) con una red de plancton de 200  $\mu\text{m}$  de apertura de malla. En el laboratorio de bioensayos se desarrolló un cultivo *stock* que fue mantenido bajo condiciones constantes de fotoperíodo (16 h luz: 8 h oscuridad) y temperatura ( $21 \pm 2$  °C). El medio de cultivo utilizando fue el mismo agua de los tanques (AT) doblemente filtrada (12  $\mu\text{m}$ ) y aireada.

Para la obtención de los mencionados comunicadores químicos (*kairomonas*) fue necesario el desarrollo y mantenimiento de un cultivo paralelo de peces zooplanctófagos. La especie seleccionada para ello fue el poecílido *Cnesterodon decemmaculatus* (Jenyns, 1842), Figura 5. Estos organismos son de pequeña talla y característicos de la ictiofauna nativa local. Numerosos autores registraron la importancia de esta especie como depredador de especies zooplanctónicas tales como copépodos del género *Notodiaptomus* (Oliveros, 1980; Escalante 1983; Rossi, 1989; Rossi, 1991; Ferris y López, 1998; Oliveros y Barros, 2004). Otra de las principales características por las cuales fue seleccionado refiere a la facilidad para el mantenimiento en laboratorio y su adaptabilidad para el empleo en ensayos de toxicidad.

La obtención de los organismos se realizó con malla (5 mm de apertura) de una pileta ubicada al aire libre en el Instituto Nacional de Limnología (CONICET-UNL), previamente inoculada con una población de peces proveniente de lagunas y cuerpos de agua asociados a la llanura aluvial del río Paraná.

**Figura 5:** Pez zooplanctófago *C. decemmaculatus* (♂).

www.fishbase.org/

**Medio control y medio acondicionado con el comunicador químico (kairomonas)**

Como medio control, se utilizó el agua de los tanques (AT) doblemente filtrada y aireada por burbujeo. Las características fisicoquímicas del AT fueron medidas acorde a los Métodos estándares para el examen de agua y aguas residuales (APHA, 2005). Tales características se observan en la Tabla 2.

**Tabla 2:** Propiedades fisicoquímicas de agua de tanque para los ensayos de ciclo de vida.

Parámetro	Unidades de medida	Valores promedio
pH	UpH	7,3
Oxígeno disuelto	mg l <sup>-1</sup>	6,4
Bicarbonatos	mg l <sup>-1</sup>	84
Sulfatos	mg l <sup>-1</sup>	32,5
Cloruros	mg l <sup>-1</sup>	12
Calcio	mg l <sup>-1</sup>	15,3
Potasio	mg l <sup>-1</sup>	1,9
Sodio	mg l <sup>-1</sup>	2,52
Magnesio	mg l <sup>-1</sup>	2,12
Nitratos	mg l <sup>-1</sup>	<0,1
DBO5	mg l <sup>-1</sup>	8,5
DQO	mg l <sup>-1</sup>	40

Para la obtención del medio con kairomonas de peces o “agua de peces” (AP) se colocaron 20 adultos de *C. decemmaculatus* (longitud total: 3,6 ± 0,6 cm) en una pecera (6 L) con agua control (AT) entre 24 y 48 h antes de los ensayos. A partir de este medio se obtuvieron cinco concentraciones, diluyendo el AP con AT al 50; 25; 12,5 y 6,25 %, estas concentraciones corresponden a las siguientes densidades: 3,3 pez l<sup>-1</sup>, para el AP al 100%; 1,65; 0,82; 0,41 y 0,2 pez l<sup>-1</sup>, para las respectivas diluciones.

Las mencionadas diluciones se realizaron inmediatamente antes de cada ensayo. Durante este procedimiento, los peces no fueron alimentados y se procuró retirar, por succión mediante sifón, las heces del fondo de la pecera a fin de evitar alteraciones químicas de la calidad del medio.

#### *Procedimiento experimental*

Para la obtención de los nauplios de <24 h, las hembras ovígeras fueron aisladas del cultivo *stock* y mantenidas en el medio control hasta la eclosión de los huevos. Los nauplios fueron individualizados en recipientes de vidrio conteniendo 6 ml del medio control o diluciones de AP. Se realizaron entre 25-40 réplicas por control o tratamiento con AP. Durante los ensayos, tanto el medio control con AT como los tratamientos con AP fueron completamente renovados diariamente. Los organismos fueron alimentados diariamente con 0,5 ml de un concentrado de *Chlorella* sp. (Densidad:  $3,7 \times 10^3$  cells ml<sup>-1</sup>).

El estado de desarrollo de cada individuo se determinó indirectamente a partir de la observación y medición de las mudas bajo microscopio estereoscópico y lupa binocular. De esta manera se construyeron tablas de vida y se designaron las siglas: N, para el estado de nauplios (sin diferenciar cada estadio), C1, C2, C3, C4 y C5 para los sucesivos estadios de copepoditos inmaduros y C6 para los adultos. Como medida de crecimiento de los copepoditos se consideró el largo total desde el extremo superior del prosoma hasta el extremo inferior de las furcas de las mudas (ver Figura 4). Las mediciones se realizaron utilizando un microscopio equipado con un micrómetro ocular Nikon 41602.

Cuando los organismos alcanzaron el estado adulto (C6), las hembras fueron colocadas en un nuevo recipiente junto con 5-8 machos a fin de inducir la fecundación. En esta etapa, las observaciones duraron 15 días más para registrar el número de hembras fecundadas, el tiempo transcurrido desde la última muda, la formación del primer saco ovígero y el número de huevos por hembra.

#### *Análisis estadísticos*

Se llevó a cabo un ANOVA de una vía y post test de Dunnett para comparar los resultados obtenidos en cada parámetro medido en los tratamientos con AP con los del control AT (tiempo de desarrollo de los nauplios, de cada estadio de copepodito, duración total del período larval, % hembras ovígeras, tiempo de



formación del primer saco ovífero, número total de huevos por hembra y crecimiento). Las diferencias fueron consideradas significativas a valores de  $p < 0,05$ . Previamente a los análisis, se corroboró la normalidad de la distribución de los datos y la homogeneidad de las varianzas utilizando el test Kolmogorov-Smirnov y Barlett.

Por otra parte se calculó la proporción específica de cada estadio de copepodito en relación al tiempo total de desarrollo. Posteriormente se utilizó el test Chi-cuadrado de bondad de ajuste para más de dos categorías a fin evaluar el efecto de las diferentes diluciones de AP sobre el modelo equiproporcional de desarrollo propuesto para los copépodos (Hart, 1990).

Los efectos del AP sobre el incremento en la talla se examinaron mediante la siguiente regresión lineal:

$$TL_{t+1} \text{ (postmuda)} = a + b (TL) \text{ (premuda)}$$

Donde  $a$  es la intercepción en  $TL_{t+1}$ , y  $b$  es la constante de crecimiento.

Para evaluar si los efectos del agua de peces sobre los parámetros analizados son dependientes de la concentración, se utilizó el coeficiente de correlación de Pearson.

### **3.2.2. Impacto del cromo y cobre sobre el ciclo de vida de *N. conifer***

A fin de evaluar los efectos del cobre ( $\text{CuSO}_4$ ) y cromo ( $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ) sobre el ciclo de vida de *N. conifer* (desde la eclosión de los huevos hasta la producción del primer saco ovífero), se consideraron los siguientes indicadores de efecto: a-tiempo de desarrollo de los nauplios, b-tiempo de desarrollo de cada estadio de copepodito, c-tiempo de desarrollo total, d-crecimiento, e-número de hembras ovíferas, f-fecundidad (número de huevos por hembra) y g-tiempo requerido para la formación del primer saco ovífero.

#### ***Selección y cultivo de los organismos:***

Los organismos fueron colectados de los tanques de cultivo exteriores del Instituto Nacional de Limnología (CONICET, UNL) con una red de plancton de 200  $\mu\text{m}$  de apertura de malla. En el laboratorio de bioensayos, se separaron los adultos mediante pipeta pasteur para iniciar un cultivo *stock* bajo condiciones controladas (fotoperíodo: 16 h luz: 8 h oscuridad; temperatura:  $21 \pm 2$  °C). Este cultivo fue mantenido durante varias semanas previas a los ensayos crónicos utilizando el agua de los tanques (AT) doblemente filtrada con malla de 12  $\mu\text{m}$  y oxigenada por

burbujeo de aire. Durante este período los organismos fueron diariamente alimentados *ad libitum* con un concentrado de *Chlorella* sp. El cultivo de las algas fue realizado siguiendo el mismo procedimiento descrito para los ensayos agudos.

#### *Procedimiento experimental*

Las concentraciones para los análisis de cromo y cobre se determinaron a partir de ensayos crónicos preliminares. Dichas concentraciones fueron: 3; 1,6; 0,8 y 0,4  $\mu\text{l l}^{-1}$  para cobre y 60; 30; 15; 7,5 y 3,75  $\mu\text{l l}^{-1}$  para cromo. Estas se obtuvieron mediante la disolución de la solución madre de cada tóxico (previamente preparada en los ensayos agudos) en AT doblemente filtrada y oxigenada, por ser el medio más apropiado para favorecer el óptimo mantenimiento de los organismos durante los ensayos y por constituir el medio real de los organismos en la naturaleza. Los controles se realizaron en AT sin tóxicos. Las características fisicoquímicas de este medio fueron medidas según los Métodos Estándares para el Examen de Agua y Aguas residuales (APHA, 2005) en el laboratorio de Química Fina y Aplicada (CDTIS – Fund. VINTEC)<sup>1</sup>.

Para iniciar los ensayos de manera homogénea y utilizando organismos de similares condiciones fisiológicas y edad, se aislaron del cultivo *stock* aproximadamente 20 hembras ovígeras que fueron colocadas en recipientes de vidrio con 100 ml del medio de cultivo sin tóxico (AT). Luego de la eclosión de los huevos, cada nauplio fue individualizado en un nuevo recipiente, de manera aleatoria, conteniendo 10 ml del medio control o el tratamiento correspondiente. De esta manera, las observaciones del ciclo de vida se iniciaron desde el primer estadio de vida de los copépodos (nauplios menores a 24h).

En este caso, se utilizó un sistema semiestático, con renovación parcial (50%) diaria del medio. Los ensayos duraron entre 19 y 30 días, dependiendo del efecto de cada tratamiento. Los experimentos fueron realizados bajo las mismas condiciones ambientales que para el mantenimiento del cultivo *stock* (fotoperíodo 16 h luz: 8 h oscuridad; temperatura:  $21 \pm 2$  °C).

Durante los experimentos los organismos fueron alimentados con un concentrado de *Chlorella* sp. ( $3,7 \times 10^3$  cel  $\text{ml}^{-1}$ ). La cuantificación de las algas se realizó siguiendo el mismo procedimiento que para los ensayos agudos.

---

<sup>1</sup> Los respectivos valores de las características fisicoquímicas del medio fueron mencionados en el apartado “Efecto de las kairomonas sobre el ciclo de vida de *N. conifer*”, en la página 51.

Cada estadio larvario fue identificado bajo lupa estereoscópica. Como medida de crecimiento se consideró el largo total desde el extremo superior del prosoma hasta el extremo inferior de las furcas de las mudas. Las mediciones se realizaron utilizando un microscopio equipado con un micrómetro ocular (Nikon 41602).

Una vez que los copépodos alcanzaron el estado adulto, las hembras fueron transferidas a un nuevo recipiente conteniendo el medio con la misma concentración a la que fueron previamente expuestas y 5 - 8 machos, a fin de inducir la fecundación. En esta etapa se registró: el tiempo en que cada hembra desarrolló el primer saco ovífero (como tiempo de la primera fecundación), el número de huevos por hembra y el número total de hembras ovíferas por población.

#### *Análisis estadísticos:*

Se llevó a cabo un análisis de la varianza (ANOVA) y post test de Dunnett para comparar los resultados obtenidos en cada parámetro medido (tiempo de desarrollo, crecimiento, tiempo de la primera reproducción y fecundidad) con el control. Las diferencias fueron consideradas significativas a valores de  $p < 0,05$ .

Previamente a los análisis, se corroboró la normalidad de la distribución de los datos y la homogeneidad de las varianzas utilizando los tests de Kolmogorov-Smirnov y de Barlett, respectivamente. Por otra parte se calculó la proporción específica de cada estadio de copepodito en relación al tiempo total de desarrollo. Posteriormente se utilizó el test Chi-cuadrado de bondad de ajuste para más de dos categorías a fin evaluar el efecto de los metales sobre el modelo equiproporcional de desarrollo propuesto para los copépodos (Hart, 1990).

Los efectos de los metales sobre el incremento en la talla se examinaron mediante la siguiente regresión lineal:

$$TL_{t+1} \text{ (postmuda)} = a + b \text{ (TL) (premuda)}$$

Donde  $a$  es la intercepción en  $TL_{t+1}$ , y  $b$  es la constante de crecimiento. El test  $t$  de Student se empleó para comparar las pendientes de las líneas de regresión calculadas (Zar, 1986).

Los parámetros de ecotoxicidad CEM (Concentración de efecto mínimo ó "LOEC") y CENO (Concentración de efecto no observable ó "NOEC") se determinaron comparando las respuestas en cada concentración contra los controles (mediante ANOVA de una vía y el post test de Dunnett). El valor subcrónico (VSC ó SChV) fue calculado como la media geométrica entre los valores de CENO y CEM.

Este valor es un estimador del valor crónico y representa los umbrales hipotéticos entre el CENO y CEM para un determinado indicador de efecto (“endpoint”) (Norber-King, 1989; Hutchinson y col., 1994).

### **3.2.3. Impacto del cromo, cobre y el endosulfán (formulado) sobre el ciclo de vida de *P. variabilis***

Para evaluar los efectos del cobre, cromo y el plaguicida sobre el ciclo de vida de *P. variabilis*, se consideraron las siguientes variables: a- longevidad (desde la eclosión del organismo hasta su muerte), b- número total de huevos por hembra, c- número de crías por camada, d- edad media de la primera reproducción (EPR), e- la tasa reproductiva neta ( $R_0$ ), f- tiempo generacional (T) y g- la tasa intrínseca de incremento poblacional ( $r$ ).

#### *Selección y cultivo de los organismos test:*

Los organismos fueron colectados de los tanques de cultivo exteriores del Instituto Nacional de Limnología (CONICET, UNL) con una red de plancton de 200  $\mu\text{m}$  de apertura de malla. A partir de las hembras ovígeras se inició un cultivo paralelo en el laboratorio de bioensayos bajo condiciones controladas (fotoperíodo: 16 luz -8 oscuridad; temperatura:  $21 \pm 2$  °C) en recipientes de vidrio de 200 ml conteniendo agua de los mismos tanques doblemente filtrada (12  $\mu\text{m}$ ) y oxigenada por burbujeo de aire.

Los organismos fueron diariamente alimentados *ad libitum* con un concentrado de *Chlorella* sp. El cultivo y cuantificación de las algas fue realizado siguiendo la misma técnica mencionada en los ensayos agudo.

#### *Procedimiento experimental*

Las concentraciones de los tres tóxicos (cobre, cromo y endosulfán) se determinaron tomando como referencia numerosos ensayos crónicos preliminares. En todos los casos se aplicó el mismo factor de dilución (2).

Las sales metálicas empleadas fueron sulfato de cobre ( $\text{CuSO}_4$ ) y dicromato de potasio ( $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ). Las soluciones *stock* de ambos metales fueron preparadas mediante la disolución de las respectivas sales en agua destilada. El insecticida empleado fue el producto comercial Zebra Ciagro™ (Ciagro, S.A. Buenos Aires,

Argentina)<sup>2</sup>. Este producto fue diluido en agua destilada para la obtención de la solución madre teniendo en cuenta la concentración del ingrediente activo en el formulado.

Las concentraciones empleadas para cada compuesto fueron: 2,5; 5; 10; 20  $\mu\text{l l}^{-1}$  de Cobre; 3,3; 6,5; 13; 26  $\mu\text{l l}^{-1}$  de Cromo y 0,018; 0,037; 0,075; 0,15  $\mu\text{g l}^{-1}$  de endosulfán (formulado). Estas concentraciones fueron preparadas previamente a cada ensayo disolviendo la respectiva solución madre en AT, utilizando el mismo criterio de selección que para los copépodos. Los controles se realizaron en AT sin tóxico. Las características fisicoquímicas del AT fueron medidas acorde a los métodos estándares para el examen de agua y aguas residuales (APHA, 2005) en el laboratorio de Química Fina y Aplicada (CDTIS – Fund. VINTEC)<sup>3</sup>.

Previamente al inicio de los ensayos, numerosas hembras ovígeras fueron aisladas del cultivo *stock* y mantenidas en recipientes de vidrio de 200 ml en AT bajo condiciones controladas hasta el nacimiento de los neonatos. Estos organismos (<24 h) fueron aleatoriamente individualizados en nuevos recipientes de vidrio con 8 ml de AT con la concentración correspondiente. Cuando los individuos alcanzaron el estado de juveniles, con un mayor tamaño corporal, se los colocó en recipientes de mayor tamaño con 12 ml de AT.

Se utilizó un sistema semiestático, con renovación parcial (50%) diaria del medio. El monitoreo de los efectos de los tóxicos sobre la sobrevivencia y longevidad se llevó a cabo durante todo ciclo de vida de los organismos, que varió dependiendo de los efectos de cada concentración (entre 29 y 62 días). Asimismo, durante este período, se cuantificaron los neonatos para evaluar los parámetros reproductivos antes mencionados. Las experiencias se llevaron a cabo bajo las mismas condiciones ambientales mencionadas para el mantenimiento del cultivo *stock* inicial. Se utilizaron 25 réplicas por control y concentración de cobre, cromo o endosulfán. Durante las mismas los individuos fueron diariamente alimentados con un concentrado de *Chlorella* sp. ( $3,7 \times 10^3 \text{ cel ml}^{-1}$ ). El cultivo y cuantificación de las algas se realizó siguiendo la misma metodología que para los ensayos agudos.

---

<sup>2</sup> La proporción de endosulfán contenida en el formulado comercial se detalla en la página 46 de la Metodología.

<sup>3</sup> Los respectivos valores de las características fisicoquímicas del medio fueron mencionados en el apartado “Efecto de las kairomonas sobre el ciclo de vida de *N. conifer*”, en la página 51 de la Metodología.

### Análisis estadísticos

El test Chi-cuadrado de bondad de ajuste para más de dos categorías fue empleado para evaluar el efecto de los tóxicos sobre la sobrevivencia de los organismos. Las diferencias fueron consideradas significativas a valores de  $p < 0,05$ .

$R_0$  fue calculado acorde a la ecuación de Lotka (1925) y  $T$  y  $r$  se calcularon según las fórmulas matemáticas de Laughlin (1965):

$$R_0 = \sum l_x m_x$$

Donde  $l_x$  es el número total de hembras vivas;  $m_x$  es la fertilidad

$$T_c = \log_e R_0 / r$$

$$r = \log_e R_0 / T_c$$

Donde,  $R_0$  representa la tasa reproductiva neta;  $T_c$  corresponde al tiempo generacional.

Se llevó a cabo un ANOVA de una vía y post test de Dunnett para comparar los resultados obtenidos en cada parámetro medido (longevidad, primera reproducción y fecundidad) con el control. Las diferencias fueron consideradas significativas a valores de  $p < 0,05$ . Previamente a los análisis, se corroboró la normalidad de la distribución de los datos y la homogeneidad de las varianzas utilizando el test Kolmogorov-Smirnov y Barlett, respectivamente.

Los valores de CEM y CENO fueron calculados para la longevidad, edad de la primera fecundación número total de huevos por hembra y tamaño medio de la camada. Este cálculo se llevó a cabo mediante la comparación estadística utilizando el test de Dunnett entre los grupos tratados de cada tóxico y el control. Para obtener el VSC se calculó la media geométrica entre los valores CEM y CENO.

### 3.3. Ensayos de comportamiento

Desde un contexto ecológico, es sabido que el comportamiento representa una respuesta integrada de un organismo a distintas situaciones ambientales, durante todo su ciclo de vida (Rinderhagen y col., 2000). Particularmente, si tales situaciones representan un posible daño o peligro, éste constituye una respuesta temprana, rápida, muy sensible y no destructiva (Ferrando y Andreu, 1993; Wolf y col., 1998). Por esta razón los ensayos que utilizan como indicadores los cambios en el comportamiento ante determinadas situaciones de estrés (químico, físico o biológico) resultan descriptores muy sensibles y apropiados de sus efectos

negativos, particularmente útiles cuando se trata de establecer los límites de tolerancia en las normativas de salud pública y protección ambiental.

Asimismo se podría afirmar que, por ser una herramienta dotada de relevancia ecológica, constituye un adecuado complemento para estudios de riesgo ambiental, que intentan ser más representativos como indicadores de efecto que los tradicionales (Lopes y col., 2004; Hund-Rinke y Wiechering, 2001).

El objetivo de un test etológico correctamente desarrollado es determinar si una sustancia induce cambios anormales o aberraciones en el comportamiento de las especies, es decir fuera del rango normal de variabilidad, durante un cierto tiempo de exposición. La detección de estos cambios indicaría que el organismo ha sido expuesto a concentraciones que exceden sus límites de tolerancia, en lo concerniente a su comportamiento normal. Los requisitos previos para llevar a cabo estos ensayos implican la adecuada selección de las especies, su aclimatación a las condiciones del bioensayo, la determinación previa del indicador de efecto a medir y el conocimiento sobre la toxicidad del compuesto sobre otros parámetros biológicos (Rand y Petroccelli, 1985). En la presente tesis se llevaron a cabo ensayos etológicos utilizando dos comportamientos clave para los organismos zooplanctónicos: el escape y la migración vertical diaria (MVD).

### *3.3.1. Selección y cultivo de los organismos*

Para analizar los efectos de los tóxicos sobre los comportamientos de escape y migración diaria de los organismos planctónicos, se emplearon las 5 especies que fueron utilizadas para los ensayos agudos: dos copépodos (*A. falcifer*, *N. conifer*) y tres cladóceros (*P. variabilis*, *C. dubia* y *D. magna*).

Por otra parte, buscando un mayor realismo ecológico de los ensayos, para analizar los efectos de los infoquímicos se emplearon sólo las especies nativas, que conviven con *C. decemmaculatus*, es decir *A. falcifer*, *N. conifer*, *P. variabilis*, *C. dubia*.

Excepcionalmente, los efectos de las mezclas (cromo + agua de peces: Cr+AP; y endosulfán + agua de peces: En+AP) sobre ambos comportamientos fueron analizados sobre una especie de copépodo (*N. conifer*) y una de cladóceros (*C. dubia*).

Con excepción de *D. magna*, cuyo cultivo se mantiene en forma permanente bajo condiciones controladas, el resto de las especies fueron extraídas de los

cultivos mantenidos en tanques de 1000 L ubicados al aire libre en el Instituto de Limnología.

En el laboratorio de bioensayos los organismos se mantuvieron en condiciones de temperatura similares a los ensayos agudos y de ciclo de vida ( $21 \pm 2$  °C). El fotoperíodo fue modificado a 12 h luz – 12 h oscuridad para una mejor interpretación de los datos durante los ensayos de migración vertical.

Dada la necesidad de establecer comparaciones adecuadas, acorde a la movilidad de los organismos, en el caso de los copépodos se utilizaron los machos adultos, entre los Cladocera Anomopoda (*C. dubia* y *D. magna*) se emplearon las hembras adultas y entre los Cladocera Ctenopoda (*P. variabilis*) se seleccionaron los juveniles por su mayor movilidad en comparación con los adultos (ver detalles en la sección “Recolección y selección de las especies” del apartado “Ensayos agudos”).

Para la obtención de los infoquímicos de un depredador, se seleccionó el pez zooplanctófago *C. decemmaculatus* por ser abundante en los cuerpos de agua asociados a la llanura aluvial del río Paraná. El cultivo y mantenimiento de estos organismos se desarrolló de igual manera que para la evaluación de los efectos de los comunicadores químicos de peces sobre el ciclo de vida de *N. conifer*.

### 3.3.2. Medio control y medio acondicionado con el comunicador químico de peces (“agua de peces”):

Para la obtención del medio con los comunicadores químicos (“agua de peces”: AP) se colocaron 20 adultos del pez *C. decemmaculatus* (longitud:  $3,6 \pm 0,6$  cm) en una pecera (6 L) con agua de red de clorada y oxigenada por burbujeo de aire. Los peces permanecieron no menos de 24 h en el agua de cultivo antes de la realización de los ensayos. Los controles se llevaron a cabo en el mismo medio (agua de red) sin haber contenido los peces.

### 3.3.3. Tóxicos:

Los compuestos químicos de cromo, cobre y endosulfán empleados en los ensayos de comportamiento fueron los mismos que para los de ciclo de vida ( $K_2Cr_2O_7$ ;  $CuSO_4$  y el producto comercial Zebra Ciagro™, respectivamente). En este caso se emplearon dos concentraciones de cada compuesto (alta y baja) definidas según la sensibilidad de cada especie. Como criterio general se calculó el 20% de las  $CE_{50}$  de los ensayos agudos para obtener la mayor concentración (según las



consideraciones de Kenaga, 1982), posteriormente dicho valor se dividió por 4 para obtener la menor concentración a emplear. Sin embargo, en el caso de *N. conifer*, los valores para cromo y cobre así calculados resultaron más altos que los empleados anteriormente en los ensayos crónicos. Considerando que el fin de los ensayos etológicos era probar la sensibilidad de los organismos a menores concentraciones, éstas se determinaron teniendo en cuenta los mencionados ensayos crónicos.

Finalmente, dado que la  $CE_{50}$  de endosulfán fue muy baja para *C. dubia*, y el cálculo mencionado resultaría en concentraciones muy pequeñas, el criterio de selección fue utilizar las mismas concentraciones que para *P. variabilis*, por ser la especie más sensible a este tóxico, al compararla con el resto.

Para facilitar la lectura, se emplearon las abreviaturas Cr1 y Cr2; Cu1 y Cu2 y Endosulfán1 y Endosulfán2 para cada concentración (baja o alta) de cada tóxico.

Las respectivas diluciones de los tóxicos se realizaron en agua de red declarada y oxigenada por burbujeo de aire durante un período mayor a 24 h. Los controles se llevaron a cabo en el mismo medio sin tóxico.

Las concentraciones empleadas se expresan a continuación, en  $\mu\text{l l}^{-1}$ : en el caso de cobre: 2,4 y 0,6 para *P. variabilis*; 5,4 y 1,3 para *C. dubia*; 37 y 9 para *D. magna*; 1 y 0,25 para *N. conifer* y 37 y 9 para *A. falcifer*. En el caso de cromo: 1 y 0,25 para *P. variabilis*; 20 y 5 para *C. dubia*; 9,3 y 2,3 para *D. magna*; 4 y 1 para *N. conifer* y 136 y 34 para *A. falcifer*. Para endosulfán, las concentraciones fueron: 0,2 y 0,05 para *P. variabilis*; y *C. dubia*; 2,2 y 0,5 para *D. magna*; 0,56 y 0,14 para *N. conifer* y, finalmente 2,2 y 0,5 para *A. falcifer*.

#### **3.3.4. Mezclas**

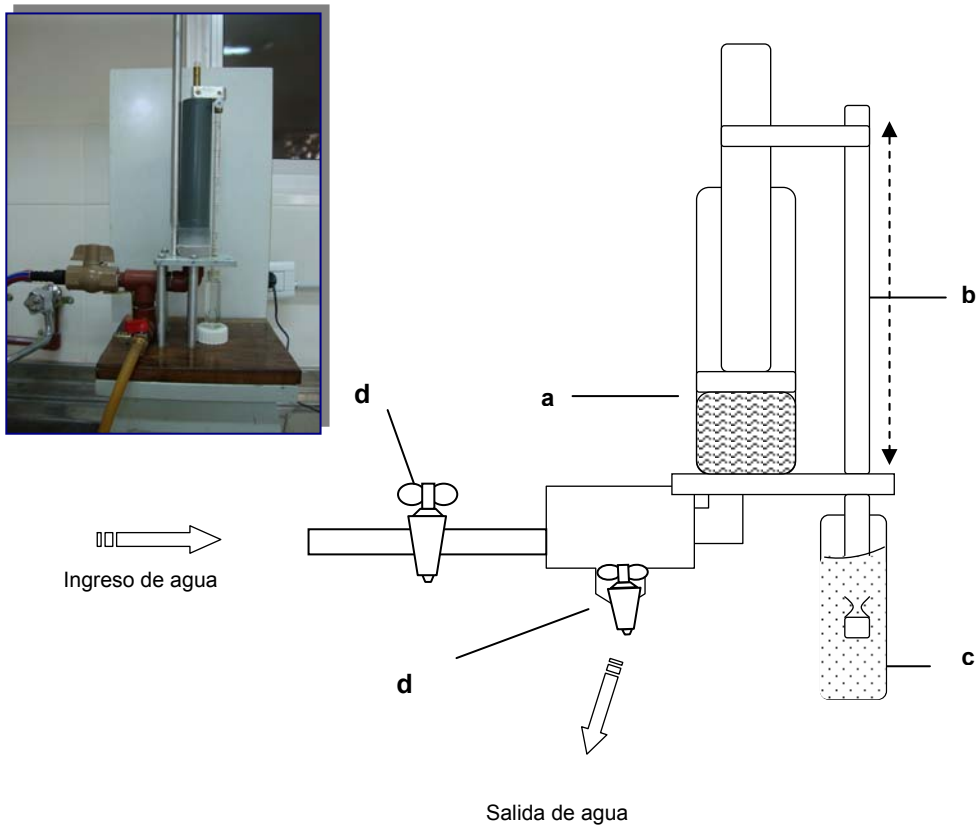
Para evaluar el efecto de ambos estresantes conjuntos (naturales y antropogénicos) se realizaron dos mezclas: cromo + infoquímico y endosulfán + infoquímico. Dado que el infoquímico se encuentra en el agua de peces (AP), ambas mezclas se denominaron: Cr+AP y En+AP. Para realizarlas se emplearon las mayores concentraciones calculadas según el criterio mencionado anteriormente (Cr2 y Endosulfán2) y se diluyeron en el agua de peces al 100%.

#### **3.3.5. Comportamiento de escape**

### Diseño experimental

Para cuantificar la habilidad de los organismos para percibir y reaccionar al acercamiento de un posible depredador (comportamiento de escape) se diseñó un mecanismo hidráulico. El mismo consiste en un tubo transparente (“tubo de captura”) (longitud: 20 cm; diámetro: 5 mm) que, movilizado mediante un pistón, se introduce en un recipiente de vidrio (capacidad: 18 ml) conteniendo el medio con los organismos (Figura 6).

**Figura 6:** Foto y esquema representativo del mecanismo hidráulico para la realización de los experimentos de escape. a) Pistón; b) Tubo de captura de vidrio transparente; c) Recipiente de vidrio, donde se colocan los organismos; d) Válvulas manuales para regular el ingreso y salida de agua.



El pistón, localizado en un cilindro de PVC es elevado con el ingreso de agua de red mediante una manguera. Cuando el agua es liberada, el descenso del pistón provoca el descenso del tubo de captura.

Para los ensayos se seleccionaron tres velocidades de captura: 0,27; 2,87 y 15  $\text{cm s}^{-1}$ , que fueron reguladas mediante una válvula manual localizada al extremo de la salida de agua. Estas velocidades se seleccionaron teniendo en cuenta los

rangos de velocidad utilizados en los experimentos de Szlawer (1964) y se identificaron como velocidad lenta (VL), media (VM) y rápida (VR) respectivamente.

Para medir las velocidades de captura se colocaron dos sensores optoacopladores: uno al inicio (largada) y otro al final (cese) del descenso del tubo de captura. Las señales detectadas fueron procesadas por dos Circuitos Integrados (PIC 125675 y MAX 232) que acomodan las tensiones de entrada con las de salida instalados en una computadora para este fin específico.

En el monitor de la computadora, un cronómetro confeccionado en lenguaje de programación VISUAL BASIC 6.0 traduce las señales enviadas por los sensores a tiempos (milisegundos) de inicio y fin. Las velocidades de captura ( $\text{cm s}^{-1}$ ) se calcularon estableciendo una relación entre la distancia de recorrido del tubo y la velocidad definida por el sistema de sensores mencionado.

Se utilizaron 30 individuos por réplica en todos los experimentos. Cada réplica consistió en un evento de captura. En cada experimento se realizaron 100 réplicas, excepto para *P. variabilis* donde, dado el escaso tamaño poblacional del cultivo *stock*, se realizaron solo 50.

Para reducir la influencia de un eventual acostumbramiento o cansancio de los individuos se procuró emplear grupos diferentes para cada réplica. Sin embargo, se llevaron a cabo experimentos preliminares que permitieron descartar tales acontecimientos. Éstos consistieron en la repetición sucesiva de 50 eventos de captura a la velocidad media (VM) utilizando el mismo grupo de individuos para las cinco especies utilizadas. Luego se compararon los resultados con la ubicación ordinal de cada experimento, presuponiendo que si existía algún efecto de acostumbramiento o cansancio, tal cosa se reflejaría en una tendencia creciente o decreciente simultánea entre el lugar ordinal del experimento y el resultado. Es decir que los resultados de los primeros experimentos serían significativamente diferentes de los últimos.

El tiempo de exposición de los organismos antes de cada experimento fue de 15 ( $\pm 5$ ) minutos. Este período fue seleccionado teniendo en cuenta trabajos previos que demuestran la elevada sensibilidad de los organismos para detectar tempranas exposiciones a los contaminantes (Lopes y col., 2004). Este período permitió detectar efectos etológicos tempranos sin llegar a afectar o dañar la integridad de los individuos (como consecuencia de un mayor tiempo de exposición).

Todos los experimentos se realizaron a la misma temperatura ( $21 \pm 2$  °C) e intensidad lumínica ( $2242 \pm 150$  Lux).

### *Análisis estadísticos*

Los resultados preliminares se analizaron mediante el cálculo del coeficiente de correlación de Spearman, relacionando el número de individuos capturados con los 50 eventos de captura sucesivos. Las diferencias fueron consideradas significativas a valores de  $p < 0,05$ .

Previo a los análisis estadísticos se realizó un análisis exploratorio de los datos, calculando las medidas de tendencia central (moda, media, mediana) y variabilidad (desvíos y coeficientes de variación: CV). Asimismo se realizaron histogramas de frecuencia que revelaron una distribución asimétrica de los datos y se calcularon los valores de kurtosis y coeficiente de asimetría. Estos análisis previos permitieron establecer comparaciones *a priori* entre controles y tratamientos que permitieron aplicar los análisis estadísticos adecuados.

Dada la asimetría de los datos, para analizar los efectos de los compuestos químicos (kairomonas o tóxicos), la velocidad de captura y sus posibles interacciones sobre el escape de los organismos se empleó un modelo lineal generalizado empleando la “devianza” como medida de variación (ANODEV) (McCullagh y Nelder, 1989). Las diferencias fueron consideradas significativas a valores de  $p < 0,05$ . Dado que estas comparaciones múltiples podrían inducir la posibilidad de cometer errores de tipo I, se realizó un segundo análisis aplicando el método de corrección secuencial de Bonferroni (Sokal y Rohlf, 1995). Finalmente, para el caso de los tóxicos (cromo, cobre y el formulado de endosulfán), se calcularon las concentraciones de efecto no observable (CENO) y las concentraciones efectivas mínimas (CEM). Este cálculo se llevó a cabo mediante la comparación estadística entre ambas concentraciones de cada tóxico y los respectivos controles.

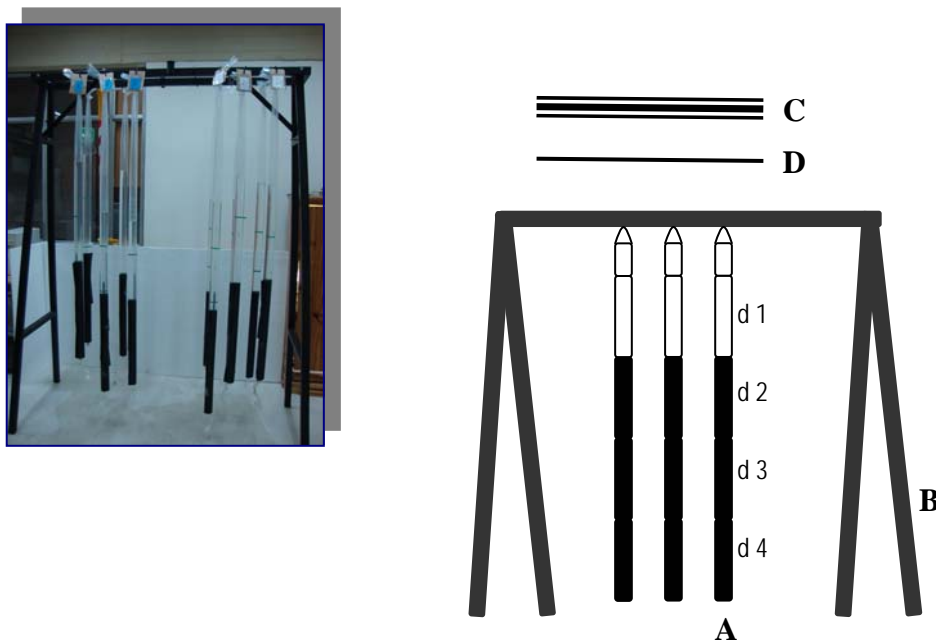
### **3.3.6. Migración vertical diaria (MVD)**

#### *Diseño experimental*

Los ensayos de migración vertical se llevaron a cabo utilizando tubos de plástico transparentes (Figura 7) (longitud total: 150 cm; diámetro: 7,2 cm). Los tubos

fueron marcados externamente cada 30 cm, determinando de esta manera 4 niveles de profundidad (de 0 a 30, de 30 a 60, de 60 a 90 y de 90 a 120 cm). Cada tubo se suspendió de un soporte de hierro construido especialmente y se llenó con 2 l del medio de cultivo (tratamientos o control) conteniendo 30 individuos (cada especie se analizó por separado).

**Figura 7:** Foto y esquema representativo del diseño experimental para los ensayos de migración vertical diaria (MVD). A) Tubo de plástico transparente; B) Soporte de hierro; C) Tubos fluorescentes de luz; D) Placa difusora; d1, d2, d3 y d4 representan los cuatro niveles de profundidad (30 cm cada uno).



El contorno y fondo de los tubos fueron cubiertos con un plástico opaco (75  $\mu\text{m}$  espesor) de tal modo de promover en ingreso de luz solo desde la superficie y minimizar la reflexión. Asimismo, siguiendo a De Meester y col., (1999) y a Cohen y Forward (2002; 2005), en la parte superior se colocaron fuentes de luz blanca fría (tubos fluorescentes) y una placa difusora opaca que permitió generar luz difusa y uniforme. De esta manera se simularon las condiciones en campo: luminosidad superior uniforme con irradiación difusa y fondo oscuro. El fotoperíodo (16 Luz : 8 Oscuridad) se mantuvo sin transición gradual de la intensidad.

La intensidad incidente de los tubos fue 3593,3 ( $\pm 77$ ) Lux en la superficie, 2200 ( $\pm 244$ ) Lux en la región media de la columna y 1200 ( $\pm 154$ ) Lux en el extremo inferior.

A fin de estimar la migración diaria de los organismos se cuantificó el número de individuos presentes en cada segmento de la columna cada 6 horas (00:00; 06:00; 12:00 y 18:00). En todos los casos las cuantificaciones se realizaron luego de transcurridas no menos de 6 horas de exposición, lo cual fue considerado el tiempo mínimo de estabilización del sistema e inicio del comportamiento migratorio.

Se llevaron a cabo 4 réplicas para los controles y 3 para cada tratamiento con cromo, endosulfán, infoquímicos o mezcla. Durante las horas nocturnas (00:00 y 06:00), se utilizó una linterna de luz roja para evitar al máximo generar alteraciones en los organismos.

### *Análisis estadísticos*

1- Para comparar los movimientos diarios de cada especie entre los tratamientos y los controles, se empleó ANOVA de tres factores: tratamiento, niveles de profundidad y hora del día, con medidas repetidas en los dos últimos. Para conocer entre qué tratamientos se registraron las diferencias, se empleó el post test de Dunnett.

Para evaluar el efecto de la interacción entre los tres factores (tratamiento, niveles de profundidad y hora del día) se realizaron comparaciones pareadas entre los tratamientos dentro de cada nivel de profundidad y horario. En este caso con los niveles críticos (*sig.*) y los intervalos de confianza ajustados mediante la corrección de Bonferroni. En todos los casos, las diferencias se consideraron significativas a valores de  $p < 0,05$ . La variable dependiente fue el número de individuos cuantificados transformados en  $\text{Log}_n(x+1)$ . Previamente a cada análisis se verificó la normalidad (test de Kolmogorov-Smirnov), homocedasticidad (test de Levene) y esfericidad (test de Mauchly) de los datos obtenidos.

2- Como medida de ubicación de los organismos en la columna de agua, para cada réplica, se calculó la profundidad media (D) (Dodson 1988) ponderando el número de individuos por nivel de profundidad mediante la siguiente fórmula:

$$D = \frac{\sum N_i d_i}{\sum d_i}$$

Donde  $N_i$ : número de individuos;  $d_i$ : nivel de profundidad.

Posteriormente para analizar las diferencias en el índice D entre control y los tratamientos en cada momento del día se empleó un ANOVA de dos factores con medidas repetidas en un factor, para cada especie por separado. Previamente fue

verificada la distribución normal de los datos (test de Kolmogorov-Smirnov), homocedasticidad (test de Levene) y esfericidad (test de Mauchly). Las diferencias se consideraron significativas a valores de  $p < 0,05$ .

3- Se empleó el índice  $P_i$  para conocer el grado de agregación de los individuos en la columna de agua (Lloyd, 1967). Este índice fue calculado mediante la siguiente fórmula matemática:

$$P_i = \sigma/x^2 - 1/x + 1$$

Donde  $\sigma$ : varianza;  $x$ : número de individuos en la columna.

A partir de los índices así obtenidos para cada réplica se empleó un ANOVA de dos factores con medidas repetidas en un factor. Este análisis permitió analizar las diferencias en la agregación entre control y los tratamientos a lo largo del día, verificando previamente la distribución normal de los datos (test de Kolmogorov-Smirnov), homocedasticidad (test de Levene) y esfericidad (test de Mauchly). Las diferencias se consideraron significativas a valores de  $p < 0,05$ .

4- Para comparar las distancias de migración (**DM= máx. prof. – mín. prof.**) para cada especie entre el control y los tratamientos se empleó la prueba  $t$  para muestras independientes (con un intervalo de confianza de 95%). Previamente se testeó la homogeneidad de las varianzas mediante la prueba de Levene. Los datos fueron previamente transformados a  $\text{Log}_n(x)$  y las diferencias se consideraron significativas a valores de  $p < 0,05$ .

