

Universidad de Chile
Facultad de Ciencias

**EFECTOS DEL CU Y DEL PH SOBRE LA
ADECUACIÓN BIOLÓGICA DE
Ceriodaphnia dubia (Richard 1894)
(Crustacea, Cladocera) EN
EXPERIMENTOS DE MICROCOSMOS**

Tesis para optar al grado de Magister en Ciencias Biológicas con mención en Ecología
Por

Ana María Gagnetten Dalla Fontana

Directora de Tesis: M. Sc. Irma Vila Pinto Co-director: Dr. Víctor Marín Briano
Enero, 2000

..	1
AGRADECIMIENTOS .	3
RESUMEN .	5
ABSTRACT .	7
INTRODUCCIÓN .	9
Hipótesis .	11
Objetivos .	12
Objetivo general . .	12
Objetivos específicos .	12
MATERIALES Y METODOS .	13
Características biológicas de los cladóceros .	13
Selección de los organismos experimentales .	14
Cultivo de Ceriodaphnia dubia .	14
Cultivo de Chlorella vulgaris .	15
Condiciones experimentales: concentración de CuSO₄ y valores de pH . .	15
Estimación de la concentración de Cu⁺² biológicamente disponible .	16
Diseño experimental . .	17
1. Experimento para el estudio del efecto del cobre y el pH sobre la sobrevivencia, fecundidad, edad de la primera reproducción y tasa reproductiva neta de <i>C. dubia</i>. . .	17
2. Experimento para evaluar el efecto del cobre sobre la estructura y la dinámica poblacional de <i>C. dubia</i> .	18
RESULTADOS . .	21
1. Experimentos de sobrevivencia y fecundidad . .	21
1.1. Sobrevivencia .	21
1. 2. Fecundidad . .	25
2. Experimentos de dinámica y estructura poblacional de <i>C. dubia</i> .	30
2.1. Análisis del tamaño poblacional . .	30

2.2 Análisis de la estructura de la población .	32
2.3. Análisis de la edad de la primera reproducción .	35
2.4. Análisis de la fecundidad . .	35
DISCUSION .	37
Efectos sobre la sobrevivencia y el tamaño de las camadas . .	37
Efectos sobre la edad de la primera reproducción .	38
Efectos sobre la tasa reproductiva neta . .	39
Efectos en la estructura y dinámica de las poblaciones . .	39
ANEXO 1 .	43
ANEXO 2 .	45
ANEXO 3 .	47
ANEXO 4 .	51
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .	53

DEDICATORIA

Quiero dedicar esta tesis a todos mis seres queridos; mi familia grande me apoyó dándome ánimos allende la cordillera, haciéndose presente de múltiples formas. Mi familia chica, mi marido y mis hijos, con su habitual nobleza, me han otorgado además de su incondicional cariño, la comprensión suficiente y necesaria como para que esta tesis pudiera concretarse. A todos ellos, les expreso mi cariño y mi agradecimiento profundos.

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi agradecimiento a las siguientes personas e instituciones:

En primer lugar a mi tutora, Prof. Irma Vila, por haberme apoyado incondicionalmente para que esta tesis pudiera concretarse y por sus valiosos aportes conceptuales.

También quiero expresar mi reconocimiento a mi co-tutor, Víctor Marín, por sus precisas y oportunas sugerencias.

A mis correctores, Prof. Italo Serey, Prof. Ramiro Bustamante y Prof. Vivian Montecino, por ayudarme a jerarquizar y sistematizar mis ideas.

Al Dr. Jaime Pizarro por su asesoramiento en los aspectos químicos; a Rodrigo Ramos, por haberme proporcionado los sujetos de experimentación y por sus valiosas sugerencias metodológicas.

A los responsables de todos los laboratorios de Hidrobiología de la Facultad de Ciencias, por haber permitido generosamente que emplee sus instalaciones y equipos: Profesores Irma Vila, Vivian Montecino, Hermann Mulhauser y Manuel Contreras.

Al Instituto Nacional de Limnología (CONICET - Argentina) por el acceso a sus laboratorios.

A mis compañeros de postgrado, por su amistad.

RESUMEN

La gran complejidad de los ecosistemas acuáticos ha dificultado detectar respuestas poblacionales a cambios en las condiciones del ambiente y distinguirlos de aquellos que surgen como consecuencia de interacciones biológicas. La aproximación usualmente utilizada ha sido establecer correlaciones entre variables ambientales tales como la temperatura, el pH y la disponibilidad de alimento y los cambios efectivamente observados en la dinámica de las poblaciones naturales. Sin embargo, este enfoque con frecuencia genera errores en las estimaciones inferidas. Esta situación ha llevado a efectuar estudios poblacionales a escala de micro y mesocosmos en los que las variables pueden aislarse y las causas de sus variaciones identificarse con mayor exactitud.

Una causa importante de perturbación antrópica en ecosistemas acuáticos es el incremento de metales pesados, entre los que se destaca el cobre por su reconocida toxicidad. Sin embargo, el estudio del comportamiento químico del cobre en solución entrega evidencia de que la abundancia de la forma tóxica del cobre (cobre iónico) es fuertemente dependiente del pH.

Esta tesis estuvo dirigida a evaluar en experimentos de microcosmos el efecto del cobre iónico dependiente del pH sobre la adecuación biológica de *Ceriodaphnia dubia*, especie zooplanctónica frecuente en los ecosistemas acuáticos continentales.

Se realizaron dos grupos de experimentos: de sobrevivencia y fecundidad y de dinámica poblacional. En los primeros, se manipuló el pH y la concentración de cobre, encontrándose evidencia experimental tanto del efecto negativo del pH ácido, como del cobre evidenciado por diferencias significativas entre controles y tratamientos en los rasgos de historia de vida y atributos poblacionales analizados. En consecuencia, en los experimentos de dinámica poblacional sólo se manipuló la concentración de cobre iónico biológicamente disponible pero se mantuvo constante el pH.

Los resultados de ambos experimentos fueron concordantes y mostraron un importante efecto tóxico del cobre evidenciado por diferencias significativas entre controles y tratamientos en la sobrevivencia y en la fecundidad. La edad promedio de la primera reproducción se atrasó, el número de neonatos producidos por hembra y el número de las camadas disminuyeron con el incremento en la concentración de cobre a ambos pH. R_0 siempre fue menor a pH 6 que a pH 8 y se relacionó negativamente con el incremento en la concentración de cobre a ambos pH. El cobre también afectó significativamente la dinámica poblacional al producir un retardo en el crecimiento y posterior declinación del tamaño poblacional en la concentración menor y una mortalidad masiva que determinó la extinción de la población en la concentración mayor.

Se propone un valor menor de toxicidad del cobre que el citado en la literatura para el grupo de cladóceros.

Se discuten los potenciales efectos que el incremento del cobre en solución pudiera tener sobre comunidades que ocupan una posición central en las redes tróficas acuáticas.

ABSTRACT

The great complexity of the aquatic ecosystems has hindered the detection of population responses to conditions of environmental changes and to distinguish them from those that develop as a consequence of biological interactions. The approach usually used has been to correlate the environmental variables such as temperature, pH and food availability with the changes observed in natural populations dynamic. However, this procedure frequently generates errors in the inferred estimates. This situation has furthered population studies at a micro and mesocosms scale in which the variables can be isolated and the causes of the variations identified more accurately.

An important cause of anthropic disturbance in aquatic ecosystems, is the enrichment with heavy metals; among these, copper stands out for its important toxicity. However, the study of dissolved copper chemical behavior evidences that the abundance of the toxic form of copper (ionic copper) is strongly dependent on the pH.

This thesis was focused to evaluate, in microcosms experiments, the effect of the pH dependance of the ionic copper on the fitness of *Ceriodaphnia dubia*, a frequent zooplanktonic species of fresh-water ecosystems.

Two groups of populational experiments were carried out : survival and fecundity and a population dynamic one. In the first ones, the pH and the copper concentration were manipulated, obtaining experimental evidences that both, the negative effect of the acid pH, and the ionic copper on the life history attributes of the population shown by significative differences between controls and life history attributes and population parameters analized. Consequently, in the population dynamic experiments the concentration of ionic copper biologically available was only changed at a constant pH.

The results of both experiments were concordant and showed an important copper toxic effect that was evidenced through significant differences in survival and fecundity between controls and treatments. At both pH, the average age at the first reproduction increased, the number of neonates produced by female and the number of broods diminished with the increment in copper concentration. R_0 was smaller at pH 6 than at pH 8 and was negatively related with the increment in copper concentration. Copper also affected significatively the population dynamics through a population delay and later decline at the smallest concentration; in the higher concentration a massive mortality determined the population's extinction. A smaller value of toxicity for Cladocera is proposed than the one cited in the literature.

The potential effects that the copper enrichment of natural ecosystems could have on community level that occupy a central position in the trophic aquatic nets, are discussed.

INTRODUCCIÓN

Uno de los objetivos principales de los estudios de ecosistemas acuáticos es la comprensión de los cambios que sufren las poblaciones que los habitan (Barnes & Mann 1991). Sin embargo, la extrema complejidad de los mismos ha llevado a efectuar estudios de poblaciones y comunidades a escala de micro y mesocosmos en los que es posible mantener controladas las condiciones de experimentación para conocer las relaciones causales de los mecanismos subyacentes (Biesinger & Christensen 1972; Chi-Hsiang & Armitage 1980; Kersting 1984; Baudo 1987; Soto 1989; Gliwicz 1990; Niederlehner et al 1990; Cowgill & Milazo 1991; Gliwicz & Lampert 1993; Gonzalez & Frost 1996; Luoma 1996).

Los estudios demográficos se desarrollan a partir de un marco teórico vinculado con la demografía clásica y con la teoría de historias de vida (Birch 1948; Andrewartha & Birch 1954; Frank 1960; Connel 1970; Pianka 1982; Whittaker & Goodman 1979; Lynch 1980, 1989 y 1992; Lande 1982; Bell 1984; Wiens 1990; Kimmerer 1987; Hebert 1980; Stearns 1994; Calow & Forbes 1998). Esta última tiene como supuesto básico que las alteraciones que se producen en el ambiente de una población, se manifiestan a través de cambios en los patrones de crecimiento, natalidad y mortalidad. A nivel de organismo, la ecofisiología describe la relación entre las probabilidades de sobrevivencia (s), la edad de la primera reproducción (t) y la fecundidad (n) en diferentes condiciones ambientales (Sibly & Calow 1986; Calow & Sibly 1990). Más recientemente, se han realizado estudios tendientes a conocer los efectos de diversos contaminantes sobre la disminución en la adecuación biológica de la biota acuática con el objetivo de interpretar su incidencia en la distribución y abundancia de los organismos y la evolución de posibles adaptaciones

fisiológicas (Forbes & Calow 1996, 1997; Calow & Forbes 1998).

En las poblaciones zooplanctónicas, los cambios en los parámetros demográficos pueden ocurrir como respuesta a perturbaciones químicas (Winner & Farrell 1976; Marshall 1978; Roch et al 1985; Baudo 1987; Kerrison et al 1988; Evans & McNaught 1988; Keller & Yan 1991). Una perturbación química de origen antrópico frecuente en ecosistemas acuáticos continentales es el incremento de metales pesados en solución. En la literatura abundan los trabajos de tipo toxicológico que vinculan la concentración de metales pesados u otras sustancias potencialmente tóxicas con la mortalidad de distintas especies de invertebrados. Algunos autores mencionan el efecto negativo de metales como el plomo, mercurio, zinc, cadmio, molibdeno y cobre sobre distintas especies zooplanctónicas (Biesinger & Christensen 1972; Winner & Farrel 1976; Marshall 1978; Sosnowski et al 1979; Roch et al 1985; Evans & McNaught 1988; Keller & Yan 1991; Correa & Ojeda 1997). Sin embargo, pocos estudios (e.g. Winner & Farrell 1976; Kerrison et al 1988) abordan esta problemática desde una perspectiva poblacional para evaluar el efecto que los metales pesados pudieran tener sobre la dinámica poblacional de cladóceros.

El cobre es un metal pesado altamente tóxico (APHA 1971 en Cairns & Dickson 1978). Si bien es un elemento traza necesario para los organismos, puede ser tóxico en su forma iónica a concentraciones mayores a 5 mg l^{-1} , concentración que Fleming & Trevors (1989) indican como propia de la mayoría de los cuerpos de agua continentales. Debe señalarse, sin embargo, que las concentraciones consideradas tóxicas para el zooplancton varían según la especie considerada y la escala del estudio realizado. Ayers & Westcot (1985) y Cowgill & Milazzo (1991), estos últimos en estudios zooplanctónicos, establecen un rango entre 100 y 1000 mg l^{-1} . Mc Intosh & Kereven (1974) comunican que la incorporación de 200 mg l^{-1} a un lago redujo significativamente las poblaciones de cladóceros y rotíferos. Por su parte, Roch et al (1985) reportan una toxicidad del zooplancton al Cu entre 500 y 5000 mg l^{-1} . A escala de mesocosmos, se reportan valores tóxicos para el zooplancton entre 10 y 100 mg l^{-1} (Kerrison et al 1988). En experimentos de tipo microcosmos, definidos por Kersting (1984) como un modelo físico que simula la totalidad o una parte de un ecosistema natural, Winner & Farrell (1978) comunican reducción de sobrevivencia en cuatro especies de *Daphnia* a concentraciones de cobre mayores a 40 mg l^{-1} aunque *Daphnia magna* sólo mostró disminución en su tasa de crecimiento poblacional a concentraciones mayores a 60 mg l^{-1} . Por su parte, Flemming & Trevors (1989) establecen un rango entre 5 y 86 mg l^{-1} como tóxico para las especies del género *Daphnia*.

