

## Trabajos

### Cicломorfosis inducida por detergente en *Daphnia magna*

RECIBIDO: 15/6/08

ACEPTADO: 7/8/08

**Castiglioni, M.<sup>1,2</sup> • Collins, P.<sup>1,2</sup> • Paggi, J.C.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Instituto Nacional de Limnología CONICET-UNL, Cuidad Universitaria Pje El Pozo s/n, 3000 Santa Fe.

<sup>2</sup> Escuela Superior de Sanidad- FBCB- UNL, Pje El Pozo s/n, 3000 Santa Fe. Email: marielacastiglioni@hotmail.com

**RESUMEN:** En los Daphnidos, la cicломorfosis es un fenómeno característico de las poblaciones planctónicas y consiste en cambios, estacionales o no, en la forma de ciertas estructuras o partes del cuerpo en los organismos. Estos procesos suelen ocurrir por influencia de algún factor ambiental externo, produciendo cambios en el crecimiento relativo de la espina caudal o de parte de la cabeza. El objetivo del trabajo es determinar si es posible la ocurrencia de cicломorfosis en *D. magna* inducida por la presencia de un formulado comercial de detergente biodegradable. Previamente se determinó la  $CL_{50}$  a través de ensayos agudos con un detergente aniónico. Una vez conocida la  $CL_{50}$  se realizaron ensayos crónicos en individuos aislados y agrupados utilizando concentraciones subletales del detergente biodegradable (0,03ml.l<sup>-1</sup>; 0,06 ml.l<sup>-1</sup>; 0,10 ml.l<sup>-1</sup> y control). A los 21 días de bioensayo, los organismos fueron retirados y llevados al laboratorio midiendo sus tallas totales, cabeza, antena y espina caudal. Esto se realizó obteniendo imágenes de cada

ejemplar por medio de fotografías digitales de alta resolución bajo microscopio estereoscópico y aplicando el software TPSdig para la medición de los ejemplares. En los bioensayos agudos, el valor medio de las  $CL_{50}$  obtenidas a las 48 hs. fue de  $0,1416 \pm 0,0008$  ml.l<sup>-1</sup> para el detergente biodegradable. En los bioensayos crónicos con individuos aislados, la longitud media de la espina caudal del control fue  $0,13 \pm 0,063$  mm. Mientras que en las experiencias con detergente se observó un aumento de esta dimensión, llegando a ser de  $0,21 \pm 0,048$  mm en la concentración mayor. En los ensayos con individuos agrupados no se observaron diferencias en las distintas medidas tomadas. El mecanismo que estimula la cicломorfosis en *D. magna*, ocurrió en las concentraciones mayores del detergente. La longitud media de la espina caudal aumentó significativamente en la concentración mayor ocurriendo un leve aumento no significativo en la concentración menor.

**PALABRAS CLAVE:** Cladóceros, cicломorfosis, detergente, xenobióticos, contaminación urbana.

**SUMMARY:** *Cyclomorphosis induction by detergent in Daphnia magna*

The wide use of pesticides in agricultural In *Daphnia*, cyclomorphosis is a phenomenon characteristic of planktonic populations, and consists of changes, seasonal or otherwise, in the size or shape of certain structures or body part. These processes usually occur due to some external environmental factor, producing morphological changes in the size of the caudal spine or the helmet. The aim of this work was to show the occurrence of cyclomorphosis in *D. magna* induced by the presence of a biodegradable detergent of massive commercial use. Previously, the acute toxicity was determined by  $LC_{50}$  determination. Once the  $LC_{50}$  was known, chronic assays with isolated and grouped animals were performed indicating the cyclomorphosis occurrence in cladocerans exposed to sublethal concentrations of biodegradable detergent (0.03 ml.l<sup>-1</sup>, 0.06 ml.l<sup>-1</sup>, 0.10 ml.l<sup>-1</sup> and control). At 21 days, the cladocerans were removed and taken to

the laboratory to measure their total length, head, caudal spine and antenna. This was done with scanning images of each animal from digital photographs of high-resolution using stereomicroscope and applying TPSdig software to the measurements. In the acute bioassays, the average value of the  $LC_{50}$  obtained at 48 h. was  $0.1416 \pm 0.0008$  ml.l<sup>-1</sup> for the biodegradable detergent. In the control individuals in the chronic bioassays, the mean length of the caudal spine was  $0.13 \pm 0,063$  mm while in the animals exposed to detergent, an increase of the caudal size occurred ( $0.21 \pm 0,048$  mm). In the tests with grouped individuals the differences were not significant in several measurements. The mechanism that stimulates cyclomorphosis in *D. magna* occurred in the higher concentrations of detergent, and in isolated animals. The mean length of the caudal spine increased significantly in the largest concentration.