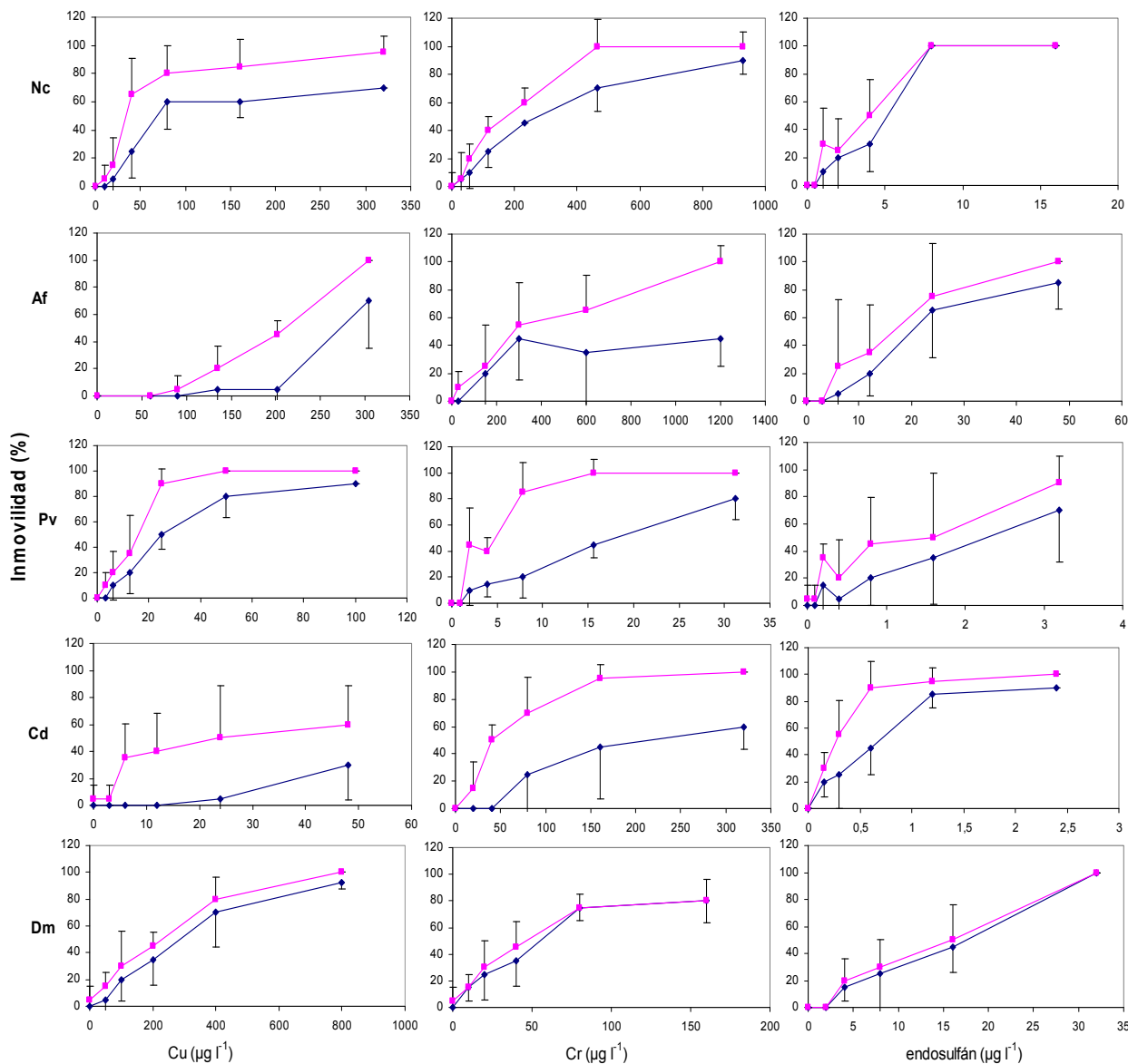
## 4. RESULTADOS

### 4.1. Ensayos agudos

La toxicidad del cobre, cromo y endosulfán fue medida en función de la inmovilidad y ausencia de respuesta de los organismos al ser estimulados. La relación concentración-respuesta, expresada en porcentaje, de cada especie a las 24 y 48 horas de exposición se presenta en la Figura 8. Durante los ensayos agudos la mortalidad en los controles no excedió en ningún caso el 5 % de la población, siendo *A. falcifer* la especie que registró menor sobrevivencia luego de 24 h, con 1 organismo muerto.



**Figura 8:** Relación concentración- respuesta de las especies estudiadas luego de 24 (◆) y 48 (■) horas de exposición al Cu, Cr y endosulfán (formulado). La respuesta considerada fue la inmovilidad de los organismos o ausencia de respuesta luego de ser levemente estimulados. **Nc:** *N. conifer*, **Af:** *A. falcifer*, **Pv:** *P. variabilis*, **Cd:** *C. dubia* y **Dm:** *D. magna*. Las barras verticales indican el  $\pm$  SD para las tres réplicas (n=5).



Las  $CE_{50}$  para 24 y 48 h calculados con el método Probit basado en Finney (1971) se muestran en la Tabla 3.

**Tabla 3:** Concentraciones efectivas para el 50% de la población ( $CE_{50}$ , en  $\mu\text{g l}^{-1}$ ) luego de 24 y 48 horas de exposición a Cu, Cr y endosulfán (formulado) para las especies estudiadas. Se utilizaron los estadios larvarios iniciales (nauplios para el caso de los copépodos y neonatos para el caso de los cladóceros). Las  $CE_{50}$  están basadas en la inmovilidad de los organismos y ausencia de respuesta luego de ser levemente estimulados. Se muestran los límites de confianza superior e inferior ( $\alpha = 0,05$ ) entre paréntesis y los valores Chi-cuadrado ( $\chi^2$ ) referidos a la desviación de la linealidad.

Especie	Cobre ( $\mu\text{g/l}$ )		Cromo ( $\mu\text{g/l}$ )		Endosulfan ( $\mu\text{g/l}$ )		
	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h	
<i>N. conifer</i>	$EC_{50}$	108,9	42,18	245,73	170,76	3,58	2,8
	Lim conf	(60,22- 267,2)	(31,3-56,4)	(213,8- 284,3)	(125,6-243,2)	(1,6- 8,2)	(1,7-3,7)
	$\chi^2$	27,7	4,9	2,05	21,4	59,19	53,6
<i>A. falcifer</i>	$EC_{50}$	753	180,09	1.166	680,15	20,54	11,23
	Lim conf	(499,7- 2020,4)	(1,59- 2,08)	(514,4- 5572,7)	(334,06-1334,9)	(18,5- 22,9)	(6,3- 27,7)
	$\chi^2$	4,03	4,65	10,35	3,53	3,5	12,58
<i>P. variabilis</i>	$EC_{50}$	25,83	12,03	15,2	5,24	2,06	1
	Lim conf	(22,5- 28,7)	(9,4-15,5)	(9,8- 30,3)	(1,8-14,1)	(1,08- 10,5)	(0,6-1,8)
	$\chi^2$	5	3,94	16,38	11,19	22,04	8,77
<i>C. dubia</i>	$EC_{50}$	64,75	27,4	207,3	100,2	0,57	0,36
	Lim conf	(54,3- 89,6)	(14,3-81,2)	(12,65- 62,32)	(100,3-168)	(0,3- 0,9)	(0,2-1,08)
	$\chi^2$	0,23	3,28	14,5	0,68	12,9	0,73
<i>D. magna</i>	$EC_{50}$	242,81	183,96	47,29	46,58	40,2	11,21
	Lim conf	(214,8- 275,3)	(117,5-270,7)	(28,7- 83,9)	(27,7- 73,06)	(17,5- 151,3)	(8,6-14,8)
	$\chi^2$	3,27	0,57	9,21	0,77	10,9	7,34

## 4. 2. Ensayos de ciclo de vida

### 4.2.1. Efecto de comunicadores químicos de peces (*kairomonas*) sobre el ciclo de vida de *N. conifer*

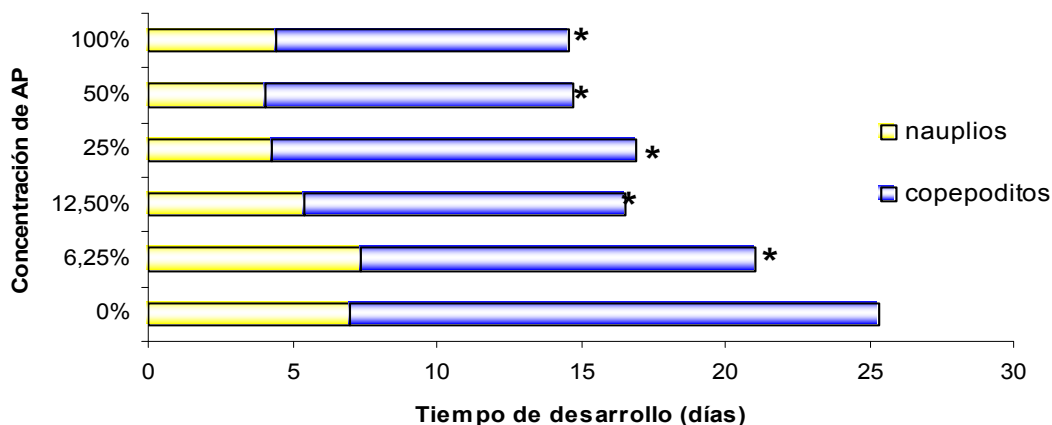
#### Mortalidad y tiempo de desarrollo

La mortalidad promedio al final del ciclo de vida fue del 5 y 17,2 % para los nauplios y copepoditos respectivamente.

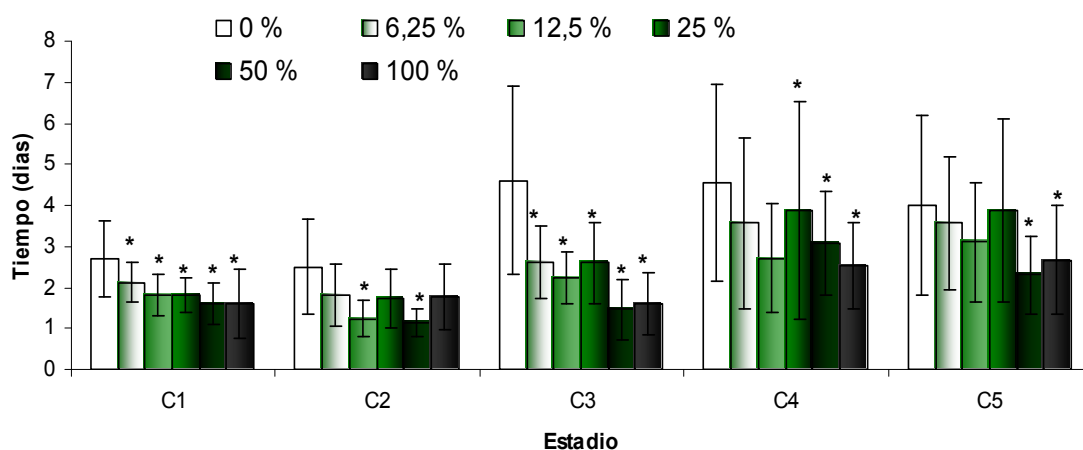
Tanto el tiempo de desarrollo de los nauplios como el tiempo de desarrollo total de los copépodos sometidos a las cuatro concentraciones mayores del AP fue significativamente más corto que el de los respectivos del control (ANOVA,  $F=26,08$  y 16,09, respectivamente;  $p<0,05$  en ambos casos) (Figura 9).

De igual manera, el tiempo de desarrollo de cada estadio de copepodito fue menor en presencia del AP (Figura 10).

**Figura 9:** Tiempo de desarrollo promedio de los nauplios y los copepoditos. (\*) Indica valores de  $p < 0,05$  con respecto al control (0%) para el tiempo total de desarrollo.



**Figura 10:** Tiempo de desarrollo diferencial de cada estadio de copepodito (de C1 a C5) del medio control y las diferentes concentraciones del AP. (\*) Indica valores de  $p < 0,05$  con respecto al control (0%).



No se registraron diferencias estadísticamente significativas, entre el control y los tratamientos con AP, respecto a la proporción que cada estadio de copepodito ocupó en relación al desarrollo total (Tabla 4). Esto indica que pese a la presencia de señales de alarma en el AP el modelo equiproporcional propuesto para los copépodos se mantuvo constante.

**Tabla 4:** Proporción (promedio) del tiempo de desarrollo de cada estadio de copepodito (de C1 a C5) en el medio control y las diferentes concentraciones del AP con sus respectivos valores de Chi-cuadrado y p ( $\alpha=0,05$ ).

AP	Proporción de cada estadio de copepodito (%)					$X^2$	p
	C1	C2	C3	C4	C5		
0%	14,7	13,6	25,1	24,8	21,8		
100%	15,7	17,5	15,7	24,8	26,3	5,6	0,2305 ns
50%	15	10,6	13,7	28,8	21,6	6,44	0,1685 ns
25%	14,4	13,8	18,6	23,3	30,8	5,52	0,2373 ns
12,50%	16,3	11,2	20,2	24,5	27,9	3,28	0,5108 ns
6,25%	15,5	13,2	19,2	26	26	2,3	0,677 ns

ns: no significativo

### Fecundidad

Tanto el porcentaje de hembras ovígeras, el promedio de huevos por hembras como el tiempo requerido para producir el primer saco ovífero disminuyeron con la presencia del AP. La Tabla 5 muestra los valores de los mencionados parámetros e indica los que resultaron estadísticamente diferentes del control (ANOVA).

**Tabla 5:** Proporción de hembras ovígeras, número de huevos por hembras y tiempo de producción del primer saco ovífero en el medio control (0%) y las distintas concentraciones de AP (100; 50; 25; 12,5 y 6,25).

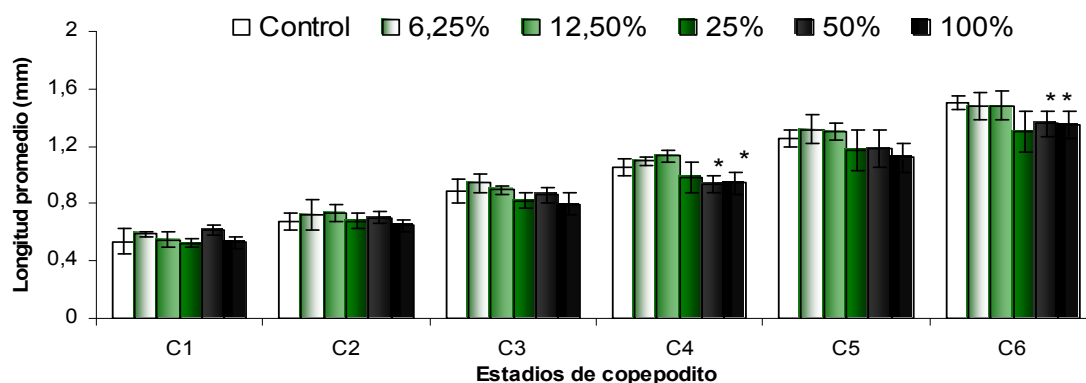
AP (%)	Hembras ovígeras (%)	Huevos/hembra (promedio)	1 <sup>er</sup> saco ovífero (días)
100	30	2,00 ( $\pm 3,4$ )	5,67 ( $\pm 0,5$ )*
50	37,5	3,13 ( $\pm 4,4$ )	6,67 ( $\pm 1,5$ )
25	44,4	4,08 ( $\pm 4,8$ )	5,5 ( $\pm 2,3$ )*
12,5	91,66	8,21 ( $\pm 2,6$ )	4,46 ( $\pm 2$ )*
6,25	85,71	8,71 ( $\pm 4,5$ )	5,83 ( $\pm 2,2$ )*
0	83,3	6,42 ( $\pm 3,5$ )	9,9 ( $\pm 2,3$ )

(\*) Indica valores de  $p < 0,05$ .

### Crecimiento

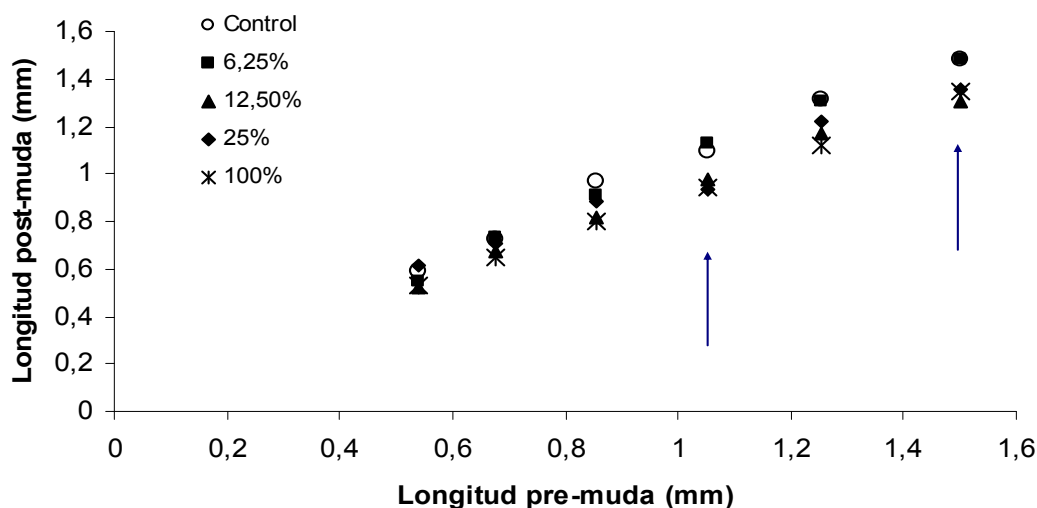
Los copepoditos C4 y C6 sometidos a las dos concentraciones más altas del AP fueron significativamente más pequeños que los del control (ANOVA; C4:  $F=2,78$  (al 50%) y  $F=2,70$  (al 100%); C6:  $F=3,49$  (al 50%) y  $F=3,77$  (al 100%);  $p < 0,05$ ) (Figura 11).

**Figura 11:** Longitud promedio de cada estadio de copepodito (de C1 a C5) del grupo control y los sometidos a las distintas concentraciones de AP. (\*) Indica valores de  $p < 0,05$  con respecto al control (0%).



El análisis del promedio del tamaño total de cada estadio de copepodito reveló que los individuos que crecieron en las mayores concentraciones de AP fueron más pequeños que los del control (Figura 12).

**Figura 12:** Relación entre la longitud promedio de pre-muda y post-muda de los copepoditos (de C1 a C6) del medio control y con las distintas concentraciones de AP. Las flechas indican que los valores son significativamente diferentes del control (0%) ( $p < 0,05$ ).



Finalmente, el tiempo de desarrollo, el tamaño de los adultos, la proporción de hembras ovígeras y el número de huevos por hembra mostraron una correlación negativa, estadísticamente significativa, con la concentración creciente del AP (Tabla

6). Esto indica que en la medida que la concentración de kairomonas aumentó en el medio, los valores de los mencionados parámetros disminuyeron.

**Tabla 6:** Coeficiente de correlación de Pearson para los parámetros del ciclo de vida de *N. conifer* analizados en relación a las concentraciones crecientes de AP (0; 6,25; 12,5; 25; 50 y 100 %).

Parámetro	R	F	N	P	
Tiempo de desarrollo	-0,5527	45,754	109	< 0,001	s
Talla del adulto	-0,4347	14,215	68	0,0004	s
% hembras fecundadas	-0,8392	9,521	64	0,0367	s
Nº huevos por hembras	-0,4581	16,199	63	0,0002	s
1 <sup>er</sup> saco ovígero	-0,2116	1,734	39	0,196	ns

s: significativo; ns: no significativo.

#### 4.2.2. Impacto del cromo y cobre sobre el ciclo de vida de *N. conifer*

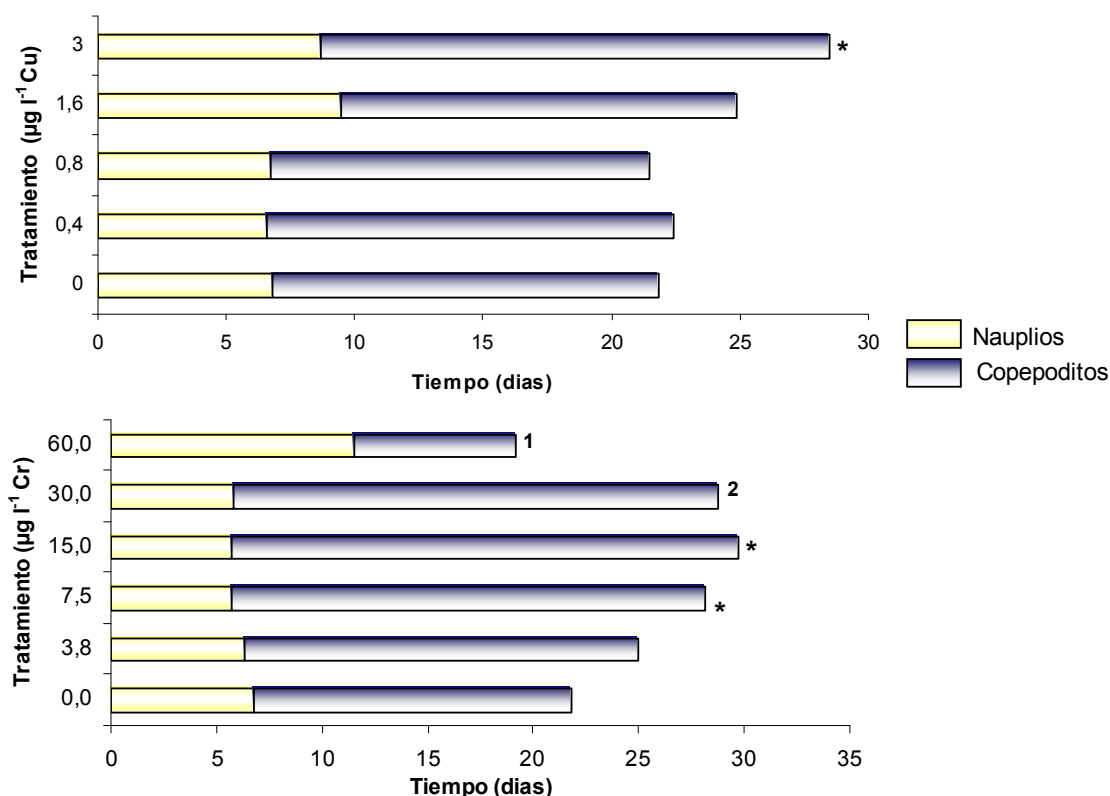
##### *Tiempo de desarrollo*

En el caso del cobre, la mayor concentración ( $3 \mu\text{g l}^{-1}$ ) provocó un retardo significativo del tiempo total de desarrollo de los organismos (ANOVA,  $F= 4,065$ ;  $df=70$ ;  $p<0,01$ ). Respecto a cada estadio larvario, los nauplios expuestos a las dos concentraciones más altas ( $1,6$  y  $3 \mu\text{g l}^{-1}\text{Cu}$ ) tardaron más tiempo que los del control en alcanzar el estado de copepodito (ANOVA,  $F= 21,258$ ;  $df= 90$ ;  $p<0,05$ ), sin embargo no hubo diferencias entre los copepoditos expuestos al cobre y los del control (ANOVA,  $F=1,710$ ;  $df= 70$ ;  $p>0,05$ ) (Figura 13).

El cromo fue altamente tóxico para los organismos, especialmente en las mayores concentraciones. El tiempo de desarrollo de los copépodos expuestos a la mayor concentración de cromo ( $60 \mu\text{g l}^{-1}$ ) no pudo ser calculado, dado que la mayoría de los organismos no lograron llegar al tercer estadio de copepodito (C3). En la concentración siguiente ( $30 \mu\text{g l}^{-1}$ ) solo tres organismos alcanzaron el estado adulto. El tiempo total de desarrollo de lo copépodos expuestos a  $7,5$   $15 \mu\text{g l}^{-1}$  Cr fue significativamente más largo que el de los del control (ANOVA;  $df=41$ ;  $p<0,05$ ). El tiempo de desarrollo de los nauplios expuestos a  $7,5$ ;  $15$ ;  $30$  y  $60 \mu\text{g l}^{-1}$  Cr fue significativamente diferente del control (ANOVA;  $df=40$ ;  $p<0,05$ ). Sin embargo, a pesar que el desarrollo de los nauplios a la menor concentración ( $3,75 \mu\text{g l}^{-1}$  Cr) fue más corto que el del control, las diferencias no fueron estadísticamente significativas

(Dunnett;  $F=1,375$ ;  $df=40$ ;  $p>0,05$ ). Finalmente, el tiempo de desarrollo de los copepoditos expuestos a 7,5 y 15  $\mu\text{g l}^{-1}$  Cr fue significativamente más largo que el del control (ANOVA,  $F=4,822$ ;  $df=40$ ;  $p<0,05$ ) (Figura 13).

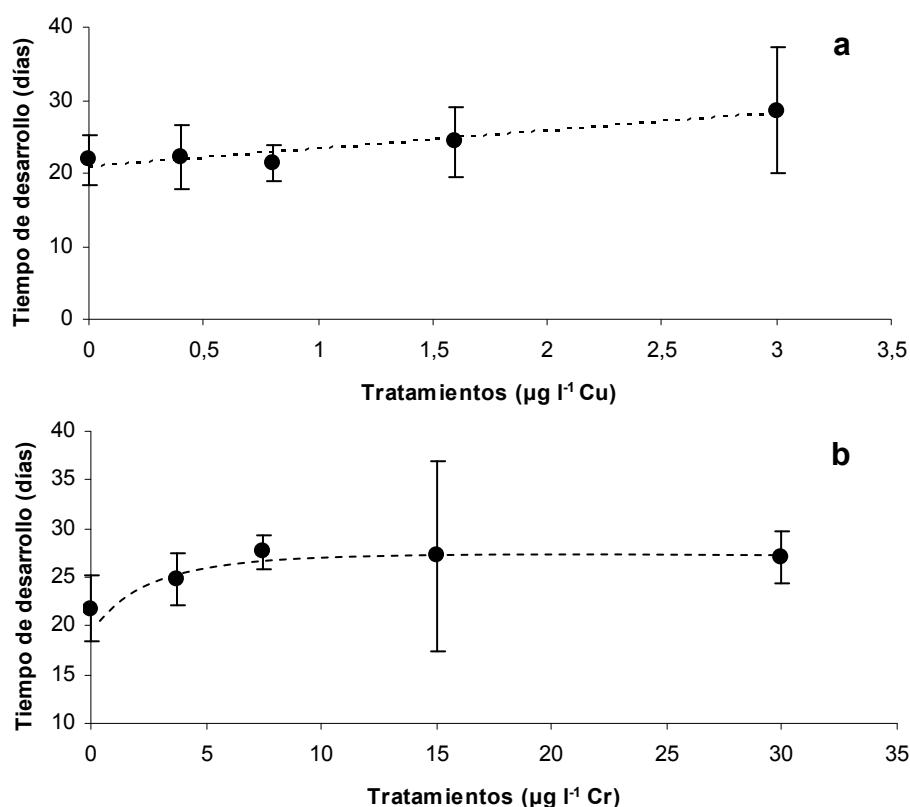
**Figura 13:** Tiempo de desarrollo promedio de *N. conifer* expuesto a Cu (a) y Cr (b). Las áreas amarillas refieren al desarrollo de los nauplios y las áreas azules refieren al desarrollo de los copepoditos. (1) Indica que ningún copépodo alcanzó el estado C3. (2) Indica que sólo 3 copépodos alcanzaron el estado adulto. (\*) Indica valores de  $p<0,05$  con respecto al control (0%) para el desarrollo total.



El tiempo de desarrollo de los copépodos mostró una correlación significativa tanto con la concentración de cobre ( $r= 0,4125$ ;  $df= 70$ ;  $p<0,001$ ) como con la concentración de cromo ( $r= 0,3510$ ;  $df=41$ ;  $p=0,022$ ) (Figura 14). La línea de tendencia del cobre fue lineal, indicando que el tiempo de desarrollo aumentó proporcionalmente con el aumento de la concentración. Por otro lado, la curva obtenida para cromo fue prácticamente asintótica, mostrando un incremento del desarrollo proporcional para las concentraciones más bajas hasta mantenerse casi constante en las concentraciones más altas (15 y 30  $\mu\text{g l}^{-1}$  Cr).

Los períodos “intermuda” promedio para cada estadio larvario de los organismos expuestos a las tres concentraciones de cobre más bajas fueron similares a los del control (ANOVA,  $p < 0,05$ ). La concentración más alta causó un incremento significativo del último estadio larvario (Dunnett;  $F=9,8$ ;  $df=71$ ;  $p > 0,05$ ). Por otra parte, los copépodos expuestos al cromo: incrementaron el período de intermuda del estadio C4 en las concentraciones 15 y  $30 \mu\text{g l}^{-1}$  (Dunnett;  $F=5,92$  y  $F=3,06$  respectivamente;  $df=43$ ;  $p > 0,05$ ) y del estadio C5 en las concentraciones 7,5; 15 y  $30 \mu\text{g Cr l}^{-1}$  (Dunnett;  $F=4,44$ ,  $F=3,91$  y  $F=4,12$  respectivamente;  $df=41$ ;  $p > 0,05$ ). La mayor concentración ( $60 \mu\text{g Cr l}^{-1}$ ) no fue considerada.

**Figura 14:** Relación entre el tiempo de desarrollo y cada concentración de Cu (a) y Cr (b) analizadas. El tiempo de desarrollo de los organismos expuestos a  $60 \mu\text{g l}^{-1}$  Cr no se incluyó dado que ningún organismo alcanzó el estadio C3.

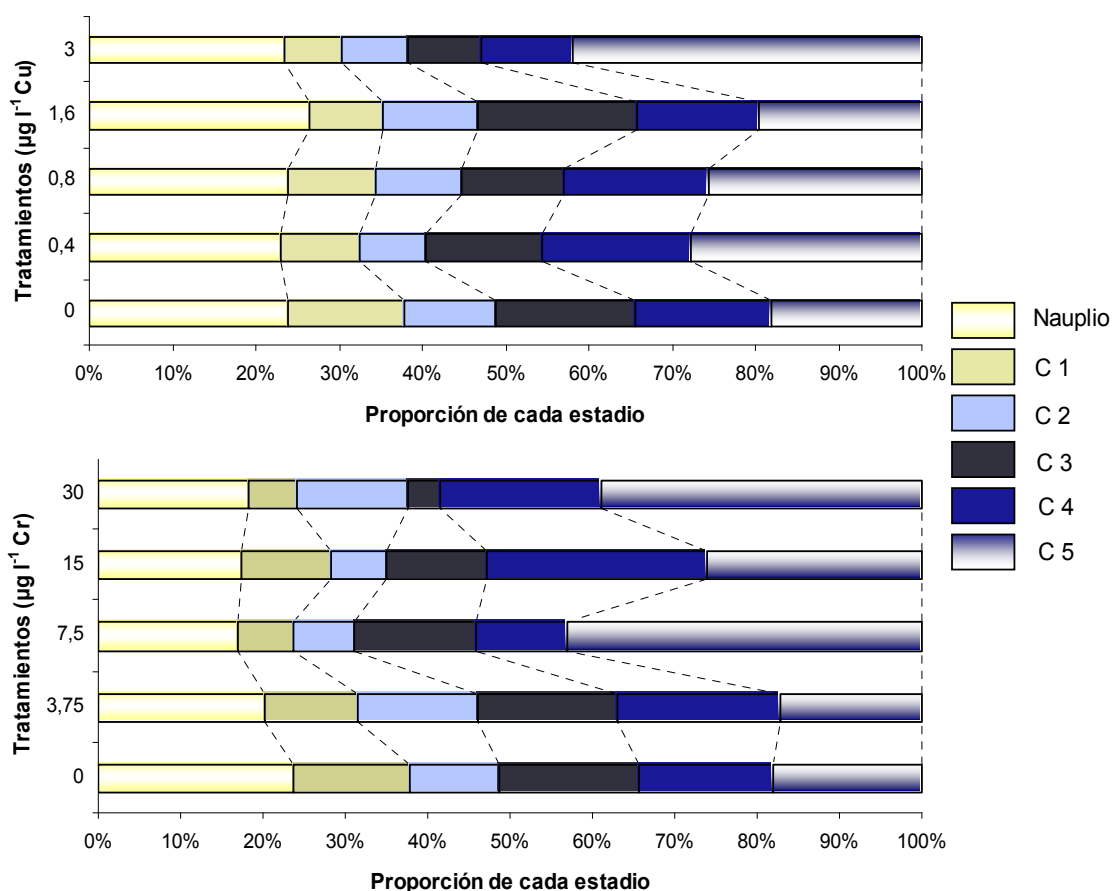


La Figura 15 (a y b) muestra la proporción media de cada estadio larvario para el control, cobre y cromo. La mayor concentración de cobre ( $3 \mu\text{g l}^{-1}$  Cu) registró un cambio significativo en la proporción de cada estadio de desarrollo en



comparación con el control ( $\chi^2=54,32$ ;  $p<0,001$ ). De la misma manera, los copepoditos expuestos a 7,5; 15 y 30  $\mu\text{g l}^{-1}$  Cr mostraron alteraciones significativas en dicha proporción ( $\chi^2=49,29$ ;  $\chi^2=18,2$ ;  $\chi^2=48,11$ , respectivamente;  $p<0,001$ ).

**Figura 15:** Proporción (promedio) de cada estadio larvario analizado (Nauplio a C5) correspondiente al total del tiempo de desarrollo para los organismos del control (0  $\mu\text{g l}^{-1}$ ), Cu (a) y Cr (b).



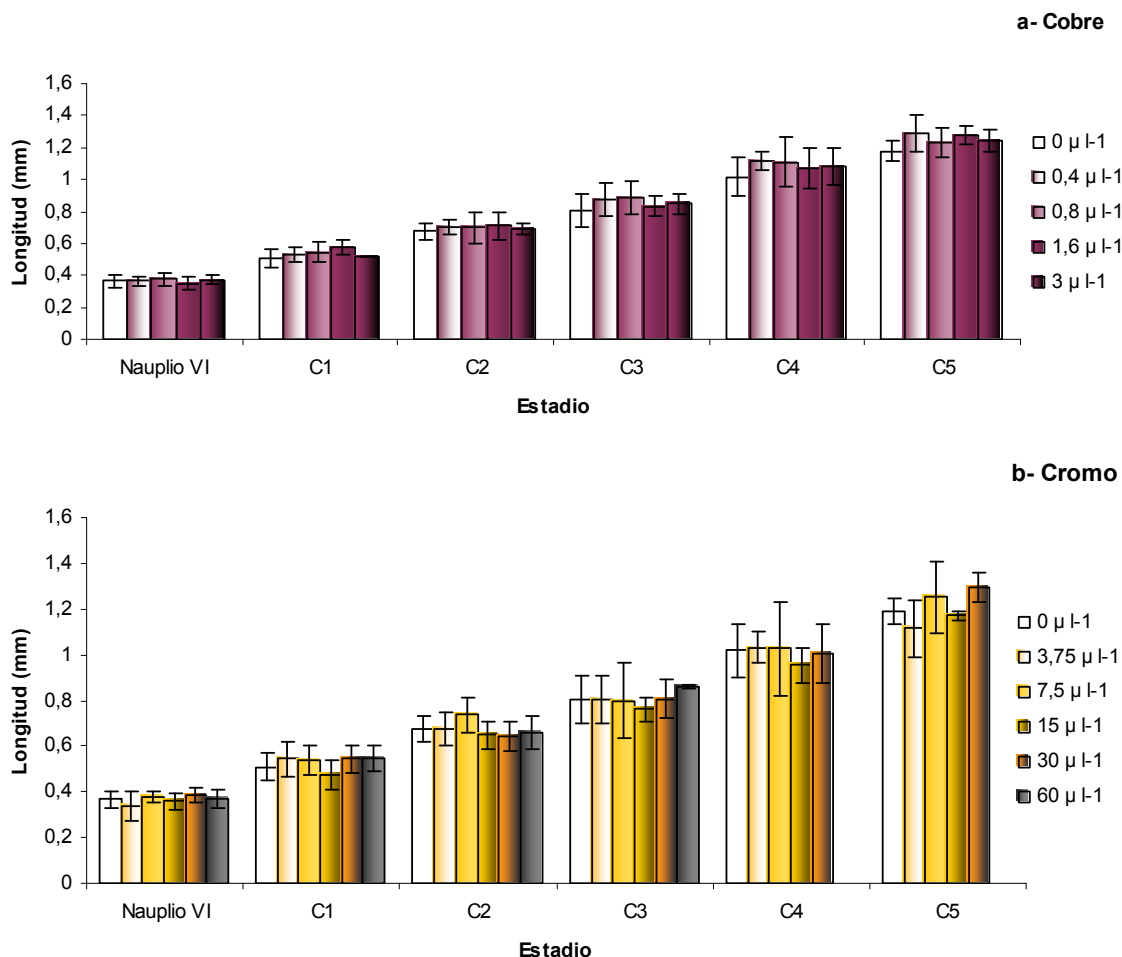
### Crecimiento

La talla de los copepoditos se modificó durante el experimento, tanto en controles como en tratados, sin embargo el crecimiento de tamaño durante el desarrollo larvario fue similar en los controles y los expuestos al cobre o al cromo (ANOVA,  $p>0,05$ ) (Figura 16).

Se registraron diferencias significativa entre las longitudes de pre-muda y post-muda para los organismos del control (ANOVA,  $df=40$ ;  $p<0,05$ ), del cobre (ANOVA,  $df=34$ ;  $p<0,05$ ) y del cromo (ANOVA,  $df=38$ ;  $p<0,05$ ), sin embargo no hubo diferencias en el incremento de la talla entre control y cobre (Test  $t$  de Student,

$df=72$ ,  $t= 0,3599$ ,  $p= 0,7199$ ), control y cromo (Test  $t$  de Student,  $df=91$ ,  $t= 0,717$ ,  $p= 0,474$ ) o ambos metales (Test  $t$  de Student,  $df=135$ ,  $t= 1,775$ ,  $p= 0,078$ ).

**Figura 16:** Talla promedio de cada estadio larvario (de Nauplio a C5) para el control ( $0 \mu\text{g l}^{-1}$ ) y los tratamientos con Cu (a) y Cr (b).



### Reproducción

La Tabla 7 resume las características reproductivas de los organismos del control y ambos metales. No hubo diferencias significativas entre el control y las tres concentraciones más bajas de cobre ni en la fecundidad (ANOVA,  $F=2,047$ ;  $df= 26$ ;  $p>0,05$ ) ni en el tiempo de la formación del primer saco ovífero (ANOVA,  $F=0,92$ ;  $df=16$ ;  $p= 0,458$ ). Sin embargo, ninguna hembra expuesta a la mayor concentración de cobre ( $3 \mu\text{g l}^{-1}$ ) y a las tres concentraciones mayores de cromo ( $7,5$ ;  $15$  y  $30 \mu\text{g l}^{-1}$ ) produjo sacos ovíferos. Las hembras expuestas a  $7,5 \mu\text{g l}^{-1}$  Cr produjeron menor cantidad de huevos que las del control (ANOVA  $F= 3,231$ ;  $df=12$ ;  $p<0,05$ ).

Notoriamente, el tiempo de la producción del primer saco ovígero fue mayor en todas las hembras expuestas al cromo (ANOVA  $F= 6,19$ ;  $df=7$ ;  $p=0,001$ ).

**Tabla 7:** Parámetros reproductivos de *N. conifer* en el control y los tratamientos con Cu y Cr.

Tratamiento	Hembras ovígeras (%)	Primer saco ovígero (días)	Nº huevos/hembra (promedio)	Nº huevos/total de hembras
<b>Control</b>	71,43	3,8 ( $\pm 0,83$ )	5,67 ( $\pm 1,14$ )	4 ( $\pm 2,9$ )
<b>Cobre (<math>\mu\text{g l}^{-1}</math>)</b>				
0,4	100	4,8 ( $\pm 1,64$ )	7 ( $\pm 1,26$ )	7 ( $\pm 1,26$ )
0,8	62,5	4,2 ( $\pm 0,83$ )	11,2 ( $\pm 0,84$ )	7 ( $\pm 0,84$ )
1,6	33,3	5	7,5 ( $\pm 0,7$ )	2,5 ( $\pm 3,9$ )
3		-	-	-
<b>Cromo (<math>\mu\text{g l}^{-1}</math>)</b>				
3,75	60	9,66 ( $\pm 2,08$ )*	4,66 ( $\pm 0,58$ )	2,8 ( $\pm 2,56$ )
7,5	33,3	10*	3*	1 ( $\pm 1,7$ )*
15	0	-	-	-
30	0	-	-	-
60	0	-	-	-

(\* )  $p < 0,05$ .

(- ) sin producción de saco ovígero.

El CEM (Concentración de efecto mínimo), CENO (Concentración de efecto no observable) y VSC (valor subcrónico) basados en las características de historia de vida analizados se muestran en la Tabla 8.

**Tabla 8:** CENO, CEM y VSC (en  $\mu\text{g l}^{-1}$ ) calculados para los indicadores de efecto del ciclo de vida de *N. conifer*.

	CEM ( $\mu\text{g l}^{-1}$ )	CENO ( $\mu\text{g l}^{-1}$ )	VSC ( $\mu\text{g l}^{-1}$ )
<b>Cobre</b>			
Sobrevivencia de nauplios	115	57	80,9
Sobrevivencia de adultos	45	30	36,7
Tiempo total de desarrollo	3	1,6	2,2
Tiempo de desarrollo de los nauplios	1,6	0,8	1,2
Tiempo de desarrollo de los copepoditos	>3	3	-
Desarrollo equiproporcional	3	1,6	
Crecimiento	>3	3	-
Huevos/ hembra	>3	3	-
Tiempo de la primera reproducción	>3	3	-
<b>Cromo</b>			
Sobrevivencia de nauplios	40	20	28,3
Sobrevivencia de adultos	125	60	86,6
Tiempo total de desarrollo	7,5	3,75	5,3
Tiempo de desarrollo de los nauplios	7,5	3,75	5,3
Tiempo de desarrollo de los copepoditos	7,5	3,75	5,3
Desarrollo equiproporcional	7,5	3,75	5,3
Crecimiento	>60	60	-
Huevos/ hembra	7,5	3,75	5,3
Tiempo de la primera reproducción	3,75	< 3,75	3,7

(-)Valores no determinados.

#### 4.2.3. Impacto del cromo, cobre y endosulfán (formulado) sobre el ciclo de vida de *P. variabilis*

Los organismos del control registraron una sobrevivencia del 92% a lo largo del experimento. Durante los primeros 30 días, los cladóceros expuestos al cobre registraron un elevado porcentaje de mortalidad (de 16 al 60 %) en sentido creciente y proporcional a la concentración empleada ( $X^2$ ;  $p < 0,001$ ). Los grupos expuestos al cromo y endosulfán sólo registraron menor sobrevivencia en las mayores concentraciones empleadas (55 y 32 %, respectivamente) (Cr:  $X^2 = 67,34$ ;  $p < 0,0001$ ; endosulfán:  $X^2 = 50,2$ ;  $p = 0,008$ ).

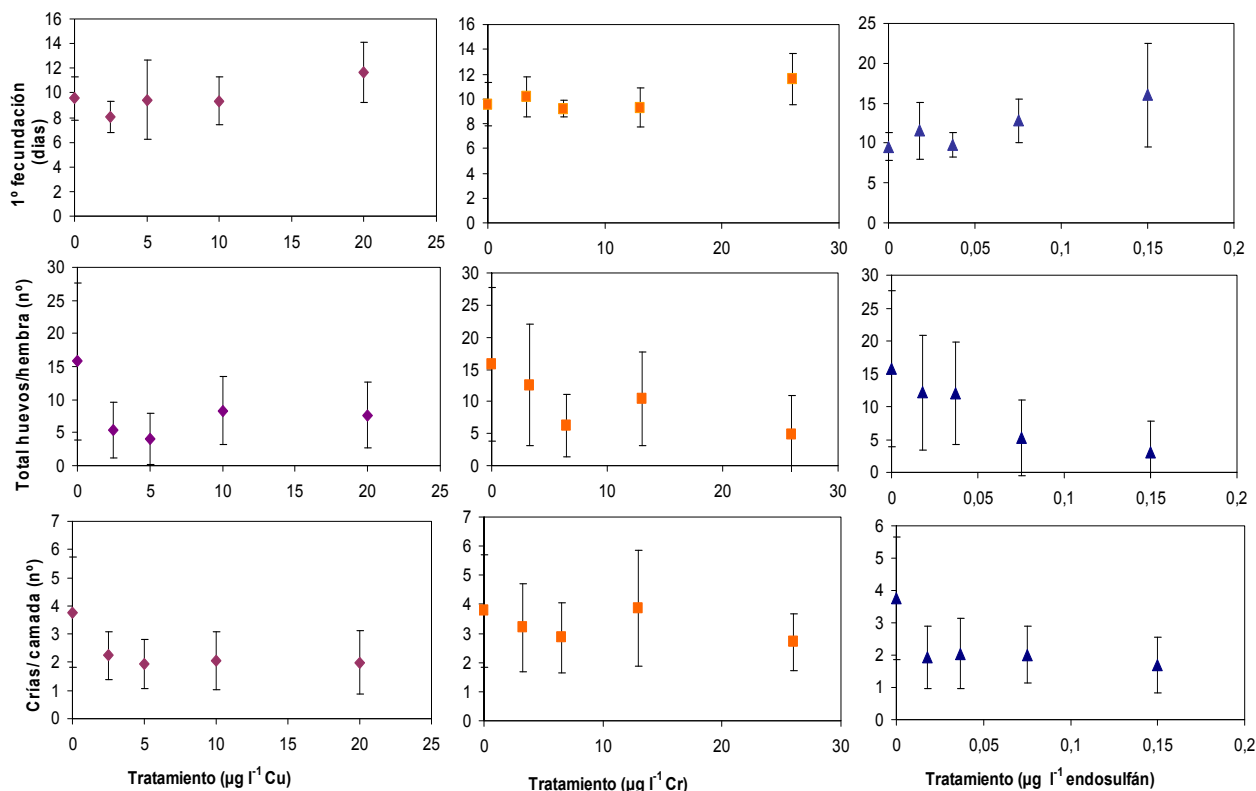
La longevidad media de los organismos del control fue de 32,5 días, sin embargo, los expuestos al cobre vivieron sólo entre 20 y 24 días (ANOVA,  $F = 122$ ;  $df = 8,839$ ;  $p < 0,01$ ). En el caso del cromo, la longevidad fue significativamente reducida en la concentración más alta (20 días) (Dunnett,  $F = 2,82$ ;  $df = 103$ ;  $p < 0,05$ ), y en el caso del endosulfán, ésta se redujo en las dos concentraciones más altas (25,9 y 25,3 días respectivamente), pero las diferencias respecto al control no fueron estadísticamente significativas (ANOVA;  $F = 7,37$ ;  $df = 123$ ;  $p > 0,05$ ).