La acción perturbadora del cobre con frecuencia es potenciada por bajos pH. Por el contrario, altos pH facilitan el proceso de unión del cobre iónico a diversas sustancias orgánicas e inorgánicas con la consiguiente formación de quelatos y precipitación sedimentaria del cobre disuelto (Boyd 1972; Sylva 1975; Bryan 1976; Fleming & Trevors 1989; Xue & Sigg 1993; Jakson & Bistricki 1994; Sigg & Xue 1994; Xue et al 1995 a y b; Filella et al 1995; Kubitz et al 1995; Luoma 1996; Shi et al 1998).

Los efectos del pH del agua en la especiación del cobre (formación de diferentes especies químicas de cobre en solución) han sido analizados por numerosos autores desde una perspectiva estrictamente química (Boyd 1972; Sylva 1975; Bryan 1976;

Fleming & Trevors 1989; Xue & Sigg 1993; Jakson & Bistricki 1994; Sigg & Xue 1994; Xue et al 1995 a) y b); Filella et al 1995; Kubitz et al 1995; Luoma 1996). Pero, si bien es ampliamente reconocido el efecto regulador del pH sobre la mayoría de las reacciones y procesos químicos que ocurren en el agua (Wetzel 1983), no son frecuentes los estudios que lo incorporan para considerar su efecto en la adecuación biológica de organismos acuáticos. Algunos investigadores destacan explícitamente la importancia del pH como variable reguladora de la toxicidad del cobre para diferentes especies de invertebrados (Havas & Hutchinson 1982, Zou & Bu 1994 y Schlenk & Moore 1994). Sin embargo no se ha explorado empíricamente el efecto del cobre y el pH sobre rotíferos, cladóceros y copépodos.

A pesar del desarrollo desigual de estas dos líneas de investigación, es decir, el considerable conocimiento adquirido acerca de los aspectos estrictamente químicos del comportamiento de los metales pesados como el cobre en solución y por otro lado el escaso conocimiento que se tiene de los efectos que este metal tiene sobre el zooplancton, ambos aspectos sin duda están estrechamente vinculados. Sin embargo los estudios no han considerado aspectos demográficos importantes para la abundancia y permanencia de las poblaciones.

En este contexto, esta tesis está orientada a estudiar el efecto de distintos contenidos de cobre y del pH sobre la adecuación biológica de una especie zooplanctónica frecuente en ambientes acuáticos continentales de Sudamérica. La aproximación es demográfica, e implica el estudio de los cambios en la sobrevivencia, la edad de la primera reproducción y de la fecundidad y un análisis de la dinámica y estructura poblacional.

Este estudio se fundamenta en el hecho de que la disponibilidad de cobre iónico cambia en función del pH, y en consecuencia debería producir cambios en la toxicidad para los organismos.

Un modelo que representa este hecho es el propuesto por Sylva en 1975 (Anexo 1). El mismo establece que la estabilidad de los compuestos orgánicos e inorgánicos de cobre es dependiente del pH, por lo que éste resulta controlador de las especies químicas de cobre presentes.

El estudio fue dirigido a evaluar empíricamente los atributos de historia de vida, parámetros poblacionales, estructura y dinámica poblacional de la especie *Ceriodaphnia dubia* (Richard 1895) (Crustacea, Cladocera) al estar expuesta a distintas concentraciones de cobre disuelto del agua.

Hipótesis

Si la disponibilidad biológica de cobre iónico disminuye la adecuación biológica de *Ceriodaphnia dubia*, entonces a mayor concentración de éste, se reducirá la sobrevivencia y fecundidad, se incrementará la edad de la primera reproducción, y se modificará la estructura y la dinámica de sus poblaciones.

Objetivos

Objetivo general

El objetivo general de esta tesis fue analizar los efectos del pH y del cobre libre (cobre iónico) sobre las poblaciones del cladócero *Ceriodaphnia dubia* en microcosmos.

Objetivos específicos

- Determinar el efecto de la concentración de cobre y el pH sobre la sobrevivencia, la edad de la primera reproducción, el número de camadas y la tasa reproductiva neta de las poblaciones experimentales.
- Determinar el efecto del cobre iónico sobre la estructura y la dinámica de poblaciones experimentales.

MATERIALES Y METODOS

Características biológicas de los cladóceros

Los cladóceros son ampliamente empleados en estudios de microcosmos. Debido a que las hembras se reproducen partenogenéticamente, un determinado genotipo (clon) puede propagarse durante muchas generaciones, con la ventaja de que disminuye en forma considerable el error experimental generado por variabilidad genética de los organismos (Goulden et al 1982; Lynch 1989; Vanni & Lampert 1992). Otra de las ventajas experimentales de los cladóceros es su corto tiempo generacional que permite obtener muchos organismos idénticos en tiempo relativamente corto.

Numerosos autores afirman que en cladóceros el crecimiento es función de la temperatura del agua (Edmonson 1974 en Marshall 1978; Taylor & Slatkin 1981; Lynch 1982 y 1989; Anderson y Benke 1994; Boersma & Vijverberg 1996). En función de la temperatura, estos organismos crecen en forma continua pero sin rasgos específicos para cada edad por lo que resulta difícil describir la estructura de edad de una población. Por consiguiente, si la temperatura se mantiene constante como sucede cuando los experimentos se realizan en cámara de incubación, el análisis demográfico puede realizarse siguiendo a la cohorte en función de la edad contada en días (Marshall 1978). Esta aproximación metodológica fue empleada en un grupo de experimentos (de

sobrevivencia y fecundidad) realizados en este estudio. Otros autores analizan los cambios en las poblaciones de cladóceros en función de los cambios en su estructura (Lynch 1978; Chi-Hsiang & Armitage 1980). Esta última aproximación metodológica fue empleada en la segunda serie de experimentos de esta tesis, en los que se analizó la estructura y dinámica poblacional de *C. dubia*.

Selección de los organismos experimentales

Se utilizaron individuos de la especie *Ceriodaphnia dubia*, caracterizada por Negrea 1983 (en Ruiz y Bahamonde 1989) como una especie holártica, etiópica y neotropical. La elección de *C. dubia* como especie de experimentación se basa en que es una especie común en ecosistemas lénticos (DeGraeve et al 1992; Anderson & Benke 1994; Ferrari & Ferard 1996), y en ser menos tolerante al cobre y otros tóxicos que otros invertebrados dulceacuícolas (Baudo 1987; Kluttgen et al 1996). Además, al estar bien representada en distintas latitudes, adquiere importancia en estudios comparativos. Desde los trabajos pioneros de Slobotkin (1954) y Hall (1964), los mayores esfuerzos de investigación en lo que respecta a las respuestas poblacionales del zooplancton han sido desarrollados con la especie *Daphnia magna* (Cairns 1986). Esta especie tiene origen y distribución en el hemisferio norte (Goulden et al 1982). Sin embargo, el trabajo con especies locales, aunque más pequeñas, menos tolerantes y por lo tanto más difíciles de mantener, permite incrementar el conocimiento disponible acerca de especies frecuentes en ecosistemas acuáticos de Sudamérica. Las poblaciones de *C. dubia* presentan un amplio rango de distribución y abundancia en Chile pues se cita para muchos ecosistemas lacustres templados: su distribución actual se extiende latitudinalmente desde la laguna de Aculeo (33° 50') hasta el lago Rupanco (40° 49') (Zuñiga y Araya 1982; Ruiz y Bahamonde 1989; Araya y Zúñiga 1991; Soto y Zúñiga 1991).

Cultivo de *Ceriodaphnia dubia*

Las hembras de *Ceriodaphnia dubia* fueron recolectadas en el embalse El Plateado (71°39'12"W - 33°04'30"S) ya que las poblaciones de este ecosistema no han estado expuestas a la acción tóxica del cobre (Araya y Zúñiga 1991), cuyo efecto se pretende investigar. Se utilizó red de plancton de 25 µ de abertura de malla. Se mantuvo una población en laboratorio durante varios meses con agua del mismo ambiente filtrada y oxigenada. A partir de uno de estos organismos, se estableció un cultivo stock que fue mantenido, al igual que los tratamientos y controles, en cámara de incubación en condiciones controladas de 18:6 hs de luz y oscuridad y temperatura = 23 ± 0.3°C (Bottrell 1975; Anderson & Benke 1994; Kubitze et al 1995; Ferrari & Ferard 1996). Los cultivos stock fueron mantenidos en solución de prueba ("medio *Daphnia*") con el agregado de vitaminas y levadura sugerido por Ferrari & Ferard (1996), adecuadamente

oxigenados y ajustados a pH 6 y 8, con el propósito de que las diferencias en sobrevivencia y fecundidad observadas en los tratamientos pudiera atribuirse exclusivamente al efecto del cobre, y no a un cambio brusco en el pH del agua.

El medio de cultivo de los tratamientos y controles se cambió diariamente en los experimentos de sobrevivencia y fecundidad y tres veces por semana en los experimentos de dinámica poblacional, para evitar el crecimiento de bacterias que pudieran producir toxinas perjudiciales para los cladóceros, y de protozoos que pudieran competir con éstos por las microalgas.

Cultivo de *Chlorella vulgaris*

Los organismos del cultivo stock así como los de los tratamientos y controles fueron alimentados con algas de la especie *Chlorella vulgaris* (Beijerinck 1890). *C. vulgaris* es una microalga reconocida por su utilización como alimento de microcrustáceos por su tamaño, forma y alto valor nutricional (Martínez 1996).

La concentración algal aproximada utilizada fue de 106-107 células/ml de medio de cultivo, concentración citada como óptima por numerosos autores (Arnold 1971; Gliwicz 1990; Lynch 1992; Sterner et al 1993; Anderson & Benke 1994; Zou & Bu 1994). Las microalgas fueron mantenidas a 20° C aproximadamente con un fotoperíodo de 12:12 hs de luz y oscuridad. Para impedir su sedimentación, se mantuvo un burbujeo permanente de aire filtrado a través de un filtro de policarbonato estéril de 0,4 mm con el objetivo de impedir la contaminación del cultivo. Al séptimo día de crecimiento, los recipientes con los cultivos fueron colocados en el refrigerador hasta la deposición de las algas; luego de dos o tres días, se descartó el sobrenadante. El concentrado resultante fue centrifugado y resuspendido en agua destilada, ajustando su volumen hasta lograr una absorbancia de 1,5 a una longitud de onda de 665 nm (Winner & Farrell 1976), equivalente a la concentración algal citada previamente. Estos cultivos no se mantuvieron axénicos ya que algunos autores afirman que cierta proporción de bacterias resulta beneficiosa para el crecimiento de cladóceros (Lampert 1974; Peterson et al 1978).

Condiciones experimentales: concentración de CuSO_4 y valores de pH

Las concentraciones de sulfato de cobre utilizadas en los microcosmos fueron determinadas de acuerdo con pruebas previas realizadas con la especie a estudiar (Anexo 1) y los rangos citados como tóxicos para Cladóceros.

Los valores de pH utilizados fueron seleccionados considerando que según Sylva (1975) a pH 9 prácticamente no existe cobre iónico disuelto; por lo tanto los tratamientos sólo fueron realizados a valores de pH 6 y 8, rango en el cual se produce la mayor

variación en la disponibilidad del Cu^{+2} .

Estimación de la concentración de Cu^{+2} biológicamente disponible

Las concentraciones de sulfato de cobre utilizadas en los tratamientos fueron de 5 y de 20 $\mu\text{g l}^{-1}$. Estos valores fueron seleccionados según dos criterios: En primer lugar, en base a datos de toxicidad para dáfnidos, tomados de la literatura (Winner & Farrel 1978; Cowgil & Milazzo 1991). En estos estudios, para diferentes especies del género *Daphnia* se mencionan valores mayores (entre 40 y 60 mg l^{-1}), pero dado que los individuos del género *Ceriodaphnia* son de menor tamaño, que los del género *Daphnia*, habitualmente usado en bioensayos, se ensayaron concentraciones de sulfato de cobre menores a las indicadas para éste.

En segundo lugar, las concentraciones empleadas en los experimentos fueron determinadas en relación con ensayos preliminares propios realizados con la especie *Ceriodaphnia dubia*, en los que se encontró que efectivamente la misma era sensible a concentraciones de sulfato de cobre menores a las citadas para otros cladóceros de mayor tamaño.

Si bien los estudios de toxicidad con cladóceros generalmente se realizan con sulfato de cobre, un estudio interesante para conocer con mayor precisión el efecto del cobre en los parámetros demográficos es analizarlo en función del cobre iónico (cobre tóxico) efectivamente disponible para los organismos.

Como en los experimentos se utilizó agua destilada, fue necesario incorporar SO_4K_2 , Cl_2Ca y CO_3HNa , para crear las condiciones experimentales compatibles con la vida para esta especie. La incorporación de estas sustancias cambian las condiciones experimentales iniciales (sulfato de cobre disuelto en agua destilada), de modo que se generan cambios en la condición iónica del medio experimental. Por lo tanto, las concentraciones de cobre iónico efectivamente presentes en solución en las condiciones experimentales ensayadas son valores teóricos, resultantes de la disociación del sulfato de cobre en solución y de su interacción con los iones de la solución de prueba ("medio *Daphnia*").

Para estimar la cantidad de cobre iónico (Cu^{+2}) efectivamente presente en las diferentes condiciones experimentales, se utilizó el programa Tritrator (Cabaniss 1986). Este programa tiene como sustento teórico la gran capacidad del cobre iónico para formar ligandos o quelatos con partículas orgánicas y/o inorgánicas, a medida que aumentan los niveles de pH y la concentración de sólidos orgánicos o inorgánicos en suspensión (Cabaniss 1986; Sigg & Xue 1994).

Como se mencionó anteriormente, para el cálculo se consideró la composición del medio iónico presente en el "medio *Daphnia*" que sería usado en los experimentos (0,026 g SO_4K_2 ; 0,224 g Cl_2Ca ; 0,2 g $\text{CO}_3\text{HNa l}^{-1}$ de agua destilada); así como el pH y la

concentración de sulfato de cobre propios de cada tratamiento. Los cálculos fueron realizados a 23° C de temperatura, debido a que la formación de diferentes especies químicas de cobre se producen en función de ésta. Los valores de Cu^{+2} obtenidos se indican en la Tabla 1.