**KEYWORDS:** Cladocerans, cyclomorphosis, detergents, xenobiotics, urban contamination.

## Introducción

La ciclomorfofosis es un fenómeno característico de poblaciones planctónicas frecuentemente observados en dáfhnidos como en otros grupos de cladóceros y, consiste en cambios en la forma de ciertas estructuras o partes del cuerpo de los organismos (1). Estos, pueden estar inducidos por algún factor ambiental externo, produciendo alargamiento de la espina caudal o variación en la forma de la cabeza, tal como el desarrollo de un "yelmo" (2). El cladócero *Daphnia magna*, si bien no es originario de la región, es uno de los organismos más uti-

lizados en ensayos ecotoxicológicos, por su fácil cultivo y su corto ciclo de vida (3). Sin embargo no se registra abundante información sobre cambios en su morfología.

La observación de la ciclomorfofosis ha sido estudiada hace más de un siglo indicando que puede ocurrir con cambios estacionales (4), o de turbiedad, viscosidad, estratificación del agua y alimento (5, 6, 7, 8, 9, 10). En la actualidad también se asocia la respuesta ciclomórfica con sustancias químicas que son liberadas por depredadores al medio, denominadas kairomonas (11). Edmondson (12) ha acuñado el térmi-

no quimiomorfosis para este fenómeno. Estas manifestaciones morfológicas debido a la presencia de un depredador es más evidente que la inducida por las variaciones en temperatura, turbulencia y concentración de oxígeno disuelto afectando a estadios juveniles (13, 14, 15, 16, 17). Otros elementos como algunas sustancias xenobióticas también se han descrito que provoca cicломorfosis en dáfnidos (18). Los individuos afectados deben realizar mecanismos de detoxificación de esas sustancias xenobióticas incorporadas, pudiendo ocurrir cambios metabólicos internos manifestados de diferentes maneras en los organismos individualmente o como mecanismos de ajuste de una población. Esta posible diferenciación revela un mecanismo complejo de la respuesta cicломórfica en los organismos debiendo tener especial cuidado en las observaciones.

En las cuencas hídricas, los sistemas acuáticos presentan una estrecha interrelación con los sistemas circundantes; siendo la contaminación una consecuencia de los procesos productivos ligados al crecimiento de la población. La producción y utilización de elementos xenobióticos proviene de las prácticas humanas modernas, las cuales ponen en riesgo al ambiente como consecuencias del crecimiento económico, confort y disponibilidad "ilimitada" de los recursos, y la acumulación y eliminación de residuos. Con ellos, la degradación de los ambientes, es una realidad. De esta manera, los ecosistemas acuáticos reflejan en general el estado de la biosfera (19).

Las fuentes puntuales o dispersas de contaminación, pueden perturbar los diversos sectores de la biota acuática con el ingreso de sustancias químicas, dependiendo de su toxicidad, concentración, frecuencia de vertido y tiempo de vida del xe-

nobiótico (20). Es por ello que la resiliencia del ecosistema va a depender de la capacidad de autodepuración del mismo y de las características específicas de sus integrantes (20).

Es notable observar los cambios vertiginosos que el hombre introduce con sus prácticas cotidianas. Unas de ellas, es el vertido de desechos domésticos a los ambientes lóticos y/o lénticos, siendo los detergentes un elemento de abundancia (21). El uso de detergentes es cada vez mayor, y su concentración se ve en aguas superficiales indicándose a estos como los contaminantes de naturaleza orgánica de mayor trascendencia a nivel mundial (21, 22). Este aumento provoca una mayor disponibilidad de nutrientes producidos por el hombre y la eutrofización de los sistemas, poniendo en riesgo la calidad ambiental de los ambientes acuáticos. La propiedad más común de los detergentes es la capacidad de modificar las condiciones físico y químicas del agua, disminuyendo la tensión superficial de esta mediante tensioactivos. Su biodegradabilidad es variable (23, 24), pudiendo ser descompuestos por las bacterias en distinto grado (25). Los fabricados con base en ABS (Alquil benceno sulfonato de sodio ramificado) son resistentes al ataque biológico, debido a su composición molecular ramificada. En vez, aquellos compuestos con LAS (Alquil benceno sulfonato de sodio lineal) son biodegradables en condiciones aeróbicas pero resistentes a la actividad bacteriana anaeróbica (25). Los tensioactivos aniónicos conformados con base LAS, comprenden más del 40% de los tensioactivos mas utilizados (26). Estudios realizados muestran que aquellos con LAS se degradan en un 90%, mientras que las ABS sólo lo hacen en un 20% (27). Además los aniónicos son generalmente menos tóxicos

que los no iónicos debido a su menor carácter hidrófobo (26).

La toxicidad de LAS en invertebrados acuáticos, en general es considerada que varía con límites amplios (1 a 100 mg.l<sup>-1</sup>) (28, 29, 30). Por otra parte, efectos negativos en el crecimiento han podido identificarse en otros invertebrados acuáticos (31, 32). Por ello, el crecimiento diferencial de alguna parte del cuerpo permite identificar la acción de algún xenobiótico sobre los organismos, siendo posible reconocer alguna respuesta diferencial entre individuos aislados y agrupados. Como se ha observado con otros xenobióticos, la ciclomorfosis corresponde a una respuesta a un estrés, el cual sería provocado por el detergente como modelo xenobiótico.

El objetivo de este trabajo es identificar la posible ocurrencia de ciclomorfosis en el cladócono *D. magna* por exposición a un formulado de detergente de uso doméstico masivo, con especial atención a la respuesta individual y poblacional de los individuos.