Entre los parámetros reproductivos, la edad de la primera reproducción (EPR) fue el menos afectado. Los organismos del control produjeron su primera camada entre los 9 y 10 días (promedio: 9,6). La presencia del cobre y cromo produjo un retardo de este parámetro sólo en las respectivas concentraciones más altas (cobre: Dunnett,  $F=3,08$ ;  $df=102$ ;  $p<0,05$ ; cromo: Dunnett,  $F=3,19$ ;  $df=77$ ;  $p<0,01$ ). Por otra parte, el plaguicida retardó significativamente la EPR a las dos concentraciones mayores (Dunnett,  $F=3$  y  $F=5,6$  respectivamente;  $df=98$ ;  $p<0,05$ ) (Figura 17).

El número total de huevos por hembra fue significativamente reducido en todas las concentraciones de cobre (ANOVA,  $df=122$ ;  $p<0,01$ ), en las tres concentraciones más altas de cromo (Dunnett,  $df=106$ ;  $p<0,05$ ) y las dos concentraciones mayores de endosulfán (Dunnett,  $df=124$ ;  $p<0,01$ ) (Figura 17).

El número de crías por camada fue significativamente menor en todas las concentraciones de cobre y endosulfán (ANOVA,  $p<0,01$ ). Para el caso del cromo solo las concentraciones de 6,5 y 26  $\mu\text{g l}^{-1}$  redujeron significativamente este parámetro (ANOVA,  $p<0,05$ ) (Figura 17).

**Figura 17:** Parámetros reproductivos de *P. variabilis* expuesta a cuatro concentraciones de Cu (paneles izquierdos), Cr (paneles centrales) y endosulfán (paneles derechos). Se muestran los valores promedio y los  $\pm$  SD;  $n=25$ .



La Tabla 9 muestra los valores de  $R_0$ ,  $T$  y  $r$ . Se observa que la tasa reproductiva neta ( $R_0$ ) decreció en presencia de los tres tóxicos, sin embargo, la reducción más importante fue generada en los organismos expuestos al cobre y en la mayor concentración de cromo y endosulfán.

El tiempo generacional ( $T$ ) no mostró importantes variaciones en los organismos expuestos a los metales, pero sí se observó un importante retardo entre los días 7 y 11 en los organismos expuestos al endosulfán.

La tasa intrínseca de crecimiento natural ( $r$ ) fue positiva en todos los casos ( $r > 0$ ), indicando que a pesar de la toxicidad de los xenobióticos, las poblaciones expuestas no sufrieron un decrecimiento durante el período experimental. Sin embargo, se observa claramente que la mayor concentración de endosulfán causó una importante reducción en este valor.

**Tabla 9:** Valores de la tasa reproductiva neta ( $R_0$ ), tiempo generacional ( $T$ ) y la tasa intrínseca de crecimiento natural ( $r$ ) de *P. variabilis* expuesta a Cu, Cr y endosulfán.

	$R_0$	$T$	$r$
<b>Cobre <math>\mu\text{g l}^{-1}</math></b>			
0	15,57	15,49	0,18
2,5	5,28	10,53	0,16
5	4,05	14,7	0,09
10	8,24	14,07	0,15
20	6,95	16,25	0,12
<b>Cromo <math>\mu\text{g l}^{-1}</math></b>			
0	15,57	15,49	0,18
3,3	12,08	17,96	0,14
6,5	6,25	11,91	0,15
13	10,4	11,75	0,19
26	4,89	13,06	0,12
<b>Endosulfán <math>\mu\text{g l}^{-1}</math></b>			
0	15,56	15,49	0,18
0,018	12,08	26,67	0,09
0,037	12,58	22,79	0,11
0,075	5,32	22,51	0,07
0,15	3,12	26,2	0,04

La Tabla 10 muestra las Concentración de Efectos Mínimos (CEM), Concentración de Efectos No Observables (CENO) y el Valor Subcrónico (VSC).

Pese a que cada parámetro analizado fue afectado de diferente manera, el número de huevos por hembra y el tamaño de la camada fueron parámetros altamente sensibles a los tres tóxicos. Contrariamente, la EPR fue el parámetro menos afectado del ciclo de vida de *P. variabilis*.

**Tabla 10:** CENO, CEM y VSC (en  $\mu\text{g l}^{-1}$ ) calculados para los cuatro indicadores de efecto del ciclo de vida de *P. variabilis*: longevidad, edad de la primera reproducción (EPR), número total de huevos por hembra (Huevos/hembra) y tamaño promedio de la camada.

Indicador de efecto	Químico	CENO	CEM	VSC
longevidad	Cobre	<2,5	2,5	<2,5
	Cromo	13	26	18,4
	Endosulfán	15	>0,15	<0,15
EPR	Cobre	10	20	14
	Cromo	13	26	18,3
	Endosulfán	0,037	0,075	0,053
Huevos/hembra	Cobre	<2,5	2,5	<2,5
	Cromo	3,3	6,5	4,6
	Endosulfán	0,037	0,075	0,053
Tamaño promedio de la camada	Cobre	<2,5	2,5	<2,5
	Cromo	3,3	6,5	4,6
	Endosulfán	<0,018	0,018	<0,018

### 4.3. Ensayos de comportamiento

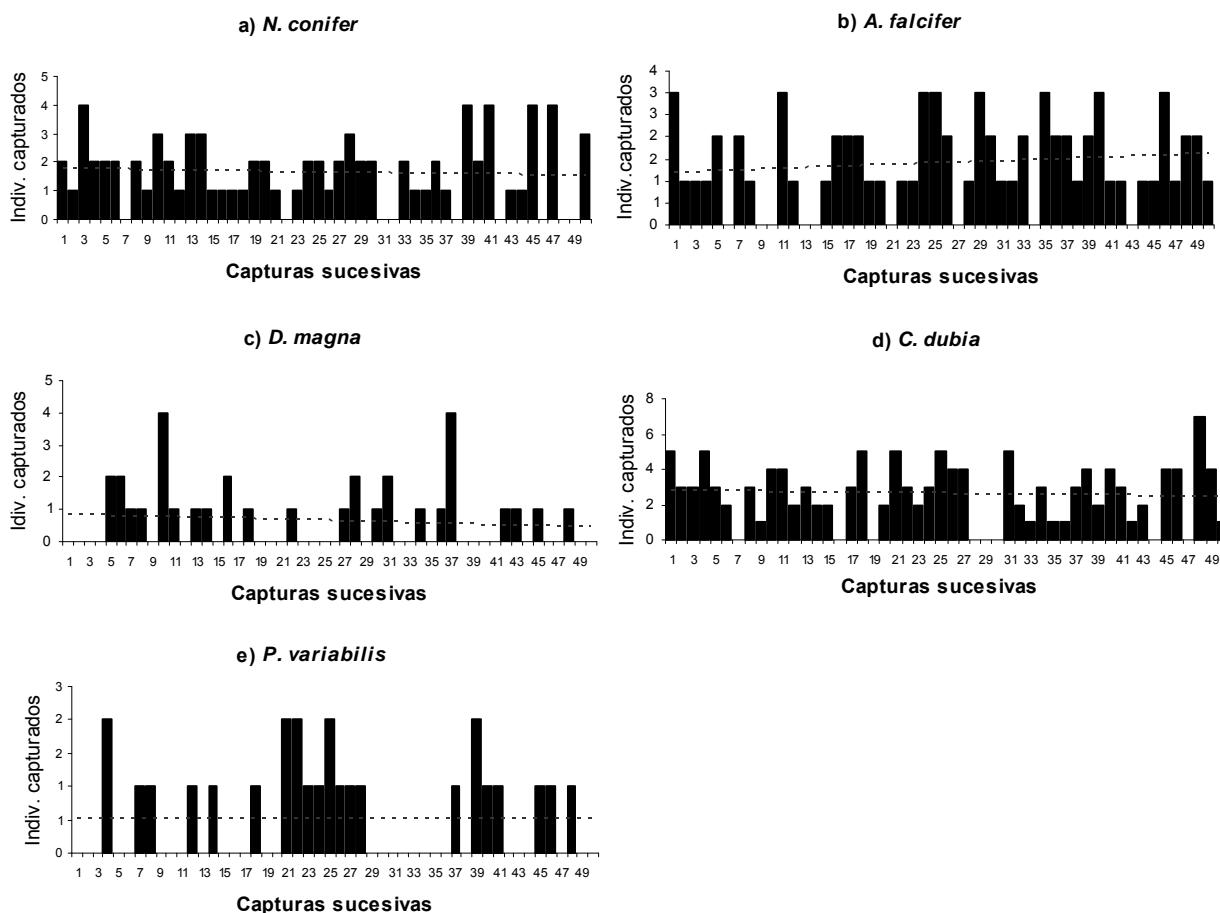
#### 4.3.1. Comportamiento de escape

La capacidad de escape de los organismos se cuantificó en función del número de individuos capturados por evento de captura (n= 100, excepto para *P. variabilis* donde n=50).

#### Experimentos preliminares

En ningún caso las correlaciones resultaron significativas (*N. conifer*:  $r^2=0,0046$ ; *A. falcifer*:  $r^2=0,0192$ ; *D. magna*:  $r^2=0,014$ ; *C. dubia*:  $r^2=0,0042$ ; *P. variabilis*:  $r^2<0,001$ ), indicando que al menos a lo largo de 50 repeticiones de capturas, los organismos no manifestaron ni acostumbamiento (correlación negativa) ni cansancio (correlación positiva) (Figura 18).

**Figura 18:** Organismos capturados (n°) a lo largo de 50 capturas sucesivas a la VM ( $2,87 \text{ cm s}^{-1}$ ). a) *N. conifer*, b) *A. falcifer*, c) *D. magna*, d) *C. dubia* y e) *P. variabilis*. Las líneas punteadas fueron calculadas a partir de la correlación de Spearman.

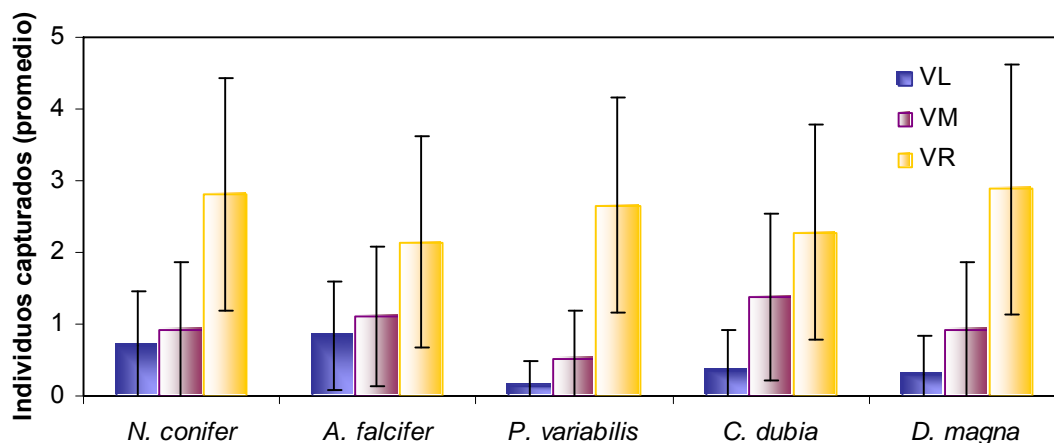


### Controles

El número promedio de individuos capturados en los controles fue variable según la especie analizada (Figura 19) y aumentó en todos los casos con la velocidad de captura. *P. variabilis* fue la menos capturada tanto en la velocidad de captura lenta (VL) como media (VM) mientras que *A. falcifer* fue el menos capturado en la mayor velocidad (VR).



**Figura 19:** Número promedio de individuos capturados en cada velocidad de captura: VL ( $0,27 \text{ cm s}^{-1}$ ); VM ( $2,87 \text{ cm s}^{-1}$ ) y VR ( $15 \text{ cm s}^{-1}$ ). Las líneas verticales representan el  $\pm$ SD.



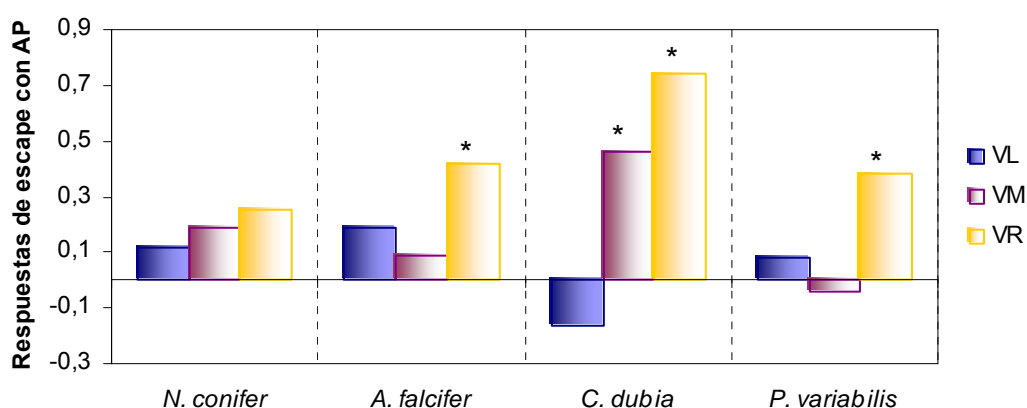
#### Efecto de los comunicadores químicos

Tal como se mencionó en el apartado “Metodología”, a fin de obtener un mayor realismo ecológico en este ensayo donde se utilizaron comunicadores químicos como fuente de estrés natural, se emplearon sólo las especies nativas, que conviven con el pez *C. decemmaculatus* (*A. falcifer*, *N. conifer*, *P. variabilis*, *C. dubia*).

La diferencia entre los promedios del control y del agua con kairomonas para cada velocidad de captura se muestra en la Figura 20. Las cuatro especies estudiadas manifestaron diferentes respuestas ante la presencia del comunicador químico de los peces, tanto en el sentido (positivo o negativo) como en la magnitud (largo de las barras). En base a los promedios, las respuestas de los copépodos a las kairomonas fueron positivas para las tres velocidades de captura. Es decir, los organismos aumentaron su eficiencia de escape respecto al control, siendo esta respuesta estadísticamente significativa en la mayor velocidad (*A. falcifer*:  $p=0,037$ , Chi-cuadrado de Wald=4,329, *N. conifer*:  $p=0,028$ , Chi-cuadrado de Wald=4,576, ANODEV). El cladóceros *C. dubia* aumentó su eficiencia de escape a las dos velocidades mayores (ANODEV, VM: Chi-cuadrado de Wald=9,075,  $p=0,003$ ; VR: Chi-cuadrado de Wald=14,523,  $p<0,001$ ), mientras que en la menor velocidad de captura mostró un comportamiento opuesto, pero no significativo respecto al control (ANODEV,  $p>0,05$ ). *P. variabilis* incrementó la eficiencia de escape a la mayor

velocidad de captura (ANODEV, Chi-cuadrado de Wald=4,459  $p=0,022$ ) pero no mostró respuestas significativas diferentes al control frente a las menores velocidades (ANODEV,  $p>0,05$ ).

**Figura 20:** Respuestas de escape de los organismos en presencia del AP a las tres velocidades de captura (VL, VM y VR). El eje X representa el valor del control. Las barras positivas indican que los organismos manifestaron una mayor habilidad de escape que los del control. Por el contrario, las barras negativas indican que los individuos fueron más capturados que los respectivos del control. La longitud de las barras representa la magnitud de las respuestas. Los asteriscos indican que las diferencias fueron estadísticamente significativas respecto al control (ANODEV;  $p<0,05$ ).



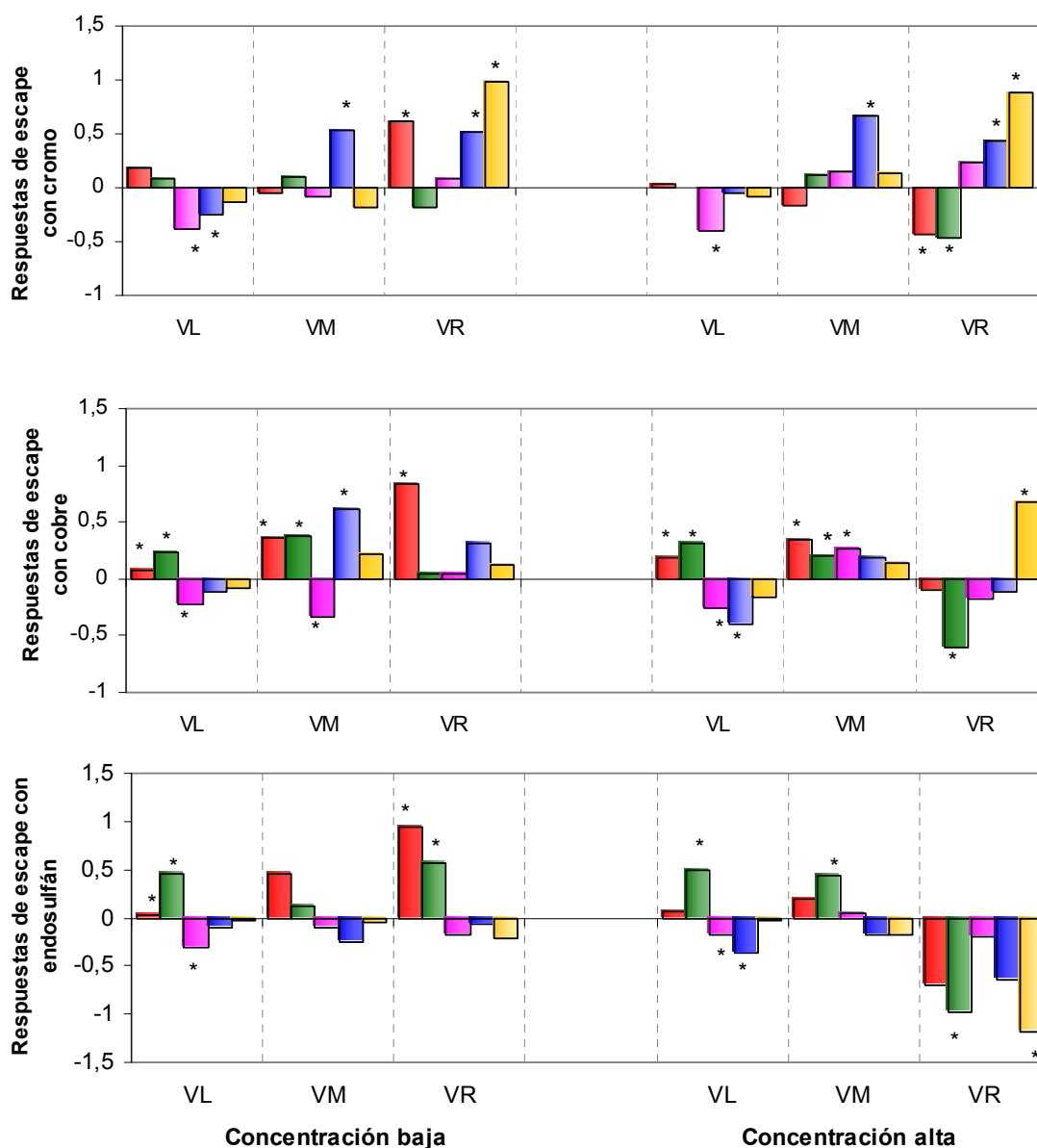
### Efecto de los tóxicos

Tanto la magnitud como el tipo de respuesta (mayor vs. menor habilidad de escape que el control) manifestada por los organismos fue diferente dependiendo de la especie, velocidad de captura (VL; VM o VR) y la concentración del tóxico (baja o alta). Para cuantificar cada respuesta, se calculó la diferencia entre el promedio de los individuos capturados en el control y el promedio de los individuos capturados en cada tratamiento. Los resultados expresados de esta manera permitieron una mejor visualización de las diferencias en cada caso particular (Figura 21).

En general hubo menos individuos capturados a las concentraciones bajas que a las altas de los tres tóxicos, particularmente en las velocidades lentas y medias (Figura 21). Esta elevada habilidad de escape estaría manifestando una respuesta temprana de excitación. Los organismos mostraron respuestas similares en los siguientes casos: en la menor concentración de cobre a la VR (respuestas positivas), en la mayor concentración de cobre a la VM (respuestas positivas) y en la

mayor concentración de endosulfán a la VR (respuestas negativas). En este último caso, es probable que los organismos hayan perdido completamente la habilidad de escape debido al efecto sinérgico de dos factores de estrés: elevada turbulencia generada por la VR y la elevada toxicidad del compuesto. Esto fue demostrado mediante el análisis de la interacción entre el endosulfán y las velocidades de captura (ANODEV, *N. conifer*  $p=0,024$ ; *A. falcifer*  $p<0,001$ ; *C. dubia*  $p=0,04$ ; *D. magna*  $p=0,04$ ; *P. variabilis*  $p<0,001$ ).

**Figura 21:** Respuestas de escape de las especies estudiadas a los tres tóxicos (Cr, Cu y endosulfán) a las tres velocidades de captura (VL, VM y VR). El eje X representa el valor del control. Las barras positivas indican que los organismos manifestaron una mayor habilidad de escape que los respectivos del control (se escaparon más). Por el contrario, las barras negativas indican que los organismos fueron más capturados que los del control. La longitud de las barras representa la magnitud de la respuesta. Los asteriscos indican que las diferencias fueron estadísticamente significativas respecto al control (ANODEV;  $p < 0,05$ ). ■ *N.conifer*, ■ *A.falcifer*, ■ *D.magna*, ■ *C.dubia* and ■ *P. variabilis*.



A pesar de las diferencias individuales en cuanto a las respuestas de escape ante los tóxicos, se observaron algunos patrones entre los cladoceros anomópodos (*D. magna* y *C. dubia*), cladoceros ctenópodos (*P. variabilis*) y copépodos (*N. conifer*

y *A. falcifer*). Para obtener una mejor interpretación de los efectos de los tóxicos, los resultados obtenidos fueron agrupados siguiendo un criterio ecológico- taxonómico (Figuras 22 y 23). Cada grupo de datos fue analizado estadísticamente empleando la devianza como medida de variabilidad, considerando las especies, concentraciones y velocidades de captura como las variables independientes y el número de individuos capturados como la variable dependiente.

### Metales

En general, los copépodos (*N. conifer* y *A. falcifer*) expuestos a ambas concentraciones de cobre y cromo fueron menos capturados que los del control a la VL ( $0,27 \text{ cm s}^{-1}$ ) y VM ( $2,87 \text{ cm s}^{-1}$ ) (Figura 22 a). La elevada habilidad de escape observada luego de la exposición fue significativa respecto a los controles para los copépodos en ambas concentraciones de cobre a las VL y VM (ver las diferencias individuales en la Figura 21). En el caso del cromo, no hubo diferencias significativas para ninguna especie de copépodos.

El mismo patrón de “elevada habilidad de escape” se encontró a la VR ( $15 \text{ cm s}^{-1}$ ) para ambos copépodos expuestos a la menor concentración de ambos metales, pero solo el caso de *N. conifer* registró diferencias significativas (ver diferencias individuales en la Figura 21).

Por el contrario, las mayores concentraciones de cobre y cromo a la VR generaron una mayor captura de los organismos que los del control (Figura 22 a). Pese a que esto se observó en las dos especies de copépodos, los resultados fueron estadísticamente significativos solo para *A. falcifer* con los dos tóxicos y para *N. conifer* con cromo (ver diferencias individuales en la Figura 21).

En el caso de los cladóceros, el patrón general fue una mayor captura de los organismos expuestos a ambos metales pesados a la VL ( $0,27 \text{ cm s}^{-1}$ ) (Figura 22 b y c). *D. magna* registró diferencias significativas en todos los casos, *C. dubia* registró diferencias significativas solo en la menor concentración de cromo y la mayor de cobre, finalmente *P. variabilis* no registró diferencias significativas cuando se lo comparó con el control (ver diferencias individuales en la Figura 21).

Como patrón general, los cladóceros expuestos a los metales se escaparon más que los del control a las VM y VR de captura (Figura 22 b y c). En la VM se encontraron diferencias significativas sólo para *D. magna* y *C. dubia*; y, en la VR las

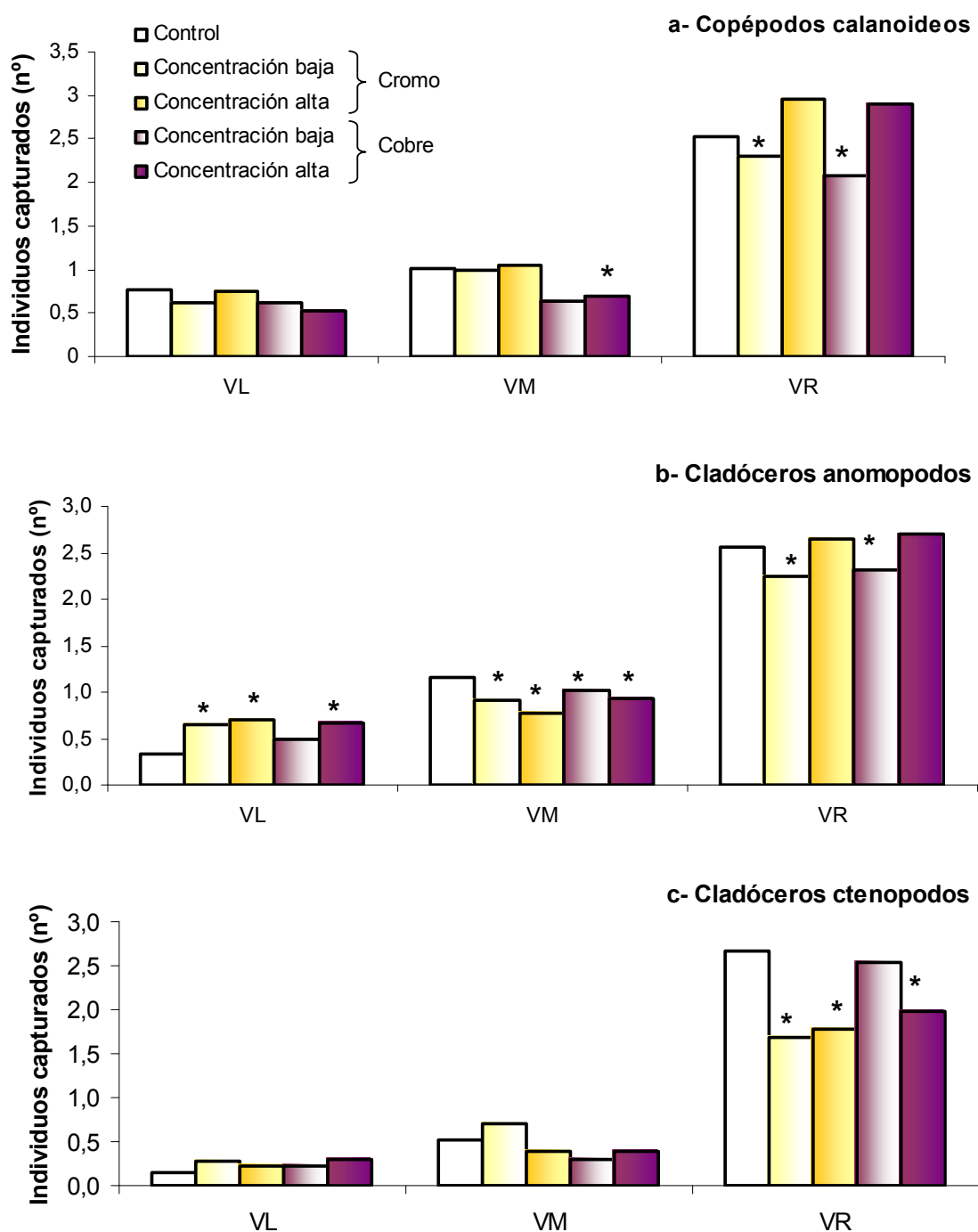
diferencias fueron significativas para *C. dubia* y *P. variabilis* (ver diferencias individuales en la Figura 21).

### *Endosulfán*

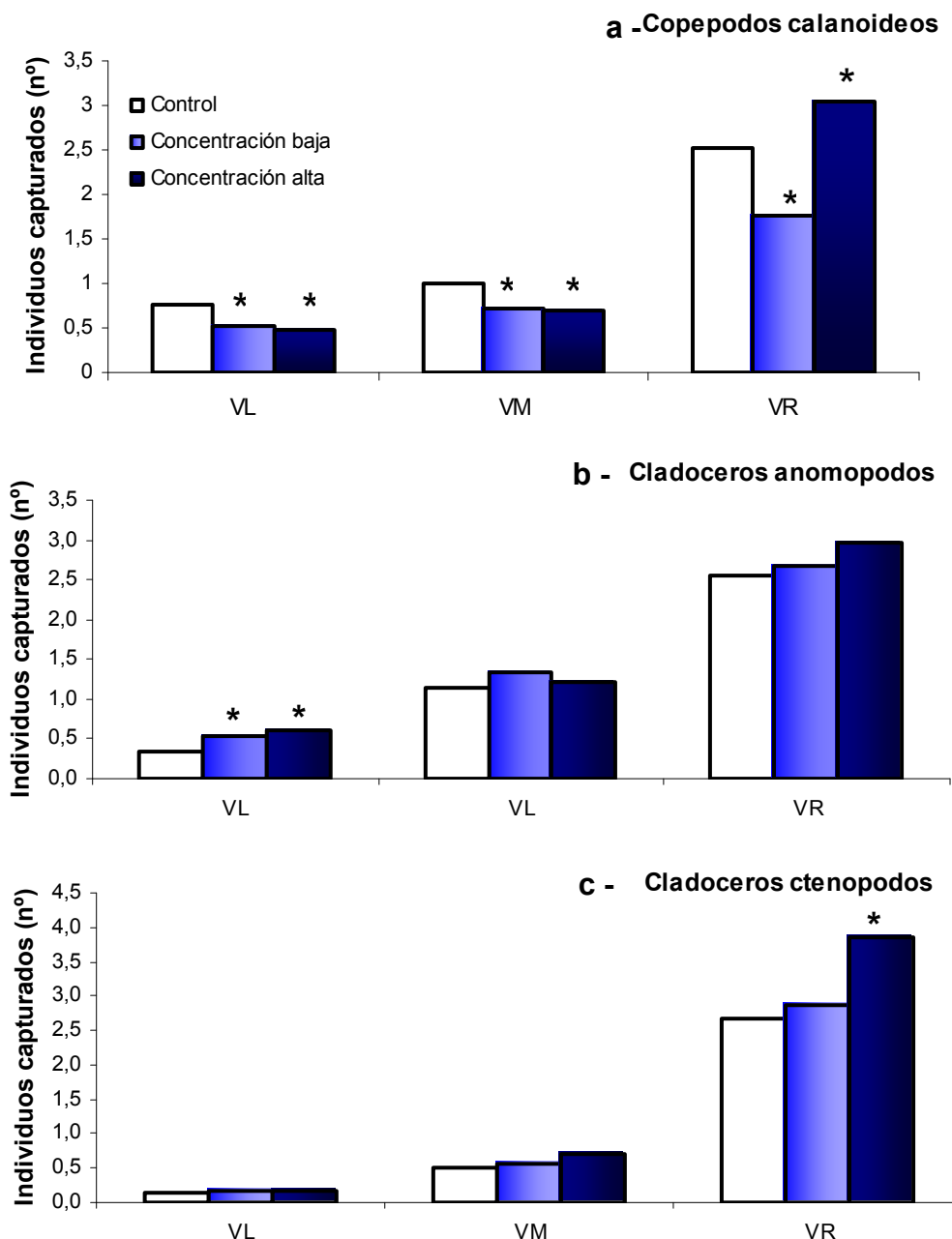
En los experimentos con endosulfán (formulado), los copépodos expuestos fueron, en promedio, menos capturados que los controles, exceptuando la mayor concentración a la VR ( $15 \text{ cm s}^{-1}$ ), donde se registró una mayor captura de las dos especies (Figura 23 a). Los análisis estadísticos mostraron que las diferencias fueron significativas para *N. conifer* y *A. falcifer* a las VL y VR y para *A. falcifer* a la VR (ver diferencias individuales en la Figura 21).

Para el caso de los cladóceros, el patrón general registrado fue una mayor captura en todas las concentraciones y todas las velocidades empleadas (Figura 23 b y c). Sin embargo, las diferencias respecto a los controles fueron significativas principalmente a la VL ( $0,27 \text{ cm s}^{-1}$ ) y a la VR ( $15 \text{ cm s}^{-1}$ ), dependiendo de la especie (ver diferencias individuales en la Figura 21).

**Figura 22:** Número de a) copepodos calanoideos (*N. conifer* y *A. falcifer*), b) cladoceros anomópodos (*D. magna*, *C. dubia*) y c) cladóceros ctenópodos (*P. variabilis*) capturados en cada concentración de Cu y Cr. Los gráficos muestran los valores medios ( $n=100$ , excepto para *P. variabilis* donde  $n=50$ ) para las tres velocidades de captura:  $0,27 \text{ cm s}^{-1}$  (VL);  $2,87 \text{ cm s}^{-1}$  (VM) y  $15 \text{ cm s}^{-1}$  (VR). Los asteriscos indican diferencias significativas respecto a los controles (ANODEV;  $p<0,05$ ).



**Figura 23:** Número de a) copepodos (*N. conifer* y *A. falcifer*), b) cladoceros anomópodos (*D. magna*, *C. dubia*) y c) cladóceros ctenópodos (*P. variabilis*) capturados en cada concentración de endosulfán. Los gráficos muestran los valores medios ( $n=100$ , excepto para *P. variabilis* donde  $n=50$ ) para las tres velocidades de captura:  $0,27 \text{ cm s}^{-1}$  (VL);  $2,87 \text{ cm s}^{-1}$  (VM) y  $15 \text{ cm s}^{-1}$  (VR). Los asteriscos indican diferencias significativas respecto a los controles (ANODEV;  $p<0,05$ ).



Las concentraciones de efecto no observable (CENO) y las concentraciones mínimas efectivas (CME) calculadas a partir del comportamiento de escape de los organismos se muestran en la Tabla 11. En base a estos datos, se puede visualizar



que los cladóceros fueron los organismos más sensibles a los tres tóxicos analizados.

**Tabla 11:** Concentraciones de efecto no observable (CENO) y concentraciones mínimas efectivas (CME) calculadas a partir del comportamiento de escape para Cr, Cu y endosulfán.

		CME*	CENO*
<i>P. variabilis</i>	Cromo	0,25	<0,25
	Cobre	2,4	0,6
	Endosulfán	0,2	0,05
<i>C. dubia</i>	Cromo	5	<5
	Cobre	1,3	<1,3
	Endosulfán	0,05	<0,05
<i>D. magna</i>	Cromo	2,3	<2,3
	Cobre	>37	37
	Endosulfán	0,5	<0,5
<i>N. conifer</i>	Cromo	4	<4
	Cobre	0,25	<0,25
	Endosulfán	0,14	<0,14
<i>A. falcifer</i>	Cromo	>136	136
	Cobre	9	<9
	Endosulfán	0,5	<0,5

\* Valores expresados en  $\mu\text{g l}^{-1}$

#### *Efecto de las mezclas*

Cuando el copépodo *N. conifer* fue sometido a la mezcla Cr+AP, los organismos mostraron en todos los casos una respuesta inversa a la observada solo con el AP (Figura 24). Se registraron diferencias significativas entre las velocidades de captura (ANODEV, Chi-cuadrado de Wald= 554,6;  $p < 0,001$ ) y entre los 4 tratamientos (control, cromo, AP y Cr+AP) (ANODEV, Chi-cuadrado de Wald= 15,83;  $p = 0,001$ ) pero no en la interacción entre ambos factores (velocidad y tratamiento) (ANODEV, Chi-cuadrado de Wald=3,69;  $p = 0,71$ ). Las comparaciones pareadas mostraron diferencias significativas entre la mezcla y el control ( $p = 0,05$ ) y la mezcla y el AP ( $p = 0,001$ ), pero no entre la mezcla y el tratamiento con Cr ( $p = 0,46$ ). Esto indicaría que el efecto del Cr fue determinante, inhibiendo la capacidad de los copéodos de detectar las señales químicas. La respuesta de los organismos sometidos a la mezcla y los del control fueron significativamente diferentes a la VM y VR ( $p < 0,05$ ).

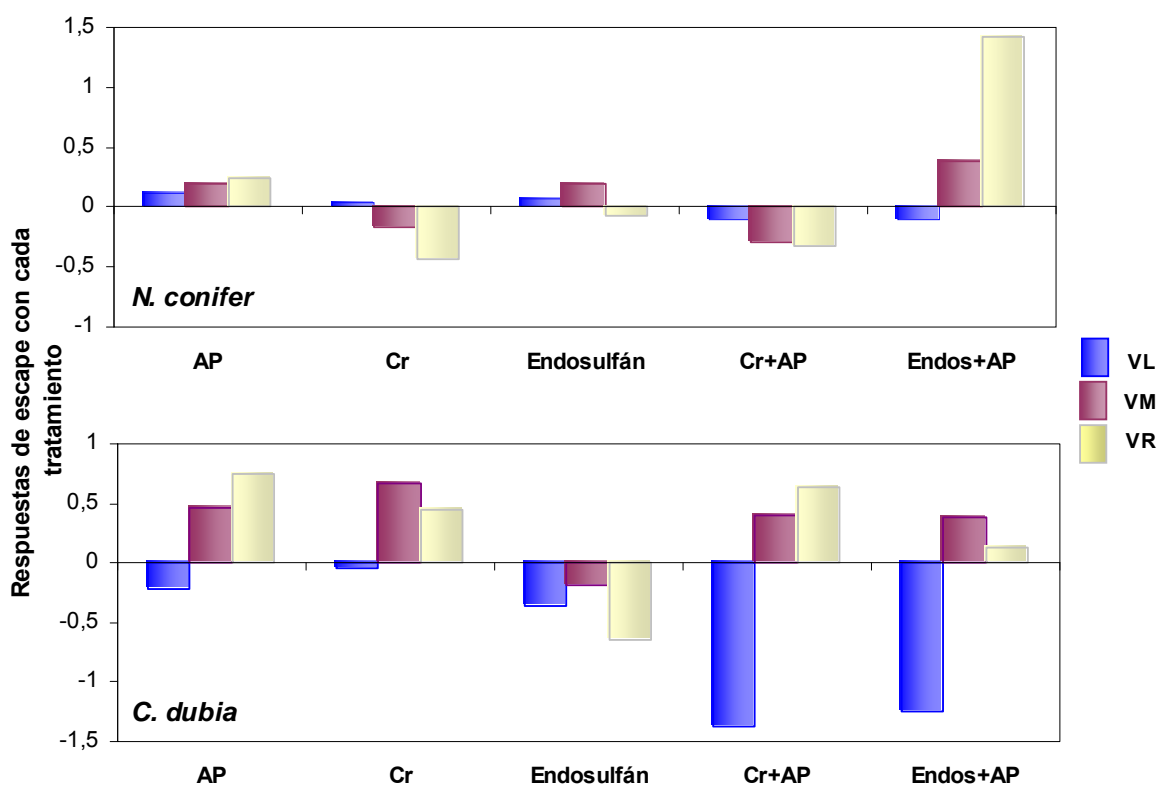
En el caso de la mezcla En+AP, hubo diferencias entre las velocidades, los tratamientos y la interacción entre ambos (ANODEV, Chi-cuadrado de Wald= 357,8;

14,01; 23,72 respectivamente,  $p < 0,05$  en todos los casos). Al comparar la mezcla con el resto de los tratamientos, se registraron diferencias significativas en todos los casos ( $p < 0,001$ ). Los organismos se escaparon significativamente más en la VM y VR ( $p < 0,05$ ) que en las respectivas del medio control.

Cuando se sometió al cladóceros *C. dubia* a la mezcla Cr+AP, se registraron diferencias significativas entre las velocidades de captura, los tratamientos y la interacción entre ambos (ANODEV, Chi-cuadrado de Wald=178,2; 33,5; 92,7 respectivamente,  $p < 0,001$  en todos los casos). La comparación pareada de la mezcla con el resto de los tratamientos (control, AP, Cr) mostró diferencias significativas en todos los casos ( $p < 0,001$ ). Los organismos sometidos a la mezcla se escaparon significativamente más que los del control y los sometidos al Cr y AP en las VM y VR ( $p < 0,05$ ; en todos los casos). En la VL, los que fueron sometidos a la mezcla y a los componentes adicionados individualmente redujeron significativamente su capacidad de escape ( $p < 0,001$ ).

Cuando se adicionó la mezcla Endos+AP se registraron diferencias significativas entre las velocidades, los tratamientos y la interacción entre ambos (ANODEV, Chi-cuadrado de Wald= 227,7; 48,7; 66,9 respectivamente,  $p < 0,001$  en todos los casos). Asimismo, la comparación entre la mezcla y los tratamientos mostró diferencias significativas en todos los casos (control, AP y endosulfán,  $p < 0,001$ ). Pese a que el endosulfán adicionado individualmente fue negativo para los organismos (reduciendo su capacidad de escape), en la mezcla, la respuesta fue inversa en las VM y VR ( $p < 0,05$ ). Cuando los organismos se sometieron a la VL, éstos disminuyeron su capacidad de escape, de la misma manera que para ambos componentes adicionados individualmente ( $p < 0,001$ ).

**Figura 24:** Respuestas de escape *N. conifer* y *C. dubia* a los diferentes tratamientos con: AP, Cr, endosulfán y las respectivas mezclas frente a las tres velocidades de captura (VL, VM y VR). El eje X representa el valor del control. Las barras positivas indican que los organismos manifestaron una mayor habilidad de escape que los del control. Por el contrario, las barras negativas indican que los individuos fueron más capturados que sus respectivos controles. La longitud de las barras representa la magnitud de las respuestas. Los asteriscos indican que las diferencias fueron estadísticamente significativas respecto a los controles (ANODEV;  $p < 0,05$ ).