Diseño experimental

Se diseñaron dos tipos de experimentos poblacionales: uno para evaluar los efectos del cobre y del pH en la sobrevivencia y fecundidad de *C. dubia* en función de tablas de vida y otro de dinámica poblacional para ver los cambios en la estructura y el tamaño de sus poblaciones.

1. Experimento para el estudio del efecto del cobre y el pH sobre la sobrevivencia, fecundidad, edad de la primera reproducción y tasa reproductiva neta de *C. dubia*.

Este experimento consistió en colocar poblaciones de *C. dubia* en las siguientes condiciones experimentales: dos condiciones de pH (6 y 8) y una población control en cada caso, sin cobre. Se ensayaron dos condiciones de concentración de CuSO_4 en cada una de las condiciones de pH, como se indica en la Tabla I. Como se observó en esta tabla, un incremento de tres veces en la concentración de sulfato de cobre produce un incremento de diez veces en la concentración de cobre iónico en ambos pH.

	$\text{SO}_4 \text{Cu}$		
pH	$0 \mu\text{g l}^{-1}$	$5 \mu\text{g l}^{-1}$	$20 \mu\text{g l}^{-1}$
6	0	0.309×10^{-7}	3.15×10^{-7}
8	0	0.009×10^{-7}	0.094×10^{-7}

Se colocaron 50 neonatos aislados y se siguió su sobrevivencia y fecundidad durante 14 días. Se realizaron en total dos controles y cuatro tratamientos.

Cada individuo fue aislado en un recipiente conteniendo 40 ml de la solución de prueba más inóculos del concentrado de microalga y vitaminas. Los valores de pH se ajustaron diariamente con HCl 0,5 N o NaOH 0,1 M (Zou & Bu 1994).

Los 50 individuos constituyeron la cohorte que fue seguida día a día durante 14 días en cada uno de los tratamientos y controles. El período de observación se estableció en referencia a datos de parámetros poblacionales de cladóceros (Porter et al 1983; Vanni 1986). Según estos autores, las primeras tres camadas expresan casi todo el potencial de crecimiento poblacional en tanto que las camadas posteriores representan una parte muy escasa del mismo.

Los neonatos originados durante el experimento fueron contados y desechados hasta la tercera camada, separándolos con una pipeta de boca ancha bajo microscopio

estereoscópico binocular provisto de luz fría. Los individuos adultos (neonatos originales de la cohorte) fueron transferidos diariamente a solución de prueba renovada a fin de asegurar que el contenido de oxígeno, de cobre y el pH de la solución permanecieran constantes y para evitar el crecimiento de hongos y bacterias.

Con la información de los experimentos se construyeron las tablas de vida, de fecundidad, para cada uno de los tratamientos y controles, que permiten obtener parámetros de sobrevivencia, de fecundidad, edad a la primera reproducción y tasa reproductiva neta.

Para construir las tablas de vida se calculó (Pianka 1982):

1 – lx: Parámetro de la tabla de vida que indica la proporción de la cohorte original que sobrevive al inicio de la clase de edad x.

2 – Fx: Parámetro de la tabla de vida que indica el número de individuos de la prole (neonatos) producidos a la edad x.

3 – mx: Parámetro de la tabla de vida que indica el número de neonatos producido por un individuo medio de edad x durante este período de edad.

4 – Ro: Tasa Reproductiva Neta, definida como el número medio de neonatos de la clase de edad cero producidos por un organismo medio durante su vida entera. Ro es un parámetro estimador de la adecuación biológica de la especie. Se calculó Ro para cada cohorte, en cada tratamiento y control, con la siguiente fórmula:

$$Ro = \sum (lx.mx)$$

Donde:

Ro: tasa reproductiva neta.

lx: sobrevivencia a la edad x.

mx: fecundidad a la edad x.

5 - Edad a la primera reproducción: se considera la edad en la cual en la tabla de vida aparece la primera cría en situación experimental.

6 - Número de camadas: es el número de eventos de liberación de neonatos de la cámara incubatriz de la hembra adulta (Chi-Hsiang & Armitage 1980).

Análisis estadístico:

Para comparar si las curvas de sobrevivencia correspondiente a cada tratamiento son distintas o iguales, se utilizó el Análisis Kaplan-Meyer (STATISTICA, Statsoft 1993). Las mismas fueron comparadas con la prueba *F* para un nivel de confianza del 95 % (Sokal & Rohlf 1969).

El efecto del cobre iónico sobre la tasa reproductiva neta se evaluó con análisis de regresión.

2. Experimento para evaluar el efecto del cobre sobre la estructura y la dinámica poblacional de *C. dubia*

Para evaluar el efecto del cobre sobre la estructura y la dinámica poblacional de *C. dubia* se realizó el seguimiento de poblaciones experimentales a pH = 8 y CuSO_4 0 m l^{-1} (control), $5 \mu\text{g l}^{-1}$ y 20 m l^{-1} . Cada tratamiento y el control fueron replicados 5 veces. El medio de cultivo y la alimentación fueron idénticas al experimento de sobrevivencia y fecundidad.

Se realizó un análisis de la estructura de la población en función del número de individuos en los estados de neonato, juvenil y adulto. Se colocó una situación control ($0 \mu\text{g l}^{-1} \text{ CuSO}_4$), y dos tratamientos, uno con $5 \mu\text{g l}^{-1}$ y otro con $20 \mu\text{g l}^{-1}$, con cinco réplicas cada uno. Se usó una sola condición de pH = 8. Las poblaciones en cada réplica se iniciaron con 20 neonatos y se siguieron contando el número de neonatos, juveniles y adultos a intervalos de 2 ó 3 días durante 60 días.

Los tres estados (neonatos, juveniles y adultos) se reconocieron siguiendo la caracterización propuesta por Chi-Hsiang & Harmitage (1980):

Neonato: Individuo de edad igual o menor a 24 hs, que es liberado de la cámara incubatriz de la hembra adulta.

Juvenil: Individuo de edad > 24 hs, que sufre tres mudas para alcanzar el estado de adulto.

Adulto: Individuo sexualmente maduro productor de huevos.

Se estudió la dinámica poblacional en una condición de pH = 8, para evaluar solamente los efectos del cobre sobre poblaciones experimentales de *C. dubia*.

Análisis estadístico:

El efecto del cobre iónico sobre la proporción de neonatos producidos en los distintos tratamientos durante el período experimental se evaluó con ANOVA de Medidas Repetidas, previa transformación de los datos porcentuales a arcoseno y test a posterior de Tukey en tres días representativos de la dinámica poblacional, a un nivel de confianza del 95 % (Sokal y Rohlf 1969).

Para determinar el efecto del cobre iónico sobre la dinámica de la población se utilizó Análisis de Varianza para Medidas Repetidas con prueba a posterior de Tukey a un nivel de confianza del 95 %. (Sokal y Rohlf 1969).

Para la edad de la primera reproducción, se usó la Prueba no paramétrica de Mann Whitney, y para la fecundidad media, ANOVA de Medidas Repetidas con test a posterior de Tukey.

RESULTADOS

1. Experimentos de sobrevivencia y fecundidad

1.1. Sobrevivencia

1.1.1. Tablas de vida

Con los datos de los experimentos de sobrevivencia y fecundidad, se construyeron tablas de vida. La información correspondientes a pH = 6 y distintas concentraciones de sulfato de cobre se muestra en la Tabla 2 y la de pH = 8, se muestra en la Tabla 3.

A pH 6 con $0 \text{ mg l}^{-1} \text{ CuSO}_4$ (control), de los 50 individuos de la cohorte sobrevivieron 6 individuos hasta el día 14, final del experimento, mientras que con CuSO_4 5 mg l^{-1} y 20 mg l^{-1} sólo sobrevivieron hasta el día 9 (1 y 3 individuos respectivamente), mostrando una reducción en la edad de los organismos respecto del control.

A pH 8 en el control sobrevivieron el doble de individuos al final del período de 14 días. De los 50 individuos iniciales sobrevivieron 15 al día 14. Con Cu 5 mg l^{-1} , sobrevivieron 8 individuos y con Cu 20 mg l^{-1} sólo un individuo sobrevivió hasta el final del experimento. En los lotes tratados con cobre a pH 6, los individuos murieron antes que en

EFFECTOS DEL CU Y DEL PH SOBRE LA ADECUACIÓN BIOLÓGICA DE *Ceriodaphnia dubia* (Richard 1894) (Crustacea, Cladocera) EN EXPERIMENTOS DE MICROCOSMOS

los controles y que en los lotes tratados con cobre a pH 8.

Tabla 2: Tabla de vida de *C. dubia* a pH = 6 y $\text{CuSO}_4 = 0, 5 \text{ y } 20 \text{ mg l}^{-1}$. *Nes* el número de individuos de la cohorte. *lx* es el parámetro de la tabla de vida.

Edad	CuSO_4 0 $\mu\text{g/l}$ (Control)		CuSO_4 5 $\mu\text{g/l}$		CuSO_4 20 $\mu\text{g/l}$	
	<i>N</i>	<i>lx</i>	<i>N</i>	<i>lx</i>	<i>N</i>	<i>lx</i>
1	50	1.000	50	1.000	50	1.000
2	35	0.700	34	0.680	25	0.500
3	26	0.520	18	0.360	22	0.440
4	18	0.360	12	0.240	14	0.280
5	14	0.280	4	0.080	7	0.140
6	12	0.240	4	0.080	4	0.080
7	11	0.220	4	0.080	3	0.060
8	10	0.200	3	0.060	3	0.060
9	10	0.200	1	0.020	3	0.060
10	9	0.180	0	0.000	0	0.000
11	8	0.160				
12	8	0.160				
13	6	0.120				
14	6	0.120				

Tabla 3: Tabla de vida de *C. dubia* a pH = 8 y $\text{CuSO}_4 = 0, 5 \text{ y } 20 \text{ mg l}^{-1}$. Los símbolos, iguales a la tabla 2.

Edad	CuSO_4 5 $\mu\text{g/l}$ (Control)		CuSO_4 5 $\mu\text{g/l}$		CuSO_4 20 $\mu\text{g/l}$	
	<i>N</i>	<i>lx</i>	<i>N</i>	<i>Lx</i>	<i>N</i>	<i>lx</i>
1	50	1.000	50	1.000	50	1.000
2	45	0.900	36	0.720	34	0.680
3	39	0.780	36	0.720	26	0.520
4	37	0.740	36	0.720	18	0.360
5	37	0.740	29	0.580	17	0.340
6	35	0.700	24	0.480	16	0.320
7	34	0.680	24	0.480	14	0.280
8	33	0.660	21	0.420	14	0.280
9	33	0.660	18	0.360	12	0.240
10	30	0.600	16	0.320	10	0.200
11	21	0.420	16	0.320	8	0.160
12	20	0.400	13	0.260	7	0.140
13	18	0.360	9	0.180	5	0.100
14	15	0.300	8	0.160	1	0.020

1.1.2. Curvas de sobrevivencia

Con los datos de la tabla de vida se realizaron curvas de sobrevivencia, que permitieron

comparar los cambios en el tiempo de las poblaciones de *C. dubia* en las diferentes condiciones experimentales.

Se usó el análisis de Kaplan-Meyer para comparar de a pares, la sobrevivencia en las seis situaciones experimentales ensayadas. Los valores de significancia obtenidos se muestran en la tabla 4.

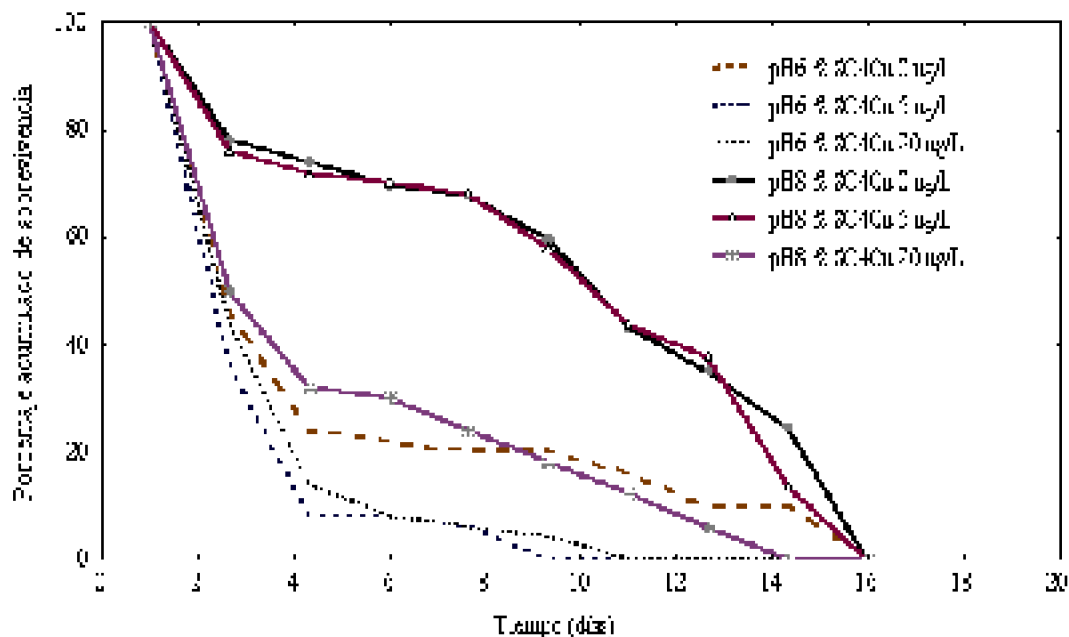


Figura 1: Función de sobrevivencia de *Ceriodaphnia dubia* a $CuSO_4 = 0, 5$ y $20 \mu g l^{-1}$ y $pH = 6$ y 8 , estimadas con el programa Statistica. 10 observaciones para cada valor de $CuSO_4$ y pH .