### **Materiales y métodos**

Los estudios se desarrollaron en los laboratorios de bioensayos y crustáceos del Instituto Nacional de Limnología, ubicado en la ciudad de Santo Tomé, provincia de Santa Fe. Las condiciones en las que realizaron los ensayos fueron de 20 ± 1°C de temperatura y con fotoperíodo de 16:8 luz-oscuridad.

En la experiencia se utilizó un formulado de detergente aniónico con 80% de biodegradabilidad mínima comercial de uso masivo y doméstico, conteniendo: lineal alquilbencensulfonato de sodio (materia activa mínima 7,65 %), además presenta lauril eter sulfonato de sodio, coco amido propil betaína, viscosantes, preservantes, sequestrantes, colorante, perfume y glicerina.

Los detergentes del tipo LAS, como el empleado en las experiencias, sufren una degradación rápida de aproximadamente 1 a 3 semanas (33).

Los ejemplares de *D. magna* fueron obtenidos a partir de un cultivo mantenido en el Instituto Nacional de Limnología. Los individuos obtenidos fueron trasladados a un laboratorio para su aclimatación. Luego de un tiempo de adaptación, hembras partenogénicas fueron colocadas en recipientes con medio de cultivo. Este estuvo compuesto por 50 % de agua de perforación y 50 % proveniente de un cuerpo de agua artificial filtrada a través de un filtro de acetato de celulosa tipo "Millipore" de 0,45 µm de tamaño de poro. Las características de los parámetros químicos más importantes son indicadas en la tabla 1. Luego de 24 hs fueron obtenidos neonatos, los cuales se utilizaron en los bioensayos.

En primer lugar se realizaron ensayos estáticos preliminares y definitivos de toxicidad aguda del formulado comercial de detergente, determinando la CL<sub>50</sub> a las 48 horas. Esta información sirvió de base para el establecimiento del diseño experimental crónico. La determinación del valor de la CL<sub>50</sub> se realizó mediante un análisis Probit (34).

Luego de la obtención de la CL<sub>50</sub>, se procedió a realizar dos ensayos crónicos con individuos aislados y agrupados utilizando las siguientes concentraciones subletales del formulado de detergente biodegradable: 0,03 ml.l<sup>-1</sup>; 0,06 ml.l<sup>-1</sup>; 0,10 ml.l<sup>-1</sup> y un control. En ambos casos se utilizaron neonatos de 24 horas.

En la primera se utilizaron 80 ejemplares ubicándolos individualmente en 20 recipientes de 50 ml para cada concentración testada y control. Mientras que en la experiencia grupal (población) se utilizaron 800 individuos, colocando 10 cladóconos por re-

recipientes de 110 ml, para ello se utilizaron 80 recipientes en total (20 para cada concentración y control).

Diariamente se suministró alimento (algas y levaduras), retiraron heces y sobrante de comida. Con la misma periodicidad, el 30% del medio fue renovado asegurando la estabilidad de las concentraciones determinadas. La experiencia duró 21 días.

Luego del período de ensayo fueron retirados los ejemplares y fotografiados bajo microscopio estereoscópico (x40). Las imá-

genes de alta resolución fueron digitalizadas mediante el programa TpsDig (35). En cada ejemplar fueron medidas las longitudes de largo total (Lt), espina caudal (ec), basípodo de la antena (a), y el ancho de la cabeza (c) (Figura 1).

Los valores de los diferentes parámetros biométricos fueron comparados entre las distintas concentraciones mediante ANOVA. Previamente se evaluó la homoscedasticidad (test de Bartlett) y normalidad (test de Shapiro-Wilk) de los ejemplares adultos (36).

Parámetro	Valor
pH	7,9
Conductividad $\mu\text{mhos cm}^{-1}$	1200
Alcalinidad ( $\text{CaCO}_3$ ) $\text{mg l}^{-1}$	434,4
Carbonatos ( $\text{CO}_3^{=}$ ) $\text{mg l}^{-1}$	ND (0,5)
Bicarbonatos ( $\text{HCO}_3^{-}$ ) $\text{mg l}^{-1}$	529,9
Dureza Total ( $\text{CaCO}_3$ ) $\text{mg l}^{-1}$	232,3
Hierro Total (Fe) $\text{mg l}^{-1}$	0,07
Sulfato ( $\text{SO}_4^{=}$ ) $\text{mg l}^{-1}$	115,4
Cloruro (Cl) $\text{mg l}^{-1}$	95,8
Nitratos ( $\text{NO}_3^{-}$ ) $\text{mg l}^{-1}$	6,9
Nitritos ( $\text{NO}_2^{-}$ ) $\text{mg l}^{-1}$	ND (LD 0,005)
Amonio ( $\text{NH}_4^{+}$ ) $\text{mg l}^{-1}$	0,47
DQO $\text{mg O}_2.\text{l}^{-1}$	15,9

**Tabla 1:** Valores de diferentes parámetros medidos en el agua de cultivo utilizada en las experiencias con *Daphnia magna*. ND: no detectado, el valor entre paréntesis corresponde a la concentración del límite de detección del método empleado

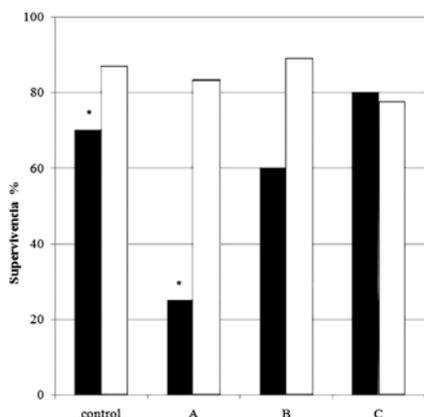


**Figura 1:** Diagrama del cladócer *Daphnia magna* indicando las diferentes medidas obtenidas de los ejemplares en las experiencias de cultivos aislados y grupales.