#### 4.3.2. Comportamiento migratorio (DVM)

##### Controles

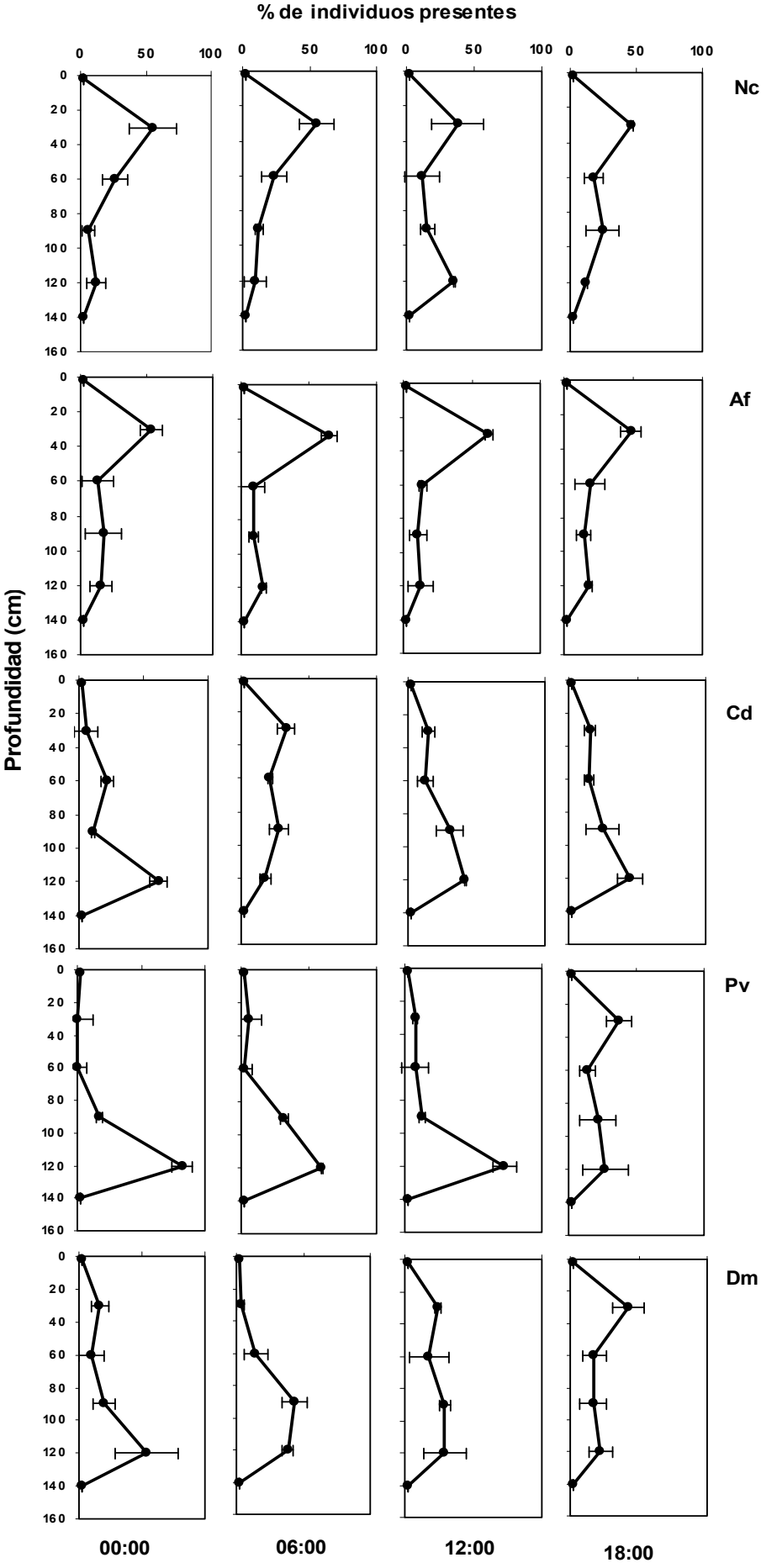
Los patrones de migración vertical fueron diferentes en cada especie analizada (Figura 25).

Si bien *N. conifer* registró un movimiento de descenso promedio de 18,14 cm entre las 06:00 y las 12:00, ambos copépodos mostraron una tendencia a mantenerse en una posición más cercana a la superficie a lo largo del día. En comparación, *N. conifer* ocupó un nivel de profundidad promedio (48,8 cm) mayor que *A. falcifer* (47,2 cm) en la columna de agua.

Entre los cladóceros, *P. variabilis* ocupó la posición media más profunda que el resto de las especies a lo largo del tiempo (85 cm) y ascendió solo hacia niveles

medios (56,7 cm) a las 12:00. *C. dubia* mostró una tendencia a excursionar hacia la superficie al final del período de oscuridad, una hora previa al encendido de luz (06:00; nivel superior máx.: 57,7 cm), descendiendo luego hacia niveles inferiores entre las 12:00 y 18:00 (nivel inferior máx.: 82,2 cm, a las 00:00). *D. magna* mostró un movimiento constante de ascenso entre las 00:00 y 18:00, realizando un recorrido promedio de 29,4 cm a lo largo de las 24 horas.

**Figura 25:** Patrón de migración vertical registrado para cada especie estudiada a lo largo de 24 horas. El diagrama representa la proporción de individuos presentes en cada nivel de profundidad a las 00:00; 06:00; 12:00 y 18:00 horas del día. **Nc:** *N. conifer*, **Af:** *A. falcifer*, **Cd:** *C. dubia*, **Pv:** *P. variabilis*, **Dm:** *D. magna*.



*Efecto de los comunicadores químicos*

Tal como se mencionó anteriormente, a fin de obtener un mayor realismo ecológico en este ensayo, donde se utilizaron comunicadores químicos como fuente de estrés natural, se emplearon sólo las especies nativas, que conviven con el pez *C. decemmaculatus* (*A. falcifer*, *N. conifer* *P. variabilis*, *C. dubia*). La comparación de la migración diaria de estas especies entre controles y el agua con kairomonas (AP) se observa en la Figura 26.

Los copépodos *A. falcifer* del control no manifestaron un movimiento migratorio significativo durante las cuatro observaciones (ANOVA<sub>mr</sub>,  $F=3,061$ ,  $df=3$ ;  $p=0,113$ );, manteniéndose en mayor proporción en el nivel superior (ANOVA<sub>mr</sub>,  $F=42,57$ ,  $df=3$ ;  $p<0,001$ );. Cuando éstos organismos fueron expuestos al agua de peces, se registraron diferencias significativas entre los cuatro niveles de profundidad (ANOVA<sub>mr</sub>,  $F=8,68$ ,  $df=3$ ;  $p=0,01$ ), al mismo tiempo que manifestaron leves movimientos migratorios, que se visualizan en la Figura 26. Sin embargo, tales movimientos no fueron significativos durante las cuatro observaciones diarias (ANOVA<sub>mr</sub>,  $F=1$ ,  $df=3$ ;  $p=0,455$ ).

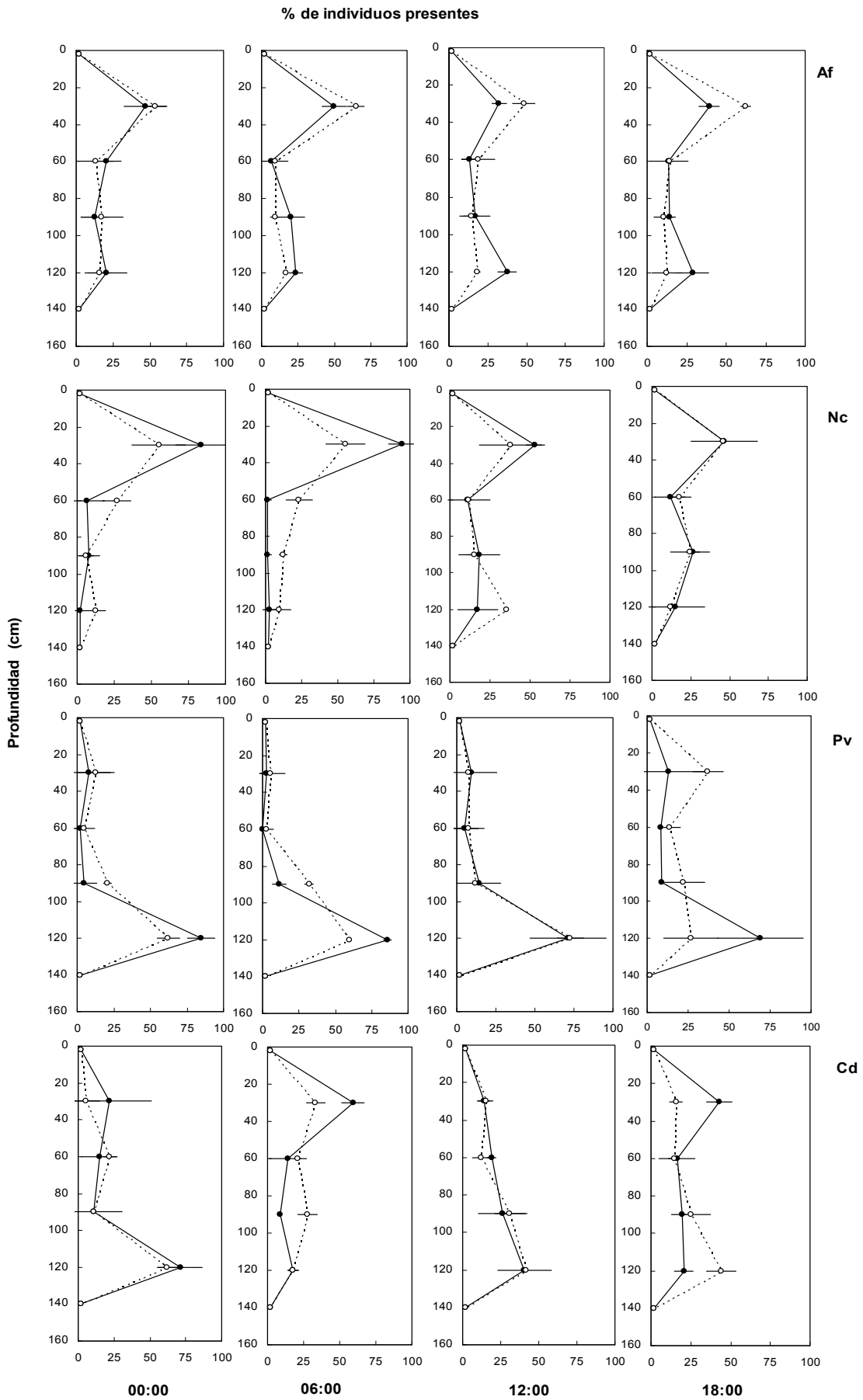
Los copépodos *N. conifer* del control, realizaron movimientos migratorios durante el día (12:00 y 18:00) y la noche (00:00 y 06:00) (Figura 26), sin embargo, las diferencias no fueron significativas para las cuatro horas en conjunto (ANOVA<sub>mr</sub>,  $F=1,796$ ,  $df=3$ ;  $p=0,248$ ), pero sí para los cuatro niveles de profundidad (ANOVA<sub>mr</sub>;  $F=0,944$ ,  $df=3$ ;  $p=0,011$ ). Por otra parte, los organismos que fueron expuestos al AP, migraron significativamente tanto entre los niveles de profundidad (ANOVA<sub>mr</sub>,  $F=24,505$ ,  $df=3$ ;  $p=0,01$ ) como entre los diferentes horarios del día (ANOVA<sub>mr</sub>;  $F=6,322$ ;  $df=3$ ;  $p=0,027$ ) dirigiéndose durante la noche hacia los niveles superiores.

El cladóceros *C. dubia* realizó movimientos migratorios diferentes pero significativos a lo largo del día, tanto en el control (ANOVA<sub>mr</sub>  $F=6,197$ ;  $df=3$ ;  $p=0,29$ ) como en el AP (ANOVA<sub>mr</sub>  $F=6,584$ ,  $df=3$ ;  $p=0,25$ ). De la misma manera, se registraron diferencias significativas entre los niveles de profundidad para ambos tratamientos (ANOVA<sub>mr</sub>, control:  $F=15,95$   $df=3$   $p=0,003$ ; AP:  $F=4,944$   $df=3$   $p=0,002$ ). En el control, estos cladóceros se mantuvieron entre los niveles más profundos (3 y 4) durante la mayor parte del día (00:00; 12:00 y 18:00), migrando levemente hacia los niveles superiores al final de la noche, hasta alcanzar una distribución equitativa entre los niveles de profundidad a las 06:00. Los organismos sometidos al AP, mostraron movimientos de ascenso más fuertes a las 06:00 y 18:00 pero, de la

misma manera que en el control, se mantuvieron en los niveles inferiores durante las 00:00 y 12:00.

*P. variabilis* del control, efectuó mínimos movimientos migratorios a lo largo del día, manteniéndose la mayor parte del tiempo en los niveles inferiores y realizando breves excursiones hacia los niveles superiores a las 18:00. Tales movimientos no fueron significativos a lo largo del día (ANOVA<sub>mr</sub>,  $F=0,714$   $df=3$ ;  $p=0,578$ ), pero sí entre los niveles de profundidad (ANOVA<sub>mr</sub>  $F=12,93$   $df=3$   $p=0,05$ ). Los que fueron sometidos al AP no ascendieron en ningún momento (ANOVA<sub>mr</sub>  $F=0,88$   $df=3$   $p=0,5$ ) manteniéndose en el nivel más profundo de la columna de agua en todos los horarios observados (ANOVA<sub>mr</sub>  $F=16,814$   $df=3$   $p=0,003$ ;

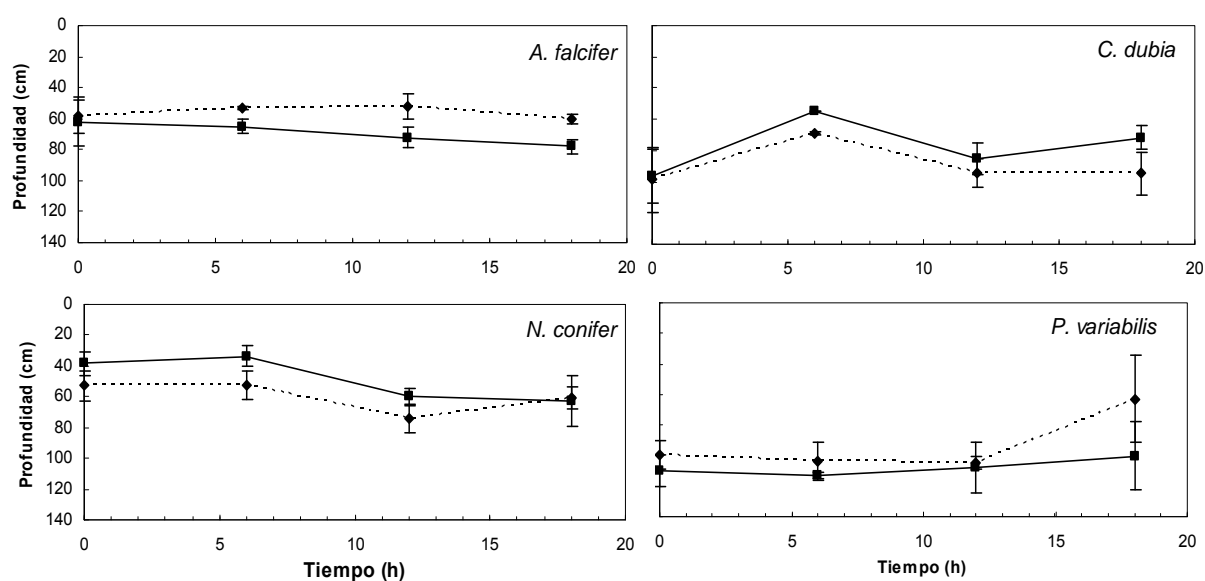
**Figura 26:** Migración vertical de de cada especie estudiada a lo largo del día. El diagrama representa la proporción de individuos presentes en cada nivel de profundidad a las 00:00; 06:00; 12:00 y 18:00 horas. Las líneas punteadas (-----) representan los grupos del control y las líneas continuas (\_\_\_\_\_) representan los grupos sometidos al AP. Las líneas horizontales representan  $\pm$ SD. **Af:** *A. falcifer*, **Nf:** *N. conifer*, **Pv:** *P. variabilis* y **Cd:** *C. dubia*





Las diferencias en la profundidad media entre el control y el AP (Figura 27) fue significativa para las cuatro especies estudiadas (ANOVA<sub>mr</sub>, *A. falcifer*  $F=14,671$ ;  $p=0,019$ ; *N. conifer*:  $F=10,20$ ;  $p=0,001$ ; *C. dubia*:  $F=8,601$ ;  $p=0,03$ , y *P. variabilis*:  $F=5,009$   $p=0,018$ ). Entre los copépodos, *A. falcifer* expuesto al AP mantuvo una posición inferior respecto al control, especialmente durante las horas del día (12:00 y 18:00), mientras que *N. conifer*, mostró un ascenso significativo, principalmente durante la noche. Entre los cladóceros, *C. dubia*, del AP mostró una respuesta similar a *N. conifer*, manteniendo una posición superior respecto a las del control durante la mayor parte del tiempo. *P. variabilis*, fue la especie que mantuvo el mayor nivel de profundidad en ambos tratamientos, aunque cuando fue sometida al AP reflejó un descenso aún mayor en todos los horarios del día, especialmente a las 18:00.

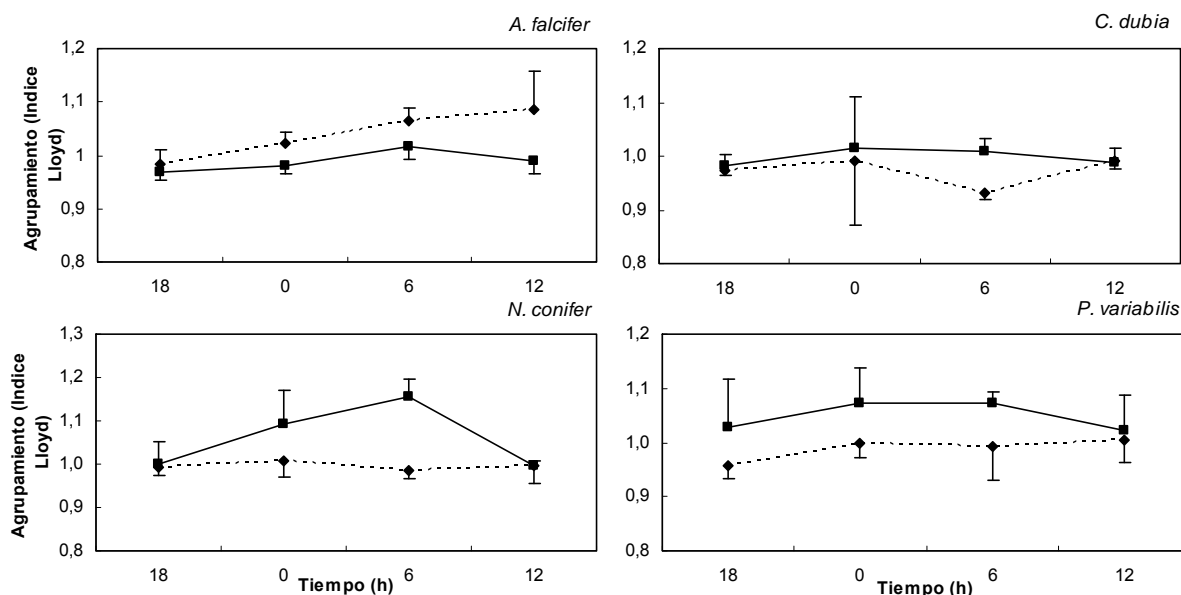
**Figura 27:** Profundidad promedio de cada especie en cada observación (00:00; 06:00; 12:00 y 18:00 horas). Las líneas punteadas (-----) representan los grupos del control y las líneas continuas (——) representan los grupos sometidos al AP. Las líneas verticales representan  $\pm$ SD.



Los copépodos registraron diferencias significativas en los índices de agrupamiento (Índice Lloyd, Figura 28) ente el control y el AP (ANOVA<sub>mr</sub>, *A. falcifer*:  $F=10,58$   $p=0,031$ ; *N. conifer*:  $F=16,316$   $p=0,016$ ). *N. conifer*, mostró un mayor agrupamiento en el AP, y las principales diferencias se observaron en las horas nocturnas donde los organismos permanecieron más agrupados en los niveles superiores (ver Figura 26). *A. falcifer* adquirió una mayor dispersión cuando fue

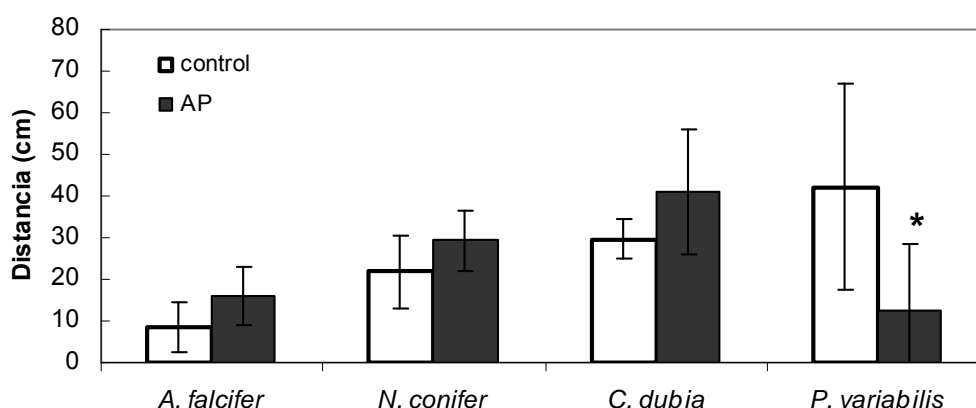
sometido al AP. En el caso de los cladóceros (Figura 28) no se registraron diferencias significativas entre ambos tratamientos (ANOVA<sub>mr</sub>, *C. dubia*:  $F=1,079$ ,  $p=0,358$ ; *P. variabilis*:  $F=3,141$ ,  $p=0,151$ ), siendo que *C. dubia* se mantuvo relativamente dispersa en todos los casos, mientras que *P. variabilis* mantuvo un agrupamiento importante en los niveles inferiores tanto en el control como en el AP (en este último caso, en mayor medida).

**Figura 28:** Índice de agrupamiento (Lloyd). Las figuras muestran los valores promedio para cada especie en cada observación (00:00; 06:00; 12:00 y 18:00). A mayores valores de dicho índice, mayor grado de agregación. Las líneas punteadas (-----) representan los grupos del control y las líneas continuas (——) representan los grupos sometidos al AP. Las líneas verticales representan  $\pm$ SD.



La Figura 29 muestra la distancia de migración (Distancia = máxima prof. – mínima prof.) de cada especie analizada. Las tres especies planctónicas reflejaron una mayor distancia de migración cuando fueron expuestas a los exudados de los peces que cuando no lo fueron (control), sin embargo, las diferencias no fueron estadísticamente significativas: *A. falcifer* ( $t=0,93$   $df=4$ ,  $p=0,3879$ ), *N. conifer* ( $t=1,421$   $df=4$   $p=0,299$ ), *C. dubia* ( $t=2,601$   $df=4$ ,  $p=0,182$ ). Por otra parte, *P. variabilis*, no migró ante la presencia de los comunicadores químicos, sino que se mantuvo durante las 24 h a una profundidad mayor y constante a lo largo del día, resultando significativa respecto al control ( $t=9,202$ ,  $df=4$ ,  $p=0,03$ ).

**Figura 29:** Valores promedio de las distancias de migración recorridas por cada especie en cada tratamiento (control y AP). Los asteriscos indican diferencias significativas respecto al control ( $p < 0,05$ ). Las líneas verticales representan el  $\pm$ SD.

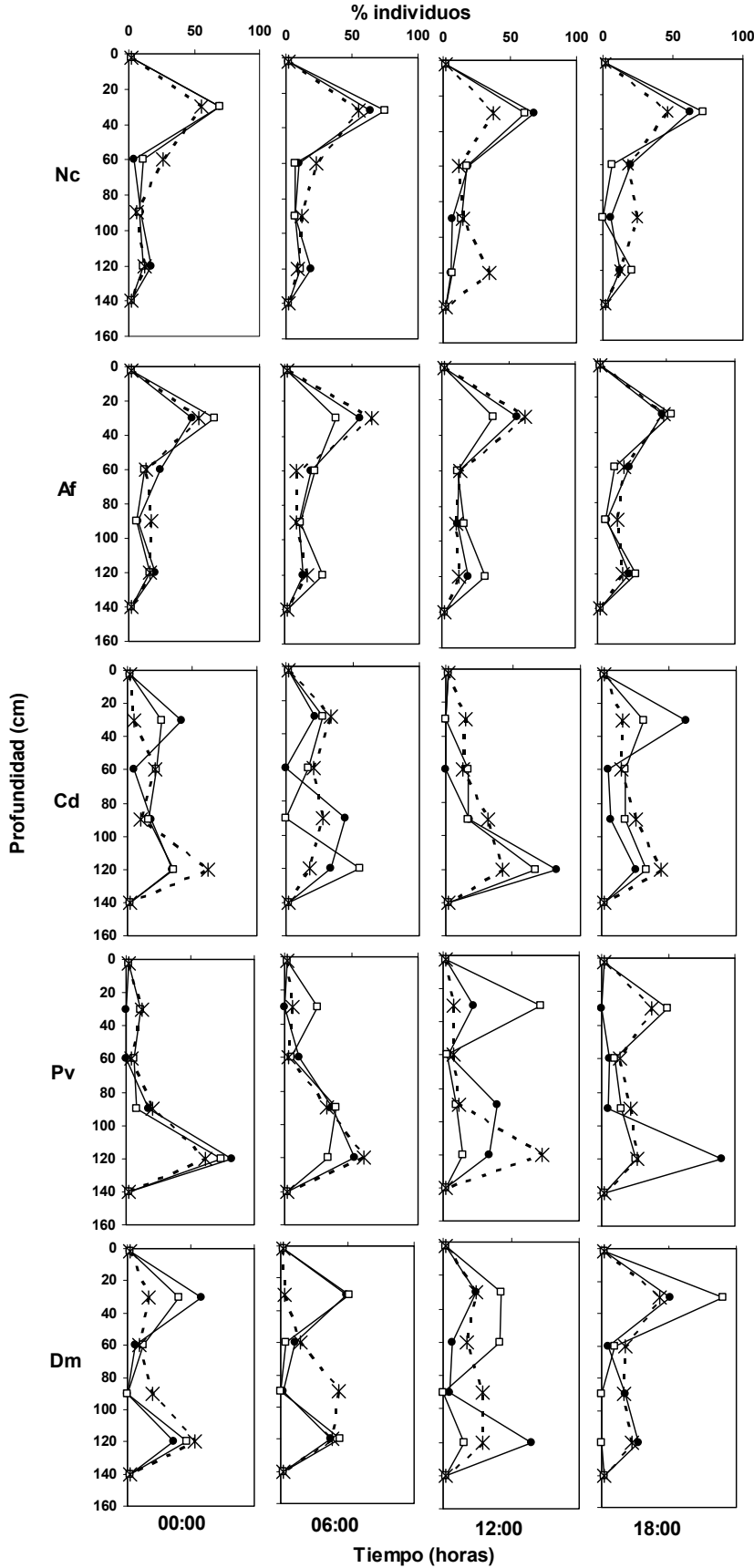


#### Efecto de los tóxicos

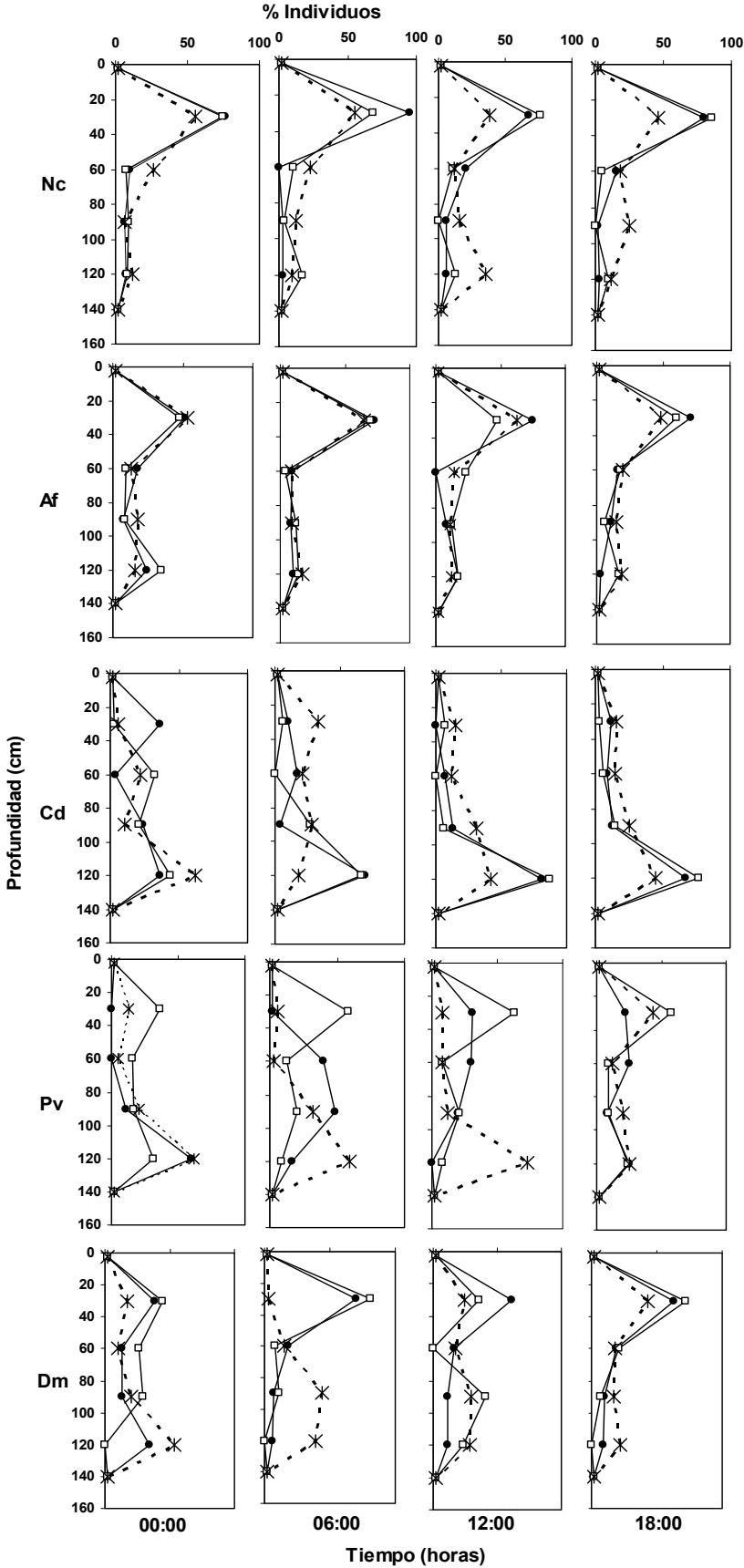
En general, las cinco especies sometidas a los tratamientos con los tóxicos (cromo y endosulfán) manifestaron alteraciones en la migración vertical diaria (ANOVA<sub>mr</sub>, *N. conifer*:  $F=1,71$ ,  $p=0,021$ ; *A. falcifer*:  $F=1,761$ ,  $p=0,017$ ; *C. dubia*:  $F=1,58$ ,  $p=0,048$ ; *P. variabilis*:  $F=2,39$ ,  $p=0,026$ ; *D. magna*:  $F=2,94$ ,  $p=0,008$ ) (Figura 30 a y b).

**Figura 30 (a y b):** Migración vertical de cada especie estudiada a lo largo del día. El diagrama representa la proporción de individuos presentes en cada nivel de profundidad a las 00:00; 06:00; 12:00 y 18:00 horas. Las líneas punteadas (.....) representan los controles y las líneas continuas (——) representan los tratamientos con Cr (a) y endosulfán (b). En ambos casos los símbolos blancos (□) representan las concentraciones tóxicas bajas y los negros (●), las concentraciones altas. **Nc:** *N. conifer*, **Af:** *A. falcifer*, **Cd:** *C. dubia*, **Pv:** *P. variabilis*, **Dm:** *D. magna*.

a- MVD con cromo



b- MVD con endosulfán



*Profundidad media*

Notablemente, los copépodos *N. conifer* sometidos a los tóxicos, mantuvieron una posición más estable en la columna de agua durante las cuatro horas observadas (Figura 31). Es decir, a diferencia de los organismos del control, estos no descendieron al medio día, registrando un nivel de profundidad media significativamente menor (Tabla 12). Las comparaciones múltiples utilizando el test de ajuste de Bonferroni, mostraron que para el caso del cromo tales diferencias se puntualizan a las 12:00 entre el control y Cr1 (ANOVA<sub>mr</sub>,  $p=0,019$ ) y el control y Cr2 (ANOVA<sub>mr</sub>,  $p=0,008$ ). Asimismo, para el tratamiento con endosulfán las diferencias se precisaron a las 12:00 (ANOVA<sub>mr</sub>,  $p=0,026$ ) y 18:00 (ANOVA<sub>mr</sub>,  $p=0,012$ ) entre el control y endosulfan1 y a las 06:00 (ANOVA<sub>mr</sub>,  $p=0,042$ ), 12:00 (ANOVA<sub>mr</sub>,  $p=0,013$ ) y 18:00 (ANOVA<sub>mr</sub>,  $p=0,017$ ) entre el control y endosulfán2.

*A. falcifer* del grupo control no registró amplios movimientos migratorios a lo largo del tiempo. Sin embargo, en presencia de cromo y endosulfan, estos organismos realizaron movimientos verticales modificando su profundidad de manera significativa respecto a la registrada en el control (Tabla 12) (Fig. 4). Respecto al cromo, tales diferencias se observaron a las 06:00 entre el control y Cr1 (ANOVA<sub>mr</sub>,  $p=0,013$ ) y a las 18 entre control y endosulfán2 (ANOVA<sub>mr</sub>,  $p=0,05$ ).

*C. dubia* no registró diferencias en la profundidad media entre el control y los tratamientos con cromo pero sí entre el control y los tratamientos con endosulfán (Tabla 12). En este caso, se observó un aumento en la profundidad media en la mayor parte del día y un notorio ascenso a las 00:00. (Figura 31). Se registraron diferencias significativas a las 06:00 para endosulfán1 (ANOVA<sub>mr</sub>,  $p<0,001$ ) y endosulfán2 (ANOVA<sub>mr</sub>,  $p=0,001$ ) y a las 12:00 para endosulfán1 (ANOVA<sub>mr</sub>,  $p=0,023$ ) y endosulfán2 (ANOVA<sub>mr</sub>,  $p=0,021$ ).

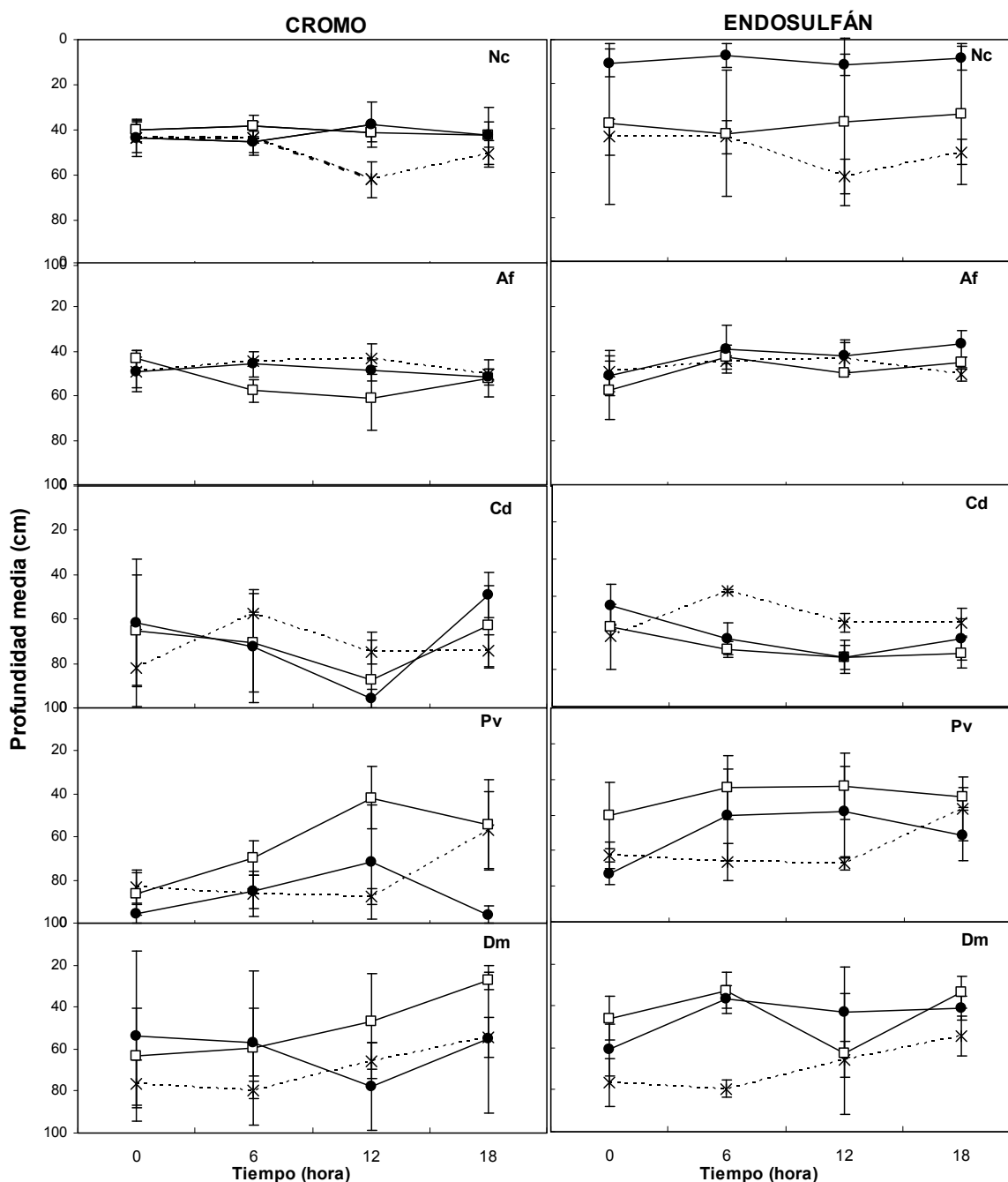
*P. variabilis* manifestó alteraciones de gran magnitud en la profundidad media cuando fue sometida a los tratamientos con cromo y endosulfán (Tabla 12) (Figura 31). En ambos casos, se observó un patrón inverso al registrado en el control. Respecto al cromo, se registraron diferencias significativas a las 12:00 entre control y Cr1 (ANOVA<sub>mr</sub>,  $p=0,023$ ) y a las 18:00 entre control y Cr2 (ANOVA<sub>mr</sub>,  $p=0,033$ ). Respecto al endosulfán, se registraron diferencias significativas a las 12:00 entre control y endosulfán1 (ANOVA<sub>mr</sub>,  $p=0,035$ ).

*D. magna* no registró diferencias en la profundidad media entre el control y los tratamientos con cromo pero sí entre el control y los tratamientos con endosulfán

(Tabla 12) (Figura 31). En presencia de este tóxico, los organismos tendieron a acercándose más hacia la superficie. Se registraron diferencias significativas a las 00:00 entre control y endosulfán1 (ANOVA<sub>mr</sub>,  $p=0,021$ ), a las 06:00 entre el control y ambos tratamientos con endosulfán (ANOVA<sub>mr</sub>,  $p<0,001$ ) y a las 18:00 entre control y endosulfán1 (ANOVA<sub>mr</sub>,  $p=0,02$ ).

En general, considerando las cinco especies estudiadas, el 64,3% de las diferencias significativas entre los controles y ambos tratamientos se observaron durante las horas de luz (12:00 y 18:00), y solo un caso registró diferencias a las 00:00 h (7%).

**Figura 31:** Profundidad promedio de cada especie en cada observación (00:00; 06:00; 12:00 y 18:00 horas). Los gráficos de la izquierda muestran la comparación entre control (-----) y los tratamientos con cromo (——), los gráficos de la derecha muestran la comparación entre el control (-----) y los tratamientos con endosulfán (——). En ambos casos, los símbolos blancos (□) representan las menores concentraciones y los símbolos negros (●) representan las mayores concentraciones. **Nc:** *N. conifer*, **Af:** *A. falcifer*, **Cd:** *C. dubia*, **Pv:** *P. variabilis*, **Dm:** *D. magna*.





**Tabla 12:** Resultados obtenidos a partir de las comparaciones entre controles y cada tratamiento con Cr y endosulfán para la Profundidad media y Agrupamiento (ANOVA, de dos factores, con medidas repetidas).

Profundidad media				Agrupamiento			
		F	p			F	p
<b><i>N. conifer</i></b>							
Control	cromo	6	0,03*	Control	cromo	0,093	0,014*
	endosulfán	31	<0,001*		endosulfán	7,07	0,026*
<b><i>A. falcifer</i></b>							
Control	cromo	3,79	0,017*	Control	cromo	7,45	0,022*
	endosulfán	6,21	0,028*		endosulfán	2,85	0,125
<b><i>C. dubia</i></b>							
Control	cromo	0,06	0,94	Control	cromo	0,29	0,75
	endosulfán	31	<0,001*		endosulfán	0,17	0,84
<b><i>P. variabilis</i></b>							
Control	cromo	10,64	0,008*	Control	cromo	0,49	0,63
	endosulfán	21,28	0,001*		endosulfán	6,59	0,025*
<b><i>D. magna</i></b>							
Control	cromo	1,86	0,225	Control	cromo	1,52	0,75
	endosulfán	45,97	<0,001*		endosulfán	1,94	0,212

\*valor estadísticamente diferente respecto al control.

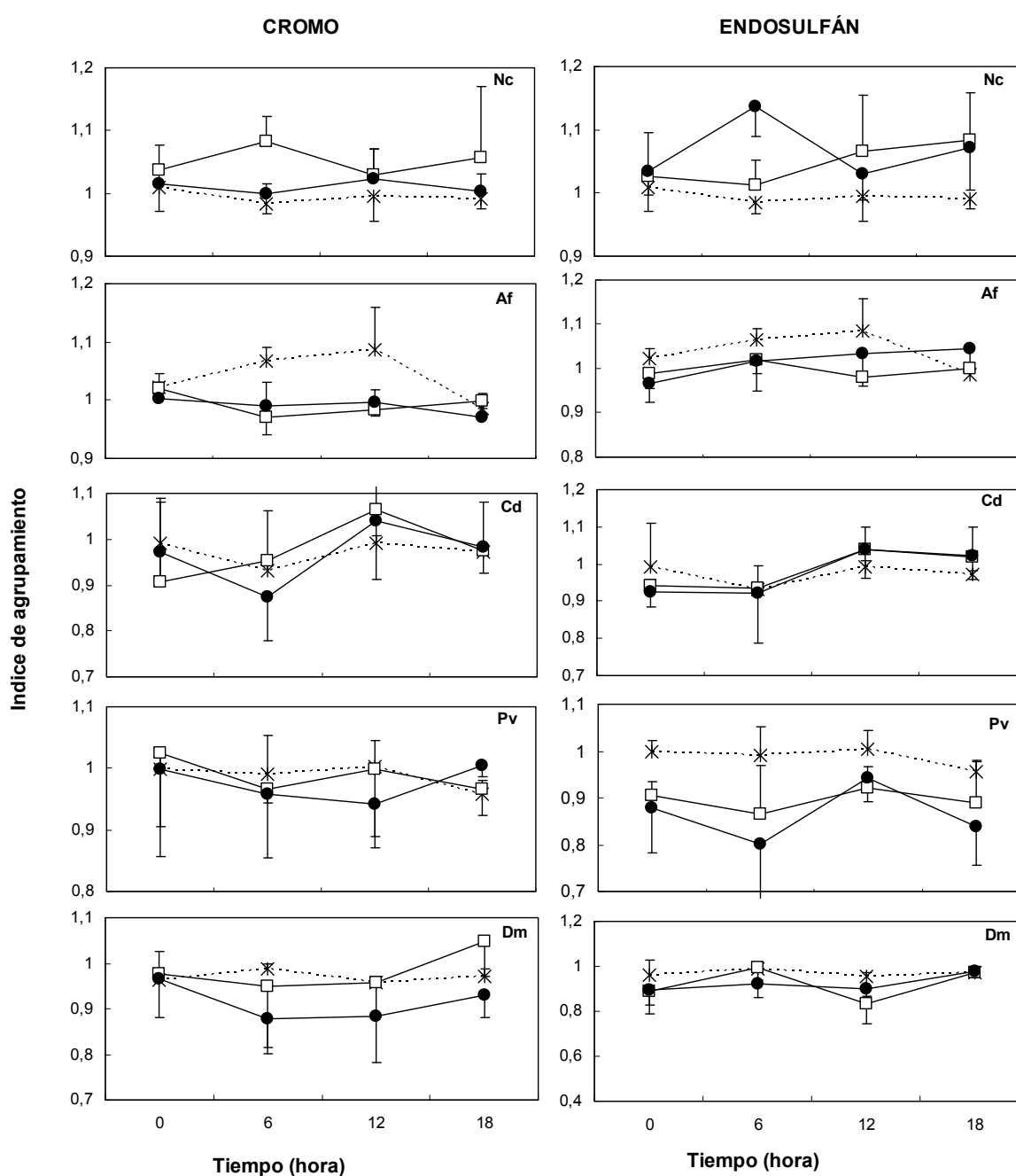
### Agrupamiento

El índice de agrupamiento para cada especie se muestra en la Figura 32. El copépodo *N. conifer* fue la única especie que manifestó una tendencia al agrupamiento luego de ser sometida a los tóxicos (Figura 32). Cuando fue sometido al cromo, tal agrupamiento fue significativamente diferente al control para la menor concentración (ANOVA<sub>mr</sub>,  $p=0,003$ ). En el caso del endosulfán, ambas concentraciones registraron diferencias significativas respecto al control (ANOVA<sub>mr</sub>,  $p=0,042$  y  $p=0,008$  endosulfán 1 y endosulfán 2, respectivamente).