Tabla 4: Comparaciones de las curvas de sobrevivencia de *Ceriodaphnia dubia* obtenidas por el método de Kaplan-Meyer para todas las situaciones experimentales. La comparación se realizó mediante la prueba F. ($p < 0.05$; $\alpha = 95\%$). (*) Diferencias significativas ($p < 0.05$). (**) Diferencias altamente significativas ($p < 0.01$). n.s. Diferencias no significativas.

[Cu SO ₄] ₄ mg·l ⁻¹	PH 6			pH 8		
	0	5	20	0	5	20
20	n.s.	(*)	(*)	(**)	(**)	
pH 8	5	(**)	(**)	(*)	n.s.	
	0	(**)	(**)	(**)		

EFFECTOS DEL CU Y DEL PH SOBRE LA ADECUACIÓN BIOLÓGICA DE *Ceriodaphnia dubia* (Richard 1894) (Crustacea, Cladocera) EN EXPERIMENTOS DE MICROCOSMOS

	20	(*)	n.s.
--	----	-----	------

pH 6	5	(*)
------	---	-----

	0
--	---

En primer lugar se compararon las curvas de los controles a pH 6 y 8, sin cobre. Esta comparación fue altamente significativa, lo que permite afirmar que existe un importante efecto del pH sobre la sobrevivencia de *C. dubia* y considerar este efecto en forma independiente del efecto del cobre.

A su vez, las curvas sin cobre a pH 6 y 8 sirvieron como controles de las curvas con cobre, para cada pH.

A pH 6, no se encontraron diferencias significativas entre $\text{Cu } 5 \mu\text{g l}^{-1}$ y $\text{Cu } 20 \mu\text{g l}^{-1}$, es decir que a este pH, el cobre resulta igualmente tóxico para *C. dubia* a las dos concentraciones empleadas. Contrariamente, el control fue significativamente diferente a las dos curvas con cobre a este pH.

Al comparar las curvas de pH 8, la curva control no fue diferente a la curva con $\text{CuSO}_4 \text{ } 5 \mu\text{g l}^{-1}$, lo que significa que la cantidad de cobre iónico a este pH no resulta tóxica para *C. dubia*. Contrariamente, el control fue significativamente diferente a la curva de $\text{CuSO}_4 \text{ } 20 \mu\text{g l}^{-1}$ a pH 8.

Por otro lado, la comparación mostró que existen tres pares de curvas claramente diferentes (Figura 1). El par formado por las dos curvas a pH 6 con $5 \mu\text{g l}^{-1}$ y 20 mg l^{-1} CuSO_4 tuvo valores mínimos de sobrevivencia; el par formado por las dos curvas de pH 8 con 0 (control) y 5 mg l^{-1} CuSO_4 mostró valores máximos de sobrevivencia, y finalmente el par formado por la curva de pH 8 con 5 mg l^{-1} CuSO_4 y por la curva de pH 6 con 0 mg l^{-1} CuSO_4 (control), mostró valores intermedios de sobrevivencia.

No se encontraron diferencias significativas al comparar el primer par de curvas, es decir, la correspondiente a $\text{Cu } 5 \mu\text{g l}^{-1}$ y a $\text{Cu } 20 \mu\text{g l}^{-1}$ a pH 6. Esto significa que a este pH el cobre iónico ya es tóxico para *C. dubia* cuando la concentración es de $\text{CuSO}_4 \text{ } 5 \mu\text{g l}^{-1}$.

Cuando se analizó el segundo par de curvas, es decir, las curvas de sobrevivencia a pH 8, con $0 \mu\text{g l}^{-1}$ y con $\text{Cu } 5 \mu\text{g l}^{-1}$, no mostraron diferencias significativas. Esto significa que a pH 8 la concentración de cobre iónico es menor que a pH 6 para una misma cantidad de CuSO_4 aplicada. Estos resultados muestran que a pH 8 el efecto tóxico del cobre se manifiesta sólo a concentraciones de cobre comparativamente altas ($20 \mu\text{g l}^{-1}$), es decir, cuando la concentración de cobre iónico es máxima. Además, la diferencia altamente significativa en la sobrevivencia entre $\text{Cu } 5 \mu\text{g l}^{-1}$ y $20 \mu\text{g l}^{-1}$ a pH 8, permitiría inferir la posible existencia de un valor umbral ($\text{Cu } 5 \mu\text{g l}^{-1}$) por encima del cual disminuye significativamente la sobrevivencia de *C. dubia*.

Por otro lado, no se encontraron diferencias significativas entre el control a pH 6 y $\text{Cu } 20 \mu\text{g l}^{-1}$ a pH 8, lo que entrega evidencia de que para *C. dubia* no resultaría diferente

desarrollarse sin cobre, a pH 6, que con altas concentraciones de cobre a pH 8.

Los antecedentes presentados permiten concluir que tanto el pH 6 como el cobre ejercieron un marcado efecto negativo sobre la sobrevivencia de *C. dubia*.

1. 2. Fecundidad

1.2.1. Tablas de vida (Fecundidad)

Los datos de la tabla de vida con los valores de fecundidad correspondientes para pH = 6 y concentraciones de sulfato de cobre de 0, 5 y 20 mg l⁻¹ se muestran en las Tablas 5, 6 y 7 respectivamente. Los datos de la tabla de vida con los valores de fecundidad correspondientes para pH = 8 y concentraciones de sulfato de cobre de 0, 5 y 20 mg l⁻¹ se muestran en las Tablas 8, 9 y 10 respectivamente. Donde x representa la edad de cada organismo; l_x su sobrevivencia a la edad x ; F_x el número de crías producidas por el individuo de edad x ; m_x la fecundidad edad-específica y R_0 la tasa reproductiva neta.

La comparación de ambos controles sin cobre muestra que a pH 6 se produjeron un total de 28 neonatos y a pH 8 se produjeron 68 neonatos. Esta diferencia de 40 neonatos otorgaría evidencia del efecto negativo del pH 6 sobre el patrón de fecundidad de *C. dubia*.

En los dos tratamientos con cobre a pH 6, no se encontró diferencia en el número de neonatos producidos. Con 5 mg l⁻¹, a pH 6 sólo se produjeron dos individuos durante el tiempo que duró el experimento, hecho que ocurrió el día 5, mientras que con Cu 20 mg l⁻¹ a igual pH también se produjeron dos individuos, pero al noveno día. Es decir, que la mayor concentración de cobre iónico actuaría atrasando la edad de la primera reproducción, mientras que el control produjo 28, tal como se indicó anteriormente.

En los dos tratamientos a pH 8 se produjo el mismo número de neonatos (31) durante todo el período del experimento. Es decir, que habría un importante efecto negativo del cobre sobre el patrón de fecundidad porque con cobre, se produjeron 68 neonatos, es decir, 37 menos.

Tabla 5: Tabla de vida. Fecundidad de *C. dubia* a pH = 6 y CuSO₄ = 0 mg l⁻¹.

EFFECTOS DEL CU Y DEL PH SOBRE LA ADECUACIÓN BIOLÓGICA DE Ceriodaphnia dubia (Richard 1894) (Crustacea, Cladocera) EN EXPERIMENTOS DE MICROCOSMOS

x	Lx	Fx	Mx	lx mx
1	1.000	0.000	0.000	0.000
2	0.700	0.000	0.000	0.000
3	0.520	0.000	0.000	0.000
4	0.360	0.000	0.000	0.000
5	0.280	6.000	0.333	0.093
6	0.240	4.000	0.286	0.069
7	0.220	0.000	0.000	0.000
8	0.200	0.000	0.000	0.000
9	0.200	6.000	0.600	0.120
10	0.180	0.000	0.000	0.000
11	0.160	2.000	0.222	0.036
12	0.160	0.000	0.000	0.000
13	0.120	4.000	0.500	0.060
14	0.120	6.000	1.000	0.120
				Ro=0.497

Tabla 6: Tabla de vida. Fecundidad de *C. dubia* a pH = 6 y $\text{CuSO}_4 = 5 \text{ mg l}^{-1}$.

x	lx	Fx	Mx	lx mx
1	1.000	0.000	0.000	0.000
2	0.680	0.000	0.000	0.000
3	0.360	0.000	0.000	0.000
4	0.240	0.000	0.000	0.000
5	0.080	2.000	0.167	0.013
6	0.080	0.000	0.000	0.000
7	0.080	0.000	0.000	0.000
8	0.060	0.000	0.000	0.000
9	0.020	0.000	0.000	0.000
10	0.000	0.000	0.000	0.000
				Ro=0.013

Tabla 7: Tabla de vida. Fecundidad de *C. dubia* a pH = 6 y $\text{CuSO}_4 = 20 \text{ mg l}^{-1}$.

x	lx	Fx	Mx	lx mx
1	1.000	0.000	0.000	0.000
2	0.500	0.000	0.000	0.000
3	0.440	0.000	0.000	0.000
4	0.280	0.000	0.000	0.000
5	0.140	0.000	0.000	0.000
6	0.080	0.000	0.000	0.000
7	0.060	0.000	0.000	0.000
8	0.060	0.000	0.000	0.000
9	0.060	2.000	0.667	0.040
				Ro=0.040

Tabla 8: Tabla de vida. Fecundidad de *C. dubia* a pH = 8 y $\text{CuSO}_4 = 0 \text{ mg l}^{-1}$.

x	Lx	Fx	Mx	lx.mx
1	1.000	0.000	0.000	0.000
2	0.900	0.000	0.000	0.000
3	0.780	0.000	0.000	0.000
4	0.740	0.000	0.000	0.000
5	0.740	1.000	0.027	0.020
6	0.700	0.000	0.000	0.000
7	0.680	8.000	0.229	0.155
8	0.660	7.000	0.206	0.136
9	0.660	5.000	0.152	0.100
10	0.600	11.000	0.333	0.200
11	0.420	13.000	0.433	0.182
12	0.400	13.000	0.619	0.248
13	0.360	6.000	0.300	0.108
14	0.300	4.000	0.222	0.067
				Ro = 1.216

Tabla 9: Tabla de vida. Fecundidad de *C. dubia* a pH = 8 y $\text{CuSO}_4 = 5 \text{ mg l}^{-1}$.

x	Lx	Fx	Mx	lx.mx
1	1.000	0.000	0.000	0.000
2	0.720	0.000	0.000	0.000
3	0.720	0.000	0.000	0.000
4	0.720	0.000	0.000	0.000
5	0.580	0.000	0.000	0.000
6	0.480	5.000	0.172	0.083
7	0.480	0.000	0.000	0.000
8	0.420	7.000	0.292	0.123
9	0.360	3.000	0.143	0.051
10	0.320	5.000	0.278	0.089
11	0.320	6.000	0.375	0.120
12	0.260	0.000	0.000	0.000
13	0.180	3.000	0.231	0.042
14	0.160	2.000	0.222	0.036
				Ro = 0.543

EFFECTOS DEL CU Y DEL PH SOBRE LA ADECUACIÓN BIOLÓGICA DE *Ceriodaphnia dubia* (Richard 1894) (Crustacea, Cladocera) EN EXPERIMENTOS DE MICROCOSMOS

x	Lx	Fx	Mx	Lx.mx
1	1.000	0.000	0.000	0.000
2	0.680	0.000	0.000	0.000
3	0.520	0.000	0.000	0.000
4	0.360	0.000	0.000	0.000
5	0.340	0.000	0.000	0.000
6	0.320	0.000	0.000	0.000
7	0.280	8.000	0.500	0.140
8	0.280	0.000	0.000	0.000
9	0.240	12.000	0.857	0.206
10	0.200	0.000	0.000	0.000
11	0.160	7.000	0.700	0.112
12	0.140	4.000	0.500	0.070
13	0.100	0.000	0.000	0.000
14	0.020	0.000	0.000	0.000
				Ro = 0.5277

Tabla 11: Valores de parámetros de historia de vida para las situaciones experimentales.

	Cu SO ₄ ⁴ (µg/l)	Número de neonatos en la población	Edad primera reproducción	Número de camadas en la población	Tasa reproductiva neta
	0	28	5	3	0.497
pH 6	5	2	5	1	0.013
	20	2	9	1	0.040
pH 8	0	68	5	3	1.216
	5	31	6	3	0.543
	20	31	7	3	0.527

1.2.2. Análisis de la edad de la primera reproducción

Los valores de edad de primera reproducción corresponden al promedio de 50 observaciones (Tabla 11). A pH 6 este atributo no fue diferente en la concentración menor con respecto al control mientras que se atrasó 4 días (del día 5 al 9) con la concentración mayor respecto a la concentración menor. Sin embargo, a pH 8 el mismo atributo sólo se atrasó un 1 día en la concentración menor con respecto al control y dos días en la concentración mayor.

1.2.3. Análisis del número de camadas

Se analizó el número de camadas producidas a pH = 6 y 8. Se encontró que a pH 6, el cobre disminuyó el número de las camadas en la población (Tabla 11). En efecto, en el control a pH 6 se produjeron tres camadas, pero con las dos concentraciones de cobre ensayadas, *C. dubia* sólo pudo producir una sola camada. Las poblaciones de *C. dubia* a pH 8, produjeron tres camadas, independientemente de la concentración de cobre de los

tratamientos.

1.2.4. Análisis de la Tasa Reproductiva Neta (R_0)

La comparación de los distintos valores de R_0 (Tabla 11) en los tratamientos y controles permitió conocer el efecto combinado de la disminución en la longevidad y en el rendimiento reproductivo de *C. dubia*. R_0 a pH 8 mostró un valor mayor a la unidad (1,216) sólo en el control sin CuSO_4 . Con 5 mg l^{-1} de CuSO_4 , R_0 fue igual a 0,543 y con 20 mg l^{-1} de CuSO_4 , R_0 fue igual a 0,527. A pH 6 siempre tuvo valores menores a 1. En el control sin cobre, R_0 fue igual a 0,497. Con 5 mg l^{-1} de CuSO_4 , R_0 fue igual a 0,013 y con 20 mg l^{-1} de CuSO_4 , R_0 fue igual a 0,040.