## Resultados

La supervivencia en el ensayo agudo disminuyó con el tiempo, determinando a las 48 horas el valor de  $\text{CL}_{50}$  para *D. magna* expuesta al formulado de detergente biodegradable de uso masivo y comercial de  $0,1416 \pm 0,0008 \text{ ml.l}^{-1}$

En las experiencias de crecimiento individual el grupo control y aquellos expuestos a las distintas concentraciones de detergente tuvieron una supervivencia entre 80 y 25% luego de 21 días de cultivo (Figura 2). Mien-



**Figura 2:** Supervivencia de *Daphnia magna* luego de 21 días cultivados individualmente (barras negras) y grupales (barras blancas) expuestos a tres concentraciones del formulado detergente (A: 0.03 ml.l<sup>-1</sup>, B: 0.06 ml.l<sup>-1</sup>, C: 0.10 ml.l<sup>-1</sup>) y control.

\* Diferencias significativas con respecto al grupo control  $p < 0,05$  (ANOVA y post test de Tukey)

tras que la mortalidad, al cabo de ese tiempo en la experiencia con individuos agrupados, fue similar en cada concentración y el control (Figura 2).

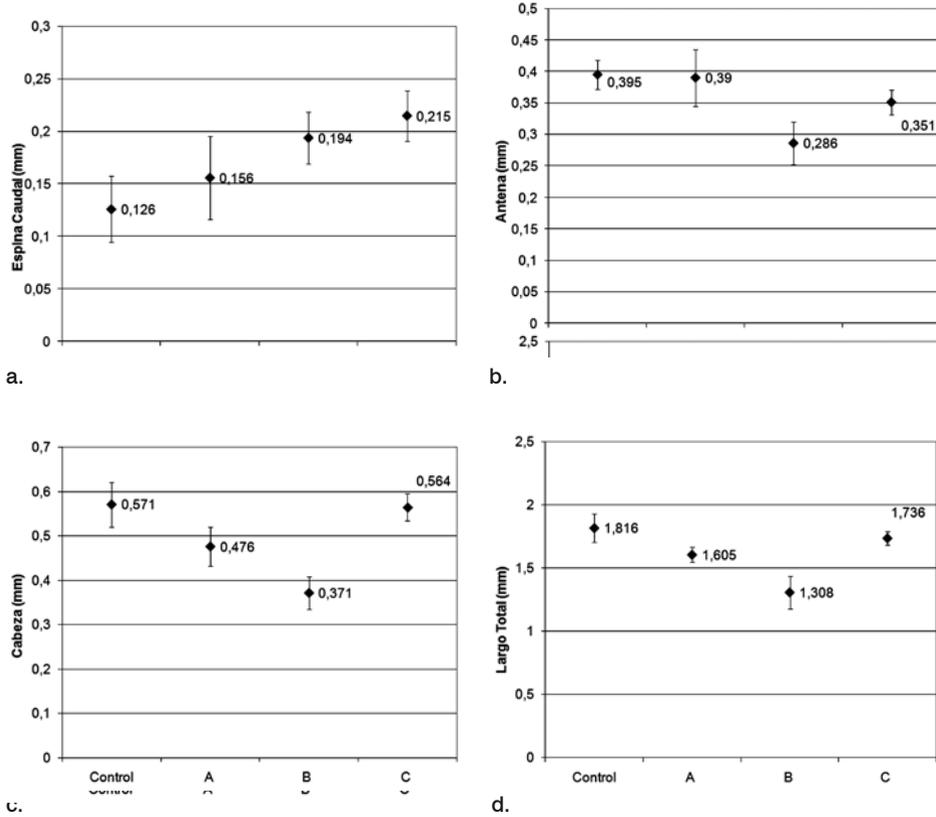
Los cultivos de ejemplares aislados de *D. magna* al finalizar la experiencia tuvieron un largo total promedio de  $1,619 \pm 0,274$  mm siendo similar entre las distintas concentraciones y el control, excepto la segunda concentración de detergente quienes tuvieron tallas inferiores (ANOVA F: 14,32  $p < 0,0001$ , post test de Tukey  $p < 0,05$ ) (Figura 3d). De la misma manera, se pudo observar que el ancho de la cabeza y el largo del basípodo de la antena no difirieron entre los individuos expuestos a las distintas concentraciones de detergente y el control exceptuando nuevamente a los individuos provenientes de la concentración intermedia (c-ANOVA F: 19,14  $p < 0,0001$ , post test de Tukey  $p < 0,05$ ; a-ANOVA F: 6,25,  $p = 0,0015$ , post test de Tukey  $p < 0,05$  respectivamente) (Figura 3b, 3c). Sin embargo diferencias mayores y significativas en el largo de la espina caudal fue observada entre el control y los ejemplares expuestos a las dos concentraciones más altas de detergente (ANOVA F: 10,91,  $p < 0,0001$ , post test de Tukey

$p < 0,05$ ). Las espinas caudales fueron más largas en los individuos expuestos a estas dos concentraciones del formulado de detergente (Figura 3a).