El resto de las especies tendieron a dispersarse cuando se las sometió a los tóxicos (Figura 32). *A. falcifer* registró diferencias significativas entre el control y los tratamientos con cromo (ANOVA<sub>mr</sub>,  $F=7,45$ ,  $p=0,022$ ) pero no entre el control y los tratamientos con endosulfán (ANOVA<sub>mr</sub>  $F=2,85$ ,  $p=0,125$ ). *C. dubia* y *D. magna* no registraron diferencias significativas entre el control y los tratamientos con cromo (ANOVA<sub>mr</sub>,  $F=0,29$ ,  $p=0,75$ ;  $F=1,52$ ,  $p=0,28$  respectivamente) ni entre el control y los tratamientos con endosulfán (ANOVA<sub>mr</sub>,  $F=0,17$ ,  $p=0,84$ ;  $F=1,94$ ,  $p=0,212$  respectivamente). *P. variabilis* no registró diferencias en el grado de agrupamiento entre el control y los tratamientos con cromo (ANOVA<sub>mr</sub>,  $F=0,49$ ,  $p=0,63$ ) pero sí entre el control y los tratamientos con endosulfán (ANOVA<sub>mr</sub>,  $F=6,59$ ,  $p=0,025$ ).

El análisis de la interacción entre los factores: tratamiento y hora de día permitieron reconocer que el 100% de las diferencias significativas entre controles y tratamientos se desarrollaron a las 06:00.

**Figura 32:** Índice de agrupamiento (Lloyd). Las figuras muestran los valores promedio para cada especie en cada observación (00:00; 06:00; 12:00 y 18:00). Los gráficos de la izquierda muestran la comparación entre control (-----) y los tratamientos con cromo (——), los gráficos de la derecha muestran la comparación entre el control (-----) y los tratamientos con endosulfán (——). En ambos casos, los símbolos blancos (□) representan las menores concentraciones y los símbolos negros (●) representan las mayores concentraciones. **Nc)** *N. conifer*, **Af)** *A. falcifer*, **Cd)** *C. dubia*, **Pv)** *P. variabilis*, **Dm)** *D. magna*.



*Efecto de las mezclas*

Las Figuras 33 y 34 comparan los movimientos migratorios a lo largo de 24 horas de cada especie expuesta a las mezclas (Cr+AP y En+AP) con los respectivos controles y cada compuesto químico adicionado individualmente.

En el caso del copépodo *N. conifer* sometido a la mezcla Cr+AP, no se registraron diferencias en la distribución a lo largo del tiempo (ANOVA<sub>mr</sub>,  $F < 0,01$   $p = 1$ ), pero sí en los distintos niveles de profundidad (ANOVA<sub>mr</sub>,  $F = 91,39$   $p < 0,001$ ) y en la interacción entre ambos factores (tiempo y profundidad) (ANOVA<sub>mr</sub>,  $F = 3,15$   $p = 0,002$ ). Asimismo, el efecto de la interacción entre los tratamientos, la profundidad y el tiempo fue altamente significativo (ANOVA<sub>mr</sub>,  $F = 3,07$ ;  $p < 0,001$ ).

Las comparaciones pareadas entre la mezcla y el resto de los tratamientos (control, AP y Cr) mostraron que las diferencias fueron a las 00:00 en el nivel 1 de profundidad (ANOVA<sub>mr</sub>,  $F = 31,76$ ,  $F = 60,06$ ,  $F = 46,66$  respectivamente,  $p < 0,05$  en todos los casos) y a las 00:00 en el nivel 4 de profundidad (ANOVA<sub>mr</sub>,  $F = 52,03$ ,  $F = 62,3$ ,  $F = 47,36$  respectivamente,  $p < 0,05$  en todos los casos). Adicionalmente se registraron diferencias a las 06:00 en el nivel 1 de profundidad entre la mezcla y el tratamiento con Cr (ANOVA<sub>mr</sub>,  $F = 37,36$ ;  $p = 0,001$ ).

Al igual que el caso anterior, los copéodos sometidos a la mezcla En+AP no mostraron diferencias en la distribución a lo largo del tiempo (ANOVA<sub>mr</sub>  $F = 0,001$   $p = 0,99$ ), pero sí en los distintos niveles de profundidad y en la interacción entre ambos factores (tiempo y profundidad) (ANOVA<sub>mr</sub>,  $F = 122,71$  y  $F = 3,16$ ,  $p < 0,001$  respectivamente). Asimismo, el efecto de la interacción entre los tratamientos, la profundidad y el tiempo fue altamente significativo (ANOVA<sub>mr</sub>,  $F = 5,85$   $p < 0,001$ ).

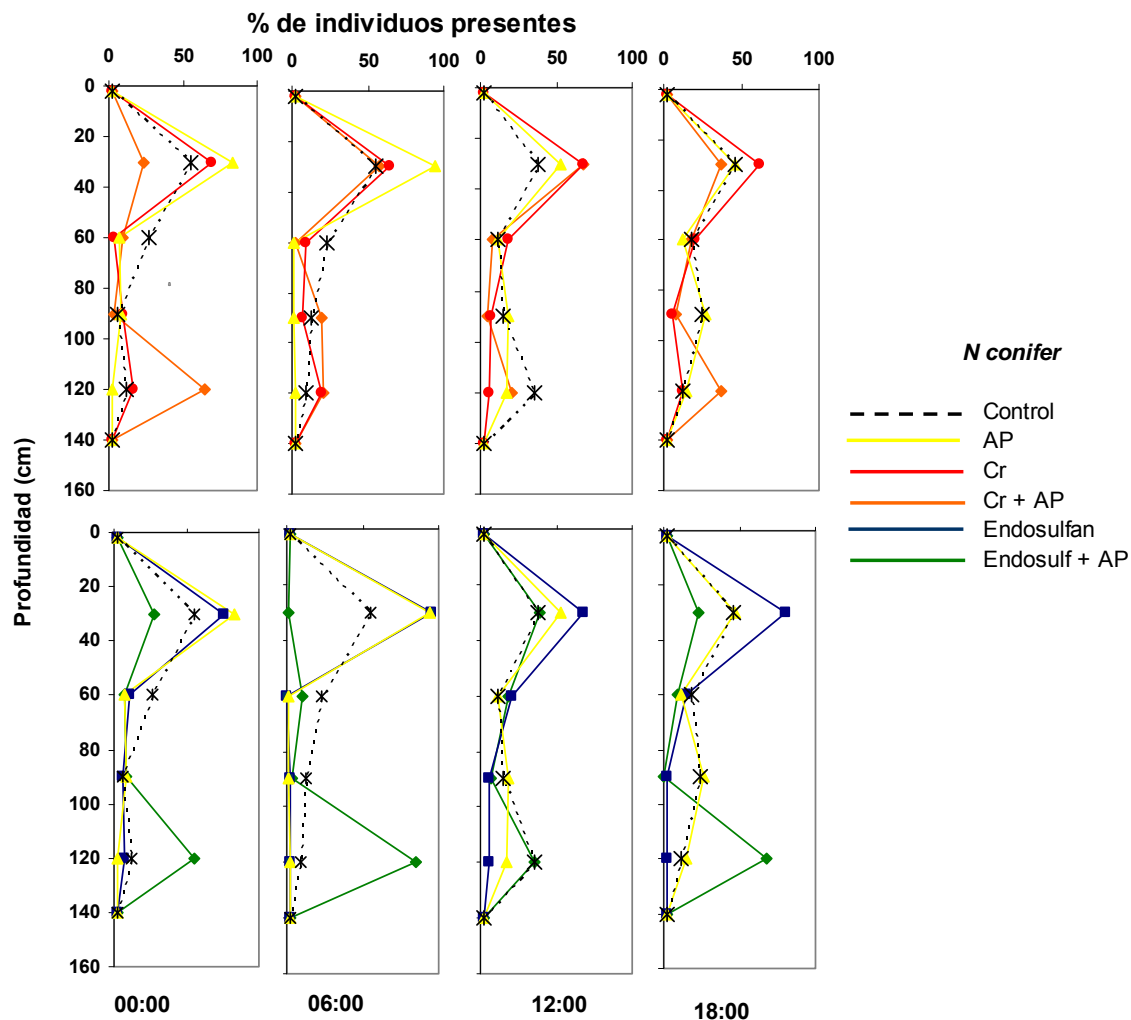
Las comparaciones pareadas entre la mezcla y el resto de los tratamientos (control, AP y endosulfán) mostraron diferencias significativas a las 00:00 en los niveles de profundidad 1 (ANOVA<sub>mr</sub>,  $F = 27,3$ ;  $55,5$  y  $48,3$  respectivamente,  $p < 0,001$ ) y 4 (ANOVA<sub>mr</sub>,  $F = 43,4$ ;  $53,7$  y  $48$  respectivamente,  $p < 0,001$ ); a las 06:00 en los niveles 1 (ANOVA<sub>mr</sub>,  $F = 53,7$ ;  $92,7$  y  $93,2$  respectivamente,  $p < 0,001$ ) y 4 (ANOVA<sub>mr</sub>,  $F = 75,7$ ;  $82,1$  y  $82,3$  respectivamente,  $p < 0,001$ ); y a las 18:00 en el nivel 1 entre la mezcla y el tratamiento con endosulfan (ANOVA<sub>mr</sub>,  $F = 56,86$   $p < 0,001$ ), en el nivel 3 entre la mezcla y AP (ANOVA<sub>mr</sub>,  $F = 26,53$ ;  $p = 0,41$ ) y en el nivel 4 en todos los casos (ANOVA<sub>mr</sub>,  $F = 55,5$ ;  $52,26$  y  $64,53$  respectivamente,  $p < 0,001$ ).

El cladóceros *C. dubia* sometido a la mezcla Cr+AP no registró diferencia a lo largo del tiempo (ANOVA<sub>mr</sub>,  $F = 0,87$   $p = 0,97$ ) pero sí entre los niveles de profundidad

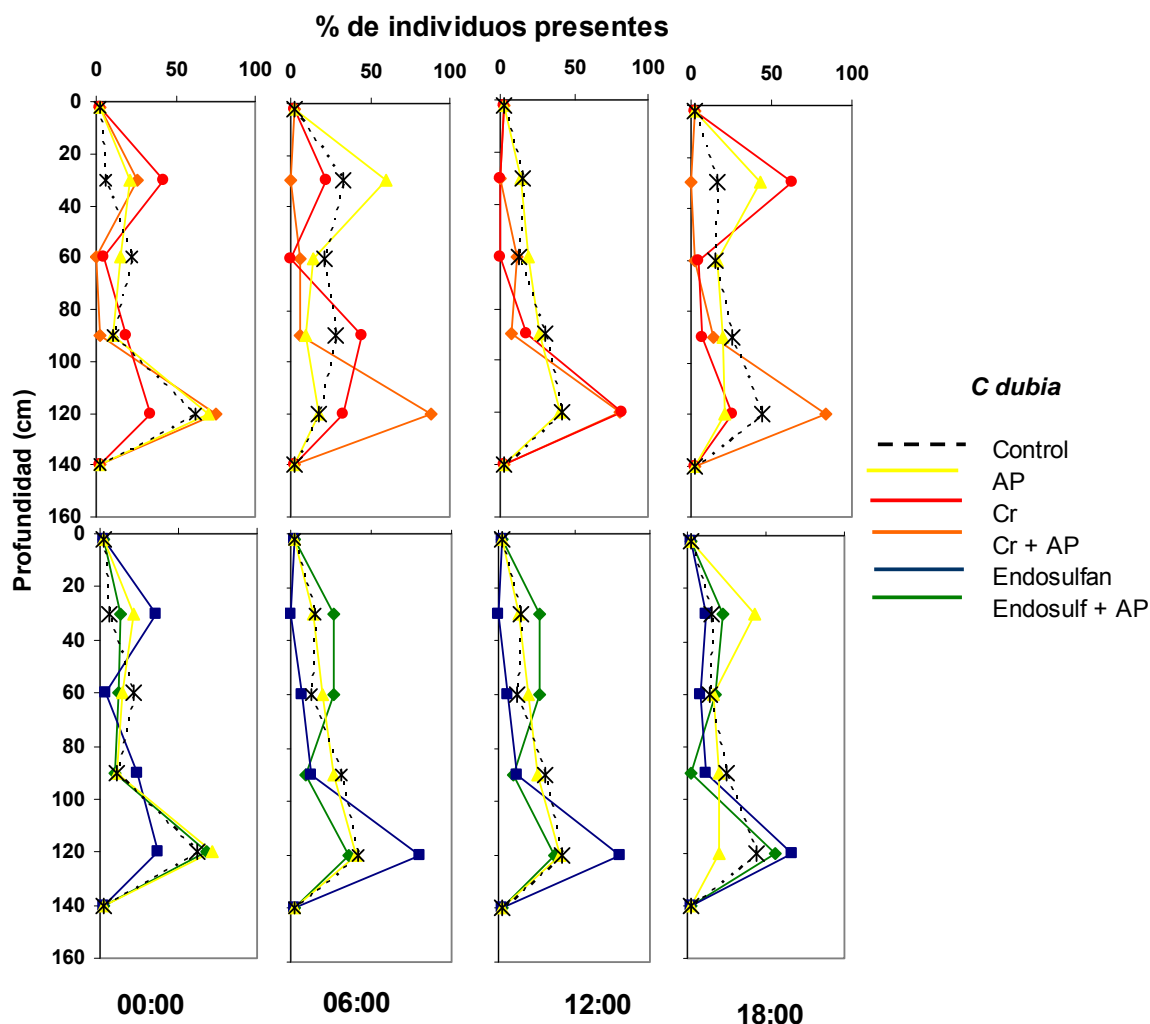
y en la interacción entre ambos factores (ANOVA<sub>mr</sub>, F=50 y 8,84 respectivamente  $p < 0,001$ ). La interacción entre los tratamientos, la profundidad y el tiempo fue altamente significativa (ANOVA<sub>mr</sub>, F=7,95  $p < 0,001$ ). Las comparaciones pareadas entre la mezcla y el resto de los tratamientos (control, AP y Cr) mostraron diferencias significativas a las 06:00 en el nivel de profundidad 1 entre la mezcla y AP (ANOVA<sub>mr</sub>, F= 60,9  $p = 0,004$ ) y en el nivel 4 con todos los tratamientos (ANOVA<sub>mr</sub>, F=70,9; 71,7 y 55,33 respectivamente,  $p < 0,05$ ); a las 12:00 en el nivel 4 con el control y AP (ANOVA<sub>mr</sub>, F=39,4 y 40,3 respectivamente,  $p = 0,001$ ); y a las 18:00 en el nivel de profundidad 1 entre la mezcla y AP (ANOVA<sub>mr</sub>, F=43,4  $p < 0,001$ ) y en el nivel 4 con todos los tratamientos (ANOVA<sub>mr</sub>, F=39,3; 63 y 57,9 respectivamente,  $p < 0,001$ ).

La mezcla En+AP no registró diferencia en la distribución de *C. dubia* a lo largo del tiempo (ANOVA<sub>mr</sub>, F=0,76  $p = 0,97$ ) ni en la interacción entre éste la profundidad (ANOVA<sub>mr</sub>, F=1,44  $p = 0,17$ ) pero sí entre los niveles de profundidad (ANOVA<sub>mr</sub>, F=82,87  $p < 0,001$ ). Por otra parte, la interacción entre los tratamientos, la profundidad y el tiempo fue altamente significativa (ANOVA<sub>mr</sub>, F=3,64  $p < 0,001$ ). Las comparaciones pareadas entre la mezcla y el resto de los tratamientos (control, AP y Endosulfan) mostraron diferencias significativas a las 06:00 en el nivel de profundidad 1 entre la mezcla y AP (ANOVA<sub>mr</sub>, F=51,66  $p < 0,001$ ), en el nivel 4 entre la mezcla, el control y AP (ANOVA<sub>mr</sub>, F=64,4 y 65,2 respectivamente,  $p < 0,001$ ); a las 12:00 en el nivel 4 entre la mezcla y el tratamiento con endosulfan (ANOVA<sub>mr</sub>, F=44,06  $p = 0,01$ ); finalmente a las 18:00 en el nivel 4 entre la mezcla y AP (ANOVA<sub>mr</sub>, F=35,7  $p = 0,02$ ).

**Figura 33:** Migración vertical diaria de *N. conifer* del control y expuesto a las mezclas Cr+AP (paneles superiores), En+AP (paneles inferiores) y a los respectivos tratamientos adicionales individualmente (AP, Cr y endosulfán). Se muestra el porcentaje de individuos promedio en cada nivel de profundidad y cada horario del día observado (00:00; 06:00; 12:00 y 18:00).



**Figura 34:** Migración vertical diaria de *C. dubia* del control y expuesta a las mezclas Cr+AP (paneles superiores), En+AP (paneles inferiores) y a los respectivos tratamientos adicionales individualmente (AP, Cr y endosulfán). Se muestra el porcentaje de individuos promedio en cada nivel de profundidad y cada horario del día observado (00:00; 06:00; 12:00 y 18:00).



### Profundidad media

En líneas generales, la Figura 35 muestra que tanto los tóxicos adicionales individualmente (Cr y endosulfán), como las correspondientes mezclas con AP modificaron la profundidad media de *N. conifer* y *C. dubia*, en relación a lo esperado a partir de los patrones manifestados en el AP.

Los efectos del tiempo y de la interacción entre éste y los tratamientos control, AP, Cr y Cr+AP sobre la profundidad media de *N. conifer* fueron significativos (ANOVA<sub>mr</sub>,  $F=11,07$  y  $3,58$ ,  $p<0,05$  respectivamente). Al comparar la mezcla con el

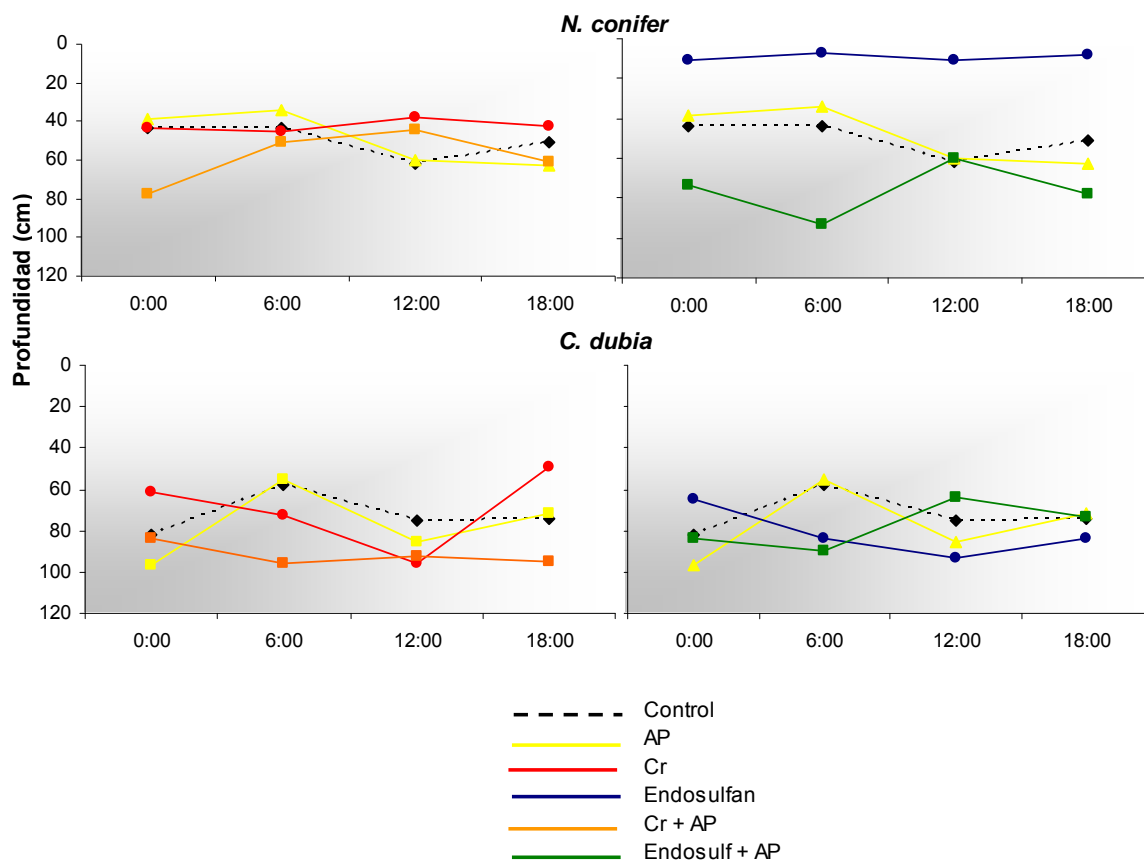
resto de los tratamientos (control, Cr y AP), las diferencias fueron significativas sólo con el tratamiento con Cr (Dunnett=16,41,  $p=0,04$ ).

De la misma manera que para el caso anterior, los efectos del tiempo y de la interacción entre éste y los tratamientos: control, AP, endosulfán y En+AP sobre la profundidad media de *N. conifer* fueron significativos (ANOVA<sub>mr</sub>,  $F=3,24$  y  $8$  respectivamente  $p<0,05$ ). Al comparar la mezcla con el resto de los tratamientos se observaron diferencias significativas en todos los casos (Dunnett= 25,8; 27; 42,3 para los tratamientos control, endosulfan y AP respectivamente,  $p<0,001$  en todos los casos).

En los ensayos con *C. dubia*, los efectos del tiempo y de la interacción entre éste y los tratamientos control, AP, Cr y Cr+AP sobre la profundidad media fueron significativos (ANOVA<sub>mr</sub>,  $F=3,19$  y  $2,71$  respectivamente  $p<0,05$ ). Al comparar la mezcla con el resto de los tratamientos se observaron diferencias significativas en todos los casos (Dunnett=19,4; 14,5; 21,4  $p=0,006$ ; 0,03; 0,003 para los tratamientos control, Cr y AP, respectivamente).

Finalmente, considerando la mezcla En+AP, si bien no hubo diferencias en la profundidad media en relación al factor tiempo (ANOVA<sub>mr</sub>,  $F=1,61$   $p=0,21$ ), si se registraron diferencias en la interacción entre éste y los tratamientos: control, AP, Endosulfán y En+AP (ANOVA<sub>mr</sub>,  $F=4,11$ ;  $p=0,003$ ). Al comparar la mezcla con el resto de los tratamientos, no se registraron diferencias significativas en ningún caso particular (ANOVA<sub>mr</sub>,  $F=2,55$ ;  $p=0,12$ ).

**Figura 35:** Profundidad promedio de *N. conifer* y *C. dubia* del control, AP, los tratamientos con Cr, endosulfán y las mezclas (Cr+AP y En+AP) en cada horario del día observado (00:00; 06:00; 12:00 y 18:00).



#### Agrupamiento (índice Lloyd).

La Figura 36 muestra los índices de agrupamiento para cada especie en cada mezcla analizada, incluyendo los controles y los tratamientos adicionados individualmente. De la misma manera que se registraron importantes diferencias en el grado de agrupamiento de ambas especies en el AP (ver efecto del AP sobre la DVM), los tóxicos y las mezclas influyeron notoriamente en este indicador, modificando el patrón esperado.

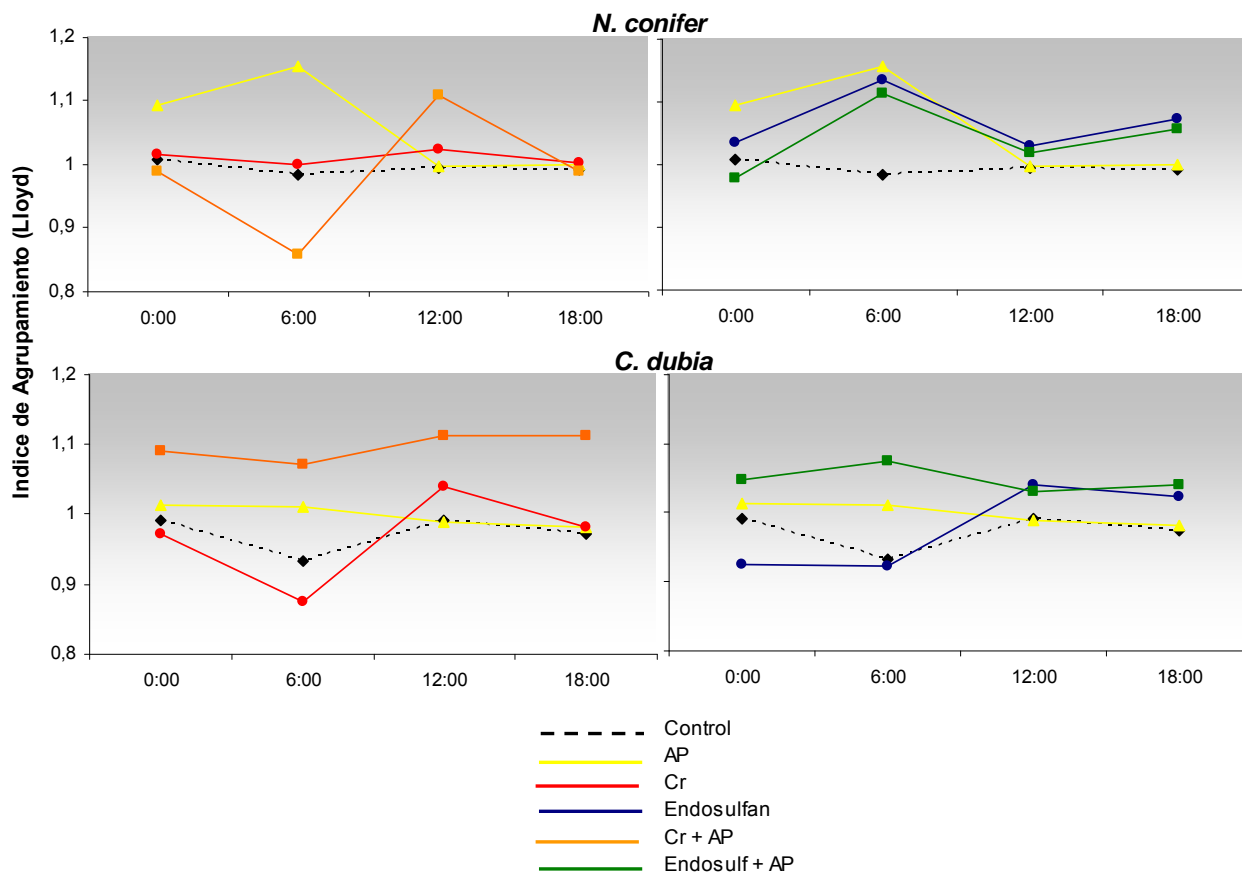
En el caso de *N. conifer*, el efecto del tiempo no fue significativo respecto al agrupamiento (ANOVA<sub>mr</sub>,  $F=1,92$ ;  $p=0,22$ ), pero sí la interacción entre éste y los tratamientos control, AP, Cr y Cr+AP (ANOVA<sub>mr</sub>,  $F=45,14$ ;  $p<0,001$ ). Cuando se analizó comparativamente la mezcla y los restantes tratamientos, no se registraron diferencias entre ellos (ANOVA<sub>mr</sub>,  $F=1,89$ ;  $p=0,2$ ). Contrariamente, tanto el efecto



del tiempo (ANOVA<sub>mr</sub>,  $F=10,59$ ;  $p<0,001$ ) como de la interacción entre éste y los tratamientos (control, AP, endosulfán y En+AP) fueron significativos para la misma especie (ANOVA<sub>mr</sub>,  $F=3,54$ ;  $p=0,003$ ). La comparación entre la mezcla y el resto de los tratamientos mostró diferencias sólo con el control (Dunnett= $0,07$ ;  $p=0,03$ ).

Cuando se analizó el agrupamiento de *C. dubia*, se observó que ni el efecto del tiempo ni de la interacción entre éste y los tratamientos (control, AP, Cr y Cr+AP) fueron significativos sobre este indicador (ANOVA<sub>mr</sub>  $F=1,68$  y  $0,69$ ;  $p=0,2$  y  $0,7$ , respectivamente). Si bien el gráfico visualiza una diferenciación entre la mezcla y los restantes tratamientos, estas diferencias no resultaron estadísticamente significativas (ANOVA<sub>mr</sub>,  $F=2,77$ ;  $p=0,11$ ). Asimismo, ni el efecto del tiempo ni de la interacción entre éste y los tratamientos (control, AP, endosulfán y En+AP) fueron significativos (ANOVA<sub>mr</sub>,  $F=0,45$ ;  $1,2$ ;  $p=0,71$ ;  $0,33$ , respectivamente). Las diferencias pareadas no mostraron diferencias significativas entre la mezcla y los restantes tratamientos (ANOVA<sub>mr</sub>,  $F=2,37$ ;  $p=0,14$ ).

**Figura 36:** Índice de agrupamiento (Lloyd) de *N. conifer* y *C. dubia* del control, AP, los tratamientos con Cr, endosulfán y las mezclas (Cr+AP y En+AP). Los gráficos muestran los valores promedio en cada horario del día observado (00:00; 06:00; 12:00 y 18:00).



## 5. DISCUSIÓN

### 5.1. Toxicidad aguda

Los ensayos agudos dieron lugar al siguiente ordenamiento para cobre: *P. variabilis* < *C. dubia* < *N. conifer* < *A. falcifer* < *D. magna*; para cromo: *D. magna* < *P. variabilis* < *C. dubia* < *N. conifer* < *A. falcifer*; y para el endosulfán (en formulado): *C. dubia* < *P. variabilis* < *N. conifer* < *A. falcifer* < *D. magna*.

A partir de estas comparaciones se observó que el copépodo *A. falcifer* fue prácticamente el más tolerante a los tres xenobióticos. Los cladóceros *P. variabilis*, *C. dubia* y el copépodo *N. conifer* fueron altamente sensibles, mientras que *D. magna* manifestó gran sensibilidad para cromo pero no para cobre y endosulfán.

En acuerdo con investigaciones previas, los ensayos agudos realizados mostraron que, entre los metales empleados, el cobre resultó ser el más tóxico para los organismos planctónicos (Bellavere y Gorbi 1981; Verriopoulos y Moraitou-Apostolopoulou 1982; Sullivan y col., 1983; Sunda y col., 1987; Wong y Pak 2004). Probablemente, los patrones de acumulación y mecanismos de toxicidad son diferentes entre ambos (Rainbow, 2002). Pese a que algunos estudios toxicológicos lo califican de baja incidencia, este hecho sólo se manifiesta en los organismos superiores, especialmente mamíferos. Sin embargo, tal como lo puntualizan numerosos autores, el cobre resulta altamente tóxico para las especies inferiores y especialmente acuáticas (Repetto, 1995). Esta toxicidad se debe principalmente a su gran solubilidad en fluidos orgánicos y facilidad de absorción a través de las membranas biológicas (Sylva, 1975).

Con respecto a la sensibilidad de *D. magna*, trabajos previos registraron  $CL_{50}$  de entre 60 a 210  $\mu\text{g l}^{-1}$  para cromo, entre 1,4 y 18,5  $\mu\text{g l}^{-1}$  para cobre (Winner y Farrel, 1976; Ewell y col., 1986; Khangarot, 1989; Persoone y col., 1989; Fargasova 1994; Dave, 1984) y 62  $\mu\text{g l}^{-1}$  para endosulfán (Schoettger, 1970). Se observa que para cromo y endosulfán, los valores obtenidos en esta tesis fueron considerablemente más bajos (46,58 y 11,21  $\mu\text{g l}^{-1}$ , respectivamente).

Para el caso de *C. dubia*, Spehar y Fiandt (1986) registraron una  $CL_{50}$  48 h de cromo de 144  $\mu\text{g l}^{-1}$ . Respecto al cobre, las  $CL_{50}$  variaron desde 35 a 79  $\mu\text{g l}^{-1}$  (Belanger y col., 1989), pero Gagneten y Vila (2001) encontraron valores menores, desde 5 a 20  $\mu\text{g l}^{-1}$ , según diferentes niveles de pH analizados. En ambos casos (cromo y cobre), las concentraciones efectivas registradas en este trabajo, se

encontraron dentro de los mismos rangos de toxicidad (100 y 27,4  $\mu\text{g l}^{-1}$ , respectivamente). Contrariamente, los valores agudos de endosulfán registrados por otros autores se encuentran entre 53,3 y 490  $\mu\text{g l}^{-1}$  (Woods y col., 2002; Sunderam y col., 1994), siendo significativamente más altos que los registrados en este trabajo (0,36  $\mu\text{g l}^{-1}$ ).

Pese a que los estudios sobre la sensibilidad de los copépodos de agua dulce al cobre y cromo son escasos, particularmente en nuestra región, algunos trabajos de mayor alcance pueden ser comparados con los valores aquí obtenidos. Wong y Pak (2004) registraron  $\text{CL}_{50}$  48 h para cobre y cromo de 75  $\mu\text{g l}^{-1}$  y 510  $\mu\text{g l}^{-1}$  respectivamente en nauplios de *Mesocyclops pehpeiensis*. Los adultos de *Cyclops abyssorum* registraron  $\text{CL}_{50}$  48 h para cobre y cromo de 2500 y 10000  $\mu\text{g l}^{-1}$ , respectivamente y *Eudiaptomus padanus* registró  $\text{CL}_{50}$  48 h de 500 y 10100  $\mu\text{g l}^{-1}$  para cobre y cromo respectivamente (Baudouin y Scoppa 1974). Estos valores son significativamente más elevados que los registrados para *N. conifer*, quien mostró ser altamente sensible, comparado con las otras especies (42,18 y 170,76  $\mu\text{g l}^{-1}$  de Cu y Cr, respectivamente). Por su parte, *A. falcifer* registró valores dentro del rango de sensibilidad de las especies recién mencionadas. Respecto al endosulfán, desafortunadamente no existen estudios sobre la sensibilidad de copépodos de agua dulce comparables con los resultados aquí obtenidos.

Desde una perspectiva más amplia, los resultados aquí obtenidos pueden ser también comparados con los obtenidos para ciertos macrocrustáceos sugeridos como posibles organismos tests. Por ejemplo, *Gammarus pseudolimnaeus* registró valores de cromo entre 94,1 y 67,1  $\mu\text{g l}^{-1}$  (Call y col., 1983). El decápodo *Macrobrachium rosenbergii* registró los valores de  $\text{CL}_{50}$  para cobre entre 530 y 450  $\mu\text{g l}^{-1}$  (Li y col., 2005). Pese a que las comparaciones respecto al cromo muestran una sensibilidad similar, los organismos zooplanctónicos resultaron ser altamente sensibles respecto al cobre, al compararlos con los macrocrustáceos.

Para el caso de endosulfán, el camarón *Palaemonetes argentinus* registró  $\text{CL}_{50}$  entre 14,1 y 6,28  $\mu\text{g l}^{-1}$  (Montagna y Collins, 2007), y el cangrejo *Trichodactylus borellianus*, entre 1827,66 y 1984,26  $\mu\text{g l}^{-1}$  luego de 24 horas de exposición (Montagna y Collins, 2008). En ambos casos, las concentraciones letales son extremadamente altas comparadas con los organismos aquí analizados. Estas comparaciones indican que la elevada sensibilidad aguda del zooplancton al

endosulfán podría ser un buen indicador de contaminación en los ecosistemas de la región.

Respecto a las normas nacionales e internacionales para la protección de la biota acuática, numerosos organismos calcularon las concentraciones máximas permitidas para mantener la calidad del agua. En Argentina, la Secretaría Nacional de Recursos Hídricos determinó en 2003 los valores agudos y crónicos para cromo en  $15 \mu\text{g l}^{-1}$  y  $2,5 \mu\text{g l}^{-1}$  respectivamente. En 2005, la misma entidad estableció el nivel crónico para cobre en  $3,9 \mu\text{g l}^{-1}$  para aguas cuya dureza promedia los  $50 \mu\text{g l}^{-1}$   $\text{CaCO}_3$ . En ambos casos estas concentraciones guía serían adecuadas para la protección, desde el punto de vista toxicológico, de los organismos estudiados.

Por otra parte, organismos internacionales establecen niveles guía para endosulfán de  $0,056 \mu\text{g l}^{-1}$  (USEPA 1980; 1986) y de  $0,06 \mu\text{g l}^{-1}$  (para la toxicidad aguda) y  $0,003 \mu\text{g l}^{-1}$  (para la toxicidad crónica) (CWQG 2010). Sin embargo, salvo algunas excepciones, aún no existen niveles guía ni reglamentaciones apropiadas para los diferentes compuestos utilizados como coadyuvantes.

Una extensa revisión bibliográfica sobre la toxicidad de los tres xenobióticos empleados en esta tesis muestra que la mayor parte de los trabajos en microorganismos acuáticos se llevaron a cabo sobre *D. magna* o algunas especies de *Ceriodaphnia*. Sin embargo cabe mencionar que *D. magna* no representa la fauna regional, por lo que su relevancia ecológica en estudios ecotoxicológicos ha sido frecuentemente criticado (Baird y col., 1989; Koivisto, 1995). Por otra parte, dado que *D. magna* y *Ceriodaphnia* son anomopodos y exclusivamente planctónicos, su sensibilidad tampoco podría ser directamente extrapolada a otras especies de cladóceros tales como las pertenecientes al orden Ctenopoda o copépodos de ambientes litorales. En este sentido, la información obtenida a partir de los ensayos agudos sobre estas especies constituye una importante contribución al conocimiento sobre la sensibilidad de la fauna neotropical.

Mas aún, considerando la particular complejidad y heterogeneidad de los ambientes acuáticos de la región (José de Paggi y Paggi, 2007), se refleja la necesidad de desarrollar nuevos estudios que provean información más adecuada sobre el potencial tóxico de ciertas sustancias o xenobióticos presentes.

## **5.2. Efecto de xenobióticos y comunicadores químicos sobre los ciclos de vida de *N. conifer* y *P. variabilis*.**

### 5.2.1. Efecto de comunicadores químicos de peces (*kairomonas*) sobre el ciclo de vida de *N. conifer*.

Los resultados obtenidos en este estudio indican que los copépodos expuestos a los comunicadores químicos de peces manifestaron cambios en su ciclo de vida. En líneas generales, redujeron el tiempo de desarrollo y maduraron tempranamente a un menor tamaño corporal, respecto a los del control. Sin embargo, pese a estos cambios, la proporción de cada estadio larvario fue similar en todas las concentraciones de agua de peces. Este aspecto indica claramente que *N. conifer* no se desvió del modelo de desarrollo equiproporcional ante la exposición a las señales de alarma exudadas por los peces. Como se mencionó anteriormente, este modelo es independiente de variables naturales tales como la temperatura o la calidad del alimento (Van Den Bosch y Wilfried, 1994; Hart, 1996; 1998), y considerando que los infoquímicos son componentes naturales, que comparten un proceso evolutivo con los organismos, es razonable pensar que no se desviaran del patrón normal de muda, pese a la inducción de otras respuestas fenotípicas adaptativas.

Los ajustes en el ciclo de vida estarían dando evidencias de que *N. conifer* es altamente sensible a la presencia de señales químicas de alarma. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por otros autores, quienes encontraron una elevada plasticidad fenotípica en cladóceros sometidos a comunicadores químicos de diferentes peces (Stibor, 1992; Engelmayer, 1995; Stibor y Machacek, 1998). La reducción en el tiempo de desarrollo y un menor tamaño corporal observado en *N. conifer* podrían ser interpretadas como “respuestas positivas” *sensu* Hanazato (2001). Estos autores sostienen que tales respuestas refieren a una maduración temprana al enfrentarse a situaciones naturales de estrés, y son adaptativas en el sentido que permiten optimizar el *fitness*; por el contrario, las “respuestas negativas”, tales como la postergación de la madurez sexual y la reproducción, constituirían consecuencias desventajosas a largo plazo para la población. Por otra parte, coincidiendo con Beckerman y col. (2007), las respuestas inducidas por *N. conifer* podrían ser el resultado de mecanismos fisiológicos actuando a lo largo del desarrollo. Estos mecanismos reflejan los patrones de alimentación de los depredadores y determinan la distribución de la energía disponible entre las diferentes actividades o

estructuras (Crowl y Covich 1990; Hall y col., 1976; Reznick y col., 2002, Riessen, 1999).

Este estudio muestra varias evidencias de que la historia de vida de *N. conifer* podría ser consecuencia de mecanismos fisiológicos: en primer lugar, tanto los nauplios como los copepoditos sometidos al agua de peces redujeron significativamente el tiempo total de desarrollo. Esta respuesta, inducida por el comunicador químico constituye una eficiente estrategia para alcanzar el estado adulto reproductivo antes de ser consumidos por sus depredadores (Lynch, 1980). Esto coincide con los resultados de Stibor (1992), quien demostró que *D. hyalina* se reproduce tempranamente y a un menor tamaño corporal, y con Weider y Pijanowska (1993) quienes obtuvieron los mismos resultados en clones de *D. magna*.

Como segunda evidencia, los copépodos sometidos a la mayor concentración de agua de peces fueron significativamente más pequeños, cuando alcanzaron el estadio adulto. Coincidiendo con algunos autores, la necesidad de reducir el tiempo de desarrollo a fin de lograr reproducirse en el menor tiempo posible, implicó una modificación en la asignación de los recursos disponibles durante la ontogenia (Weider y Pijanowska, 1993), así los organismos maduraron rápidamente pero a un menor tamaño corporal. Es interesante mencionar que otros trabajos en esta línea encontraron que la presencia de comunicadores químicos de alarma reducen las actividades de filtración tanto en copépodos (Cieri y Stearns, 1999) como en cladóceros (Rose y col., 2003). Estas investigaciones consideran que tal estrategia podría ser una eficiente manera de evadir el riesgo de ser detectados por los depredadores, sea porque la presencia de alimento en el intestino incrementa su visibilidad (tornando los organismos más contrastantes con el medio) o porque los movimientos utilizados en el proceso de alimentación los haría más perceptibles a la identificación mecánica. Sin embargo, considerando que una menor actividad de filtración o ingestión no implica necesariamente una menor eficiencia de asimilación (Beckman y col., 2007), concluimos que un menor tamaño corporal es una consecuencia directa de la redistribución de los recursos durante la ontogenia, y no de una reducción en la cantidad de carbono disponible (debido a un menor ingreso o pérdida como consecuencia del incremento en la tasa respiratoria). Como resultado, la aceleración del desarrollo permite alcanzar un mayor éxito reproductivo lo antes posible (Machacek, 1991; Stibor, 1992; Ball y Baker, 1996). En este sentido, el

principal mecanismo adaptativo de los organismos en relación a las señales químicas de alarma fue una modificación en la distribución energética durante el ciclo total de desarrollo hacia una madurez temprana. Por otra parte, el pequeño tamaño tanto de los adultos como de las crías al momento de la primera reproducción, sería beneficiosa en la medida que reduciría el riesgo de ser capturados por depredadores visuales selectivos, particularmente peces.

En tercer lugar, estudios previos demostraron que *C. decemmaculatus* es un depredador generalista, manteniendo una gran preferencia por presas grandes (Oliveros, 1980; Escalante, 1983; Rossi, 1989; Oliveros y Rossi, 1991; Barros, 2004). Coincidiendo con las interpretaciones de Beckerman y col., (2007), las señales químicas presentes en el agua de peces utilizadas en este estudio reflejan las respuestas acorde a éste patrón de alimentación.

Las evidencias mencionadas anteriormente indican que la historia de vida de *N. conifer* responde a mecanismos fisiológicos mediante los cuales la energía disponible es preferiblemente asignada al desarrollo, resultando la madurez temprana y el tamaño corporal pequeño, las principales consecuencias directas de estos mecanismos.