Por lo tanto, R_0 siempre mostró valores menores con CuSO_4 0 mg l^{-1} (control) a pH que en el control a pH 8, lo que demuestra el efecto negativo del pH sobre la sobrevivencia y la fecundidad. Además, R_0 se relacionó negativamente con el incremento en cobre a ambos valores de pH lo que demuestra el efecto tóxico del cobre sobre la sobrevivencia y la reproducción. Este efecto, al igual que para el tamaño de camada, fue mayor a pH 6 que a pH 8. Estos datos entregarían evidencia de que este parámetro es un buen indicador de la adecuación biológica para esta especie.

Entre todos los parámetros de la tabla de vida analizados (Tabla 11), se seleccionó R_0 para calcular el coeficiente de regresión entre los valores de este parámetro y los valores de cobre iónico biológicamente disponibles. Esta elección se fundamenta en el hecho de que ambas variables son en sí mismas, resultantes de un grupo de variables: R_0 integra variables demográficas, mientras que Cu^{+2} integra variables químicas del medio de los experimentos en los que se desarrolló *C. dubia*.

El análisis de regresión entre $[\text{Cu}^{+2}]$ y R_0 resultó significativo ($r = -0,625$). Este resultado entrega evidencia del efecto negativo e independiente del pH y del cobre iónico sobre la sobrevivencia y fecundidad de *Ceriodaphnia dubia* (Figura 2).

En resumen, los resultados de los experimentos de sobrevivencia y fecundidad permiten concluir que el pH ácido y el cobre tienen un efecto negativo e independiente uno de otro, sobre la sobrevivencia y la fecundidad de esta especie a través de la disminución en la sobrevivencia, de la reducción en el número de neonatos y de camadas producidos y a través del atraso en la edad de la primera reproducción.

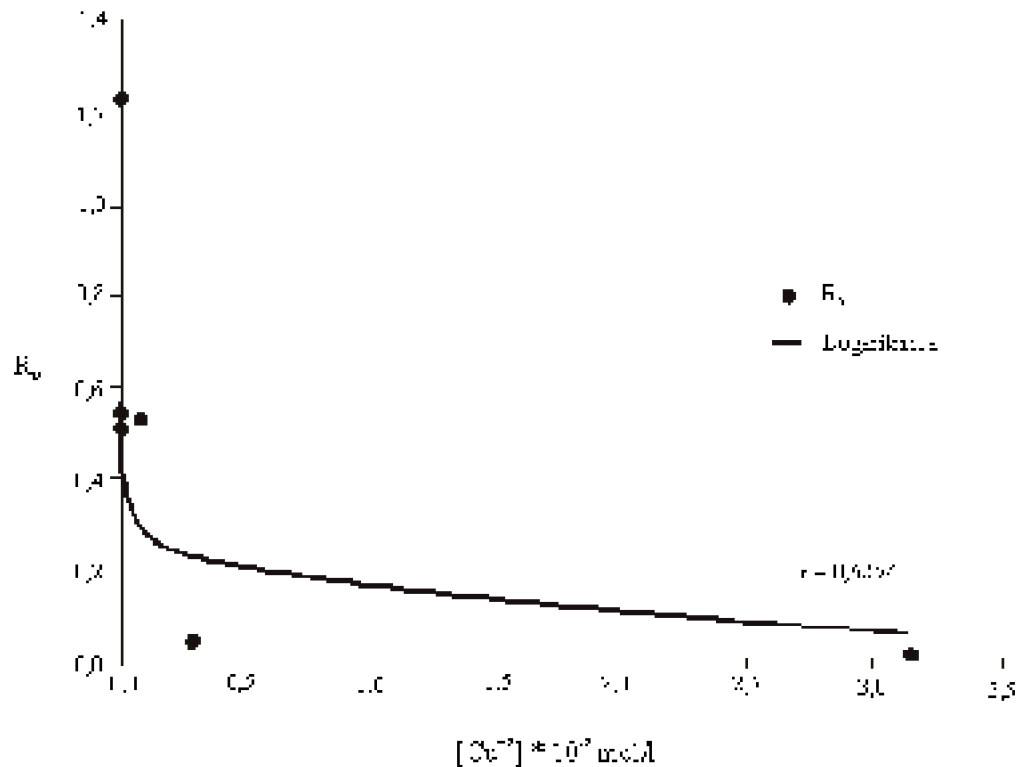


Figura 2 : regresión entre la tasa reproductiva neta a escala logarítmica y $[Cu^{+2}]$ de *C. dubia*.

2. Experimentos de dinámica y estructura poblacional de *C. dubia*

2.1. Análisis del tamaño poblacional

El experimento de dinámica poblacional fue realizado a pH constante. Sin embargo, el desarrollo de la población modificó químicamente el medio debido al uso del mismo. En consecuencia, el pH osciló entre 7,5-8 durante el tiempo que duró el experimento.

Como puede observarse en la Figura 3, el tamaño poblacional de *C. dubia* se afectó significativamente con ambas concentraciones experimentales de cobre en el medio. En el control la población disminuyó los primeros cinco días. A partir de este momento se recuperó rápidamente hasta alcanzar un tamaño de 42 individuos; luego volvió a disminuir. Tuvo fluctuaciones amplias entre 15 y 45 individuos, con un valor medio de aproximadamente 25 individuos. El comportamiento poblacional al final del experimento permite suponer que se inició un nuevo ciclo de recuperación en la población experimental. Estos resultados indican que bajo las condiciones del control la población de *C. dubia* podría mantenerse viable aunque mostró indicios de un comportamiento oscilatorio ya que se observaron tres máximos de abundancia poblacional.

Contrariamente, en los tratamientos con cobre las poblaciones no fluctuaron alrededor de un tamaño medio sino que disminuyeron rápidamente hasta extinguirse. Esto ocurrió a los 37 días con la concentración menor de cobre, y a los 13 días con la concentración mayor. Con $5 \mu\text{g l}^{-1} \text{CuSO}_4$ las poblaciones de *C. dubia* mostraron valores constantes hasta el día 6, luego decrecieron gradualmente hasta extinguirse. A diferencia del control, la población no produjo máximos de crecimiento y se extinguió prácticamente al final de la primera cohorte. El cobre produjo un efecto de mortalidad que causó la disminución permanente del tamaño de las poblaciones hasta el final de la experiencia. Esto permite afirmar que $5 \text{ mg l}^{-1} \text{CuSO}_4$ afectaron la dinámica poblacional de *C. dubia* llevándola a la extinción el día 37. Con $20 \text{ mg l}^{-1} \text{CuSO}_4$ las poblaciones de *C. dubia* disminuyeron aún más drásticamente hasta extinguirse en los trece primeros días en condiciones de laboratorio.

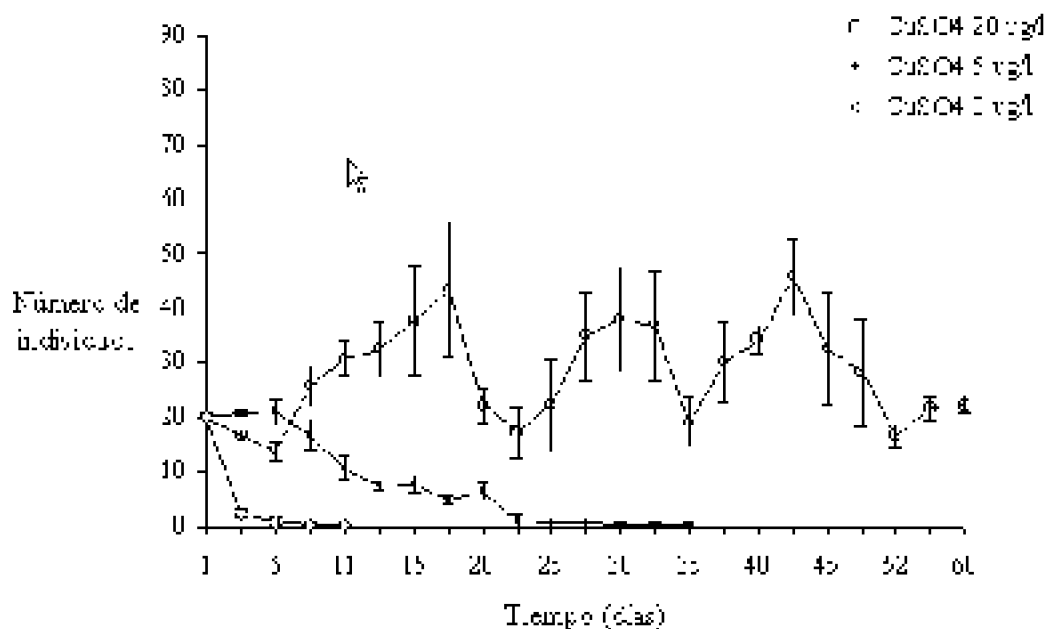


Figura 3: Cambios en el tamaño poblacional promedio de *C. dubia* con 0; 5 y $20 \text{ mg l}^{-1} \text{CuSO}_4$. Cada tratamiento replicado 5 veces. $N_0 = 20$ neonatos. Las barras verticales indican 1 D.E. $N = 5$.

Se compararon las dinámicas poblacionales en los tres tratamientos con ANOVA

para medidas repetidas, utilizando el programa estadístico SYSTAT (SPSS Inc. 1990-1994), previa transformación de los datos a la raíz cuadrada por el número de réplicas de cada experimento (N = 5). La salida del análisis de la varianza mostró un marcado efecto negativo del CuSO_4 sobre la dinámica poblacional de *C. dubia* (Tabla 12, ANOVA, $p < 0,001$).

Para conocer qué curvas mostraban diferencias estadísticamente significativas, se las comparó de a pares con el test a posterior de Tukey, con datos transformados a raíz cuadrada, en tres momentos representativos de la dinámica poblacional de este cladócer: Al día 11, cuando se extinguió la población con $20 \text{ CuSO}_4 \text{ mg l}^{-1}$, las tres curvas mostraron diferencias altamente significativas (Tukey, $p < 0,001$). Igual nivel de significancia mostró la comparación entre el control y $5 \text{ CuSO}_4 \text{ mg l}^{-1}$ y entre el control y $20 \text{ CuSO}_4 \text{ mg l}^{-1}$ al día 18, tiempo en que se alcanza el máximo tamaño poblacional en el control (Tukey, $p < 0,001$). Entre $5 \text{ CuSO}_4 \text{ mg l}^{-1}$ y $20 \text{ CuSO}_4 \text{ mg l}^{-1}$ de este mismo día también se encontraron diferencias significativas (Tukey, $p < 0,021$). También se compararon las dinámicas poblacionales al día 23, cuando se extinguió la población con $5 \text{ CuSO}_4 \text{ mg l}^{-1}$. La comparación entre el control y $5 \text{ CuSO}_4 \text{ mg l}^{-1}$ y entre el control y $20 \text{ CuSO}_4 \text{ mg l}^{-1}$ mostró diferencias significativas (Tukey, $p < 0,001$). No ocurrió lo mismo al comparar $5 \text{ CuSO}_4 \text{ mg l}^{-1}$ con $20 \text{ CuSO}_4 \text{ mg l}^{-1}$ (Tukey, $p = 0,664$), pues ambas poblaciones se habían extinguido al día 23.

Los resultados de los análisis estadísticos efectuados para el tamaño poblacional de *C. dubia* permitieron observar que existieron diferencias altamente significativas entre el control y la concentración menor y entre el control y la concentración mayor, y sólo significativas entre ambas concentraciones al día 11.

Tabla 12: ANOVA de Medidas Repetidas para la densidad poblacional de *Ceriodaphnia dubia* a 0, 5 y $20 \mu\text{g l}^{-1}$ CuSO_4 . 23 observaciones por muestra. 5 réplicas por tratamiento.

Fuente de variación	SC	gl	CM	F	p
Tratamiento	1509,833	2	754,916	2096,921	<<0,001
Tiempo	124,116	21	5,916	10,043	<<0,001
Trat * Tiempo	254,940	42	6,070	10,315	<< 0,001
Error 1	4,320	12	0,360		
Error 2	148,259	252	0,588		

2.2 Análisis de la estructura de la población

2.2.1. Neonatos

Como se observa en la Figura 1 (Anexo 3), en el control los neonatos disminuyeron durante los primeros seis días debido al paso al estado de juvenil y adulto, los que a partir del 6° día produjeron nuevos neonatos, lo que permitió el crecimiento de de la población.

Con $5 \text{ mg l}^{-1} \text{ CuSO}_4$ en los primeros tres días, los neonatos disminuyeron menos que en el control. Entre los días 3 al 9 el número de neonatos se mantuvo estable,

mostrando que el efecto negativo del cobre se manifestó en un retardo del crecimiento y desarrollo de *C. dubia*, que impidió el cambio de estado a juvenil. La producción de los primeros neonatos ocurrió a partir del día 13 lo que muestra un importante retardo en la edad de la primera reproducción.

Con 20 mg l⁻¹ CuSO₄ el número de neonatos disminuyó rápidamente. Sin embargo, en este caso no pasaron al estado de juvenil, extinguiéndose la población el día 18.

Se tomó a los neonatos como estado representativo de la población, para analizar el cambio en el tiempo de la relación porcentual de neonatos existentes en la población con 0, 5 y 20 mg l⁻¹ CuSO₄. (Figura 4). Para cada día, se dividió el número de neonatos en cada una de las cinco réplicas por el número de individuos totales de la población de cada réplica.