En la experiencia con ejemplares agrupados la talla de los ejemplares al terminar la experiencia de exposición al formulado de detergente fue similar entre las concentraciones y el control ( $1,626 \pm 0,288$  mm) (ANOVA F: 332,58  $p < 0,0001$ , post test de Tukey  $p < 0,05$ ) (Figura 4d). Por otra parte y de la misma manera, las otras tres medidas (ancho de cabeza, largo de basípodo de la antena y espina caudal) no difirieron significativamente entre los individuos del control y aquellos expuestos a las distintas concentraciones de detergente (c-ANOVA F: 265,44  $p < 0,0001$ , post test de Tukey  $p < 0,05$ ; a-ANOVA F: 122,56,  $p < 0,0001$ , post test de Tukey  $p < 0,05$ ; ec-ANOVA F: 143,91,  $p < 0,0001$ , post test de Tukey  $p < 0,05$  respectivamente) (Figura 4).

La relación entre las diferentes medidas y el largo total fueron similares tanto en los individuos aislados como en aquellos agrupados (Figura 5), excepto en la relación longitud de la espina caudal y largo total de los ejemplares aislados. En estos los valores en

**Figura 3:** Valores medios y desvíos estándares (barra) de diferentes medidas obtenidas en *Daphnia magna* luego de 21 días cultivados individualmente y expuestos a tres concentraciones del formulado de detergente (A: 0.03 ml.l<sup>-1</sup>, B: 0.06 ml.l<sup>-1</sup>, C: 0.10 ml.l<sup>-1</sup>) y control. a) espina caudal, b) antena, c) ancho de cabeza, d) largo total.



\* Diferencias significativas con respecto al grupo control  $p < 0,05$  (ANOVA y post test de Tukey)

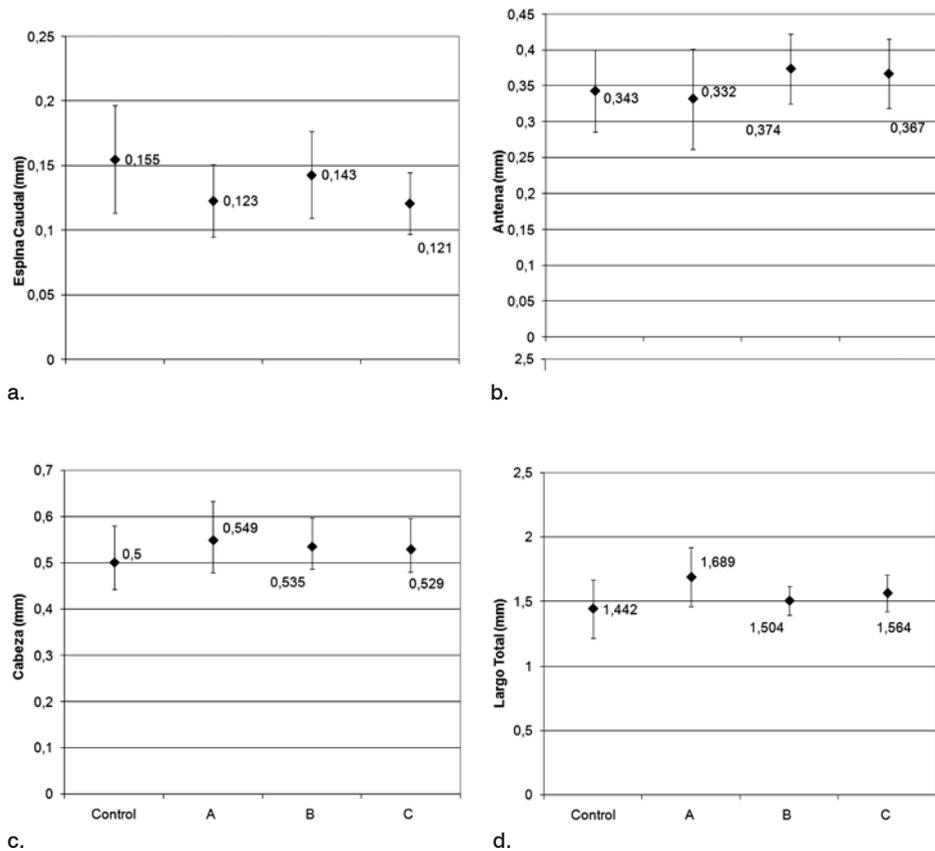
las dos concentraciones mayores del formulado de detergente fueron significativamente diferentes a los calculados en el control (Figura 5a). Por otra parte se observa algunas diferencias entre los individuos aislados y agrupados sin embargo estas en general no fueron significativas, excepto en las relaciones de espina caudal y largo total de los ejemplares en la concentración C, longitud del basípodo de la antena y largo total de los ejemplares expuestos a la concentra-

ción B; y en la relación entre ancho de cabeza y largo total de los ejemplares expuestos a las concentraciones A y B (Figura 5).