Por otra parte, pese a que la sobrevivencia no fue afectada por la presencia de los comunicadores químicos, tal como en otros trabajos previos (Dodson y col., 1995; Rose y col., 2001), el porcentaje de hembras fecundadas en las mayores concentraciones de agua de peces (100 y 50 %) fue muy bajo en relación con el control. Estudios recientes demostraron que la mayoría de los copépodos utilizan señales químicas para reconocer y localizar a sus parejas durante la reproducción (señales denominadas feromonas) (Yen y col., 1991). Sin embargo, la presencia de otros estresantes (naturales o xenobióticos) en el medio podría interactuar con estas sustancias, obstaculizando la comunicación química entre los organismos. Al momento existen muy pocos estudios que evalúan el efecto de variaciones fisicoquímicas del medio sobre las feromonas (Steele y Henderson, 1992; Dodson y col., 1995), pero la presencia de exudados de peces probablemente podrían alterar la comunicación. Los comportamientos reproductivos en los copépodos son altamente complejos y requieren no sólo compatibilidad morfológica sino también etológica y, consecuentemente, un elevado consumo energético (Blades y Youngbluth, 1980; Maier, 1995). Por esta razón, el éxito reproductivo debería ser



estudiado en el contexto de las interacciones con sus aspectos etológicos, mecánicos y ambientales.

De manera similar a los resultados obtenidos en *Daphnia longispina* por Castro y col. (2007), algunos parámetros de la historia de vida de *N. conifer* actuaron de manera dependiente de la concentración del agua de peces, mientras que en otros casos, la mínima existencia de infoquímicos en el medio determinó cambios significativos. En este estudio, los análisis de correlación mostraron que el tiempo de desarrollo, el tamaño corporal, la proporción de hembras ovígeras y el número de huevos por hembra fueron afectados de una manera dependiente de la concentración. Por otra parte, y teniendo en cuenta el rango de diluciones empleados, el tiempo de formación del primer saco ovífero no aparenta estar relacionado con la concentración, es decir que la sola presencia de los peces fue suficiente para inducir respuestas.

Considerando el tiempo total de desarrollo de los organismos y el tiempo de formación del primer saco ovífero en las hembras fecundadas, los resultados obtenidos indican que la dilución al 6,25 % del agua de peces (0,41 pez l<sup>-1</sup>) sería el umbral mínimo para la detección de la presencia de posibles depredadores. Beckerman y col. (2007) y Castro y col. (2007) encontraron respuestas en cladóceros sometidos a infoquímicos de otros poecilidos de similar tamaño a concentraciones entre 3 y 0,5 pez l<sup>-1</sup>. Los cambios fenotípicos observados en el ciclo de vida de *N. conifer* a las mínimas concentraciones usadas en este trabajo evidencian que los copépodos son tan sensibles como los cladóceros. Sin embargo, si analizamos el tamaño corporal y el número de huevos por hembra como parámetros aislados, se observa que sólo los organismos de las mayores concentraciones mostraron diferencias significativas respecto a los del control. Estos resultados muestran la importancia de analizar la historia de vida completa de los organismos, exponiendo los estadios larvarios más sensibles a los comunicadores químicos a fin de conocer los umbrales de sensibilidad mínimos, tal como proponen Weider y Pijanowska (1993).

Finalmente, considerando los ajustes en el ciclo de vida observados en ese estudio, para las concentraciones entre 3,3 y 0,41 pez l<sup>-1</sup> podemos afirmar que *N. conifer* posee una considerable capacidad de reconocimiento de las señales químicas presentes en los exudados del pez *C. decemmaculatus*. Las respuestas son inmediatas y dependientes de la densidad de peces para la mayoría de los

parámetros analizados. Los mecanismos fisiológicos inducidos como estrategias para maximizar el fitness no alteraron la proporción de los estadios larvarios respecto al tiempo total de desarrollo, demostrando que *N. conifer*, en presencia de señales químicas de alarma respondieron acorde al modelo general propuesto por Hart (1990) para los copépodos de vida libre (desarrollo equiproporcional). Los ajustes a lo largo de la historia de vida constituyen una respuesta adaptativa a la presencia de depredadores selectivos del tamaño de las presas y son un importante ejemplo del rol de la depredación como fuerza selectiva en los ambientes naturales, delineando la evolución de los ciclos de vida y el comportamiento de los organismos. En este contexto, la selección natural favorecerá a aquellos organismos capaces de ajustarse a las condiciones ambientales adquiriendo sensibilidad a las señales químicas para anticiparse a esos cambios (Kerfoot y col., 1980).

En los ambientes naturales las respuestas adaptativas en relación a los comunicadores químicos podrían ser difíciles de detectar debido a la gran complejidad de interacciones entre individuos y otros componentes fisicoquímicos y biológicos en el ambiente. Dada la escasez de estudios que analizan estos ajustes en los ciclos de vida, se hace evidente la necesidad de continuar los análisis sobre los mecanismos de acción de los infoquímicos, las respuestas de otras especies de copépodos, y la incidencia de los efectos combinados con otros componentes (naturales o xenobióticos) del medio.

#### 5.2.2. Impacto del cromo y cobre sobre el ciclo de vida de *N. conifer*

Entre las variables analizadas en los ensayos de ciclo de vida con *N. conifer*, el tamaño corporal prácticamente no fue afectado por la exposición a los metales. Sin embargo, el tiempo en alcanzar el estado adulto, el número de hembras ovígeras y el modelo de desarrollo equiproporcional fueron severamente afectados por cobre y cromo en concentraciones relativamente bajas. Respecto al último parámetro mencionado, es importante destacar que el efecto detectado fue inverso al causado por la presencia de las kairomonas del pez *C. decemmaculatus*, ya que tales infoquímicos no modificaron el patrón de desarrollo. Cabe mencionar además, que cada metal incidió de manera diferencial sobre los parámetros de la historia de vida del copépodo.

Pese a que el tiempo de desarrollo fue significativamente afectado sólo en la mayor concentración de cobre, el cromo comenzó a ejercer sus efectos tóxicos a

partir de las concentraciones más bajas ( $7,5 \mu\text{g l}^{-1}$ ). En ambos casos, ocurrió un notable alargamiento del período normal, produciendo una postergación de la madurez sexual. En el caso de los copépodos expuestos a cobre, el período de desarrollo se incrementó proporcionalmente a la concentración empleada. En cambio, en el caso del cromo, este período se prolongó proporcionalmente hasta alcanzar un umbral máximo (a  $15 \mu\text{g l}^{-1}$ ), luego del cual se registró una tendencia a mantenerse constante. Este resultado estaría reflejando que los organismos no podrían postergar la madurez sexual un período mayor a 27-30 días, pese a los efectos negativos del cromo (al menos en condiciones experimentales). Probablemente debido a la existencia de restricciones fisiológicas o al elevado costo energético que a largo plazo podría afectar el *fitness* individual y el crecimiento de la población (Fox, 2000; Fox y Czesak, 2000).

Es sabido que una consecuencia importante de retardar el desarrollo radica en un significativo incremento en el tiempo generacional. En este sentido, Allan y Daniels (1982) y Gentile y col. (1982) demostraron mediante modelos poblacionales que la consecuencia de incrementar esta característica de la historia de vida, es una reducción en el tamaño de las poblaciones. La relevancia ecológica de esta reducción residiría en la alta probabilidad de extinción local en un mayor plazo, generando además serias consecuencias sobre el resto de las comunidades (Sibly y Calow 1986; Forbes y Calow 1996).

De la misma manera que el tiempo de desarrollo, la estabilidad proporcional de cada estadio larvario fue alterada de manera diferencial según el metal. Sólo los copépodos expuestos a la mayor concentración de cobre ( $3 \mu\text{g l}^{-1}$ ) modificaron su equiproporcionalidad en relación al control. Sin embargo, en el caso del cromo, esto ocurrió en las tres concentraciones más altas. Acorde al modelo equiproporcional propuesto para los copépodos, cada estadio larvario, mediado por procesos fisiológicos complejos, constituyen una proporción fija del tiempo total de desarrollo, y es totalmente independiente de factores naturales que podrían afectar el metabolismo (Hart, 1990)<sup>1</sup>.

Dada la constancia de este patrón de desarrollo y su relación con procesos fisiológicos internamente sincronizados y numerosos mecanismos hormonales promotores de los momentos de ecdisis, es razonable pensar que los xenobióticos

---

<sup>1</sup> Mayores detalles del modelo de desarrollo equiproporcional propuesto para los copépodos se describe en la Introducción (página 28, figura 2).

capaces de modificarlo, estarían actuando como verdaderos desorganizadores endócrinos (Le Blanc, 2007; Rodríguez y col., 2007). Más aún, considerando la existencia una fuerza -o restricción- que hace tan inflexible este patrón en los copépodos, aún ante la presencia de comunicadores químicos, cualquier alteración observada en él podría ser un importante indicador de toxicidad y de considerable relevancia ecológica en el campo de la ecotoxicología. Estos resultados reflejan la utilidad de este modelo de desarrollo para estudiar los tóxicos capaces de alterar los procesos de muda (Brown y col., 2003b) y constituye una contribución importante al conocimiento del cobre y cromo sobre los estadios de vida particularmente más sensibles durante el desarrollo de los copépodos.

Por otra parte, las variables reproductivas también fueron afectadas por ambos metales pero, con pocas excepciones, el cobre resultó menos tóxico que el cromo. La fecundidad y el tiempo de producción del primer saco ovífero fue afectado por el cobre sólo en la mayor concentración, pero el cromo resultó altamente tóxico para las mismas variables en todas las concentraciones testeadas.

Acorde a las teorías ecofisiológicas (Forbes y Callow, 1996), la designación de los recursos energéticos a diferentes actividades o estructuras implica un balance por parte del organismo. Esta posibilidad le permite priorizar ciertas características de la historia de vida en detrimento de otras, y es sabido que la sobrevivencia y mantenimiento individual constituyen la principal fuente de demanda energética. En este sentido, es probable que los organismos expuestos al cromo hayan establecido balances energéticos a favor de su supervivencia, resignando los parámetros reproductivos (Sterns, 1992). En esta línea, la necesidad de neutralizar la toxicidad de los metales implicó un costo energético alto, lo que se evidenció en un menor número de huevos y un mayor tiempo de la formación del primer saco ovífero.

Respecto al número de hembras ovíferas, éstas resultaron escasas en presencia de las concentraciones más altas de ambos metales. Estudios previos demostraron que los comportamientos de fecundación son extremadamente complejos en los copépodos, y requieren un elevado gasto energético (Blades y Youngbluth, 1980; Maier, 1995). Probablemente la presencia de los xenobióticos en el agua afectaron las interacciones necesarias entre machos y hembras alterando tanto los procesos pre- como post copulatorios (Yen y col., 1991).

Pese a que los valores agudos y crónicos para cromo establecidos por la Secretaría Nacional de Recursos Hídricos se encuentran por debajo de los

obtenidos con *N. conifer* (entre 3,7 y 5,3  $\mu\text{g l}^{-1}$ ), no ocurre lo mismo con los valores establecidos para cobre. El nivel crónico para este metal fue determinado en 3,9  $\mu\text{g l}^{-1}$ , sin embargo, las CENO, CEM y, principalmente el VSC obtenidos en este trabajo (entre 1,2 y 2,2  $\mu\text{g l}^{-1}$ ) demuestran que esta especie no está adecuadamente protegida.

Cabe mencionar que un aspecto importante a ser considerado sobre el efecto de los xenobióticos en los ecosistemas es la influencia del tiempo de exposición y la presencia de factores bióticos y abióticos en el medio. En este sentido, numerosos autores estudiaron la posible incidencia de estos componentes sobre la biodisponibilidad de los metales para los organismos acuáticos (Walker 1990; Castañé y col., 2003). Por esta razón, los resultados obtenidos en trabajos experimentales, a nivel de microcosmos y bajo condiciones controladas no podrían ser directamente extrapolados al ambiente. Sin embargo, estos estudios son valiosos en la medida que proveen información general sobre los posibles mecanismos de acción de los tóxicos y su influencia sobre ciertos parámetros de la historia de vida, lo que sería prácticamente imposible de evaluar en trabajos de campo.

Como conclusión de este análisis, los resultados demuestran que el cobre y el cromo alteran diferentes parámetros de la historia de vida de *N. conifer*. El tiempo de madurez sexual, el número de hembras ovígeras, el tiempo de la primera reproducción y la fecundidad fueron las variables más sensibles al estrés subletal. Estos parámetros constituyen no sólo buenos indicadores sino también de considerable significancia ecológica por sus implicancias a nivel poblacional y comunitario. Adicionalmente, el test propuesto de desviación del desarrollo equiproporcional podría ser de gran utilidad para comprender posibles alteraciones durante el tiempo de desarrollo. Finalmente, dada la gran sensibilidad de *N. conifer* (observada en los ensayos agudos y de ciclo de vida), su representatividad y frecuencia en los ambientes neotropicales, sugerimos a esta especie como un posible bioindicador en futuros tests ecotoxicológicos.

### 5.2.3. Impacto del cromo, cobre y endosulfán sobre el ciclo de vida de *P. variabilis*.

El análisis de los efectos de los metales sobre *P. variabilis* indicaron que el cobre resultó más tóxico que el cromo. Notoriamente este resultado invirtió lo reflejado por el copépodo *N. conifer*, quien mostró mayor sensibilidad a la toxicidad

de éste último. Este hecho concuerda con numerosos autores quienes sugieren que la selectividad de los contaminantes está estrechamente relacionada a la historia evolutiva, los ciclos de vida, la talla e interacciones biológicas de los organismos en cuestión (Koivisto 1995; Daniels y Allan 1982).

Entre los ocho parámetros del ciclo de vida analizados, la sobrevivencia, la longevidad, el número de huevos por hembra, tamaño medio de la camada y la tasa reproductiva neta ( $R_0$ ) fueron severamente alterados por el cobre. Sin embargo, la edad de la primera reproducción (EPR), el tiempo generacional (T) y la tasa intrínseca de incremento natural ( $r$ ) no resultaron afectados (exceptuando la mayor concentración:  $5 \mu\text{g l}^{-1} \text{ Cu}$ ). De manera similar, el cromo alteró prácticamente los mismos parámetros biológicos pero, como se mencionó anteriormente, éste fue comparativamente menos tóxico, ejerciendo su efecto negativo sólo en las concentraciones más altas.

Es sabido que los parámetros  $r$ ,  $R_0$  y T constituyen los principales indicadores de la dinámica de las poblaciones en la naturaleza. Entre ellos, numerosos autores propusieron a la tasa intrínseca de incremento poblacional ( $r$ ) como el principal integrador de los parámetros de la historia de vida de los organismos (edad de la primera reproducción, sobrevivencia, tamaño de la camada y longevidad), y su valor final es el resultado de la interacción matemática de dichos componentes (Lotka, 1925; Laughlin, 1965).

Pese a esta potencialidad, en este trabajo, el parámetro  $r$  no resultó ser el principal indicador de efecto de los metales sobre *P. variabilis*. A partir de la obtención de resultados similares, estudios previos sugieren que sólo aquellos tóxicos capaces de alterar la primera reproducción pueden causar una reducción significativa de  $r$  (Cole, 1954; Allan, 1976; Villarroel y col., 2003), confiriéndole una posición central a la primera reproducción sobre el resto de los componentes del indicador  $r$ . Desde una perspectiva más amplia e integradora, podríamos afirmar que los parámetros no afectados por los metales finalmente compensaron las alteraciones, manteniendo los valores de  $r$  cercanos e incluso superiores a los del control. Por esta razón, desde el punto de vista ecotoxicológico, la utilidad de  $r$  como parámetro sensible podría ser cuestionada.

Por otra parte, desde una perspectiva ecológica, sería razonable pensar que las ventajas de establecer compensaciones son sólo aparentes para las poblaciones naturales a mayor escala temporal. Es decir, el establecimiento de balances

energéticos entre la necesidad de neutralizar los tóxicos y el mantenimiento de las estructuras o funciones fisiológicas relevantes constituyen estrategias provisorias, pero insostenibles a largo plazo si los efectos tóxicos perduran en el tiempo (Stearns, 1992).

Finalmente, podríamos afirmar que pese al empleo frecuente de  $r$  como parámetro integrador de la historia de vida de los organismos, no siempre constituye el indicador de efecto más apropiado. Más aún, podríamos afirmar que si observáramos sólo el parámetro  $r$  en el presente trabajo, arribaríamos a conclusiones erróneas o poco reales respecto a la toxicidad de los metales. En este sentido, y coincidiendo con Villaroel y col., (2003), sería más valioso y efectivo examinar cómo la exposición crónica afecta a cada uno de los componentes individuales de dicho parámetro.

Por ejemplo, el análisis detallado del ciclo de vida de los organismos, muestra que la sobrevivencia resultó más sensible y representativa que  $r$ . En concordancia con esta observación, numerosos trabajos sugieren que la sobrevivencia es el índice más apropiado, dada su menor variabilidad respecto a los parámetros reproductivos, principalmente cuando los estudios involucran el ciclo de vida completo de los organismos (Daniels y Allan, 1981, Ingersoll y Winner, 1982). En este sentido, se podría afirmar que tanto el empleo de múltiples parámetros biológicos como un período de exposición integrador del ciclo de vida completo de los organismos serían más apropiados para alcanzar resultados más acordes a la realidad.

Cuando se analizó el insecticida con endosulfán, se observó que los principales indicadores poblacionales ( $r$ ,  $R_0$  y  $T$ ) fueron altamente afectados. Si bien la tasa intrínseca de crecimiento natural ( $r$ ) fue positiva ( $r > 0$ ), lo que refleja la capacidad teórica de las especies para crecer en un ambiente ilimitado, se observó una reducción importante en su valor final, especialmente en las mayores concentraciones. En este sentido, numerosos trabajos demuestran la relevancia ecológica de reducir  $r$  hacia cero a causa del estrés crónico. Estos autores estiman que las principales consecuencias residen en la posibilidad de extinción local en períodos temporales de mediano y largo plazo (Allan y Daniels, 1982; Gentile y col., 1982; Forbes y Calow, 1996). Por otra parte, el indicador  $R_0$ , definido como el número de huevos totales presentes en una población, ha sido considerado el más efectivo en estudios toxicológicos (Brita y col., 2002; Wang y col., 2007; 2009), lo que efectivamente concuerda con el presente trabajo. Finalmente, y a diferencia de

los efectos de los metales, el importante retardo del tiempo generacional (T) sugeriría la potencial incidencia negativa del insecticida sobre los procesos fisiológicos implicados en el desarrollo. En concordancia con esto se ha demostrado que el sulfato de endosulfán es un compuesto antiecdisteroide para *D. magna*, que actúa retrasando significativamente el proceso de muda (Palma y col., 2009).

Considerando los valores guía propuestos por la Secretaría Nacional de Recursos Hídricos para los ambientes de agua dulce, el presente caso resultó similar al del copépodo *N. conifer*. Los valores agudos y crónicos propuestos para cromo se encuentran por debajo de los obtenidos para *P. variabilis* ( $4,6 \mu\text{g l}^{-1}$ ), sin embargo, los valores establecidos para cobre superan las CEM obtenidas (valor crónico propuesto:  $3,9 \mu\text{g l}^{-1}\text{Cu}$ ; CEM para *P. variabilis*:  $2,5 \mu\text{g l}^{-1}\text{Cu}$ ). De la misma manera que para cobre, los niveles guía internacionales establecidos para endosulfán ( $0,056 \mu\text{g l}^{-1}$ , USEPA, 1980; 1986 y  $0,06 \mu\text{g l}^{-1}$ , CWQG, 2010) resultaron muy elevados respecto a los obtenidos para *P. variabilis* ( $0,018$  y  $0,053 \mu\text{g l}^{-1}$ ). Estas comparaciones indican que, de igual manera que para *N. conifer*, ésta especie no se encuentra adecuadamente protegida ante la presencia de cobre o endosulfán en el medio.

La comparación de la sensibilidad crónica a los tóxicos aquí analizados entre *P. variabilis* y *D. magna* revela que el cladócero ctenópodo es el más sensible. Por ejemplo, Kuhn y col., (1989) observaron que la menor concentración de cromo a la cual *D. magna* registra un efecto adverso en la fecundidad, es igual a  $21 \mu\text{g l}^{-1}$ , mientras que el mismo efecto sobre *P. variabilis* se observó a  $6,5 \mu\text{g l}^{-1}$ . De la misma manera, para el caso de cobre, Biesinger y Christensen (1972) registraron alteraciones reproductivas en *D. magna* a concentraciones entre  $35$  y  $55 \mu\text{g l}^{-1}$ , mientras que similares alteraciones en el cladócero *P. variabilis* fueron observadas a  $2,5 \mu\text{g l}^{-1}$ . Lamentablemente, al presente no hay información sobre *D. magna* respecto a los efectos crónicos del insecticida aquí empleado, pero estudios previos indican que la CENO de endosulfán (puro) para la eficiencia de alimentación fue de  $100 \mu\text{g l}^{-1}$  (De Lorenzo y col., 2002), y concentraciones similares son capaces de alterar el crecimiento y la reproducción de esta especie. Sin embargo, las CENO y CEM para *P. variabilis* fueron  $0,037$  y  $0,075 \mu\text{g l}^{-1}$  respectivamente para la EPR y número de huevos por hembra, entre otros parámetros reproductivos.

En esta línea cabe mencionar que pese a su frecuente empleo en estudios ecotoxicológicos, *D. magna* ha sido ampliamente criticada como organismo test.



Esto se debe a que su alta sensibilidad -como consecuencia de las particulares características de su tamaño corporal, hábitat e historia de vida, entre otras- tiende a sobreestimar la del resto de los organismos zooplanctónicos (Koivisto, 1995).

A modo general, el relativo gran tamaño de *D. magna* la torna vulnerable a la depredación por peces relegándola normalmente hacia ambientes efímeros o temporarios, donde los depredadores vertebrados son raros o inexistentes. Como resultado de esta presión de selección, esta especie es raramente representativa de ambientes contaminados. Por otra parte, los ambientes efímeros son susceptibles a amplias variaciones fisicoquímicas y biológicas del ambiente, y es posible que las adaptaciones a estos cambios la tornen también muy tolerante a la contaminación.

La historia de vida de *D. magna*, además, difiere de la de gran parte de los cladóceros que habitan los lagos someros, y es posible que especies con diferentes historias de vida reaccionen de manera diferente a situaciones de estrés por contaminación química. En este sentido, Collins (1980) propuso que bajo condiciones de estrés, los organismos tienden a preservar aquellas características más importantes para el fitness, en detrimento de los parámetros menos críticos, y los parámetros más vitales para los organismos pequeños no son necesariamente los mismos que para los más grandes.

Finalmente, pese a que *D. magna* podría ser un excelente organismo test para los xenobióticos cuya relativa toxicidad ya es conocida, sería definitivamente inapropiada para predecir el efecto de los xenobióticos en los ecosistemas naturales. Para obtener mayor información sobre el potencial tóxico de los xenobióticos es necesario estudiar las respuestas de especies que juegan un rol esencial en las respectivas comunidades cuyos ambientes están contaminados, tal como es *P. variabilis* para nuestra región.

Los datos obtenidos en este estudio muestran que los metales (cobre y cromo) y el insecticida con endosulfán son altamente tóxicos para numerosos parámetros del ciclo de vida de *P. variabilis*. Las CENO, CEM y el VSC indican que la sobrevivencia, longevidad, y tamaño medio de la camada constituyen los indicadores de efecto más apropiados para ser analizados.

Los resultados obtenidos en este trabajo con *P. variabilis* podrían ser comparados con los obtenidos por otros autores para *P. ramosa*, quienes analizaron su sobrevivencia ante seis contaminantes orgánicos e inorgánicos (Freitas y Rocha, 2011). Esta comparación sugiere que la elevada sensibilidad en ambas especies

sería una característica genérica, lo que sumado a su representatividad en los ambiente litorales neotropicales, su gran tamaño y pertenencia al orden Ctenopoda las tornan especies clave para futuros estudios ecotoxicológicos.

Finalmente, es importante mencionar que los ensayos realizados deberían ser continuados, especialmente mediante estudios multigeneracionales, a fin de obtener mayor información sobre su ciclo de vida (prácticamente desconocido) y para evitar subestimar el posible efecto de los xenobióticos en la naturaleza (Marcial y Hagiwara 2007).

### 5.3. Ensayos de comportamiento

#### 5.3.1 .Patrones normales

Como se mencionó en el apartado de los Resultados, en los ensayos preliminares de habilidad de escape, no se encontró correlación entre las sucesivas capturas y el número de individuos capturados. Esto indicaría que este estímulo no influyó en las respuestas a lo largo del tiempo. Pese a que algunos autores atribuyen diferentes respuestas del zooplancton a posibles acostumbramientos o aprendizaje (Pijanowska y col., 2006; Buskey, 1984), nuestros resultados concuerdan con los obtenidos por Szlawer (1963) quien encontró que cincuenta capturas sucesivas no influyeron en el comportamiento de escape de *D. pulex*.

Acorde a lo esperado, los ensayos definitivos mostraron que las especies estudiadas poseen diferentes patrones de comportamiento, tanto en la habilidad de escape como en los movimientos migratorios. El cladócono litoral *P. variabilis* fue el menos capturado en las velocidades baja y media, pero en la columna de agua mostró un comportamiento mas pasivo a lo largo del día, manteniéndose en el nivel inferior y realizando breves excursiones vespertinas (18 h). Estudios en campo revelan que este cladócono es una especie particularmente asociada a los ambientes litorales o altamente vegetados, coexistiendo con numerosos invertebrados depredadores táctiles tales como *Chaoborus*, noctonectidos, odonatos, camarones y belostomátidos (Neil, 1990; González Sagrario y Balseiro, 2010). En este sentido, el contacto con el fondo constituiría una cierta protección en ausencia de vegetación (fenómeno denominado tigmotaxis). Es probable que la gran sensibilidad a estímulos mecánicos sutiles y la permanencia en zonas profundas con un alto grado de agrupamiento sean un reflejo de las estrategias adquiridas evolutivamente frente a

los depredadores no visuales, que poseen movimientos migratorios inversos o bien complejos (Ohman, 1988).

*Argyrodiaptomus falcifer* fue el más capturado en la VL pero menos capturado en la VR al compararlo con el resto de las especies. Debido a su relativo gran tamaño comparado con otras especies zooplanctónicas (1,75 mm  $\pm$  0,14) y natación limnética, es lógico pensar que esta estrategia responde a la depredación por peces visuales selectivos (Zaret y Suffern, 1976) cuyos mecanismos de captura son más activos y rápidos (Lauder, 1980; Lazzaro, 1987). A diferencia de *P. variabilis*, este copépodo se mantuvo en las horas nocturnas en los niveles superiores, permaneciendo más dispersos durante el día, de la misma manera que *N. conifer*, aunque a una menor profundidad media, lo que posiblemente favorezca el aprovechamiento de los recursos y evite la competencia tanto intra- como interespecífica en la naturaleza.

Por otra parte, *N. conifer*, permaneció más disperso durante el día y agrupado durante las horas nocturnas. La ventaja adaptativa de seleccionar diferentes profundidades y niveles de agrupamiento ha sido bien estudiada desde el punto de vista ecofisiológico por numerosos autores (Young y Watt, 1993; Lampert y col., 2003; Lampert 2005). Por ejemplo, es sabido que el principal costo de agruparse reside en una mayor competencia intraespecífica y menor disponibilidad de alimento, pero las altas densidades locales también han sido identificadas como estrategias anti-depredador muy efectivas (Johnsen y Jacobsen, 1987).

Los cladóceros anomópodos *C. dubia* y *D. magna* permanecieron en una posición media en la columna de agua: *C. dubia*, mantuvo en ocasiones una distribución homogénea, pero realizó excursiones hacia la superficie a las 06:00 (antes del amanecer), asimilándose al patrón denominado "twiligh" (Cohen y Fordward, 2002). *D. magna*, en cambio, realizó un lento pero continuo ascenso entre las 06:00 y 18:00. Estos patrones más complejos, probablemente estén relacionados, en términos de causas últimas, tanto con la evasión a depredadores invertebrados como con la mayor eficiencia de filtración de las algas del medio (McLaren, 1963; Kerfoot y col., 1980). Si bien la interpretación sobre estos movimientos resulta limitada, ya que un fenotipo actual es el resultado de múltiples componentes endógenos y externos, éstos demuestran la importancia de la selección de hábitat como un verdadero proceso activo tendiente a maximizar el *fitness* (Gliwicz y col., 2006).

### 5.3.2. Efecto del AP sobre el escape

Considerando la presencia de señales de alarma, se puede afirmar que, en al menos una situación, las kairomonas realzaron la capacidad de escape de los organismos (en términos de mayor velocidad o “refinando” la sensibilidad). Estos resultados concuerdan con otros trabajos que evidencian el importante rol de la comunicación química en este tipo de respuestas rápidas (Pijanowska y col., 2006; De Mester y Pijanowska, 1996; Brewer y col., 1999), así como en la detección del alimento (Buskey, 1984; Poulet y Marsot, 1978) y localización de parejas (Griffith y Frost, 1976; Fleminger, 1967; Katona, 1973).

En general, *C. dubia* fue la especie con mayor capacidad de escape comparada con el resto, y particularmente con los copépodos, quienes comúnmente manifiestan mayor velocidad de nado. Estos resultados podrían ser un indicio de que la susceptibilidad a la depredación depende más de las capacidades perceptivas que de la velocidad o *performance* en los movimientos, especialmente en ambientes de estructura compleja. Estas interpretaciones han sido también sugeridas por Titelman (2001) quien encontró que los nauplios de *Acartia tonsa* y *Temora longicornis* registraron diferente susceptibilidad al mismo depredador pese a tener similar velocidad de escape. Adicionalmente numerosos autores encontraron que los cladóceros constituyen el principal ítem en la dieta de peces poecílidos, tales como *Cnesterodon decemmaculatus*, en ambientes naturales (Oliveros, 1980; Escalante, 1983). Intuitivamente se podría sugerir que estos organismos han desarrollado evolutivamente una elevada sensibilidad a los infoquímicos permitiendo adquirir un estado de alerta temprano y una ventaja sobre otros organismos menos preferidos.

### 5.3.3. Efecto del AP sobre la MVD

En los ensayos de migración vertical los organismos efectivamente manifestaron cambios fenotípicos en su comportamiento; sin embargo, en contraposición a lo esperado, éstos no siempre respondieron acorde al patrón inverso<sup>2</sup>. Notablemente, *A. falcifer* se mantuvo más disperso pero a menor profundidad media que en el control. La disminución de la densidad podría ser una

---

<sup>2</sup> Tal como fue descrito en la introducción (página 32), el patrón inverso ha sido estrechamente asociado por diversos autores a la presencia de depredadores vertebrados en los ambiente naturales. Éste implica un movimiento direccional hacia la superficie durante las horas nocturnas y hacia la profundidad de la columna de agua durante el día.

estrategia temporaria de seguridad frente a los depredadores visuales, al mismo tiempo que una efectiva ganancia para el fitness, tal como observó Gliwicz (2006) para algunos dáfnidos. Pese a que las elevadas densidades locales han sido identificadas como estrategias anti-depredación, especialmente hacia organismos visuales, numerosos autores consideraron estas estrategias como “maladaptativas”, dado que los peces serían capaces de realizar búsquedas intensivas en parches con organismos amontonados, optimizando la explotación de esos recursos. Adicionalmente, acorde al modelo de óptima elección de parches (Mc Naught y Hasler, 1961) los peces pueden recordar el valor nutritivo de cada sitio recorrido y no volver luego de haber explotado suficientemente los recursos. Contrariamente, en el resto de las especies de menor talla estudiadas (*N. conifer*, *C. dubia* y *P. variabilis*) se observó un mayor agrupamiento respecto a los respectivos controles. Considerando que el principal costo de agruparse radica en la menor disponibilidad de alimento, y que tales costos serían mayores para especies grandes y activas, es razonable pensar que estos organismos adquieran estrategias defensivas diferentes.

Otra respuesta interesante fue la permanencia significativa en niveles inferiores del cladóceros litoral *P. variabilis*, potenciado por la presencia de kairomonas. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por otros autores tanto en trabajos de campo (Pijanowska y Dawidowicz, 1987) como experimentales (Loose y Dawidowicz, 1994), y permiten reconsiderar el modelo de “permanecer abajo” como estrategia anti-depredación desarrollado por Vos y col. (2002). Tal comportamiento permitiría aumentar el *fitness* en la medida que reduciría los gastos energéticos que implica migrar, al tiempo que proveería importantes beneficios poblacionales manteniendo el tiempo óptimo de la primera reproducción y el tamaño de la camada.

Contrastando las respuestas fenotípicas observadas en los comportamientos de escape y migración de las cuatro especies regionales con los modelos teóricos clásicos frente a posibles depredadores (Hutchinson 1967; Zaret y Suffern, 1976; Lampert 1989), nos preguntamos: ¿por qué los organismos no adquirieron estrategias direccionales idénticas en todos los casos (hacia un patrón de migración inverso, un mayor grado de agrupamiento y escapando positivamente) frente a comunicadores químicos del mismo depredador? Este trabajo permite sustentar la hipótesis de que las diferentes respuestas etológicas de estas especies serían el resultado de múltiples componentes naturales externos interactuando con

particularidades endógenas fijadas evolutivamente (Vitasalo y col., 1998; Landry, 1978). En este sentido, la gran variabilidad en las condiciones físicas, químicas y biológicas de los sistemas en los cuales conviven estos organismos determinaría respuestas mucho más complejas que aquellas manifestadas en ambientes más estables o predecibles, sobre los cuales se desarrollaron aquellas hipótesis clásicas mencionadas. Sin embargo, sería interesante analizar en futuras investigaciones si, pese a las diferencias en las estrategias etológicas, los organismos adquieren similares ventajas, y más aún, si dichas similitudes son las que efectivamente permiten su coexistencia y desarrollo con éxito en estos ambientes.

#### 5.3.4. Efecto de los xenobióticos sobre el escape

Tanto la magnitud como el tipo de respuesta (mayor *versus* menor habilidad de escape que el control) manifestada por las cinco especies fueron diferentes según la velocidad de captura y la concentración del tóxico analizado. Sin embargo, a pesar de las diferencias particulares, se logró reconocer un interesante patrón de comportamiento entre los cladóceros y copépodos durante el relativamente corto tiempo de exposición ( $15 \text{ min} \pm 5$ ). Sólo con dos excepciones, los organismos zooplanctónicos expuestos a los metales (Cr y Cu) registraron un incremento del estado de alerta, el cual se reflejó en una mayor habilidad de escape del tubo de captura. Esta respuesta es consistente con los resultados registrados por Sullivan y col., (1983) quienes encontraron que los nauplios sometidos durante 24 h a concentraciones subletales de cobre manifestaban una gran hiperactividad. Este patrón de estimulación de la capacidad de escape producido por ciertos tóxicos también es similar a otras respuestas etológicas documentadas previamente (Sharp y Sterns, 1997; Calabrese y col., 1999; Brown y col., 2003a).

Sin embargo, tal como sugieren numerosos autores, esta aparente ventaja es cuestionable desde la ecotoxicología, dado que el incremento en un proceso fisiológico o un comportamiento podrían darse a expensas de otras características relevantes de la historia de vida de los organismos, generando serias consecuencias a mayor plazo (Forbes, 2000; Andersen y col., 2001). Una incompleta interpretación en este sentido, podría además proveer un gran problema en evaluaciones de riesgo.

Por otra parte, es importante mencionar que las respuestas observadas constituyen una reacción inmediata de los organismos a la exposición, con lo cual

podríamos hipotetizar que la elevada capacidad de escape corresponde más a una reacción involuntaria (acto reflejo) que una estrategia adaptativa. Más aún, el excesivo estado de alerta podría ser altamente negativo luego de un período corto de exposición si se consideran las interacciones depredador- presa. En esta línea, Guerritsen y Strickler (1997) demostraron que las consecuencias negativas de la hiperactividad en las presas se deben al aumento de la probabilidad de encuentro de ambos individuos en los ambientes naturales. Finalmente, es probable que el cansancio y pérdida de energía así como los daños fisiológicos ocasionados, pudieran promover una posterior disminución de la actividad natatoria (Preston y col., 1999). Dado que la actividad natatoria está estrechamente ligada a la de filtración, esta reducción podría generar además consecuencias serias en la eficiencia de alimentación, y por lo tanto en la energía disponible para el metabolismo general, crecimiento y reproducción (Gliwicz, 1994).

La primera excepción al patrón observado ocurrió con los copépodos expuestos a la mayor concentración de ambos metales a la VR ( $15 \text{ cm s}^{-1}$ ). Tal como lo mostraron los análisis estadísticos, su inhibición sería el resultado de la interacción de las dos fuentes de estrés (la elevada toxicidad de los metales y la elevada turbulencia a la VR, que podría haber causado una severa desorientación). La segunda excepción fue la actividad de escape de los cladóceros (principalmente anomópodos) a la menor velocidad (VL:  $0,27 \text{ cm s}^{-1}$ ), donde las vibraciones son suaves. Dado que no se requiere una elevada actividad natatoria a una velocidad de captura de  $0,27 \text{ cm s}^{-1}$ , hipotetizamos que a pesar de sus diferencias fisiológicas y morfológicas, la elevada captura de estos cladóceros podría estar relacionada a una inhibición de sus sistemas sensoriales. La relevancia ecológica de este aspecto reside en que los organismos contaminados podrían ser altamente vulnerables a ciertos depredadores específicos (por ejemplo los acechadores o ciertos invertebrados) (Viitasalo y col., 1998).

En los ensayos con endosulfán, mientras ambas concentraciones redujeron la habilidad de escape de los cladóceros, los copépodos respondieron de manera similar que para los metales, principalmente en las VL y VM ( $0,27$  y  $2,87 \text{ cm s}^{-1}$ ). Sin embargo, las mayores concentraciones de endosulfán inhibieron su capacidad de escape a la mayor velocidad de captura ( $15 \text{ cm s}^{-1}$ ).

Pese a que en esta tesis no se evaluó químicamente el modo de acción del endosulfán, estudios previos demostraron que este plaguicida es capaz de alterar la

actividad de la enzima acetilcolinesterasa (AChE), lo que podría obstaculizar ciertas funciones nerviosas y, consecuentemente las respuestas musculares (Bhavan y Geraldine, 2001). En este sentido, numerosos autores documentaron que este compuesto neurotóxico afecta ciertos comportamientos relacionados con la habilidad de escape tales como la natación, filtración y reproducción (Baudo, 1987; Hanazato, 2001). Adicionalmente, se ha observado que el endosulfán puede afectar el metabolismo y otros parámetros bioquímicos (Mc Kee y Knowles, 1986; Barry, 1999).

En general, en este trabajo se reconocieron dos tipos de respuestas, hiperactividad, con un elevado estado de alerta, generalmente a las menores concentraciones de los xenobióticos o la completa pérdida de habilidad de escape. Este característico comportamiento bifásico sugiere la existencia de un umbral para cada xenobiótico. Es probable que sobre tales límites de toxicidad, los organismos manifiesten la pérdida de habilidad de desarrollar adecuadas evaluaciones del medio debido a la inhibición de los sistemas sensoriales o motores. Desde una perspectiva más amplia, independientemente de la alteración (estimulación o depresión), esto podría generar una gran vulnerabilidad de los organismos a la depredación. El significado ecológico de sus consecuencias reside en el hecho que estos microcrustáceos son componentes clave de las redes tróficas acuáticas, poseen la capacidad de controlar los *blooms* de ciertas algas (Collumb y Buskey, 2004) y pueden transferir los tóxicos a los niveles tróficos superiores (Watras y col., 1998; Liu y col., 2002).

Los resultados obtenidos a partir de estos ensayos fueron comparados con estudios previos basados en otros parámetros considerados altamente sensibles tales como la sobrevivencia, longevidad, edad de la primera reproducción y número de huevos por hembra (Biesinger y Christensen, 1972; Winner y Farrel, 1976; Gagneten y Vila, 2001). Pese a la falta de mayor información al respecto, este estudio permitió detectar CENO y CEM mucho menores que los observados en los mencionados estudios. Por ejemplo, Suedel y col. (1996) determinaron que el valor crónico de cobre para *C. dubia* se encuentra entre 3,2 y 163  $\mu\text{g l}^{-1}$  los cuales son más elevados que las CEM obtenidos para la mayoría de las especies empleadas en este estudio. De manera similar, las CEM obtenidas para cromo (21  $\mu\text{g l}^{-1}$ ) (Kuhn y col., 1989) y endosulfan (100  $\mu\text{g l}^{-1}$ ) en *D. magna* (De Lorenzo y col., 2002) fueron



más altas que las calculadas para la misma especie utilizando la capacidad de escape como indicador de efecto.

Más aún, es importante mencionar que en el presente estudio la toxicidad subletal del cobre, cromo y endosulfán ocurrieron, en general, a concentraciones menores que las propuestas por la Secretaría Nacional de Recursos Hídricos de la Nación (2003; 2005) y por organismos internacionales (USEPA, 1980) para la protección de la biota acuática. En este sentido, pese a la necesidad de mayores evaluaciones y ajustes en este tipo de experiencias, nuestros resultados demuestran la elevada sensibilidad del escape y su potencialidad como bioindicador en futuros estudios.

Desde un punto de vista ecológico, los conocimientos actuales sobre el comportamiento alimenticio de peces zooplanctófagos indican que este comportamiento es un proceso altamente dinámico requiriendo 20-100 milisegundos, incluyendo instantáneas aceleraciones y provocando un fuerte flujo de agua desde el exterior hacia el interior de la cavidad bucal (Lauder, 1980). En este sentido, la velocidad de captura registrada en diferentes peces zooplanctófagos podría alcanzar o superar los  $40 \text{ cm s}^{-1}$  (Webb y Skadsen, 1980). Teniendo en cuenta esta información, y a fin de obtener resultados más consistentes con el comportamiento real de los organismos, se sugiere priorizar la velocidad más rápida de captura aquí empleada tanto para las interpretaciones como para los estudios futuros ya propuestos.

Finalmente, cabe destacar que, según nuestro conocimiento, este innovador ensayo constituye uno de los primeros estudios donde se analiza la sensibilidad de un comportamiento tan importante, como es el escape, en relación con xenobióticos. Sin embargo, lejos de ser una propuesta acabada, este trabajo intenta proponer una nueva línea de investigación, tendiente a detectar efectos tempranos y sensibles de diversos contaminantes.

#### 5.3.5. Efecto de los xenobióticos sobre la MVD

Tal como suponíamos, y en concordancia con las hipótesis de Dawidowicz y col. (1990) y Loose y col. (1993)<sup>3</sup>, cuando los organismos fueron sometidos a

---

<sup>3</sup> Las hipótesis planteadas por estos autores sugieren que el impacto de estresantes antropogénicos, nuevos en términos evolutivos para los organismos, podrían alterar el comportamiento migratorio,

estresantes antropogénicos (cromo y endosulfán) manifestaron en numerosas ocasiones, cambios en su comportamiento natural.

Como se mencionó anteriormente, bajo condiciones naturales, el cladóceros ctenopodo *P. variabilis* manifestó un patrón simple, permaneciendo la mayor parte del tiempo en las zonas más profundas de la columna experimental, con un gran índice de agrupamiento y realizando breves excursiones vespertinas. Sin embargo, cuando fue sometido a los tóxicos, este patrón de migración no sólo fue alterado sino revertido. De modo similar, este cambio fue además opuesto en mayor magnitud a las respuestas inducidas frente a los infoquímicos de los peces (ver efecto de las kairomonas sobre la MVD). Por esta razón, la desagregación y reversión de un patrón cuyas ventajas son muy importantes para la defensa podría acarrear serias consecuencias, principalmente el incremento de la vulnerabilidad a los depredadores y la reducción de la eficiencia de los balances energéticos (Christensen y col., 2005).

Entre los copépodos, *A. falcifer* del control se mantuvo posicionado durante todo el ciclo diario en el nivel más alto de la columna de agua, lo que podría favorecer la eficiencia de filtración del fitoplancton, que normalmente se establece en la zona fótica. Sin embargo, en presencia del cromo y endosulfán estos organismos realizaron movimientos migratorios que se reflejaron en variaciones importantes de la profundidad media. Es probable que la desorientación haya sido la principal causa de tales movimientos.