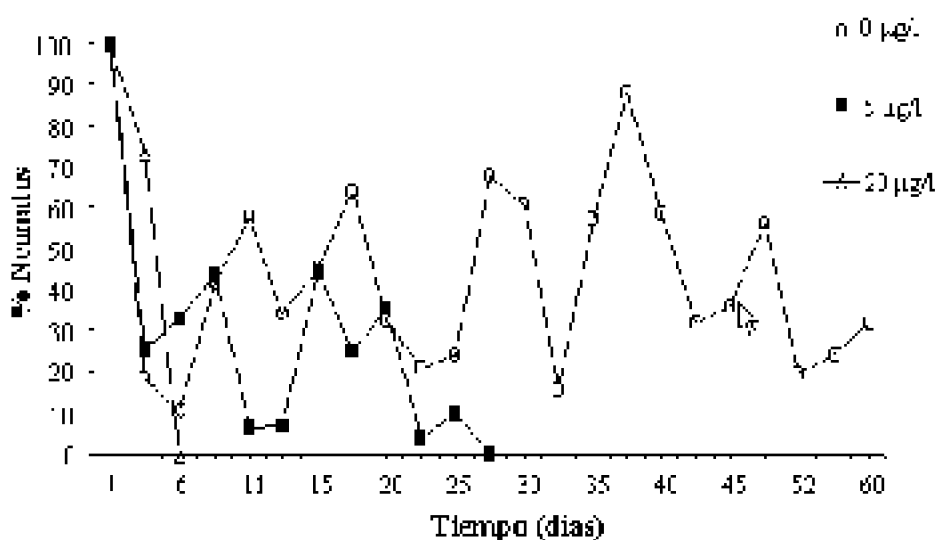


Figura 4: Porcentaje de neonatos de *C. dubia* a 0, 5 y 20 mg l⁻¹ CuSO₄.

A los datos porcentuales se les aplicó la transformación arcoseno (Sokal y Rohlf 1969). Con los datos así transformados se realizó un análisis de medidas repetidas. Este análisis mostró diferencias altamente significativas (Tabla 13, Anova p << 0,001).

Fuente de variación	SC	gl	CM	F	p
Tratamiento	1,893	2	0,946	63,059	<< 0,001
Tiempo	2,498	21	0,119	6,541	< 0,001
Trat * Tiempo	5,934	42	0,141	7,768	< 0,001
Error 1	0,120	8	0,015		
Error 2	3,055	168	0,018		

Ante estas evidencias, se realizó un test a posterior (ANOVA simple, univariado, en tres tiempos) para comparar de a pares las curvas del control y de los tratamientos con cobre. Se seleccionó el día 8 por ser el día en que murieron todos los neonatos en la

concentración mayor; el día 11 por ser el tiempo en el que los neonatos alcanzaron densidad máxima en la población control dentro del período de tiempo en que existen neonatos en los tres tratamientos. También se seleccionó el día 25 por ser el tiempo en que se extinguieron los neonatos en la concentración menor.

La comparación al día 8 entre CuSO_4 0 mg l^{-1} y CuSO_4 5 mg l^{-1} no fue significativa (Tukey, $p = 0,986$) pero sí entre CuSO_4 0 mg l^{-1} y 20 mg l^{-1} (Tukey, $p = 0,006$) y entre CuSO_4 5 mg l^{-1} y CuSO_4 20 mg l^{-1} (Tukey, $p = 0,004$). Al día 11 se encontraron diferencias altamente significativas entre CuSO_4 0 mg l^{-1} y CuSO_4 5 mg l^{-1} y entre CuSO_4 0 mg l^{-1} y CuSO_4 20 mg l^{-1} (Tukey, $p = 0,002$ y $p << 0,001$ respectivamente), pero no entre CuSO_4 5 mg l^{-1} y CuSO_4 20 mg l^{-1} (Tukey, $p = 0,513$).

La comparación al día 25 entre CuSO_4 0 mg l^{-1} y CuSO_4 5 mg l^{-1} no fue significativa (Tukey, $p = 0,426$) ni entre CuSO_4 0 y CuSO_4 20 (Tukey, $p = 0,105$). Tampoco mostró diferencias significativas entre ambos tratamientos con cobre (Tukey, $p = 0,623$).

Estos resultados muestran que al inicio de la experiencia no se encontraron diferencias entre el control y CuSO_4 5 mg l^{-1} , debido a que en ambos se produjo una gran mortalidad inicial de neonatos. Sí se encontraron diferencias entre el control y CuSO_4 20 mg l^{-1} y entre ambos tratamientos con cobre, debido al importante efecto negativo del cobre sobre la producción de neonatos. Contrariamente, al día 11 se encontraron diferencias significativas entre el control y ambos tratamientos con cobre, porque a este tiempo fue muy marcado el efecto negativo del cobre.

Al día 25, no se encontraron diferencias entre el control y los tratamientos con cobre debido a que la población control en ese día tenía una proporción muy baja de neonatos (aproximadamente 20 %), lo cual, sumado a la variabilidad entre las réplicas, puede explicar la falta de diferencias significativas para este día. Tampoco se encontraron diferencias significativas entre ambos tratamientos con cobre porque la proporción de neonatos en relación al total de la población era mínima con CuSO_4 5 mg l^{-1} (aproximadamente 10 %) e igual a cero con CuSO_4 20 mg l^{-1} .

Estos resultados indican que el número de neonatos considerado como proporción de la población total, sería un buen estimador de los cambios que ocurren en la misma.

2.2.2. Juveniles

La Figura 2 (Anexo 3) muestra que el número de individuos en el estado de juvenil aumentó en el control y en la concentración menor como consecuencia del paso de los neonatos a este estado durante los tres primeros días de la experiencia. En el control disminuyeron como consecuencia del paso al estado de adulto entre los días 3 y 8. En la concentración menor se produjo una disminución semejante aunque menos intensa, lo que entrega evidencia de que el cobre generó un retardo en el estado de juveniles impidiendo el paso rápido al estado de adulto.

Entre los días 8 y 11 se mantuvo constante el número de juveniles en la concentración menor lo que evidencia cierto retardo en el crecimiento y desarrollo en este estado. No ocurrió lo mismo en el control, donde aumentaron rápidamente entre los días 8 y 13 como consecuencia del paso de los neonatos al estado de juveniles.

Contrariamente al control sólo sobrevivieron algunos juveniles con $20 \text{ mg l}^{-1} \text{ CuSO}_4$.

2.2.3. Adultos

El número de adultos aumentó rápidamente en el control a partir del día 6. Entre los días 18 y 23 los mismos disminuyeron, hecho que coincidió con la disminución de neonatos y con el aumento de juveniles (Figura 3, Anexo 3).

Con $5 \text{ mg l}^{-1} \text{ CuSO}_4$ los adultos tuvieron un máximo de 4 individuos promedio el día 8. Luego disminuyeron progresivamente hasta el día 15 y se mantuvieron en un promedio de 2 individuos hasta el día 17. Si se compara este valor con el número de adultos en el control del mismo día (aproximadamente 12 individuos) se tiene una medida del efecto negativo del cobre sobre el estado de adulto de *C. dubia* (Figura N° 16, notar la diferente escala en el eje y de juveniles y adultos en Figuras 2 y 3 de Anexo 3).

Con $20 \text{ mg l}^{-1} \text{ CuSO}_4$ no se registraron adultos como consecuencia de la alta mortalidad de neonatos.

2.3. Análisis de la edad de la primera reproducción

Para analizar si el cobre modificó la edad de la primera reproducción en esta segunda serie de experimentos, se consideraron las cinco réplicas, y en cada una de ellas, se determinó el día en que se produjo el primer neonato, es decir, un neonato que no perteneciera a los 20 neonatos colocados al inicio del experimento. Fueron considerados sólo los datos correspondientes al control y a $5 \text{ Cu SO}_4 \text{ mg l}^{-1}$, porque con $20 \text{ CuSO}_4 \text{ mg l}^{-1}$ no se produjeron neonatos.

Se realizó una comparación no paramétrica que mostró diferencias significativas para la edad de la primera reproducción entre 0 y $5 \mu\text{g l}^{-1}$ (Mann-Whitney, U-Test, $U = 24$, $p = 0,013$). Es decir, que la edad de la primera reproducción se adelantó significativamente con $5 \mu\text{g l}^{-1}$ con respecto al control. Este resultado no es coincidente con el encontrado para este atributo de historia de vida en el primer grupo de experimentos, en los que se observó un retraso de la edad de la primera reproducción. Sin embargo, es difícil conocer con exactitud la variabilidad que existe en la edad de la primera reproducción en un experimento de tipo poblacional como el presente, en el que coexisten organismos multietáreos. Esto sería posible aislando cada uno de ellos y analizando la variabilidad de este atributo de historia de vida en toda la población. Sin embargo, la anterior sería una pregunta formulada a otro nivel de organización biológica: el nivel de individuo.

2.4. Análisis de la fecundidad

Se estimó la fecundidad media por día, dividiendo el número de neonatos por el número de adultos, para los días 4, 8, 13, 18 y 22. Este período comprende el primer ciclo de fluctuación en la población control y los mayores cambios en las dinámicas poblacionales en los tratamientos. Sólo pudo compararse el control con 5 mg l^{-1} , debido a que con $\text{CuSO}_4 20 \text{ mg l}^{-1}$ no se registraron adultos.

EFFECTOS DEL CU Y DEL PH SOBRE LA ADECUACIÓN BIOLÓGICA DE *Ceriodaphnia dubia* (Richard 1894) (Crustacea, Cladocera) EN EXPERIMENTOS DE MICROCOSMOS

Los datos de fecundidad media se compararon con ANOVA para medidas repetidas, con test a posterior de Tukey en los días antes indicados. La salida del ANOVA mostró diferencias significativas en la fecundidad media de *C. dubia* entre 0 y 5 $\text{CuSO}_4 \text{ mg l}^{-1}$ (Tabla 14, ANOVA, $p \ll 0,001$).

Tabla 14: ANOVA de Medidas Repetidas para la fecundidad media por día de *Ceriodaphnia dubia* con 0, 5 y 20 $\mu\text{g l}^{-1}$ CuSO_4 . Cada tratamiento, con cinco réplicas. $N_0=20$ individuos.

Fuente de variación	SC	gl	CM	F	p
Tratamiento	58,320	1	58,320	145,800	< 0,001
Tiempo	98,520	4	24,630	11,456	< 0,001
Trat * Tiempo	49,880	4	12,470	5,800	= 0,001
Error 1	3,200	8	0,400		
Error 2	68,800	32	2,150		

La comparación de la fecundidad media entre el control (CuSO_4 0 mg l^{-1}) y CuSO_4 5 mg l^{-1} fue significativa para el día 4 (Tukey, $p = 0,003$). También fue significativa para el día 8 (Tukey, $p = 0,008$). No mostró diferencias significativas en las siguientes comparaciones: el día 13 (Tukey, $p = 0,397$), el día 18 (Tukey, $p = 0,217$), ni el día 22 (Tukey, $p = 0,305$). Sin embargo, la falta de significancia en estos últimos casos pudo deberse a la alta variabilidad en el número de neonatos producidos.

DISCUSION

Las evidencias encontradas indican la existencia de efectos negativos que ejercen el pH y el cobre sobre los atributos de historia de vida y los parámetros poblacionales analizados para *C. dubia*. A continuación se discutirán los efectos del pH y el cobre sobre la sobrevivencia, el número de las camadas, sobre la edad de la primera reproducción, sobre R_0 y sobre la estructura y dinámica de las poblaciones experimentales de *C. dubia*.

Efectos sobre la sobrevivencia y el tamaño de las camadas

El efecto de la disminución de los parámetros indicados en las poblaciones experimentales de *C. dubia* en los tratamientos con pH 6 y 8 y diferentes concentraciones de CuSO_4 mostraron que ambos ejercieron efecto negativo sobre la sobrevivencia de *C. dubia* y que este efecto fue independiente entre ambos factores. Con la concentración de cobre más alta, la sobrevivencia de *C. dubia* no fue diferente en un ambiente con alto contenido de cobre y pH 8, que en un ambiente sin cobre y pH 6. Por otro lado, a pH 6 el cobre mostró ser igualmente tóxico para la sobrevivencia de *C. dubia* en las dos concentraciones de sulfato de cobre ensayadas.

El pH 6 también afectó al patrón de fecundidad por la disminución en el número de camadas y por el atraso de la edad de la primera reproducción. A pH 8 se produjo un

mayor número de camadas que a pH 6. Es decir, hay un efecto negativo del pH 6 en estos parámetros poblacionales, en edades tempranas aún en ausencia de cobre. En el control la gran producción de neonatos en la tercer camada permitió que la población pudiera establecerse.

En la condición de pH 6, *C. dubia* solamente produjo una camada; no produjo la segunda y tercer camadas, como habitualmente ocurre. En efecto, cuando el ambiente es altamente perjudicial para un organismo, no existen posibilidades de establecer compromisos en la asignación de recursos a distintas funciones vitales (Sibly & Calow 1986; Forbes & Calow 1997). Esto sería lo que ocurrió con las poblaciones de *C. dubia* en los tratamientos con cobre y pH 6, en los que la elevada mortalidad indica que esta particular combinación de factores es incompatible con la vida para esta especie.

Efectos sobre la edad de la primera reproducción

En sentido evolutivo, cualquier rasgo puede ser analizado como la suma de los costos que reducen la adecuación biológica y de los beneficios que la incrementan. Sólo por permanecer menor tiempo como juveniles, los organismos que maduran en poco tiempo tienen mayor probabilidad de sobrevivir hasta la madurez. Además, logran mayor adecuación biológica debido a que su progenie nace y comienza a reproducirse más tempranamente. Sin embargo, el atraso en la madurez podría implicar beneficios vinculados a una mayor fecundidad inicial si permite un mayor crecimiento en el caso de que la fecundidad se incremente con el tamaño, o si el atraso en la madurez se traduce en crías de mayor tamaño o en cuidados parentales, que reducen la tasa de mortalidad juvenil instantánea de la prole (Stearns 1994). Los cladóceros son organismos iteróparos sin cuidado parental por lo que el atraso de la primera reproducción no representaría una ventaja adaptativa, pero sí un adelanto de la misma. Sin embargo, dadas las condiciones de los experimentos de sobrevivencia con cobre a ambos pH, el atraso observado en la edad de la primera reproducción de *C. dubia*, estaría mostrando que estas poblaciones enfrentan condiciones desfavorables que se traducen en retardo en el desarrollo y la reproducción, lo que significa una disminución de su adecuación biológica.