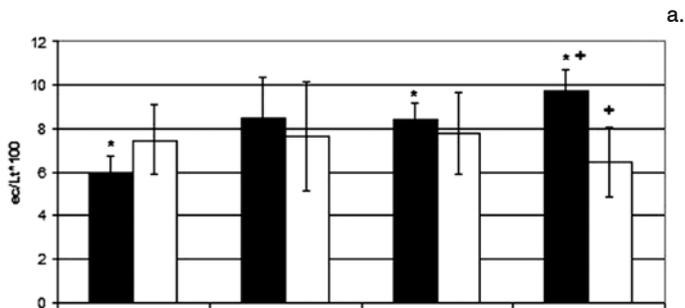
### Discusión

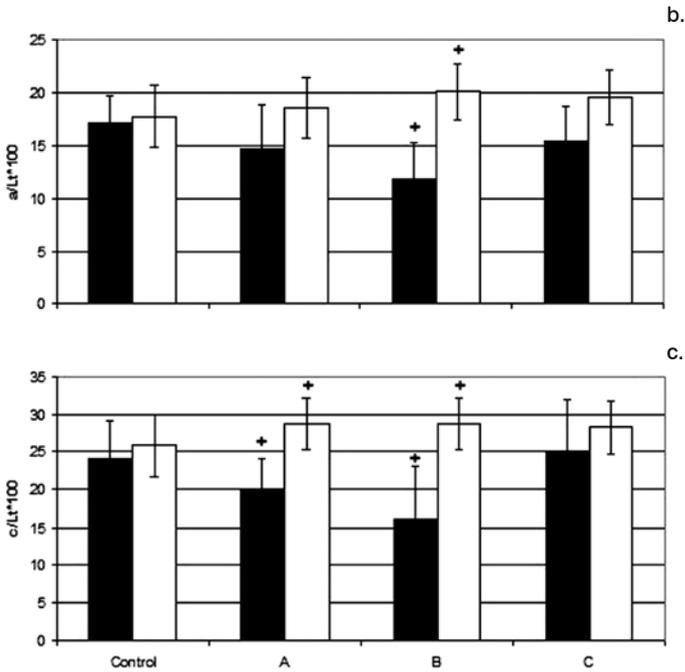
La contaminación de sustancias químicas, más especialmente los formulados de detergentes biodegradables, pueden provocar estrés en los organismos acuáticos. Si bien, investigaciones anteriores han indicado que la cicломorfosis se manifiesta por

**Figura 4:** Valores medios y desvíos estándares (barra) de diferentes medidas obtenidas en *Daphnia magna* luego de 21 días cultivados grupalmente y expuestos a tres concentraciones del formulado de detergente (A: 0.03 ml.l<sup>-1</sup>, B: 0.06 ml.l<sup>-1</sup>, C: 0.10 ml.l<sup>-1</sup>) y control. a) espina caudal, b) antena, c) ancho de cabeza, d) largo total.



**Figura 5:** Relaciones entre la longitud total y diferentes medidas de *Daphnia magna* mantenidos individualmente (barra negra) y agrupados (barra blanca) en tres concentraciones del formulado de detergente y control sin detergente (A: 0.03 ml.l<sup>-1</sup>, B: 0.06 ml.l<sup>-1</sup>, C: 0.10 ml.l<sup>-1</sup>). Las relaciones son: a) longitud de espina caudal y largo total, b) longitud del basípodo de la antena y largo total, c) ancho de la cabeza y largo total.





\* Diferencias significativas con respecto al grupo control  $p < 0,05$  (ANOVA y post test de Tukey); + Diferencias significativas entre los valores de la experiencia con individuos aislados y agrupados  $p < 0,05$  (ANOVA y post test de Tukey).

cambios en la temperatura, turbiedad, luz y viscosidad del agua (4, 5, 6, 7, 8, 9, 10), también ciertos contaminantes pueden causar esas modificaciones morfológicas (18).

En este trabajo se puede observar cambios en la longitud de la espina caudal de ejemplares de *D. magna* expuestos a un detergente de uso doméstico y mantenidos individualmente. La generación de ciclomorfosis en los ejemplares expuestos a concentraciones de 0,10 ml.l<sup>-1</sup> ocurrió en todos los individuos. Este xenobiótico podría estar actuando sobre los receptores de una sustancia que podrían emitir o estar presente en el medio por acción de los depredadores, denominada kairomona. Las kairomonas son capaces de provocar cambios morfológicos en diferentes especies

de dáfhnidos (11, 12, 37). Los organismos ante la presencia de esta sustancia extraña, reaccionan incrementando el crecimiento diferencial de diversas partes del organismo (37). Esto es considerado como una estrategia de defensa (12, 37).