En contraposición al copépodo *A. falcifer*, *N. conifer* realizó movimientos migratorios, manteniéndose disperso durante el día y agrupado durante las horas nocturnas. Sin embargo, el cromo y endosulfán causaron la imposibilidad de realizar tales movimientos migratorios. En ambos casos los organismos se mantuvieron en una posición estable y a diferencia de las otras especies, con una tendencia a mantenerse agrupados. Ha sido demostrado que en presencia de situaciones de estrés los costos de mantenimiento individual poseen gran prioridad en el presupuesto energético (Forbes y Callow, 1996). Por lo tanto, es razonable pensar que al enfrentarse con los tóxicos, la opción de no descender en la columna de agua podría estar asociada con un menor *input* disponible de energía para estos movimientos. En términos comparativos con las proporciones humanas, el descenso

---

dado que sus mecanismos fisiológicos aún no están naturalmente adaptados para compensar los efectos tóxicos. Una mayor explicación se desarrolla en la página 33 del apartado Introducción.

de la longitud total de la columna de agua experimental para un organismo de 1,4 mm, implicaría caminar aproximadamente 1,37 km, pero si las condiciones fisiológicas son inapropiadas como consecuencia de una intoxicación, tales migraciones serían muy costosas e inapropiadas.

Como se mencionó durante la descripción de los patrones normales de migración, los cladóceros anomópodos *C. dubia* y *D. magna* se mantuvieron en una posición media en la columna de agua: *C. dubia*, realizando excursiones una hora previa al encendido de luz y *D. magna* realizando un lento pero continuo ascenso entre las 06:00 y 18:00. Sorpresivamente, ambas especies no fueron severamente afectadas por cromo, sin embargo, el endosulfán causó un ascenso hacia los niveles más altos durante las horas diarias (en algunos casos se observó a los organismos estrechamente asociados a la película de agua superficial).

Uno de los rasgos más notables de la exposición a los tóxicos fue la intensificación de las alteraciones durante las horas diurnas. Una posible interpretación reside en que las actividades metabólicas y nerviosas son mayores durante el día (como consecuencia de un incremento de la temperatura, alimentación o mayor estado de alerta), lo que podría haber activado los mecanismos de ingreso y acción de los tóxicos *sensu* Castañé y col. (2003). Sin embargo, pese a la necesidad de mayores investigaciones en esta línea, es razonable asumir la existencia de alguna fuerza o restricción etológica, que induce mayor constancia en la MVD durante la noche, aún bajo situaciones de estrés químico.

A pesar del conocimiento sobre los efectos del endosulfán como importante neurotóxico y desorganizador hormonal (Palma y col., 2009) y del cromo como compuesto capaz de alterar numerosas funciones metabólicas (Eisler, 1986), los mecanismos por los cuales estos xenobióticos afectan los comportamientos complejos, tales como MVD, requieren mayor claridad. Sin embargo, nuestros resultados permiten hipotetizar, en línea con otros autores, que la reducción en la actividad natatoria y la desorientación podrían ser las principales causas de estas alteraciones, impidiendo a las especies alcanzar el fitness óptimo y el mantenimiento de la dinámica poblacional (Goodrich y Lech, 1990; Christensen y col., 2005).

Finalmente, el presente trabajo constituye el primer registro de alteración en la MVD del zooplancton a causa de concentraciones subletales de xenobióticos, como son el cromo y el endosulfán. Pese a que la mayoría de los trabajos toxicológicos

emplean tests de toxicidad estándar (sobrevivencia y reproducción) por su simplicidad, se ha demostrado que frecuentemente tienden a subestimar el riesgo real que los contaminantes representan (Heugens y col., 2001). Por lo anteriormente mencionado y dada la importancia ecológica, sensibilidad, y *a priori*, gran capacidad de generalización a una amplia variedad de especies, la MVD podría ser un adecuado complemento en estudios ecotoxicológicos y una importante herramienta para evaluar los efectos de los contaminantes bajo escenarios más realistas.

#### 5.3.6. Efecto de las mezclas (*kairomonas* y *xenobióticos*) sobre ambos comportamientos (*escape* y *MVD*)

Los cambios observados sobre el comportamiento de escape y la migración de *N. conifer* y *C. dubia* permitieron reconocer que las interacciones entre el AP, conteniendo las señales químicas indicadoras de peligro, y los xenobióticos son capaces de generar más que simples efectos aditivos (Folt y col., 1999). Similares resultados fueron registrados en el comportamiento fototáctico de *D. magna* en presencia de *kairomonas* de peces y sometida a distintas concentraciones de cobre, cadmio y el plaguicida pentaclorofenol (Yuan y col., 2003) y en la selección de hábitat en diversos organismos contaminados con PCBs (Bernatowicz y Pijanowska, 2010). Estos últimos autores encontraron alteraciones muy complejas en este comportamiento, pero estrechamente ligadas a la sensibilidad específica.

En nuestro caso, la aplicación del Cr en presencia del AP inhibió significativamente la capacidad de los copépodos de reaccionar a las señales de alarma e incrementar su escape, mostrando una respuesta completamente inversa a la manifestada sólo en presencia del AP. Dada la magnitud del cambio, se podría decir que el cromo actuó de manera independiente, siendo relevante y ejerciendo prácticamente el mismo efecto que cuando se lo adicionó solo. Similares respuestas fueron observadas por otros autores, quienes encontraron que la incidencia ciertos tóxicos, especialmente metales pesados, inhiben las respuestas fenotípicas de los organismos frente a sus depredadores (Jansen, 1995; Barry, 1999; Hanazato, 2001; Sakamoto y col., 2006; Coors y DeMester, 2008; Collen, 2008; Bernatowicz y Pijanowska, 2010). Por su parte, Mirza y Pyle (2009) mostraron que bajas dosis de Cu interfieren con la habilidad de *Daphnia* de responder mediante cambios morfológicos a las señales de alarma liberadas por *Chaoborus*. Ellos coinciden en que la inhibición de las respuestas a causa de los efectos tóxicos pueden tener

importantes consecuencias, en términos de mayor depredación, cuando los depredadores son más tolerantes que las presas (Preston y col., 1999).

En nuestro trabajo, los organismos fueron enfrentados a las kairomonas de *C. decemmaculatus*, un pez zooplanctófago significativamente representativo de la fauna regional, cuya sensibilidad a diferentes tóxicos ha sido estudiada en numerosas ocasiones (Villar y col., 2000; Villar y col., 2001; Carriquiriborde y col., 2007). Estos trabajos demuestran una relativa mayor tolerancia del mismo a los metales y otros plaguicidas, en comparación con la sensibilidad de sus presas zooplanctónicas. En este sentido, es posible suponer que el desequilibrio de tolerancias sea altamente desfavorable para éstos últimos en un corto plazo. Sin embargo, desde una perspectiva evolutiva, y a un mayor tiempo de exposición, es posible suponer que tal desventaja desfavorecerá también a los peces, debido a una progresiva e irreversible disminución de los recursos (Kerfoot y col., 1980).

Contrariamente, al analizar la interacción del insecticida con el AP, se observó un efecto sinérgico sobre el comportamiento de escape de *N. conifer* a las VM y VR. La respuesta manifestada fue una mayor capacidad de escape respecto a la de ambos componentes adicionados individualmente, o a la simple sumatoria de cada uno de ellos. Trabajos previos indican que los plaguicidas, y en especial los insecticidas, tienden a generar frecuentemente efectos aditivos o sinérgicos, tales como el observado en este trabajo. Esto se debe a que ambos componentes comparten el sitio de acción en los sistemas biológicos, interfiriendo de esta manera con las interacciones depredador- presa (Rose y col., 2001; Dodson y col., 2005).

A modo general, los insecticidas neurotóxicos como el endosulfán pueden estimular los mismos nervios colinérgicos que inervan los receptores de las kairomonas, o los mismos nervios que estimulan las glándulas endocrinas que liberan las hormonas responsables de inducir las respuestas fenotípicas frente a las señales químicas de alarma (Barry y Logan, 1998). Se ha demostrado, por ejemplo que el endosulfán tiende a potenciar el desarrollo de la cresta en *Daphnia* a concentraciones subletales, mediante el bloqueo de ácido alfa-aminobutírico (GABA): un neurotransmisor que inhibe la transmisión de los nervios colinérgicos, es decir estimulando la transmisión colinérgica. En contraste, mayores concentraciones pueden disminuir la formación de la cresta, probablemente debido a un aumento de los costos energéticos que implica la detoxificación (Barry y Logan, 1998). En este sentido, estos autores remarcan la desventaja que genera la inducción de defensas

por estos compuestos en ausencia de depredadores, y sugieren que tales respuestas podrían ser “maladaptativas” para los individuos, y consecuentemente para la población.

Similar efecto sinérgico de ambas mezclas se observó en el cladóceros *C. dubia* a la menor velocidad de captura (VL). La escasa turbulencia, debido al suave descenso del tubo, probablemente generó una gran desorientación y la pérdida de noción del peligro, favoreciendo de esta manera, una mayor captura (Sutterlin, 1974). Sin embargo, en las VM y VR, los efectos conjuntos del Cr y AP fueron aditivos, provocando una aceleración del metabolismo e incrementando la capacidad de escape. Contrariamente, el endosulfán generó una reducción en la magnitud de la respuesta hacia las kairomonas, lo que podría ser interpretado, según las hipótesis fisiológicas de los balances energéticos, como un efecto antagónico negativo para el fitness de los organismos. Si bien son escasos los trabajos que registran efectos antagónicos entre los plaguicidas y las señales químicas de alarma (Coors y col., 2004; Coors y De Meester, 2008), es muy probable que el comportamiento de las mezclas sea un fenómeno especie- específico, y, en este sentido, los organismos responderán de manera diferente según su historia de vida y patrones de distribución energética (Bernatowicz y Pijanowska, 2010).

La migración vertical diaria esperada para ambas especies en relación al AP fue modificada por las mezclas de manera muy compleja, dependiendo de la mezcla y la especie analizada. Como primera aproximación, estas modificaciones estarían manifestando una importante desorientación a causa de una doble situación de estés químico. Sin embargo, considerando la importancia de los balances energéticos para las historias de vida, una gran reducción en la fuente de energía debido a la necesidad de neutralizar los tóxicos, podría ser considerada la principal causa de las alteraciones observadas. En este sentido y coincidiendo con Preston y col. (1999), las interacciones entre varios estresantes conjuntos tienden a disminuir el fitness de mayor manera que cuando actúan individualmente.

*Notodiptomus conifer*, contrariamente al comportamiento de “mantenerse abajo”, manifestó un notable ascenso al medio día en presencia de la mezcla Cr + AP. Si tal comportamiento ocurre en condiciones naturales, su vulnerabilidad ante los posibles depredadores se incrementaría notablemente. Sin embargo, seis horas posteriores se observó un descenso hacia la misma profundidad alcanzada ante la presencia del AP, permaneciendo aún más profundamente que los del control. Lo

mismo ocurrió con el insecticida durante todo el ciclo diario de *N. conifer*, ya que ante la presencia de la mezcla, los copépodos descendieron más profundamente que cuando fueron sometidos sólo al AP. Dado que el descenso en la columna de agua frente al peligro de ser depredado confiere numerosas ventajas adaptativas (Lampert, 1989; Dodson, 1990; Loose y Dawidowicz, 1994), la potenciación de este fenómeno en presencia del endosulfán, podría sugerir un efecto notablemente sinérgico entre los componentes de la mezcla (endosulfán y AP), tal como observaron otros autores con plaguicidas similares (Hanazato, 1998).

De igual manera que *N. conifer*, el cladóceros *C. dubia*, mostró importantes alteraciones en la MVD al ser sometido a las mezclas. Cuando se incorporó el Cr al AP, no realizó movimientos verticales, manteniéndose en un nivel profundo y estable a lo largo del día. En presencia del endosulfán y el AP manifestó movimientos prácticamente inversos a los esperados, y en todos los casos se mantuvo más agrupado durante todo el ciclo diario.

Estos resultados permiten observar, en concordancia con otros trabajos previos, que las concentraciones subletales de diversos xenobióticos pueden causar consecuencias serias en los organismos, no sólo mediante sus procesos directos sino también mediante procesos indirectos, provocando importantes interrupciones sobre las interacciones depredador- presa (Hanazato, 1998). Sin embargo éstos últimos constituyen los más relevantes para prever los riesgos sobre las poblaciones naturales y entender los cambios sobre los procesos evolutivos a causa de los xenobióticos (Boyd, 2010).

En ciertos casos, los contaminantes pueden imitar el efecto de los comunicadores químicos y, en otras situaciones inhibir la inducción de las defensas, siendo capaces en conjunto de disturbar las interacciones necesarias para el funcionamiento integral de los ecosistemas (Dodson y Hanazato, 1995; Barry, 2010). Las respuestas fenotípicas implican grandes costos para el organismo, y si tales respuestas son inducidas por los xenobióticos, podrían ser consideradas “maladaptativas”, incrementando notablemente el riesgo de extinción local (Preston y col., 1999).

Por otra parte, dado que los procesos de detoxificación y reparo de los daños causados por los xenobióticos son altamente costosos, pueden restar la energía disponible para el desarrollo de las estrategias anti-depredación, tornando a los organismos más vulnerables (Barry, 2000). De manera inversa, las respuestas de los

individuos a la presencia de los depredadores podría reducir la tolerancia a estresantes antropogénicos (Hanazato, 2001).

Finalmente, considerando que la variabilidad genética constituye un componente clave en el mantenimiento de las poblaciones, especialmente por estar expuestas a múltiples factores de estrés, sería interesante analizar, desde un punto de vista evolutivo, en qué sentido actuaría la selección natural. A partir de recientes pero escasas investigaciones, una primera aproximación sería pensar que la selección favorecerá a aquellos individuos capaces de desarrollar estrategias defensivas, aún en presencia de contaminantes (Collen, 2008; Bernatowicz y Pijanowska, 2010). Es decir, serán potencialmente seleccionados aquellos individuos que desarrollen resistencia suficiente a los tóxicos, que les permita además sobrevivir a los depredadores y perpetuar en el ambiente. Teniendo en cuenta el carácter xenobiótico de los contaminantes, es también razonable pensar que tales individuos no sean justamente aquellos más frecuentes en la población, generando un proceso de empobrecimiento genético, con predominio parcial o total de los genotipos resistentes. Este fenómeno de “cuello de botella” tendría dos consecuencias principales: la reducción de la diversidad biológica y el aumento de la proporción de contaminantes alojados en el compartimiento biológico de los ecosistemas. En conclusión, es posible afirmar que los trabajos (tales como esta tesis) tendientes a analizar los efectos de múltiples estresantes sobre los parámetros biológicos más sensibles los organismos, suelen arribar a resultados complejos para su interpretación, pero efectivamente más acordes a la realidad.



## 6. CONCLUSIONES

### 6.1. Toxicidad aguda:

- El presente trabajo constituye un aporte científico al conocimiento de la sensibilidad de *Notodiaptomus conifer*, *Argyrodiaptomus falcifer* y *Pseudosida variabilis* a los tres xenobióticos empleados. Esto se debe a que la información disponible sobre estas especies era inexistente, previo al desarrollo de esta tesis.
- Entre los cinco microcrustáceos estudiados, el copépodo *A. falcifer* fue en general, el más tolerante. Los cladóceros *P. variabilis*, *Ceriodaphnia dubia* y el copépodo *N. conifer* fueron moderadamente sensibles y *Daphnia magna* manifestó gran sensibilidad al cromo pero no al cobre y endosulfán.
- Comparando los resultados obtenidos con los publicados en trabajos previos nacionales e internacionales, *D. magna* resultó ser más sensible al cromo y al endosulfán que lo esperado. De igual manera, la sensibilidad al endosulfán de *C. dubia* fue mayor a la registrada con anterioridad y, respecto a los valores de toxicidad aguda de cromo y cobre, éstos se mantuvieron dentro de un rango similar a los obtenidos por otros investigadores. *N. conifer* mostró mayor sensibilidad a otras especies de copépodos de agua dulce, y en comparación con otros macrocrustáceos regionales, los cinco microcrustáceos estudiados resultaron mucho más sensibles a los tres tóxicos.

### 6.2. Ciclo de vida del copépodo *N. conifer* y del cladóceros *P. variabilis*:

- El presente trabajo permite concluir que el copépodo *N. conifer* es tan sensible como los cladóceros a los comunicadores químicos (kairomonas) de sus depredadores vertebrados, en este caso, del pez *C. decemmaculatus*.
- Ante la detección de las “señales de alarma”, éste es capaz de manifestar cambios en su ciclo de vida, mostrando una amplia plasticidad fenotípica.

Dicha plasticidad constituye una respuesta positiva que se manifiesta en un menor tiempo de desarrollo, madurez temprana y menor tamaño corporal al alcanzar el estadio adulto.

- Pese a tales cambios, su desarrollo no se desvía de la equiproporcionalidad, acorde a los modelos teóricos vigentes para los copépodos de vida libre. Es decir, mantiene inflexible la proporción del tiempo de cada estadio a lo largo del desarrollo ontogénico.
- Considerando los efectos de los xenobióticos, el cobre y el cromo inducen respuestas negativas sobre el ciclo de vida de *N. conifer*, postergando el tiempo para alcanzar el estado adulto, reduciendo el número de hembras ovígeras y alterando el modelo de desarrollo equiproporcional. En líneas generales, el cromo es más tóxico que el cobre.
- Respecto al cladócero *P. variabilis*, tanto los metales como el endosulfán (formulado) son altamente tóxicos para diversos parámetros de su ciclo de vida. En general, la sobrevivencia, longevidad, y tamaño medio de la camada constituyen los indicadores de efecto más sensibles. En este caso, entre los metales, el cobre resultó más tóxico que el cromo.
- Dada la sensibilidad de *N. conifer* y *P. variabilis*, estas especies se podrían proponer como posibles bioindicadoras en futuros trabajos ecotoxicológicos. Esto se fundamenta en la gran sensibilidad aguda y crónica al cromo, cobre y endosulfán en relación con otros organismos tradicionalmente empleados en estudios ecotoxicológicos, así como por su alta representatividad en los ambientes neotropicales.

### 6.3. Comportamiento:

- Las modificaciones registradas en los comportamientos de escape y migratorios de los microcrustáceos del zooplancton expuestos a comunicadores químicos (kairomonas) o contaminantes, permiten validar la hipótesis propuesta.

- Si bien las cinco especies aquí estudiadas manifestaron diferentes patrones de comportamiento, la presencia de kairomonas de *C. decemmaculatus* potenció la habilidad de escape, siendo *C. dubia* la especie menos capturada.
- De igual manera, ante las señales de alarma, las cinco especies manifestaron cambios fenotípicos en la MVD. Sin embargo estos comportamientos no respondieron acorde al patrón esperado, lo que permite proponer nuevas líneas de investigación tendientes a analizar más detalladamente sus estrategias ante posibles depredadores.
- Los efectos de los xenobióticos sobre la habilidad de escape fueron “bifásicos”: por un lado, generando hiperactividad, con un elevado estado de alerta, especialmente a las menores concentraciones, y por otro hipoactividad y pérdida de habilidad de escape. Este característico comportamiento bifásico sugiere la existencia de un umbral para cada xenobiótico, que podrán establecerse con investigaciones futuras.
- De modo particular, la exposición de los organismos a los metales generó un mayor escape del tubo de captura. Sin embargo se registraron dos excepciones, donde esta habilidad fue inhibida: cuando los copépodos se sometieron a la interacción entre la mayor concentración de metales y la VR, y cuando los cladóceros se sometieron a la mayor concentración de metales y la VL.
- La exposición al endosulfán (formulado) redujo la habilidad de escape de los cladóceros en todos los casos, pero la incrementó en los copépodos, exceptuando la interacción entre las mayores concentraciones y la VR, donde también fueron inhibidos.
- Respecto a la MVD, tanto el cromo como el endosulfán (formulado) alteraron en diferente grado el comportamiento migratorio esperado, provocando principalmente modificaciones en la profundidad media y en el nivel de agrupamiento de los microcrustáceos. En algunos casos, como en el de *P.*

*variabilis*, tales alteraciones fueron muy notorias por generar la reversión total del patrón esperado. En otras oportunidades, se observó una diferenciación según el tóxico, como lo ocurrido con *C. dubia* y *D. magna*, ya que la migración de ambas no fue severamente afectada por el cromo, pero sí por el endosulfán (formulado).

- Las interacciones entre el AP y los xenobióticos generaron más que simples efectos aditivos tanto en el comportamiento de escape como en la migración de *N. conifer* y *C. dubia*. En algunos casos, imitando el efecto de los comunicadores químicos (principalmente las mezclas con endosulfán) y, en otras situaciones, inhibiendo la inducción de las defensas (principalmente las mezclas con cromo). Esto demuestra que los contaminantes pueden ejercer efectos indirectos interfiriendo en las relaciones interespecíficas.
- Respecto a las normativas vigentes, y teniendo en cuenta sólo la toxicidad aguda, los niveles de cobre y cromo propuestos por la Secretaría Nacional de Recursos Hídricos para la protección de la fauna de agua dulce, serían adecuados para proteger la sobrevivencia de los microcrustáceos estudiados a corto plazo. Sin embargo, considerando la toxicidad crónica, si bien el nivel guía propuesto para cromo sería acorde a la sensibilidad registrada para *N. conifer* y *P. variabilis*, el nivel guía propuesto para cobre supera las CENO y las CEM obtenidas en este trabajo. Esto indica claramente que dicho nivel no protege adecuadamente ambas especies.
- Finalmente, las alteraciones en la habilidad de escape y los movimientos migratorios como indicadores de efecto, revelan que la toxicidad del cobre, cromo y endosulfán ocurre a concentraciones aún menores que las estimadas por las entidades nacionales e internacionales mencionadas. De igual manera, la sensibilidad de ambos comportamientos fue mucho mayor que la de otros indicadores tradicionalmente empleados. Cabe mencionar que dada la sensibilidad y relevancia ecológica de los comportamientos de escape y migratorio, la existencia de mínimas concentraciones de estos xenobióticos en el ambiente podría influir negativamente no sólo sobre los organismos sino también en la estructura y dinámica del ecosistema.

- Por lo anteriormente mencionado, podemos aceptar la segunda hipótesis propuesta, demostrando que los comportamientos de escape y migratorios de microcrustáceos son parámetros sensibles al efecto de xenobióticos.
- En este sentido, se sugiere el estudio de ambos comportamientos como parámetros complementarios tanto en estudios ecológicos como ecotoxicológicos. Adicionalmente, entre estos comportamientos, se propone al escape como un potencial bioindicador de contaminación ambiental. Esto radica en su elevada sensibilidad, demostrada mediante su comparación con otros parámetros tradicionalmente considerados sensibles. Se sugiere además priorizar la velocidad de captura rápida (VR) a fin de obtener resultados más consistentes con el comportamiento real de los organismos.
- Finalmente, el diseño de un dispositivo *ad hoc* para la cuantificación de las alteraciones en el comportamiento de escape permitió obtener información precisa y comparable sobre la habilidad de escape de los organismos. Dada su facilidad de manipulación, pequeño tamaño y amplia capacidad de aplicación a diversas especies, se lo propone como una herramienta metodológica adecuada para futuras investigaciones en el campo de la ecología aplicada.

## 7. Referencias bibliográficas

- Achiorno C.L.; Villalobos C. de y Ferrari L. (2008) Toxicity of herbicide glyphosate to *Cordodes nobilii* (Gordiida Nematomorpha). *Chemosphere* 71:1816-1822.
- Agrawal A.A. (2001) Phenotypic plasticity in the interactions and evolution of species. *Science* 29: 321-326.
- Aladin N.V. y Potts W.T. (1995) Osmoregulatory capacity of the cladocera. *Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology* 164(8): 671-683.
- Allan D.J. (1976) Life history patterns in zooplankton. *The American Naturalist* 110: 165-180.
- Allan D.J. y Daniels R.E. (1982) Life table evaluation of chronic exposure of *Eurytemora affinis* (Copepoda) to kepone. *Marine Biology* 66: 179-184.
- APHA, AWWA, and WEF (2005) Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 21st ed. American Public Health Association, Washington, D.C.
- Andersen H.R.; Wollenberger L.; Halling-Sorensen B. y Ole Kusk K. (2001) Development of copepod nauplii to copepodites- A parameter for chronic toxicity including endocrine disruption. *Environmental Toxicology and Chemistry* 20 (12): 2821-2829.
- Anderson D.H. y Benke A. (1994) Growth and reproduction of the cladoceran *Ceriodaphnia dubia* from a forested floodplain swamp. *Limnology and Oceanography* 39(7): 1517-1527.
- Aránguiz-Acuña A.; Ramos-Jiliberto R.; Sarma N.; Sarma S.S.S.; Bustamante R.O. y Toledo V. (2010) Benefits, costs and reactivity of inducible defenses: an experimental test with rotifers. *Freshwater Biology* 55(10): 2114-2122.
- Baird D.J.; Barber I.; Bradley M.; Calow P. y Soares A.M. (1989) The Daphnia bioassays: A critique. *Hydrobiologia* 188: 403-406.
- Ballesteros M.L.; Wunderlin y Bistoni M.A. (2009) Oxidative stress responses in different organs of *Jenynsia multidentata* exposed to endosulfan. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 72(1): 199-205.
- Barbour M.T.; Graves C.G.; McCulloch W.L. (1989) Evaluation of the intrinsic rate of increase as an endpoint for *Ceriodaphnia* chronic tests. En: Aquatic Toxicology and Environmental Fate (Suter G.W. y Lewis M.A., eds.), Philadelphia, pp 273-288.
- Barnes R.S.K. y Mann K.H. (1991) Fundamentals of aquatic ecosystems. Blackwell Scientific Publications 229 p.
- Barros M.E. (2004) Alimentación de *Astyanax abramis* (Characiformes: Characidae) en el embalse Cabra Corral, Salta, Noroeste de Argentina. *Revista AquaTIC* 20: 88- 96.
- Barry M.J. (1999) The effects of a pesticide on inducible phenotypic plasticity in Daphnia. *Environmental Pollution* 104: 217-224.

- Barry M.J. (2000) Effects of endosulfan on *Chaoborus*-induced life-history shifts and morphological defenses in *Daphnia pulex*. *Journal of Plankton Research* 22 (9):1705–1718
- Barry M.J. (2010) Effects of copper, zinc and dragonfly kairomone on growth rate and induced morphology of *Bufo arabicus* tadpoles. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 74(4): 918-923.
- Barry M.J. y Logan D.C. (1998) The use of temporary pond microcosms for aquatic toxicity testing: direct and indirect effects of endosulfan on community structure. *Aquatic Toxicology* 41, 101–124
- Baudo R. (1987) Ecotoxicology testing with *Daphnia*. En: *Daphnia* (Peters R.H. y De Bernardi R., eds.), A special edition of *Memorie dell'Istituto Italiano di Idrobiologia*. Pallanza, Italy, pp 461-482.
- Baudouin M.F.; Scoppa P. (1974) Acute toxicity of various metals to freshwater zooplankton. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 12: 745-751.
- Beckerman A.P.; Kieski K. y Baird D.J. (2007) Behavioural versus physiological mediation of life history under predation risk. *Oecologia* 152: 335- 343.
- Belanger S.E.; Farris J.L. y Cherry D.S. (1989) Effects of diet, water hardness, and population source on acute and chronic copper toxicity to *Ceriodaphnia dubia*. *Archive of Environmental Contamination and Toxicology* 18: 601–611.
- Bellavere C. y Gorbi J. (1981). A comparative analysis of acute toxicity of chromium, copper and cadmium to *Daphnia magna*, *Biomphalaria glabrata*, and *Brachydanio rerio*. *Environmental Technology* 2(3): 119-128.
- Bentkowska P.; Markowska M. y Pijanowska J. (2010) Role of melatonin in the control of depth distribution of *Daphnia magna*. *Hydrobiologia* 643:43-50.
- Bernatowicz P. y Pijanowska J. (2010) *Daphnia* response to biotic stress is modified by PCBs. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 74(4): 711-718.
- Bhavan S.P. y Geraldine P. (2001) Biochemical stress responses in tissues of the prawn *Macrobrachium malcolmsonii* on exposure to endosulfan. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 70: 27–41.
- Biesinger K.E. y Christensen G.M. (1972) Effects of various metals on survival, growth, reproduction, and metabolism of *Daphnia magna*. *Journal of Fisheries Research Board of Canada* 29: 1691-1700.
- Birch L.C. (1948) The intrinsic rate of natural increase of an insect population. *Journal of Animal Ecology* 17: 15-26.
- Blades P.I. y Youngbluth M.J. (1980) Morphological, physiological, and behavioral aspects of mating in calanoid copepods. En: *Evolution and Ecology of zooplankton Communities* (Kerfoot, WC., ed.), University Press of New England, NH, pp 39-51.
- Boriss H.; Boersma M. y Wiltshire K.H. (1999) Trimethylamine induces migration of waterfleas. *Nature* (398): 382.

- Borowitzka M.A. y Borowitzka L.J. (eds.) (1988) *Microalgal Biotechnology*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Bossuyt B.T.; De Schampelaere K.A. y Janssen C.R. (2004) Using the biotic ligand model for predicting the acute sensitivity of cladoceran dominated communities to copper in natural surface waters. *Environmental Science and Technology*. 38(19): 5030-5037.
- Boyd R.S. (2010) Heavy metal pollutants and chemical ecology: exploring new frontiers. *Journal of Chemical Ecology* 36: 46-58.
- Brewer M.C.; Dawidowicz P. y Dodson S.I. (1999) Interactive effects of fish kairomones and light on *Daphnia* escape behavior. *Journal of Plankton Research* 21(7): 1317-1335.
- Brita T.A.M.; Janssen C.R. y Bossuyt T.A. (2002) Tolerance and acclimation to zinc of field-collected *Daphnia magna* populations. *Aquatic Toxicology* 56:69-79.
- Brooks J.L. (1959) Cladocera. En: *Freshwater biology* (Edmondson W.T., ed.), 2<sup>nd</sup> ed. Wiley, NewYork pp, 587-656.
- Brown C.; Davidson T. y Laland K. (2003b) Environmental enrichment and prior experience of live prey improve foraging behaviour in hatchery-reared *Atlantic salmon*. *Journal of Fish Biology* 63 (1): 187-196.
- Brown R.J.; Rundle S.D.; Hutchinson T.H.; Williams T.D. y Jones M.B. (2003a). A copepod life-cycle test and growth model for interpreting the effects of lindane. *Aquatic Toxicology* 63: 1-11.
- Brylinski J.M. (1984) Anomalies morphologiques chez le genre *Acartia* (Crustacea: Copepoda): description et essai de quantification. *Journal of Plankton Research* 6: 961-965.
- Buikema A.L. Jr. y Benfield E.F. (1979) Use of macroinvertebrate life history information in toxicity tests. *Journal of Fish Research B* 36: 321-328.
- Buikema A.L. Jr.; Niederlehner B.R. y Cairns J. Jr. (1982) Biological monitoring. Part IV. Toxicity testing. *Water Research* 16: 239 - 262 .
- Buskey E.J. (1984) Swimming pattern as an indicator of the roles of copepod sensory systems in the recognition of food. *Marine Biology* 79: 165-175.
- Calabrese E.J.; Baldwin L.A.; Holland C.D. (1999) Hormesis: A highly generalizable and reproducible phenomenon with important implications for risk assessment. *Risk Anal* 19:261-281.
- Call D.J. et al. (1983) Toxicity and metabolism studies with EPA priority pollutants and related chemicals in freshwater organisms.. En: U.S. EPA. (1985). *Ambient Water Quality Criteria for Chromium 1984*. Criteria and Standard Division, U.S. Environmental Protection Agency, Washington.
- Canadian Water Quality Guidelines, CWQG (2010) Canadian Council of Ministers of the Environment. 2010. Canadian water quality guidelines for the protection of aquatic life: Endosulfan. In: Canadian environmental quality guidelines, 1999, Canadian Council of Ministers of the Environment, Winnipeg.



- Carlotti F. y Sciandra A. (1989) Population dynamics model of *Euterpina acutifrons* (Copepoda: Harpacticoida) coupling individual growth and larval development. *Marine Ecology Progress Series* 56: 225-242.
- Carrquiriborde P.; Díaz J.; Mugni H.; Bonetto C. y Ronco A.E. (2007) Impact of cypermethrin on stream fish populations under field-use in biotech-soybean production. *Chemosphere* 68: 613-621.
- Castañé P.M.; Topalián M.L.; Cordero R.R. y Salibián A. (2003) Influencia de la especiación de los metales pesados en medio acuático como determinante de su toxicidad. *Revista de Toxicología* 20: 13-18.
- Castro B.B.; Consciencia S. y Goncalves F. (2007) Life history responses of *Daphnia longispina* to mosquitofish (*Gambusia holbrooki*) and pumpkinseed (*Lepomis gibbosus*). *Hydrobiologia* 594: 165- 174.
- Cerbin S.; Kraak M.H.S.; Voogt P. de; Visser P.M. y Van Donk E. (2010) Combined and single effects of pesticide carbaryl and toxic *Microcystis aeruginosa* on the life history of *Daphnia pulex*. *Hydrobiologia* 643(1): 129-138.
- Ceresoli N. y Gagneten A.M. (2003). Efectos del efluente de curtiembre sobre *Ceriodaphnia dubia* (Crustacea, Cladocera) en condiciones experimentales. *Interciencia* 28 (8): 469-475.
- Chang E.S. (1989) Endocrine regulation of moltin in Crustacea. *Review of Aquatic Science* 1:131-157.
- Christensen B.T.; Lauridsen T.L.; Weber Ravn H. y Bayley M. (2005) A comparison of feeding efficiency and swimming ability of *Daphnia magna* exposed to cypermethrin. *Aquatic Toxicology* 73: 210-220.
- Chuah T.S.; Loh J.Y. y Hii Y.S. (2007) Acute and chronic effects of the insecticide endosulfan on freshwater cladoceran, *Moina macrocopa* Straus. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 79: 557-561.
- Cieri M.D. y Stearns D.E. (1999) Reduction of grazing activity of two estuarine copepods in response to the exudate of a visual predator. *Marine Ecology Progress Serie* 177: 157-163.
- Coats J.R. (1990) Mechanisms of toxic action and structure-activity relationships for organochlorine and synthetic pyrethroid insecticides. *Environmental Health Perspectives* 87:255-262.
- Cohen J.H. y Forward R.B. Jr (2002) Spectral sensitivity of vertically migrating marine copepods. *Biological Bulletin* 203(3):307-14.
- Cohen J.H. y Forward R.B. Jr. (2005) Fotobehaviour as an inducible defense in the marine copepod *Calanopia americana*. *Limnology and Oceanography* 50(4): 1269-1277.
- Cole L.C. (1954) The population consequences of life history phenomena. *The Quarterly Review of Biology* 29(2):103-137

- Collen M.I. (2008) The effect of copper on kairomone-mediated responses by wild *Daphnia pulicaria* clones from lakes along a copper gradient. Tesis presentada en la Queen's University Kingston, Ontario, Canada.
- Collins N.C. (1980) Developmental responses to food limitation as indicators of environmental conditions for *Ephydra cinerea* Jones (Diptera). *Ecology* 61: 650-661.
- Collumb C.J. y Buskey E.J. (2004) Effects of the toxic red tide dinoflagellate (*Karenia brevis*) on survival, fecal pellet production and fecundity of the copepod *Acartia tonsa*. En: Harmful algae (Steidinger K.A.; Landsberg J.H.; Tomas C.R. y Vargo G.A., eds). Florida Fish and Wildlife Conservation Commission, Florida Institute of Oceanography, and Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO.
- Coors A. y De Meester L. (2008) Synergistic, antagonistic and additive effects of multiple stressors: predation threat, parasitism and pesticide exposure in *Daphnia magna*. *Journal of Applied Ecology* 45: 1820-1828.
- Coors A.; Hammers-Wirtz M. y Ratte H.T. (2004) Adaptation to environmental stress in *Daphnia magna* simultaneously exposed to a xenobiotic. *Chemosphere* 56: 395-404.
- Corkett C.J. (1984) Observations on development in copepods. *Crustaceana* (Suppl.) 7: 150-153.
- Corkett C.J. y McLaren I. A. (1970) Relationships between development rate of eggs and older stages of copepods. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 50: 161-168.
- Crowl T.A. y Covich A.P. (1990) Predator- induced life-history shifts in a freshwater snail. *Science* 247: 949-951.
- Daniels R.E. y Allan J.D. (1981) Life table evaluation of chronic exposure to a pesticide. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 39: 485-494.
- Dave G. (1984) Effects of copper on growth, reproduction, survival and haemoglobin in *Daphnia magna*. *Comparative Biochemistry and Physiology* 78(2): 439-443.
- Dawidowicz P. y Loose C.J. (1992) Metabolic costs during predator-induced diel vertical migration of *Daphnia*. *Limnology and Oceanography* 37:1589-1595.
- Dawidowicz P.; Pijanowska J. y Ciechomski K. (1990) Vertical migration of *Chaoborus* larvae is induced by the presence of fish. *Limnology and Oceanography* 35:1631-1636.
- de Angelis M. y Lee C. (1994) Methane production during zooplankton grazing on marine phytoplankton. *Limnology and Oceanography* 39: 1298- 1308.
- De Bernardi R. y Peters R.H. (1987) Why *Daphnia*? *Memorie Inst Ital Idrobiol Dott Marco Marchi* 45:1-9
- De Graeve G.M. y col. (1992) Variability in the performance of the 7-d *Ceriodaphnia dubia* survival and reproduction test: an intra and interlaboratory study. *Journal of environmental Toxicology and Chemistry* 11: 851-858.

- De la Torre F.R.; Ferrari L. y Salibián A. (2005) Biomarkers of a native fish species (*Cnesterodon decemmaculatus*) application to the water toxicity assessment of a peri-urban polluted river of Argentina. *Chemosphere* 59: 577-583
- De Lorenzo M.E.; Taylor L.A.; Lund S.A.; Pennington P.L.; Strozier E.D. y Fulton M.H. (2002) Toxicity and bioconcentration potential of the agricultural pesticide endosulfan in phytoplankton and zooplankton. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 42:173–181.
- De Meester L. (1993) Genotype, fish-mediated chemicals and phototaxis in *Daphnia*. *Ecology* 74: 1467-1474.
- De Meester L. y Pijanowska J. (1996) On the trait-specificity of the response of *Daphnia* genotypes to the chemical presence of a predator. En: *Zooplankton: sensory ecology and physiology*. (Lenz P.H.; Hartline D.K.; Purcell J.E. y Macmillan D.L., eds), pp. 407-417. Gordon and Breach, Amsterdam, The Netherlands.
- De Meester L.; Dawidowicz P.; Van Gool E. y Loose C.J. (1999) Ecology and evolution of predator-induced behavior of zooplankton: depth selection behavior and diel vertical migration. En: *The ecology and evolution of inducible defenses*. (Tollrian R y Harvell C.D.). Princeton University Press, Princeton, New Jersey, USA.
- De Meester L. y Weider L.J. (1999) Depth selection behavior, fish kairomones and the life histories of *Daphnia hyalina x gelata* clones. *Limnology and Oceanography* 44: 1248-1258.
- De Meutter F.V.; Stoks R. y De Meester L. (2005) Spatial avoidance of littoral and pelagic invertebrate predators by *Daphnia*. *Oecologia* 142:489-499.
- De Robertis A.; Jaffe J.S. y Ohman M.D. (2000) Size-Dependent visual predation risk and the timing of vertical migration in zooplankton. *Limnology and Oceanography* 45:1838-1844.
- Dini M.L. y Carpenter S.R. (1991) The Effect of whole-lake fish community manipulations on *Daphnia* migratory behavior. *Limnology and Oceanography* 36:370-377.
- Dodson S. y Hanazato T. (1995) Commentary on effects of anthropogenic and natural organic chemicals on development, swimming behavior, and reproduction of *Daphnia*, a key member of aquatic ecosystems. *Environmental Health Perspective* 103(4): 7-11.
- Dodson S.I. (1988) The ecological role of chemical stimuli for the zooplankton: predator-avoidance behavior in *Daphnia*. *Limnology and Oceanography* 33: 1431-1439.
- Dodson S.I. (1989) The ecological role of chemical stimuli for the zooplankton: predator induced morphology in *Daphnia*. *Oecologia* 78:361-367
- Dodson S.I. (1990) Predicting diel vertical migration on zooplankton. *Limnology and Oceanography* 35:1195-1200.
- Dodson S.I.; Hanazato T. y Gorski P.R. (1995) Behavioral responses of *Daphnia pulex* exposed to carbaryl and *Chaoborus* kairomone. *Environmental Toxicology and Chemistry* 14: 43-50.

- Dodson S.I.; Ryan S.; Tollrian R. y Lamper W. (1997) Individual swimming behavior of *Daphnia*: effects of food, light and container size in four clones. *Journal of Plankton Research* 19:1537-1552.
- Dussart B.H. (1984) Some Crustacea Copepoda from Venezuela. *Hydrobiologia* 113: 25-67.
- Dussart B.H. y Frutos S.M. (1986) Sur quelques Copépodes d'Argentine. *Revue d'Hydrobiologie Tropicale* 19(3-4): 241-262.
- Eisler R. (1986) Chromium hazards to fish, wildlife, and invertebrates: a synoptic review. U.S. Fish and Wildlife Service Biol. Rep. 85 (1.6). 60pp.
- Engelmayer A. (1995) Effects of predator-released chemicals on some life history parameters of *Daphnia pulex*. *Hydrobiologia* 307(1-3): 203-206
- Enright J.T. y Hamner W.M. (1967) Vertical diurnal migration and endogenous rhythmicity. *Science* 157:137-141.
- Escalante A.H. (1983) Contribución al conocimiento de las relaciones tróficas de peces de agua dulce del área platense. II. Otros Tetragnopteridae. *Limnobiós* 2(6): 376-402.
- Espíndola E.L.G. y Niselli R. (1996) Análise da dinâmica populacional de *Notodiaptomus conifer*, Sars 1901, (Copepoda, Calanoida): Un abordagem experimental. *Acta Limnológica Brasiliensis* 8: 1-12.
- Ewell W.; Gorsuch J.; Kringle R.; Robillard K. y Spiegel R. (1986) Simultaneous evaluation of the acute effects of chemicals on seven aquatic species. *Environmental Toxicology and Chemistry* 5: 831-840.
- Fargasová A. (1994) Comparative toxicity of five metals on various biological subjects. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 53: 317-324.
- Farías S.S.; Casa V.A.; Vázquez C.; Ferpozzi L.; Pucci G.N. y Cohen I.M. (2003) Natural contamination with arsenic and other trace elements in ground waters of Argentine Pampean Plain. *Science of Total Environment* 309: 187-199.
- Ferdous Z. y Muktadir A.K.M. (2009) A Review: Potentiality of Zooplankton as Bioindicator. *American Journal of Applied Sciences* 6(10): 1815-1819
- Ferrando M.D. y Andreu E. (1993) Feeding behavior as an index of copper stress in *Daphnia magna* and *Brachionus calyciflorus*. *Comparative Biochemistry and Physiology, part C* 106 (2): 327-331.
- Ferrari B. y Ferard J.F. (1996) Effects of nutritional renewal frequency on survival and reproduction of *Ceriodaphnia dubia*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 15:765-770.
- Ferriz A. y López G.R. (1998) Diet of *Lycegraulis olidus* (Gunther, 1874) (Pisces: Engraulidae) in the lower Uruguay river. *Biokos* 12(1): 69- 71.
- Finney D.J. (1971) Probit Analysis. 3<sup>ra</sup> ed. Cambridge Univ. Press, Londres, 234 pp.