Los cladóceros suelen responder adaptativamente a condiciones ambientales inestables o adversas tales como disminución de la temperatura y desecación formando huevos de resistencia o efipios (Kerfoot 1974; Therelkeld 1979; Fryer 1982, Paggi 1995). Es interesante hacer notar que durante el desarrollo de los experimentos no se observó la formación de efipios en condiciones de baja densidad de organismos. Sin embargo, estos se observaron durante la fase de cultivo masivo de los cladóceros, previo al inicio de las experiencias controladas. La estrategia mostrada por *C. dubia* en los tratamientos de sobrevivencia con pH y cobre fue el retardo en la edad de la primera reproducción y la disminución en la sobrevivencia y en la fecundidad, mientras que en el experimento de dinámica poblacional ocurrió un adelanto en la edad de primera reproducción, con respecto de la situación control. Este resultado contradictorio podría ser explicado por un cambio en la composición genética de los clones empleados, debido al tiempo

transcurrido entre ambos experimentos, .

Efectos sobre la tasa reproductiva neta

La comparación de los distintos valores de R_0 permitió conocer el efecto combinado de la disminución en la longevidad y en la reproducción de *C. dubia* como una medida de su adecuación biológica. R_0 mostró un valor mayor a la unidad, valor compatible con el crecimiento poblacional, sólo en el control a pH 8. En resumen, R_0 siempre mostró valores menores a pH 6 que a pH 8 y se relacionó negativamente con el incremento en cobre a ambos valores de pH lo que demuestra el efecto tóxico del cobre sobre la longevidad y la reproducción. Este efecto, al igual que para el número de camadas, fue mayor a pH 6 que a pH 8, lo que entregaría evidencia del importante efecto negativo de los pH más ácidos sobre estas poblaciones. Finalmente, el valor de regresión entre R_0 y la concentración de cobre libre ($r = 0,625$) permitió concluir que el cobre tuvo un efecto tóxico sobre *Ceriodaphnia dubia* que fue independiente del efecto negativo del pH. Sin embargo, es difícil mantener el pH del medio experimental con valores constantes, motivo por el cual generalmente los experimentos de toxicidad se estandarizan con concentraciones conocidas de sulfato de cobre.

Efectos en la estructura y dinámica de las poblaciones

La estructura y dinámica poblacionales reflejan las presiones selectivas actuales y pasadas a las que estuvo sujeta esta población y son un producto de la selección natural; son el resultado de una serie de causas que *a priori* pueden ser muy variadas. La dinámica de una población indica cambios de su abundancia en función del tiempo, bajo el supuesto de que el espacio se mantiene constante. Este supuesto, difícil de controlar en condiciones naturales, puede manipularse experimentalmente para simular condiciones diferentes y constantes durante el tiempo de experimentación.

En el segundo grupo de experimentos de dinámica poblacional a pH 8, constante, se encontró que la concentración de cobre iónico afectó a las poblaciones experimentales de *C. dubia* generando un retardo para alcanzar los estados de juvenil y adulto.

Existen antecedentes en la literatura de que a edades tempranas en los cladóceros, otros invertebrados y vertebrados son menos tolerantes a la acción de diferentes causas de perturbación, siendo críticas para que una población pueda establecerse y crecer. Así lo sugiere Neill (1988) al estudiar los efectos de la disminución del alimento en la larva del insecto *Chaoborus*; Pearson (1988) en peces (en Vanni & Lampert 1992) y en *Daphnia* Vanni & Lampert (1992). En los experimentos de dinámica poblacional con la menor concentración de cobre, los primeros neonatos se produjeron un poco antes que los controles. Así el comportamiento es coincidente con el resultado de los autores citados.

Tal como se sintetiza en la Figura 5, el atraso en la generación de neonatos en los experimentos de sobrevivencia, que impidió alcanzar el estado de adulto en corto tiempo, la gran mortalidad inicial de los neonatos y la baja tasa reproductiva pudieron ser factores críticos que actuaron sinérgicamente generando una importante disminución del reclutamiento poblacional.

En los experimentos poblacionales sin cobre se produjo un gran número de neonatos que condujo a un rápido aumento del tamaño de la población, mostrando tres ciclos de fluctuaciones. El aumento poblacional rápido bajo condiciones ambientales favorables es característico de *C. dubia* y de los cladóceros en general y permite que se acorte el tiempo generacional con el consiguiente incremento de la adecuación biológica, por lo que resulta altamente adaptativo (Barnes et al 1993; Anderson & Benke 1994). Por otra parte, desde los trabajos seminales de Frank y Slobodkin, quienes analizaron la dinámica del cambio poblacional de distintas especies de cladóceros (e. g. Frank 1960) se sabe que la dinámica de las poblaciones de cladóceros tiene fluctuaciones normales que resultan sólo de la estructura de edad de sus poblaciones. En relación a los experimentos poblacionales sin cobre realizados con *C. dubia*, se observó que cuando la población alcanzó el valor máximo, la gran mayoría de los organismos pertenecían a las clases de edad intermedia -juveniles-, que tienen tasas de mortalidad edad-específicas bajas. Luego del día 16 la población decreció, debido a que en el estado de adulto las tasas de mortalidad son más altas. Hacia el día 23 la natalidad se incrementó nuevamente. La mayoría de los organismos de la población original habían muerto, y los restantes eran jóvenes y adultos, por lo que tendrían tasas de fecundidad edad-específicas altas, lo que explica el segundo incremento poblacional. Luego tuvo otro ciclo de aumento poblacional similar al primero entre los días 35 y 52. Por lo tanto, las fluctuaciones observadas experimentalmente podrían considerarse derivadas de las características biológicas propias de la reproducción de esta especie.

La dinámica poblacional de *C. dubia* mostró diferencias significativas entre el control y ambas concentraciones de cobre ensayadas, lo que entregaría evidencia de las importantes consecuencias poblacionales de la disminución en la sobrevivencia y fecundidad registrados en el primer grupo de experimentos. Los costos de neutralizar una sustancia tóxica estableciendo compromisos con otros componentes del presupuesto energético pueden modificar la dinámica poblacional. Particularmente, puede establecerse un compromiso entre la capacidad de sobrevivir al tóxico y la tasa de crecimiento y la fecundidad (Sibly & Calow 1989 en Forbes y Calow 1996).

Siguiendo los resultados obtenidos en esta tesis para compararlos con otros estudios realizados a distintas escalas se concluye que *C. dubia* es menos tolerante al cobre que otros cladóceros e.g. del género *Daphnia* para el que se establece un rango tóxico entre 5 y 86 $\mu\text{g l}^{-1}$ Flemming & Trevors (1989). En experimentos ecosistémicos los rangos utilizados varían entre 200 y 5000 $\mu\text{g l}^{-1}$ (Roch et al 1985). En mesocosmos, entre 10 y 100 $\mu\text{g l}^{-1}$ (Kerrison et al 1988); en experimentos de microcosmos como el presente se establece un valor umbral de 40 $\mu\text{g l}^{-1}$ (Winner & Farrell 1978). Los resultados aportados en esta tesis indican que, al menos para *Ceriodaphnia dubia*, debe considerarse tóxico un rango menor, entre 5 y 20 $\mu\text{g l}^{-1}$ (equivalentes a $0,009 \times 10^{-7} \text{ mol l}^{-1}$ y $0,094 \times 10^{-7} \text{ mol l}^{-1}$ de Cu^{+2} respectivamente). Al considerar el grado de toxicidad efectivo que pudiera

tener el incremento de cobre en un determinado ecosistema, también debería tenerse en cuenta el pH y la cantidad de materia orgánica e inorgánica suspendida en el ambiente.

En resumen, se acepta la hipótesis de que la concentración de cobre y el pH afectan negativamente la adecuación biológica del cladóceros *Ceriodaphnia dubia* por la disminución de su sobrevivencia y fecundidad, por cambios en la estructura y dinámica de sus poblaciones bajo las condiciones experimentales.

Otro aspecto a considerar es el de la legitimidad de la extrapolación de experimentos poblacionales de laboratorio a poblaciones de ambientes naturales y a niveles de organización más complejos como el comunitario o el ecosistémico. En este sentido, el análisis de la literatura especializada muestra que los numerosos estudios desarrollados con poblaciones zooplanctónicas son de dos tipos fundamentales. Algunos se realizan bajo condiciones controladas de laboratorio que permiten el aislamiento de variables: sus resultados generalmente son consistentes y aportan conocimiento de las causas de los cambios poblacionales, pero están limitados a condiciones muy específicas rara vez encontradas en la naturaleza. Otros se realizan en el ambiente natural, en cuyo caso los estudios se limitan a establecer correlaciones entre los cambios poblacionales y variables ambientales muchas veces difíciles de controlar, situación que con frecuencia conlleva errores importantes en las estimaciones inferidas. Otra aproximación posible es la comparación de las respuestas a una misma variable en experimentos simultáneos de laboratorio y terreno (Balseiro et al 1992; González & Frost 1996). Siguiendo este enfoque, Balseiro et al (1992) comunican que *Ceriodaphnia*, a diferencia de *Bosmina*, mostró el mismo patrón de fecundidad en experimentos de campo y de laboratorio, lo que sugiere que el comportamiento reproductivo del género *Ceriodaphnia* sería similar en ecosistemas más complejos.

Por otro lado, los efectos del cobre iónico dependientes del pH del agua podrían explicar algunos cambios que ocurren a nivel comunitario y ecosistémico; pH menores a 5 por sí mismos determinan cambios en la trama trófica consistentes en mayor variabilidad de la omnivoría y del canibalismo, así como de la proporción de especies basales, intermedias y topes (Havens 1993; Locke 1992; Locke & Sprules 1994). Sin embargo, es difícil trasladar las observaciones sobre poblaciones experimentales a los niveles comunitario y ecosistémico, a) porque no se tienen suficientes datos de cómo responden las distintas especies y b) existen relaciones complejas entre la composición de especies y los atributos funcionales de las comunidades y ecosistemas (Lawton 1994).

En este contexto, existen evidencias que el Embalse Rapel (34°10'S-71°29'W) (Cabrera et al 1977) ha recibido relaves con sulfato de cobre durante los últimos quince años y se han alcalinizado sus aguas (Vila et al 1997; Schalscha & Ahumada 1998). Este último factor posiblemente esté enmascarando las consecuencias negativas del incremento del cobre sobre el zooplancton que sí se observaron en los experimentos con *C. dubia*. Estudios recientes (Shi 1998 a y b; Robertson 1998) confirman que el pH es un factor clave en el control de la adsorción del cobre libre a las partículas orgánicas e inorgánicas suspendidas en aguas fluviales superficiales. Las variaciones en el cobre libre aún de los efluentes industriales tratados presenta una cinética de especiación propia que puede tener gran incidencia en la toxicidad para la biota acuática y posibles efectos de bioacumulación en las tramas tróficas terrestres cuando el agua contaminada

con metales pesados es utilizada para riego (Allen & Hansen 1996; Schalscha & Ahumada 1998). En los ecosistemas acuáticos eutróficos como el embalse Rapel ocurren naturalmente cambios de pH vinculados a la función fotosintética y respiratoria (Wetzel 1983; Andrew et al 1989; Horne & Goldman 1994). Según los antecedentes experimentales y bibliográficos aportados en esta tesis, podría esperarse que la acción conjunta del cobre y de los cambios de pH generara cambios en la estructura comunitaria de este ecosistema. Esta proposición requiere posteriores estudios que ratifiquen los potenciales mecanismos involucrados.

Aunque las evidencias aportadas por los experimentos no permiten realizar una extrapolación directa del efecto que el cobre pudiera tener a otros niveles de organización biológica, cabe considerar que estudios como el presente, en los cuales la información se obtiene mediante condiciones controladas, con bajos niveles de cobre, tienen valor comparativo con otros estudios similares realizados con distintas especies pertenecientes al mismo ecosistema, o entre la misma especie perteneciente a distintos ecosistemas. Además son esenciales para la comprensión de las bases mecanicísticas de las perturbaciones al actuar en niveles superiores de organización biológica.

Se propone profundizar el conocimiento alcanzado en esta área a través del análisis del efecto del pH en otras especies de cladóceros y desarrollar estudios orientados a conocer los efectos fisiológicos que pudieran tener el pH y el Cu actuando juntos o aisladamente. En particular, deberían vincularse los estudios realizados a escala de individuo, población y especie a través de la cuantificación de los costos metabólicos asociados con la posible detoxificación, y dilucidarse las relaciones funcionales específicas entre los costos metabólicos y las variables del ciclo de vida y los parámetros poblacionales de *C. dubia*.

Asimismo se propone analizar el efecto tóxico del cobre y de otras sustancias potencialmente tóxicas en la estructura comunitaria del zooplancton del embalse Rapel y en otros ecosistemas para incrementar la comprensión de las consecuencias ecológicas que tienen las variaciones poblacionales de especies que ocupan una posición central en las redes tróficas acuáticas. Los estudios desarrollados en este sentido corresponden al hemisferio norte, no habiéndose investigado estas relaciones en tramas tróficas propias del hemisferio sur, las que podrían mostrar particularidades propias.

ANEXO 1

Tabla : Supervivencia de *Ceriodaphnia dubia* (en días) en “medio *Daphnia*” (pH: 7.5) a: 0, 5, 15, 20 y 25 (g l⁻¹) de So₄ Cu. 5 tratamientos con diez neonatos cada uno.