Sin embargo, en la experiencia con ejemplares agrupados no se observó ningún cambio en la forma de los individuos. Esto permitiría pensar que la inducción a la ciclomorfosis por el detergente no ocurre cuando existe una población. Es decir, cuando los organismos se encuentran con otros dáfhnidos, existiría algún tipo de comunicación química o mecánica entre los cladóceros indicando a la población la no existencia del depredador. Este mecanismo ha sido relacionado también con receptores mecá-

nicos que perciben la turbulencia generada por los predadores invertebrados (37).

Al disponerlos individualmente, los organismos no encuentran respuesta de sus congéneres ante la sustancia que le provoca tal estrés. Esto podría generar la condición ciclomórfica, en donde el aumento del tamaño de la espina caudal se ha indicado como una respuesta de defensa ante los depredadores (12, 36, 38).

También esta diferencia entre las dos experiencias podría deberse a una mayor disponibilidad del formulado de detergente en los individuos aislados que en los agrupados. O, que en este grupo ocurriera una bio-disponibilidad mayor de nutrientes permitiendo generar estrategias de detoxificación que no se exprese como cambios de forma. Por otra parte, el estado nutricional deficitario como también algunos biocidas no provocan cambios en las formas de algunos dáphnidos como *D. longichepala* (40). Esto acompleja la interpretación en algunos casos cuando son más de una variable las que se evalúan.

Si bien esta especie no es regional, este trabajo permite entender el proceso de ciclomorfosis en cladóceros siendo posible su ocurrencia en las especies locales. De esta manera se podría evaluar ciertos riesgos ecológicos juzgados a partir de los efectos sobre los organismos o las comunidades (41, 42).

### Agradecimiento

Este trabajo fue financiado por el proyecto CONICET PIP6275.

### Bibliografía

1. Hutchinson, G. E. 1967. A Treatise on Limnology. II. Introduction to Lake Biology and the Limnoplankton. John Wiley & Sons, New York. 1115 p.
2. Margalef, R. 1988. Limnología. Omega, Barcelona, 341p.
3. Nuñez, M. y Hurtado, J. 2005. Biensayos de toxicidad aguda utilizando *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Daphniidae) desarrollada en medio de cultivo modificado. Rev. peru. Biol. **12**(1): 165-170 p.
4. Wesenberg-Lund, C. 1900. Von dem Abhängigkeitsverhältnis zwischen dem Planktonorganismen der Bau und den spezifischen Gewicht des Süßwassers. Biol. Zentralb., **20**: 606-619, 644-656.
5. Brooks, J. L. 1964. The relationship between the vertical distribution and seasonal variation of limnetic of *Daphnia*. Verh. Intern. Ver. Limnol., **15**:684-689.
6. Jacobs, J. 1970. Multiple determination der Zyklomorphose durch Umweltfaktoren. Eine Regressionsanalyse an *Daphnia galeata* Sars im Freiland. Oecologia (Berlin), **5**:96-126.
7. Wagler, E. 1937. Klasse Crustacea, Krebstiere. Die Tierwelt Mitteleuropas, II **2**:1-224. Leipzig.
8. Wesenberg-Lund, C. 1926. Contributions to the biology and morphology of the genus *Daphnia*. K. danske Vidensk. Selsk. Skr., Naturw. Math. Afd., s. 8, **11**:92-250.
9. Wesenberg-Lund, C. 1939. Biologie der Süßwassertiere. Wirbellose Tiere. Julius Springer, Wien, 817pp.
10. Woltereck, R. 1930. Alte und neue Beobachtungen über die geographische und die zonare Verteilung der helmlosen und helmtragenden Biotypen von *Daphnia*. Int. Revue ges. Hydrobiol., **24**L:358-380.
11. Brown, W., Eisner, T. y Whittaker, R. 1970. Allomones y kairomones: transspecific chemical messengers. Bioscience, **20**: 21 -22
12. Edmondson, W. 1987. *Daphnia* in experimental ecology: notes on historical perspectives. Mem. Ist. Ital. Idrobiol., **45**: 11-30
13. Grant, J. y I. Bayly. 1981. Predator induction