- Fleming C.A. y Trevors J.T. (1989) Cooper toxicity and chemistry in the environment: a review. *Water, Air and Soil Pollution* 44: 143-158.
- Fleminger A. (1967) Taxonomy, distribution and polymorphism in the Labidocera jdlae group with remarks on evolution within the group (Crustacea: Calanida) *Proceedings of the US Natural Museum* 120: 1-61.
- Fleminger A. (1985) Dimorphism and possible sex change in copepods of the family Calanidae. *Marine Biology* 88(3): 273-294.
- Folt C.L.; Chen C.Y.; Moore M.V. y Burnaford J. (1999) Synergism and antagonism among multiple stressors. *Limnology and Oceanography* 44(3): 864-877
- Forbes V.E. (2000) Is hormesis an evolutionary expectation? *Functional Ecology* 14:12-24.
- Forbes V.E. y Calow P. (1996) Costs of living with contaminants: implications for assessing low-level exposures. Northeast Regional Environmental Public Health Center. MA: *Belle Newsletter* 4: 1-8.
- Forbes V.E. y Calow P. (1997) Responses of aquatic organisms to pollutant stress: Theoretical and practical implications. En: *Environmental Stress and Evolution*. (Bijlsma B. y Escheke, eds). Brkhauser Verlag Basel Switzerland. 25-41.
- Forward R.B. Jr. (1988) Diel vertical migration: zooplankton photobiology and behaviour. *Oceanographic Marine Biology Annals Review* 26:361-393.
- Forward R.B. Jr. y Rittschof D. (1999) Brine shrimp larval photoresponses involved in diel vertical migration: activation by fish mucus and modified amino sugars. *Limnology and Oceanography* 44: 1904- 1916.
- Forward R.B. Jr. y Rittschof D. (2000) Alteration of photoresponses involved in diel vertical migrations of a crab larva by fish mucus and degradation products of mucopolysaccharides. *Journal of Experimental Marine Ecology* 245: 277-292.
- Fox C.W. (2000) Natural selection on seed-beetle egg size in nature and the laboratory: variation among environments. *Ecology* 81: 3029–3035.
- Fox C.W. y Czesak M.E. (2000) Evolutionary ecology of progeny size in arthropods. *Annual Review of Entomology* 45: 341–369.
- Freitas E. C. y Rocha O. (2011) Acute toxicity tests with the tropical cladoceran *Pseudosida ramosa*: the importance of using native species as test organism. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 60: 241-249.
- Freitas E.C. y Rocha O. (2006) The life cycle of *Pseudosida ramosa*, Daday 1904, an endemic Neotropical cladoceran. *Acta Limnologica Brasiliensia* 18(34): 293-303.
- Frost W.V. (1980) Grazing. In: *The physiological ecology of phytoplankton*. (Morris I., ed.) Blackwell, Oxford, p. 465-49.
- Gagneten A.M. (2002) Respuesta de una comunidad zooplanctónica de agua dulce a la aplicación de cromo en clausuras experimentales. *Interciencia* 27 (10): 563-570.

- Gagneten A.M. (2006) Efectos de la toxicidad crónica del cromo y del cobre en *Daphnia magna* Straus (Crustacea, Cladocera). En: Salud Ambiental y Humana. Una Visión Holística. (Herkovits J., ed) Sociedad de Toxicología y Química Ambiental (SETAC). 66-68 p.
- Gagneten A.M. y Paggi J.C. (2009) Effects of heavy metal contamination (Cr, Cu, Pb, Cd) and eutrophication on zooplankton in the lower basin of the Salado River (Argentina). *Water, Air and Soil Pollution* 198: 317–334.
- Gagneten A.M. y Vila I. (2001) Effects of  $\text{Cu}^{+2}$  and pH on the fitness of *Ceriodaphnia dubia* (Richard 1894) (Crustacea, Cladocera) in microcosm experiments . *Environmental Toxicology* 16 (5): 428-438.
- Gagneten A.M.; Plá R.R.; Regaldo L. y Paggi J.C. (2009) Assessment of bioconcentration factor of chromium by instrumental neutron activation analysis in *Argyrodiaptomus falcifer* Daday, a subtropical freshwater copepod. *Water, Air and Soil Pollution* 204: 133-138
- Gagneten A.M.; Gervasio S. y Paggi J.C. (2007) Heavy metal pollution and eutrophication in the lower Salado River basin (Argentina). *Water, Air and Soil Pollution* 178: 335–349.
- Gentile J.H.; Gentile S.M.; Hairston N.G. Jr y Sullivan B.K. (1982) The use of life-tables for evaluating the chronic toxicity of pollutants to *Mysidopsis bahia*. *Hydrobiologia* 93(1-2): 179-187.
- Gilbert J.J. (1967) Asplanchna and postero-lateral spine production in *Brachionus calyciflorus*. *Archive of Hidrobiologia* 64: 1-62.
- Gill C.W. y Crisp D.J. (1985) Sensitivity of intact and antennule amputated copepods to water disturbance. *Marine Ecology Progress Serie* 21:221-227.
- Gliwicz M.Z. (1986) A lunar cycle in zooplankton. *Ecology* 67:883-897.
- Gliwicz M.Z. y Maszczyk P. (2007) *Daphnia* growth is hindered by chemical information on predation risk at high but not a low food levels. *Oecología* 150:706-715.
- Gliwicz Z.M. (1994) Relative significance of direct and indirect effects of predation by planktivorous fish on zooplankton. *Hydrobiologia* 272: 201- 210.
- Gliwicz Z.M.; Dawidowicz P. y Maszczyk P. (2006) Low density anti-predation refuge in *Daphnia* and *Chaoborus*? *Archive fur Hydrobiologie* 167: 101-114.
- González Sagrario M.A. y Balseiro E. (2010) The role of macroinvertebrates and fish in regulating the provision by macrophytes of refugia for zooplankton in a warm temperate shallow lake. *Freshwater Biology* 55: 2153-2166.
- Goodrich M.S. y Lech J.J. (1990) A behavioral screening assay for *Daphnia magna*: A method to assess the effects of xenobiotics on spacial orientation. *Environmental Toxicology and Chemistry* 9:21-30.
- Gorbi G.; Invidia M.; Zanni C.; Torelli A.y Corradi M.G. (2004) Bioavailability, bioaccumulation and tolerance of chromium: consequences in the food chain of freshwater ecosystems. *Annals of Chemistry* 94: 505-13.

- Griffith A.M. y Frost B.W. (1976) Chemical communication in the marine planktonic copepods *Calanus pacificus* and *Pseudocalanus* sp. *Crustaceana* 30: 1-9.
- Guerritsen J. y Strickler J.R. (1977) Encounter probabilities and community structure in zooplankton: a mathematical model. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada* 34: 73-82.
- Guglielmucci G., Baudo R., Galanti G. y Varini P. (1981) Toxicity of chemical form of copper and chromium. Part II. Acute mortality of *Daphnia magna* Straus. *Mem Inst Ital Idrobiol* 39:263-280.
- Gurney W.S.C.; Mccauley E.; Nisbet R.M. y Murdoch W.W. (1990) The physiological ecology of *Daphnia*: A dynamic model of growth and reproduction. *Ecology* 71: 7 16-732.
- Gutierrez M.F.; Gagneten A.M.y Parma J. (2007) Bioconcentration and trophic transfer of chromium in the system *Daphnia magna* (Crustacea, Cladocera) -*Cnesterodon decemmaculatus* (Pisces, Poeciliidae). *Fresenius Environmental Bulletin* 17: 647-651.
- Hall D.J.; Threkeld S.T.; Burns C.W. y Crowley P.H. (1976) The size efficiency hypothesis and the size structure of zooplankton communities. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 7: 177-208.
- Hanazato T. (1995) Combined effect of the insecticide carbaryl and the *Chaoborus* kairomone on helmet development in *Daphnia ambigua*. *Hydrobiologia* 310: 95-100.
- Hanazato T. (1998) Response of zooplankton community to insecticide application in experimental ponds: a review and the implications of the effects of chemical on the structure and functioning of freshwater communities. *Environmental Pollution* 101: 361-373.
- Hanazato T. (2001) Pesticide effects on freshwater zooplankton: an ecological perspective. *Environmental Pollution* 112: 1-10.
- Hanazato T. y Dodson S.I. (1993) Morphological responses of four species of cyclomorphic *Daphnia* to a short term exposure to the insecticide carbaryl. *Journal of Plankton Research* 15:1087-1095.
- Hanazato T. y Dodson S.I. (1995) Synergistic effect of low oxygen concentration, predator, Kairomone and pesticide on the cladoceran *Daphnia pulex*. *Limnology and Oceanography* 40:700-709.
- Hansson L.A.; Nicolle A.; Brodersen J.; Romare P.; Anders Nilsson P.; Bro'nmark C. y Skov C. (2007) Consequences of fish predation, migration, and juvenile ontogeny on zooplankton spring dynamics. *Limnology and Oceanography* 52(2): 696-706
- Hart R.C. (1990) Copepod post-embryonic durations: pattern, conformity, and predictability. The realities of isochronal and equiproportional development, and trends in the opepodid-naupliar duration ratio. *Hydrobiologia* 206(3): 175-206.
- Hart R.C. (1996) Naupliar and copepodite growth and survival of two freshwater calanoids at various food levels: Demographic contrasts, similarities and food needs. *Limnology and Oceanography* 41: 648-658.

- Hart R.C. (1998) Copepod equiproportional development: experimental confirmation of its independence of food supply level, and a conceptual model accounting for apparent exceptions. *Hydrobiologia* 380: 77-85.
- Havens K.E. (1994) An experimental comparison of the effects of two chemical stressors on a freshwater zooplankton assemblage. *Environmental Pollution* 84: 245-281
- Hays G.C. (2003) A review of the adaptive significance and ecosystem consequences of zooplankton diel vertical migrations. *Hydrobiologia* 503:163-170.
- Heugens E.; Hendriks A.; Dekker T.; van Stralen N. y Admiraal W. (2001) A review of the effects of multiple stressors on aquatic organisms and analysis of uncertainty factor for use in risk assessment. *Critical Reviews in Toxicology* 31: 247-284.
- Hodson P.V.; Borgmann U. y Shear H. (1979) Toxicity of copper to aquatic biota. En: Copper in the environment. Part II: Health effects (Nriagu J.U.,ed). John Wiley and Sons. Toronto pp. 307-372.
- Hund-Rinke K. y Wiechering H. (2001) Earthworm avoidance test for soil assessments: An alternative for acute and reproduction tests. *Journal of Soils Sediments* 1: 15-20.
- Hutchinson G.E. (1967) *A treatise on limnology*, 2. Wiley and Sons, New York 115 p.
- Hutchinson T.H. (2002) Reproductive and development effect of endocrine disrupters in invertebrates: in vitro and in vivo approaches. *Toxicology Letters* 131: 75-81.
- Hutchinson T.H.; Williams T.D. y Eales G.J. (1994). Toxicity of Cadmium, Hexavalent Chromium and Copper to Marine Fish Larvae (*Cyprinodon variegatus*) and Copepods (*Tisbe battagliai*). *Marine Environmental Research* 38: 275-290.
- Hynes H.B.N. (1978) The biology of polluted waters. Liverpool University Press. 202 p.
- Ingersoll C.G. y Winner R.W. (1982) Effect on *Daphnia pulex* (DeGeer) of daily pulse exposures to copper or cadmium. *Environmental Toxicology and Chemistry* 1:321-327.
- International Programme of Chemical Safety, IPCS. (1984) Environmental Health Criteria 40. Endosulfan Geneva.
- Jamieson C.D. (2005) Coexistence of two similar copepod species, *Eudiaptomus gracilis* and *E. graciloides*: the role of differential predator avoidance. *Hydrobiologia* 542: 191-202.
- Jansen V.A.A. (1995) Regulation of predator-prey systems through spatial interactions: a possible solution to the paradox of enrichment. *Oikos* 74(3): 384-390.
- Janssen C.R.; Persoone G. y Snell T.W. (1994). Cyst-based toxicity test. VIII. Short-chronic toxicity tests with the freshwater rotifer *Brachionus calyciflorus*. *Aquatic Toxicology* 28: 243-258.
- Jergentz S.; Mugni H.; Bonetto C. y Schulz R. (2005) Assessment of insecticide contamination in runoff and stream water of small agricultural streams in the main soybean area of Argentina. *Chemosphere* 61: 817-826.



- Jergentz S.; Pessacq P.; Mugni H.; Bonetto C. y Schulz R. (2004) Linking in situ bioassays and dynamics of macroinvertebrates to assess agricultural contamination in streams of the Argentine pampa. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 59: 133-141.
- Johnsen G.H. y Jacobsen P.J. (1987) The effect of food limitation on vertical migration in *Daphnia longispina*. *Limnology and Oceanography* 32: 873-880.
- José de Paggi S. (1995) Vertical distribution and diel migration of rotifers in Parana River floodplain lake. *Hydrobiologia* 310: 87-94.
- José de Paggi S.J. y Paggi J.C. (2007) Zooplankton. En: The Middle Paraná River: limnology of a subtropical Wetland (Iriondo M.H.; Paggi J.C. y Parma M.J., eds.). New York: Springer. p. 229-245.
- Kalff J. (2002) Limnology: Inland Water System. Prentice Hall.
- Kate L.B. y Dill L.M. (1998) The scent of death: chemosensory assessment of predation risk by prey animals. *Écoscience* 5: 361–394.
- Katona S.K. (1973) Evidence for sex pheromones in planktonic copepods . *Limnology and Oceanography* 18: 574-583.
- Kenaga E. (1982) Predictability of chronic toxicity from acute toxicity of chemicals in fish and aquatic invertebrates. *Environmental Toxicology and Chemistry* 1:347–358.
- Kerfoot W.C.; Kellogg D.L. y Strickler J.R. (1980) Visual observations of live zooplankters: evasion, escape, and chemical defenses. En: Evolution and ecology of zooplankton communities (Kerfoot W.C., ed), pp. 1027. Hanover, NH: University Press of New England.
- Khengarot B.S. (1989). Investigations of correlation between physicochemical properties of metals and their toxicity to the waterflea *Daphnia magna* Straus. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 18(2): 109-120.
- Khun R.; Pattard M.; Pernak K. y Winter A. (1989) Results of the harmful effects of water pollutants to *Daphnia magna* in the 21 day reproduction test. *Water Research* 23:501-510.
- King G.M. (1984) Metabolism of trimethylamine choline and glycine betaine by sulfate reducing and methanogenic bacteria in marine sediments. *Applied Environmental Microbiology* 48: 719- 725.
- Klaschka U. (2008) The infochemical effect- a new chapter in ecotoxicology. *Environmental Science Pollution Research* 15(6): 452-462.
- Kluttgen B.; Kuntz N. y Ratte H.T. (1996) Combined effects of 3,4-dichloroaniline and food concentration on life-table data of two related cladocerans, *Daphnia Magna* and *Ceriodaphnia Quadrangula*. *Chemosphere* 32(10): 2015-2028.
- Koivisto S. (1995) Is *Daphnia* an ecologically representative zooplankton species in toxicity tests? *Environmental Pollution* 90(2): 263-267.

- Koivisto S.; Ketola M, y Walls M. (1992) Comparison of five cladoceran species in short- and long-term copper exposure. *Hydrobiologia* 348: 125-136.
- Kotov A.A. y Dumont H.J. (2000) Analysis of the *Ilyocryptus spinifer* species group (Anomopoda, Branchiopoda), with description of a new species. *Hydrobiologia* 428: 85–113.
- Lajmanovich R.; Lorenzatti E.; de la Sierra P.; Marino F. y Peltzer P. (2002) First registrations of organochlorines pesticides residues in amphibians of the mesopotamic region, Argentina. *Froglog* 54: 4.
- Lajmanovich R.C.; Cabagna M; Peltzer P.M.; Stringhini G.A. y Attademo A.M. (2005) Micronucleus induction in erythrocytes of the *Hyla pulchella* tadpoles (Amphibia: Hylidae) exposed to insecticide endosulfan. *Mutation Research* 587(1-2): 67-72.
- Lampert W. (1989) The adaptative significance of diel vertical migration of zooplankton. *Functional Ecology* 3: 21-27.
- Lampert W. (1993) Ultimate causes of diel vertical migration of zooplankton: a new evidence for the predator avoidance hypothesis. *Archiv für Hydrobiologie Beiheft* 39: 79-88.
- Lampert W. (2005) Vertical distribution of zooplankton: density dependence and evidence for an ideal free distribution with costs. *BMC Biology* 3:10.
- Lampert W. (2006) Vertical distribution of zooplankton: density dependence and evidence for an ideal free distribution with costs. *BMC Biology* 3:10.
- Lampert W. y Sommer U. (1997) Limnoecology: The ecology of Lakes and Streams. Oxford. University Press, New York, Oxford. 382 p.
- Lampert W.; McCauley E. y Manly B.F.J. (2003) Trade-offs in the vertical distribution of zooplankton: ideal free distribution with costs? *Proceedings of the Royal Society B* 270: 765-773.
- Landry M.R. (1978) Population dynamics and production of a planktonic marine copepod, *Acartia clausii*, in a small temperate lagoon on San Juan Island, Washington. *Internationale Revue der gesamten Hydrobiologie* 63: 77-119.
- Landry M.R. (1983) The development of marine calanoid copepods with comment on the isochronal rule. *Limnology and Oceanography* 28:614-624.
- Larsson P. y Dodson S. (1993) Chemical communication in planktonic animals. *Archives of Hydrobiology* 129: 129-155.
- Lass S. y Spaak P. (2003) Chemically induced anti-predator defenses in plankton: a review. *Hydrobiologia* 491:221-239.
- Lauder G.V. (1980) Hydrodynamic of prey capture by teleost fishes. *Proceeding of the Second Conference on Biofluid Mechanics* 2: 161-181. New York: Plenum press.
- Laufer H. y Borst D.H. (1988) Juvenile hormone in crustacea. En: Invertebrate endocrinology, Vol. 2 Endocrinology of selected invertebrate types (Laufer H. y Downer R.G., eds.) AR Liss Inc. New York. pp305-313.

- Laughlin R. (1965) Capacity for increase: a useful population statistic. *Journal of Animal Ecology* 34: 77-91.
- Lazzaro X. (1987) A review of planktivorous fishes: Their evolution, feeding behaviours, selectivities, and impacts. *Hydrobiologia* 146: 97-167.
- Le Blanc G.A. (2007) Crustacean endocrine toxicology: a review. *Ecotoxicology* 16: 61-81.
- Li N.; Zhao Y.L. y Yang J. (2005) Accumulation, distribution, and toxicology of copper sulfate in juvenile giant freshwater prawns, *Macrobrachium rosenbergii*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 75: 497-504.
- Liu X.J.; Ni I.H. y Wang W.X. (2002) Trophic transfer of heavy metals from freshwater zooplankton *Daphnia magna* to zebrafish *Danio reiro*. *Water Research* 36:4563- 4569.
- Lloyd M. (1967) Mean crowding. *Journal of Animal Ecology* 36: 1-30.
- Lonsdale D.J.; Frey M.A. y Snell T.W. (1998) The role of chemical signals in copepod reproduction. *Journal of Marine Systems* 15:1-12.
- Loose C.J. y Dawidowicz P. (1994) Trade offs in diel vertical migration by zooplankton: the costs of predator avoidance. *Ecology* 75(8): 2255-2263.
- Loose C.J.; von Elert E. y Dawidowicz P. (1993) Chemically induced diel vertical migration in *Daphnia*- a new bioassay for kairomones exuded by fish. *Archives of Hydrobiology* 126: 329-337.
- Lopes I.; Baird D.J. y Ribeiro R (2004) Genetic determination of tolerance to lethal and sublethal copper concentrations in field populations of *Daphnia longispina*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 46: 43-51.
- Lopretto E.C. y Tell. G. (1995) Ecosistemas de aguas continentales. Metodologías para su estudio 3.
- Lotka A.J. (1925) A natural population norm. *Journal of the Washington Academy of Science* 3: 241-293.
- Luoma S. (1995) Prediction of metal toxicity in nature from bioassays: Limitations and research needs. En: Metal Speciation and bioavailability in aquatic systems (Tessier A y Turner D., eds). Chichester, England.
- Lynch M. (1980) The evolution of cladoceran life histories. *Quarterly Review of Biology* 55: 2342.
- Lynch M. (1989) The life history consequences of resource depression in *Daphnia pulex*. *Ecology* 70(1): 246-256.
- Macháček J. (1991) Indirect effect of planktivorous fish on the growth and reproduction of *Daphnia galeata*. *Hydrobiologia* 225(1):193-197.
- Macháček J. (1993) Comparison of the response of *Daphnia galeata* and *Daphnia obtusa* to fish produced chemical substance. *Limnology and Oceanography* 38: 1544- 1550.

- Mackay D.; Shiu W.Y. y Ma K.C. (1997) Illustrated Handbook of physical-chemical properties and environmental fate for organic chemicals. Vol. 5. Pesticide chemicals. Lewis Publishers, New York. 812 p.
- Maier G. (1995). Mating frequency and inter-specific mating in some freshwater cyclopoid copepods. *Oecologia* 101: 245-250.
- Mann R.M. y Bidwell J.R. (1999) The toxicity of glyphosate and several glyphosate formulation to four species southwestern Australian frogs. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 36:193-199.
- Marcial H. y Hagiwara A. (2007) Multigenerational effects of 17 $\beta$ -estradiol and nonylphenol on euryhaline cladoceran *Diaphanosoma celebensis*. *Fish Science* 73: 324-330.
- Mark U. y Solbé J. (1998) Analysis of the ecetoc aquatic toxicity (EAT) database V — The relevance of *Daphnia magna* as a representative test species. *Chemosphere* 36(1):155-166.
- Mc Cullagh P. y Nelder J (1989) Generalized Linear Models. Chapman y Hall. Londres. 511 p.
- McKee M.J. y Knowles C.O. (1986) Effects of fenvalerate on biochemical parameters, survival, and reproduction of *Daphnia magna*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 12:70-84
- McLaren J.A. y Corkett C.J. (1981) Temperature-dependent growth and production by a marine copepod. *Journal of Fisheries and Aquatic Science of Canada* 38: 77-83.
- McNaught D.C. y Hasler A.D. (1961) Surface schooling and feeding behavior in white bass. *Limnology and Oceanography* 6: 53-60.
- Miller G.B. (1977) Growth rules in the marine copepod genus *Acartia*. *Limnology and Oceanography* 22(2): 326-335.
- Mirza R.S. y Pyle G.G. (2009) Waterborne metals impair inducible defences in *Daphnia pulex*: morphology, life-history traits and encounters with predators. *Freshwater Biology* 53(5): 1016-1027.
- Montagna M.C. y Collins P. (2004) Efecto de un formulado comercial del herbicida glifosato sobre el cangrejo *Trichodactylus borellianus* (Crustacea, Decapoda: Braquiura). *FABICIB* 8:227–234
- Montagna M.C. y Collins P. (2007) Survival and growth of *Palaemonetes argentinus* (Decapoda; Caridea) exposed to insecticides with chlorpyrifos and endosulfan as active element. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 53: 371-378.
- Montagna M.C. y Collins P. (2008) Oxygen consumption and ammonia excretion of the freshwater crab *Trichodactylus borellianus* exposed to chlorpyrifos and endosulfan insecticides. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 92 : 150–155.
- Mort M.A. (1986) Chaoborus predation and the function of phenotypic variation in *Daphnia*. *Hidrobiología* 133: 39-44.

- Neil W.E.(1990) Induced vertical migration in copepods as a defense against invertebrate predation. *Nature* 345: 524-526.
- Norberg-King T.J. (1989) An evaluation of the fathead minnow seven-day subchronic test for estimating chronic toxicity. *Environmental Toxicology and Chemistry* 8: 1075–1089.
- Nurdlund D.A. y Lewis W.J. (1976) Terminology of chemical releasing stimuli in intraspecific and interspecific interaction. *Journal of Chemical Ecology* 2: 211-220.
- Occhi R. y Oliveros O. (1974) Estudio anatomo- patológico de la cavidad bucofaríngea de *Leporinus obtusidens* y su relación con el régimen alimentario. *Physis*. Sec. B, 33(86): 77- 90.
- Ohman M.D. (1988) Behavioral responses of zooplankton to predation. *Bulletin of Marine Science* 43(3): 530-550.
- Ohman M.D. (1990) The demographic benefits of diel vertical migrarion by zooplankton. *Ecological Monographs*. 60: 257-281.
- Oliveros O.B. (1980) Campaña limnológica "Keratella I" en el Río Paraná Medio: Aspectos tróficos de peces de ambientes leníticos. *Ecología* 4: 115-126.
- Oliveros O.B. y Rossi L. (1991) Ecología trófica de *Hoplias malabaricus malabaricus* (Pisces: Erythrinidae) *Natura Neotropicalis* 22(2): 55- 68.
- Otha T.; Tokishita S.; Shiga Y.; Hanazato T. y Yamagata H. (1998) An assay system for detecting environmental toxicants with cultured cladoceran eggs in vitro: malformations induced by ethylenethiourea. *Environmental Research Sec A* 77: 43-48.
- Paggi J.C. (1995) Crustacea-Cladocera. En: Ecosistema de aguas continentales: metodologías para su estudio. (Lopretto E.C. y Tell G., eds). La Plata, Ediciones Sur, Tomo III. pp. 909-951.
- Paggi J.C. (1998) Cladocera (Anomopoda y Ctenopoda). En: Biodiversidad de Artrópodos Argentinos, Una perspectiva biotaxo-nómica. (Morrone J.J. y Coscarón S., eds), La Plata, Argentina, pp 507-518.
- Paggi J.C. (2006) Redescription and re-evaluation of the taxonomic status of the Neotropical copepod *Diaptomus falcifer* Daday, 1905 (Calanoida: Diaptomidae). *Studies on Neotropical Fauna and Environment* 41(1):67-78.
- Palma P.; Palma V.L.; Matos C.; Fernández R.M.; Bohn A.; Soares A.M. y Barbosa I.R. (2009) Effects of atrazine and endosulfan sulfate on the ecdysteroid system of *Daphnia magna*. *Chemosphere* 74: 676-681.
- Pane E.F.; Smith C.; McGeer J.C. y Wood C.M. (2003) Mechanisms of acute and chronic waterborne nickel toxicity in the freshwater cladoceran, *Daphnia magna*. *Environmental Science and Technology* 37: 4382–4389.
- Pennak R.W. (1991) Freshwater invertebrates of the Unitate States (3 ed). Wiley. USA, 628 p.

- Persoone G.; Van del Vel A.; Van Steertegem M. y De Nayer B. (1989) Predictive value of laboratory tests with aquatic invertebrates: influences of experimental conditions. *Aquatic Toxicology* 14, 149-166
- Perticarrari A.; Arcifa M.S. y Rodrigues R.A. (2004) Diel vertical migration of copepods in a Brazilian lake: a mechanisms for decreasing risk of Chaoborus predation? *Brazilian Journal of Biology* 64(2): 289-298.
- Pijanowska J. & Dawidowicz P. (1987) The lack of vertical migration in Daphnia: the effect of homogenously distributed food. *Hydrobiologia*, 148, 175-181.
- Pijanowska J. y Kowalczewski A. (1997) Predators can induce swarming behaviour and locomotory responses in Daphnia. *Freshwater Biology* 37: 649-656.
- Pijanowska J.; Dawidowicz P. y Weider L.J. (2006) Predator-induced escape response in Daphnia. *Archiv fur Hydrobiologie* 167(1-4): 77-87.
- Pires de Gouvea E. (1980) Estagios do desenvolvimento naupliar de *Notodiaptomus conifer* (Sars 1901) (Copepoda, Calanoida). *Ciencia e Cultura* 32(8): 1048-1059.
- Pohnert G. y Von Elert E. (2000) No ecological relevance of trimethylamine in fish- daphnia interactions. *Limnology and Oceanography* 45: 1153- 1156.
- Poulet S.A. y Marsot P. (1978) Chemosensory grazing by marine calanoid copepods (Arthropoda: Crustacea). *Science* 200:1403-1405
- Preston B.J.; Cecchine G. y Snell T.W. (1999) Effects of pentachlorophenol on predator avoidance behavior of the rotifer *Brachionus calyciflorus*. *Aquatic Toxicology* 44:201-212.
- Rainbow P.S. (2002) Trace metal concentrations in aquatic invertebrates: why and so what? *Environmental Pollution* 120: 497-507.
- Ramcharan C.W. y Sprules W.G. (1991) Predator-induced behavioral defense and its ecological consequences for two calanoid copepods. *Oecologia* 86: 276-286.
- Rand G.M. y Petrocelli S.R. (1985) *Fundamentals of Aquatic Toxicology*. Taylor and Francis. Bristol, USA.
- Rathore B.S. y Khangarot E.S. (2003) Effects of water hardness and metal concentration on a freshwater *Tubifex tubifex* Muller. *Water, Air and Soil Pollution* 142: 341-356.
- Reichwaldt E.S. y Stibor H. (2005) The impact of diel vertical migration of Daphnia on phytoplankton dynamics. *Oecologia* 146(1): 50-56.
- Repetto M. (1995) *Toxicología avanzada*. Madrid, España 621 p.
- Reznick D.; Bryant M.J. y Bashey F. (2002) r- and K-selection revisited : in the role of population regulation in life-history evolution. *Ecology* 83: 1509-1520.
- Riessen H.P. (1999) Predator- induced life history shifts in Daphnia : a synthesis of studies using meta-analysis. *Journal of Fishery and Aquatic Science of Canada* 56: 2487-2494.

- Rinderhagen M.; Ritterhoff J. y Zauke G. (2000) Crustaceans as Bioindicators. En: Biomonitoring of Polluted Water – Reviews on Actual Topics. (Gerhardt A., ed.). Carl von Ossietzky Universität Oldenburg, FB Biologie (ICBM). Trans Tech Publications – Scitech Publications, 161-194.
- Ringelberg J. (1991) Enhancement of the phototactic reaction of *Daphnia hyaline* by a chemical mediated by juvenile perch (*Perca fluviatilis*). *Journal of Plankton Research* 13: 17-25.
- Ringelberg J. (1999) The photobehaviour of *Daphnia* sp. as a model to explain diel vertical migration in zooplankton. *Biological Reviews* 74: 397-423.
- Ringuelet R.A. (1958) Los crustáceos copépodos de las aguas continentales en la República Argentina. Sinópsis sistemática. Contribuciones Científicas. Serie Zoología, 1(2). Universidad de Buenos Aires. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Buenos Aires. 126 p.
- Rodgher S.; Lombardi A.T.; Gama Mela M.G. y Tonietto A.E. (2008) Change in life cycle parameters and feeding rate of *Ceriodaphnia silvestrii* Daday (Crustacea, Cladocera) exposure to dietary copper. *Ecotoxicology* 17: 826–833.
- Rodríguez E.; Medesani D.A. y Mingelman M. (2007) Endocrine disruptions in crustaceans due to pollutants: a review. *Comparative Biochemistry and Physiology* 146: 661-671.
- Rose R.M.; Warne M.S.J y Lim R.P. (2001) Factors associated with fish modify life history traits of the cladoceran *Ceriodaphnia* cf. *dubia*. *Journal of Plankton Research* 23(1):11-17.
- Rose R.M.; Warne M.S.J. y Lim R.P. (2003) Exposure to chemicals exuded by fish reduces the filtration and ingestion rates of *Ceriodaphnia* cf. *dubia*. *Hydrobiologia* 501: 215-217.
- Rossi L. (1989) Alimentación de larvas de *Salminus maxillosus* Val. 1840 (Pises, Characidae). *Iheringia* 69: 49- 59.
- Ruíz R. y Bahamonde N. (1989) Cladóceros y copépodos límnicos en Chile y su distribución geográfica. Lista sistemática. Publicación N°45. Museo Nacional de Historia Natural. Santiago, Chile. 48 p.
- Sakamoto M.; Chang K. y Hanazato T. (2006) Inhibition of development of anti-predator morphology in the small cladoceran *Bosmina* by an insecticide: impact of an anthropogenic chemical on prey–predator interactions. *Freshwater Biology* 51: 1974-1983.
- Sarma S.S.S. y Nandini S. (2006) Review of recent ecotoxicological studies on cladocerans. *Journal of Environmental Science and Health B*. 41: 1417-1430.
- Sato C.; Schnoor J.L. y McDonald D.B. (1986) Characterization of effects of copper, cadmium and nickel on the growth of *Nitrosomonas europaea*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 5(4): 403-416
- Schoettger R.A. (1970) Toxicology of thiodan in several fish and aquatic invertebrates. *Investments Fish Control* 35: 1-31.

- Secretaría Nacional de Recursos Hídricos (2003) Desarrollo de Niveles Guía Nacionales de Calidad de Agua ambiente correspondiente a Cromo. Argentina. <http://www.hidricosargentina.gov.ar>
- Secretaría Nacional de Recursos Hídricos (2005) a. Desarrollo de Niveles Guía Nacionales de Calidad de Agua ambiente correspondiente a Cobre. Argentina. <http://www.hidricosargentina.gov.ar>
- Secretaría Nacional de Recursos Hídricos (2005) b. Desarrollo de Niveles Guía Nacionales de Calidad de Agua ambiente correspondiente a Plomo. Argentina. <http://www.hidricosargentina.gov.ar>
- Sharp A.A. y Stearns D.E. (1997) Sublethal effects of cupric ion activity on the grazing behaviour of three calanoid copepods. *Marine Pollution Bulletin* 34:1041-1048.
- Shurin J. y Dodson S.I. (1997) Sublethal toxic effects of cyanobacteria and nonylphenol on environmental sex determination and development in *Daphnia*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 16:1269–1276.
- Sibly R.M. y Calow P. (1989) A life-cycle theory of responses to stress. *Biological Journal of the Linnean Society* 7: 101-116.
- Sillett K.B. y Stemberger R.S. (1998) Masculinized females in a population of *Leptodiatomus minutus* (Copepoda, Calanoida). *Canadian Journal of Zoology* 76: 596–600
- Sinev A.Y. (2000) Postembryonal development of male and abnormal sexual individuals of *Alona affinis* (Leydig, 1860) (Anomopoda, Chydoridae). *Hydrobiologia* 437: 197-202.
- Sinistro R. (2010) Top-down and bottom-up regulation of planktonic communities in a warm temperate wetland. *Journal of Plankton Research* 32(2): 209- 220.
- Smith R.J.F. (1992) Alarm signal in fishes. *Reviews of Fish and Biological Fisheries* 2: 33-63.
- Sokal R.R. y Rohlf F.J. (1995) Biometry: The principles and practice of statistics in biological research, W.H. Freeman y Co.
- Spehar R.L. y Fiandt J.T. (1986) Acute and chronic effects on water quality criteria-based metal mixtures on three aquatic species. *Environmental Toxicology and Chemistry* 5: 917-931.
- Steele J.H. y Henderson E.W. (1992) The role of predation in plankton models. *Journal of Plankton Research* 14(1): 157-172.
- Sterns S.C. (1992) The Evolution of Life Histories. Oxford University Press, Oxford.
- Steven D.G. y Chapman G.A. (1984) Toxicity of trivalent chromium to early life stages of steelhead trout. *Environmental Toxicology and Chemistry* 3: 125-133.
- Stirling G. y Roff D.A. (2000) Behaviour plasticity without learning: phenotypic and genetic variation of naive *Daphnia* in an ecological trade-off. *Animal Behaviour* 59: 929–941.



- Strickler J.R. y Bal A.K. (1973) Setae of the first antennae of the copepod *Cyclops scutifer* (Sars): their structure and importance. *Proceeding of the Natural Academy of Science of USA* 70(9): 2656-2659
- Suedel B.C.; Deaver E. y Rodgers J.H. (1996) Experimental factors that may affect toxicity of aqueous and sediment-bound copper to freshwater organisms. *Archive of Environmental Contamination and Toxicology* 30:40-46.
- Sullivan B.K.; Buskey E.; Miller D.C. y Ritacco P.J. (1983) Effects of copper and cadmium on growth, swimming and predator avoidance in *Eurytemora affinis* (Copepoda). *Marine Biology* 77: 299-306.
- Sunda W.G.; Teste P.A. y Huntsman S.A. (1987) Effects of cupric and zinc ion activities on the survival and reproduction of marine copepods. *Marine Biology* 94: 203-210.
- Sunderam R.I.; Thompson G.B.; Chapman J.C. y Cheng D.M. (1994) Acute and chronic toxicity of endosulfan to two Australian cladocerans and their applicability in deriving water quality criteria. *Archive of Environmental Contamination and Toxicology* 27(4): 541-545.
- Sylva R.N. (1975) The environmental chemistry of copper (II) in aquatic systems. *Water Research* 10: 789-792.
- Szlawer L. (1964) Reaction of *Daphnia pulex* de Geer to the approach of different objects. *Polskie Archiwum Hydrobiologii* 1: 5-16.
- Thomaz S.M.; Agostinho A.A. y Hahn N.S. (2004) The Upper Paraná River and its floodplain: Physical aspects, ecology and conservation. Backhuys Publishers, Leiden, pp.331–352.
- Titelman J. (2001) Swimming and escape behavior of copepod nauplii: implications for predator-prey interactions among copepods. *Marine Ecology Progress Series* 213: 203–213.
- Tollrian R. (1994) Fish-kairomone induced morphological changes in *Daphnia lumholtzi* (SARS). *Archiv für Hydrobiologie* 130:(11) 69-75
- Tollrian R. y Harvell C.D. (1999) The Ecology and Evolution of Inducible Defenses. Princeton, New Jersey. USA
- Tollrian R. y Von Elert E. (1994) Enrichment and purification of *Chaoborus* kairomone from water –further steps toward its chemical characterization. *Limnology and Oceanography* 39:788-796.
- Tollrian R. y Dodson S.I. (1999) Inducible defenses in Cladocera: constraints, costs, and multipredator environments. En: The ecology and evolution of Inducible defenses (Tollrian R. y Harvell C.D., eds.), pp.177-202. Princeton University Press, Princeton, New Jersey, USA.
- Trevisan G.V. y Forsberg B.R. (2007) Relationships among nitrogen and total phosphorus, algal biomass and zooplankton density in the central Amazonia lakes. *Hydrobiologia* 586: 357–365.

- UNEP/POPS/POPRC.3/5 (2007) Propuesta sobre el endosulfán, y UNEP/POPS/POPRC.3/INF/9 Additional information on endosulfan. Preparado por la Comunidad Europea y sus estados miembros en apoyo de su propuesta para enlistar endosulfan al Convenio de Estocolmo.
- United States Environmental Protection Agency ,USEPA (2002) Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms, 5a ed. US Environmental Protection Agency, Office of Water (4303T). NW. Washington, DC 20460. EPA-821-R-02-012, 266 p.
- United States Environmental Protection Agency, USEPA (1979) Guidance for premanufacture testing: discusión of policy issues, alternatives approaches and test methods. Federal register, 44: 16240.
- United States Environmental Protection Agency, USEPA (1986) Quality criteria for water 1986. EPA 440/5-86-001. Office of Water Regulations and Standards, Washington, DC.
- United States Environmental Protection Agency, USEPA (1980) Ambient water quality criteria for endosulfan. EPA 440/5-80-046. Office of Water Regulations and Standards. Washington, DC
- Utermöhl H. (1958) Zur Vervollkommnung der quantitativen Phytoplankton - Methodik. Mitteilungen der Internationale Vereinigung für Theoretische und Angewandte Limnologie 9: 1-38.
- Uye S. (1988) Temperature-dependent development and growth of *Calanus sinicus* (Copepoda: Calanoida) in the laboratory. *Hydrobiologia* 167/168: 285- 293.
- Van Den Bosch F, y Wilfried G. (1994) A model of growth and development in copepods. *Limnology and Oceanography* 39(7): 1528-1542.
- Van Straalen N.M.; Schobben J.H.M. y De Goede R.G.M. (1989) Population consequences of cadmium toxicity in soil microarthropods. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 17: 190-204.
- Verriopoulos G. y Moraitu-Apostolopoulou M. (1982) Differentiation of the Sensitivity to copper and cadmium in different life stages of a copepod. *Marine Pollution Bulletin* 13(4): 123-125.
- Villar C.A.; Stripeikis J.; Colautti D.; D'Huicque L.; Tudino M. y Bonetto C. (2001) Metals contents in two fishes of different feeding behaviour in the lower Paraná river and Río de la Plata estuary. *Hydrobiologia* 457(1-3): 225-233.
- Villar C.A; Gómez S.E. y Bentos CA. (2000) Lethal concentration of Cu in the neotropical fish *Cnesterodon decemmaculatus* (Pisces, Cyprinodontiformes). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 65:465-469.
- Villaroel M.J.; Sancho E.; Ferrando M.D. y Andreu E. (2003) Acute, chronic and sublethal effects of the herbicide propanil on *Daphnia magna*. *Chemosphere* 53: 857-864.

- Vitasalo M.; KiØrboe T.; Flinkman J.; Pedersen L.W. y Visser A.W. (1998) Predation vulnerability of planktonic copepods: consequences of predator foraging strategies and prey sensory abilities. *Marine Ecology Progress Serie* 175:129-142.
- Von Elert E. y Loose C.J. (1996) Predator- induced diel vertical migration in *Daphnia*-enrichment and preliminary chemical characterization of kairomone exuded by fish. *Journal of Chemical Ecology* 22: 885-895.
- Vos M.; Flik B.J.G.; Vijberberg J.; Ringelberg J. y Mooij W.M. (2002) From inducible defenses to population dynamics: modelling refuge use and life history changes in *Daphnia*. *Oikos* 99: 386-396.
- Vos M.; Vet L.E.M.; Wackers F.L.; Middelburg J.J.; van der Putten W.H.; Mooij W.M.; Heip C.H.R. y van Donk E. (2006) Infochemicals structure marine, terrestrial and freshwater food webs: implications for ecological informatics. *Ecological Informatics* 1: 23-32.
- Vrede T. y Vrede K. (2005) Contrasting 'top-down' effects of crustacean zooplankton grazing on bacteria and phytoflagellates. *Aquatic Ecology* 39: 283-293.
- Walker G.H. (1990) Kinetic models to predict bioaccumulation of pollutants. *Functional Ecology* 4: 295 – 301.
- Walter, Hopkin, Sibly and Peakall (1997) (2º ed). Principles of Ecotoxicology Taylor & Francis Ed. Univ. Of Reading UK.
- Wang Z.S.; Changzhou Y. y Xian Z. (2009) Acute and chronic cadmium toxicity to a saltwater cladoceran *Moina monogolica* Daday and its relative importance. *Ecotoxicology* 18: 47-54.
- Wang Z.S.; Kong H.N. y Wu D.Y. (2007) Acute and chronic copper toxicity to a saltwater cladoceran *Moina monogolica* Daday. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 53:50–56.
- Watras C.J.; Back R.C.; Halvorsen S.; Hudson R.J.M.; Morrison K.A. y Wente S.P. (1998) Bioaccumulation of mercury in pelagic freshwater food webs. *Science of Total Environment* 219: 183-208.
- Watt P.J. y Young S. (1994) Effect of predator chemical cues on *Daphnia* behaviour in both horizontal and vertical planes. *Animal Behaviour* 48(4): 861-869.
- Webb P.W. y Skadsen J.M. (1980) Strike tactics of *Esox*.. *Canadian Journal of Zoology* 58:1462–1469.
- Weider L.J. y Pijanowska J. (1993) Plasticity of *Daphnia* life histories in response to chemical cues from predators. *Oikos* 67: 385- 392.
- Winner R.W. y Farrell M.P. (1976) Acute and chronic toxicity of copper to four species of *Daphnia*. *Journal of the Fisheries Resources Board of Canada* 33: 1685-1691.
- Wolf G.; Scheunders P. y Selens M. (1998) Evaluation of the swimming activity of *Daphnia magna* by image analysis after administration of sublethal cadmium concentrations. *Comparative Biochemistry and Physiology A* 120: 99–105.

- Wong C.K. (1993) Effects of chromium, copper, nickel, and zinc on longevity and reproduction of the cladoceran *Moina marocopa*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 50:633-639.
- Wong C.K. y Pak A.P. (2004) Acute and subchronic toxicity of the heavy metals copper, chromium, nickel and zinc, individually and in mixture, to the freshwater copepod *Mesocyclops pehpeiensis*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 73: 190-196.
- Woods M.; Kumar A. y Correll R. (2002) Acute Toxicity of Mixtures of Chlorpyrifos, Profenofos, and Endosulfan to *Ceriodaphnia dubia*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 68: 801–808.
- Wright S. (1938) A review of the *Diaptomus bergi* group, with descriptions of two new species. *Transactions of the American Microscopical Society* 57(3): 297-315.
- Yen J.; Sanderson B.; Strickler J.R. y Okubo A. (1991) Feeding currents and energy dissipation by *Euchaeta rimana*, a subtropical copepod. *Limnology and Oceanography* 36: 362-369
- Young S. y Watt P. (1993) Behavioral mechanisms controlling vertical migration in *Daphnia*. *Limnology and Oceanography* 38: 70-79.
- Yuan L.; Michels E. y De Meester L. (2003) Changes in phototactic behavior of *Daphnia magna* clone C<sub>1</sub>242 in response to copper, cadmium and pentachlorophenol. *Journal of Environmental Science* 15(6): 841–847.
- Zar J.H. (1986) Biostatistical analysis. 2d ed. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, New Jersey.
- Zaret T.M. y Suffern J.S. (1976) Vertical migrations in zooplankton as a predator avoidance mechanisms. *Limnology and Oceanography* 21: 804-813.
- Zilli F. y Gagneten A.M. (2004) Efectos de la contaminación por metales pesados sobre la comunidad bentónica de la cuenca del arroyo Cululú (río salado del norte, Argentina). *Interciencia* 30(3):159-165.