- of crests in morphs of the *Daphnia carinata* King complex. *Limnol. Oceanogr.* **26**:201-208.
- 14.** Vuorinen, I., M. Ketola, & M. Walls. 1989. Defensive spine formation in *Daphnia pulex* Leydig and induction by *Chaoborus crystallinus* De Geer. *Limnol. Oceanogr.* **34**:245-248.
- 15.** Hanazato, T. 1991. Induction of development of high by a *Chaoborus*-released chemical in *Daphnia galeata*. *Arch. Hydrobiol.* **122**:167-175.
- 16.** Tollrian, R. 1990. Predator-induced formation in *Daphnia cucullata* (Sars). *Arch. Hydrobiol.* **119**:191-196.
- 17.** Tollrian, R. 1994. Fish-kairomone induced morphological changes in *Daphnia lumholtzi* (Sars). *Arch. Hidrobiol.* **130**:69-75.
- 18.** Hanazato, T. y Dodson, S. 1993. Morphological responses of four species of cyclomorphic *Daphnia* to short-term exposure to the insecticide carbaryl. *Journal of plankton research.* **15**(9): 1087-1095
- 19.** Ostroumov, S.A. 2005. Biological effects of surfactants. Ed. Taylor & Francis. Rusia.
- 20.** Newman, M.C. y Unger, M. A. 2003. Fundamentals of Ecotoxicology. Segunda edición. Ed: Lewis Publishers.
- 21.** Lewis, M. A. 1986. Comparison of the effects of surfactants on freshwater phytoplankton communities in experimental enclosures and on algal population growth in the laboratory. *Environmental Toxicology*, **5**(3): 319-332.
- 22.** Álvarez, G.; Medina, G. y Sanchez, G. 1999. Efecto del detergente biodegradable (Aquil sulfonato de sodio) en el consumo de oxígeno y tasa de filtración del bivalvo *Semimytilus algosus*. *Revista Peruana de Biología* **6**: 68-74.
- 23.** Jensen, J. 1999. Fate and effects of linear alkylbenzene sulphonate (LAS) in the terrestrial environment. *Science of the Total Environment*, **226**: 93-111.
- 24.** Temara, A.; Carr, G.; Webb, S.; Versteeg, D. y Feijtel, T. 2001. Marine risk assessment: linear alkylbenzenesulphonates (LAS) in the North Sea. *Marine Pollut ion Bulletin*, **42**: 635-642.
- 25.** Ying, G.-G. 2006. Fate, behavior and effects of surfactants and their degradation products in the environment. *Environment International*, **32**(3): 417-431.
- 26.** Scott, M y Jones, N. 2000. Review: the biodegradation of surfactants in the environmental. *Biochemia et Biophysica Acta*, **1508**: 235-251
- 27.** <http://www.cepis.org.pe/eswww/repamar/gtzproye/impacto/anexo1.html> Ingresado: 2.6.08
- 28.** Faba, G. y Crotti, E. 1979. Efecto di un deterivo commerciale e di uno dei suoi componenti, LAS, sulla produzione di nauplii in *Tisbe holothuriae* (Copepoda, Harpacticoida) in condizioni di alto e basso affollamento. *Atti Accad. naz. Lincei. Rend. Cl. Sci. fis.,mat e natur*, **66** (3): 223-231.
- 29.** Sivak, A.; Goyer. M.; Permak, J.; y Thayer, P. 1982. Environmental and human health aspects of commercially important surfactants. In *Solution behavior of surfactants*. New York: Plenum Press, Vol. 1, 173 p.
- 30.** Ostroumov, S.A. 1981. Protection of the environment. *Veterinary encyclopedic dictionary*. Moscow: Sov. Entsiklopediya: 205-206 p.
- 31.** Hansen, B.; Fotel, F.; Jensen, N. y Wittrup, L. 1997. Physiological effects of the detergent linear alkybenzene sulphonate on blue mussel larvae (*Mytilus edulis*) in laboratory and mesocosm experiments. *Marine Biology*, **128**: 627-637.
- 32.** Castiglioni, M. y Collins, P. 2007. Efectos de detergente sobre un integrante de la fauna acuática. XII Jornadas de Jóvenes Investigadores Asociación de Universidades Grupo Montevideo (AUGM) "Investigación, Integración y Desarrollo" Asunción del Paraguay, Paraguay. Disponible en CD.
- 33.** Iannacone, J. y Alvaríño, L. 2002. Efecto del detergente doméstico Alquil Aril Sulfonato de Sodio Lineal (LAS) sobre la mortalidad de tres caracoles dulceacuícolas en el Perú. *Ecología Aplicada*. **1**: 81-87.
- 34.** Finney, D. J. 1971. Probit analysis.

Cambridge University Press, New York. 918 p.

- 35.** Rohlf, F. J. 2006. tpsDig program, version 2.10. Department of Ecology and Evolution, State University New York. Stony Brook.
- 36.** Zar, J.H., 1996. Biostatistical Analysis. Prentice Hall, New York.
- 37.** JACOBS, J. 1987. Cyclomorphosis in *Daphnia*. Mem. Ist. Ital. Idrobiol., **45**: 325-352.
- 38.** Tollrian, R y Laforsch C. 2006. Linking predator kairomones and turbulence: synergistic effects and ultimate reasons for phenotypic plasticity in *Daphnia cucullata*. Archiv für Hydrobiologie, **167**(14): 135-146
- 39.** Kolar, C y Wahl, D. 1998. *Daphnid* morphology deters fish predators. Oecologia, **116**: 556-564.
- 40.** Barry, M.J. 1999. The effects of a pesticide on inducible phenotypic plasticity in *Daphnia*. Environmental Pollution **104**: 217-224.
- 41.** Iannacone, J. y Alvaríño, L. 2002. Evaluación del riesgo ambiental del insecticida Cartap en bioensayos con tres invertebrados. Agricultura Técnica, 366-374 p.
- 42.** Iannacone, J.; Caballero, C. y Alvaríño, L. 2002. Empleo del caracol de agua dulce *Physa venustula Gould* como herramienta ecotoxicológica para la evaluación de riesgos ambientales por plaguicidas. Agricultura Técnica, **62**: 212-225.