So ₄ Cu (mg l ⁻¹)	dia 1	dia 2	dia 3	Dia 4	Dia 5	dia 6	dia 7	dia 8	dia 9	dia 10
0	10	10	10	10	33	30	58	66	65	79
5	10	6	6	8	8	8	12	10	10	7
10	10	5	5	5	10	7	12	8	7	2
15	10	5	5	5	8	4	0	0	0	0
20	10	9	7	4	6	0	0	0	0	0
25	10	2	2	4	4	3	0	0	0	0

ANEXO 2

ANEXO 3

Datos de tabla de vida del Análisis de Kaplan-Meyer para los análisis de la función de sobrevivencia de *Ceriodaphnia dubia*.

Tabla de vida para el Grupo 1

pH6- CuSO4 0 $\mu\text{g l}^{-1}$					
Día	No.Enter	No.Cnsrd	No.Dying	% Srvvng	Cum.%.Sr
1	50	0	27	46	100
2.7	23	0	11	52.17	46
4.3	12	0	1	91.66	24
6	11	0	1	90.90	22
7.7	10	0	0	100	20
9.3	10	0	2	80	20
11	8	0	3	62.5	16.00
12.6	5	5	0	100	10.00
14.3	0	0	0	0	10.00
16	0	0	0	0	0

Tabla de vida para el Grupo 2

EFFECTOS DEL CU Y DEL PH SOBRE LA ADECUACIÓN BIOLÓGICA DE Ceriodaphnia dubia (Richard 1894) (Crustacea, Cladocera) EN EXPERIMENTOS DE MICROCOSMOS

pH6-CuSO4 5 µg l⁻¹

Día	No. Enter	No. Cnsrd	No. Dying	% Srvvng	Cum.% Sr
1	50	0	32	36	100
2.7	18	0	14	22.22	36
4.3	4	0	0	100	8.00
6	4	0	1	75	8.00
7.7	3	0	3	0	6
9.3	0	0	0	0	0
11	0	0	0	0	0
12.6	0	0	0	0	0
14.3	0	0	0	0	0
16	0	0	0	0	0

Tabla de vida para el Grupo 3

pH6-CuSO4 20 µg l⁻¹

Día	No. Enter	No. Cnsrd	No. Dying	% Srvvng	Cum.% Sr
1	50	0	28	44	100
2.7	22	0	15	31.81	44
4.3	7	0	3	57.14	14
6	4	0	1	75	8.00
7.7	3	0	1	66.66	6
9.3	2	0	2	0	4.00
11	0	0	0	0	0
12.6	0	0	0	0	0
14.3	0	0	0	0	0
16	0	0	0	0	0

Tabla de vida para el Grupo 4

pH8-CuSO4 0 µg l⁻¹

Día	No. Enter	No. Cnsrd	No. Dying	% Srvvng	Cum.% Sr
1	50	0	11	78	100
2.7	39	1	2	94.80	78
4.3	36	0	2	94.44	73.94
6	34	0	1	97.05	69.83
7.7	33	0	4	87.87	67.78
9.3	29	0	8	72.41	59.56
11	21	0	4	80.95	43.13
12.6	17	14	3	70	34.91
14.3	0	0	0	0	24.44
16	0	0	0	0	0

Tabla de vida para el Grupo 5

pH8-CuSO4 5 $\mu\text{g l}^{-1}$					
Día	No.Enter	No.Cnsrd	No.Dying	% Srvvng	Cum.%Sr
1	50	0	12	76	100
2.7	38	0	2	94.73	76
4.3	36	0	1	97.22	72
6	35	0	1	97.14	70.00
7.7	34	0	5	85.29	68.00
9.3	29	1	7	75.43	58.00
11	21	0	3	85.71	43.75
12.6	18	8	9	35.71	37.50
14.3	1	0	1	0	13.39
16	0	0	0	0	0

Tabla de vida para el Grupo 6

pH8-CuSO4 20 $\mu\text{g l}^{-1}$					
Día	No.Enter	No.Cnsrd	No.Dying	% Srvvng	Cum.%Sr
1	50	0	25	50	100
2.7	25	0	9	64	50
4.3	16	0	1	93.75	32
6	15	0	3	80	29.99
7.7	12	0	3	75	24
9.3	9	0	3	66.66	18
11	6	0	3	50	12
12.6	3	0	3	0	6
14.3	0	0	0	0	0
16	0	0	0	0	0

ANEXO 4

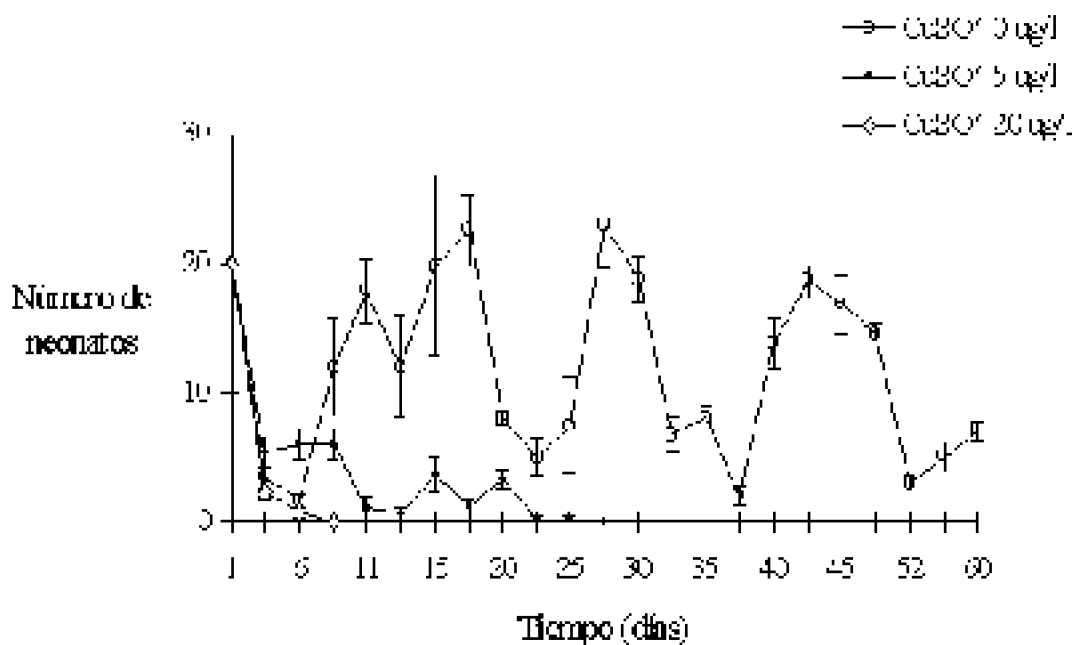


Figura 1: Variación en el número de neonatos de *C. dubia* en el control y con 5 y 20 mg l⁻¹ CuSO₄. Cada tratamiento replicado 5 veces. N₀ = 20 neonatos por réplica. Las barras verticales indican 1 D.E. N = 5.

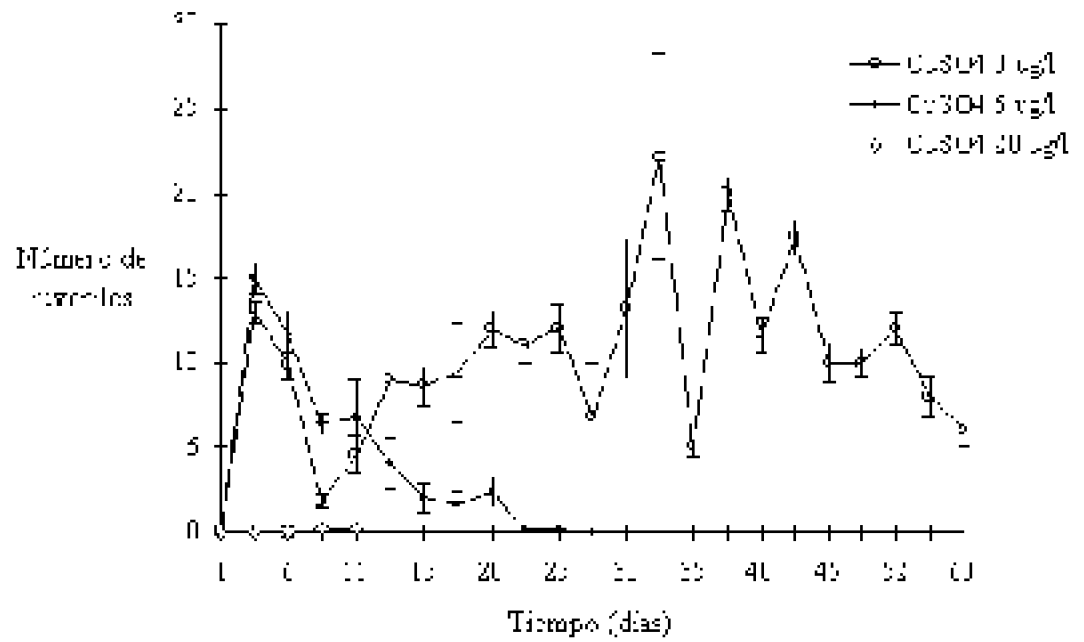


Figura 2: Variación en el número de juveniles de *C. dubia* en el control y con 5 y 20 mg l⁻¹ CuSO₄. Cada tratamiento replicado 5 veces. N₀ = 20 juveniles por réplica. Las barras verticales indican 1 D.E. N = 5.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Allen H. E. & Hansen, D. J. (1996) Importance of trace metal speciation to water quality criteria. *Water Environ. Res.* 68: 42-54.
- Anderson, D. H. & A. Benke (1994) Growth and reproduction of the cladoceran *Ceriodaphnia dubia* from a forested floodplain swamp. *Limnol. & Oceanogr.* 39 (7)1517-1527.
- Andrew, T. E. , S. Cabrera & V. Montecino (1989) Diurnal changes in zooplankton respiration rates and the phytoplankton activity in two Chilean lakes. *Hydrobiología* 175:121-135.
- Andrewartha, H.G. & L. C. Birch (1954) *Selections from The Distribution and Abundance of Animals*. Chicago Press 275 pp.
- American Public Health Association (1971) *Standard methods for the examination of waste water and sewage*, 13th ed. New York.
- Araya J.M. y L. Zuñiga (1985) *Manual taxonómico del zooplancton lacustre de Chile*. Instituto de Zoología. Universidad Austral de Chile.
- Araya, J. & L. Zúñiga (1991) Zooplankton community structure in two Chilean reservoirs. *Arch. Hydrobiol.* 123, 3:305-335.
- Arnold, D. E. 1971. Ingestion, assimilation, survival, and reproduction by *Daphnia pulex* fed on seven species of blue-green algae. *Limnol. Oceanogr.* 16: 906-920.
- Ayers R.S, & Westcot D.W. (1985) *Water quality for Agriculture F.A.O. paper 29*, 174

pp.

- Balseiro, E. G., B. E. Modenutti & C. P. Queimaliños (1992) The coexistence of *Bosmina* and *Ceriodaphnia* in a south Andes lake: an analysis of demographic responses. *Freshwater Biology* 28: 93-101.
- Barnes, R., Calow, P. & Olive, P. (1993) *The Invertebrates. A new synthesis.* Blackwell Scientific Publications. 488pp.
- Barnes, R. & Mann, K. (1991) *Fundamentals of Aquatic Ecology.* Blackwell Scientific Publications. 270 pp.
- Baudo, R. (1987) Ecotoxicological testing with *Daphnia*. *Mem. Ist. Ital Idrobiol.*, 45: 461-482.
- Bell, G. (1984) Measuring the costs of reproduction II. The correlation structure of the life tables of five freshwater invertebrates. *Evolution* 38: 314-326.
- Biesinger, K.E. & G.M. Christensen (1972). Effects of various metals on survival, growth, reproduction and metabolism of *Daphnia magna*. *Journal of Fisheries Research Board of Canada* 29: 1691-1700 pp.
- Birch, L. C. (1948) The intrinsic rate of natural increase of an insect population. *Journal of Animal Ecology* 17: 15-26.
- Boersma, M. & J. Vijverberg (1996) Food effects on life history traits and seasonal dynamics of *Ceriodaphnia pulchella*. *Freshwater Biology* 35: 25-34.
- Boyd, C. E. (1972) *Water quality in a warmwater fish pond.* Agriculture Experiment Station. Auburn University. Alabama. 359 pp.
- Bottrell, H. H. (1975) Generation time, length of life, instar duration and frequency of moulting, and their relationship to temperature in eight species of Cladocera from River Thames, Reading. *Oecología* 19: 129-140.
- Bryan, G. W. (1976) Some aspects of heavy metal tolerance in aquatic organisms. *In* *Pollutants on aquatic organisms.* A.P.M. Lockwood ed. Cambridge University Press.
- Cabaniss, S. E. (1986) *Equilibrium Speciation.* Version 2.1.
- Cabrera, S., V. Montecino, I. Vila, N. Bahamonde., I. Bahamondes, I. Barends, R. Rodriguez, R. Ruiz, D. Soto (1977) *Características Limnológicas del Embalse de Chile Central Seminario sobre medio ambiente y represas.* Montevideo, Uruguay. Publ. O.E.A. Depto. Asuntos científicos y tecnológicos. Tomo I: 40-61.
- Cáceres, C. (1998) Interspecific variation in the abundance, production and emergence of *Daphnia* diapausing eggs. *Ecology* 79:1699-1710.
- Cairns, J. (1986) The myth of the most sensitive species. *BioScience* Vol 36. N° 10. 670-672 pp.
- Cairns, J. & K. L. Dickson (1978) Field and Laboratory protocols for evaluating the effects of chemical substances on aquatic life. *Journal of testing and evaluation*, Vol 6, N° 2. 81-90 pp.
- Callow, P. & V. E. Forbes (1998) How do physiological responses to stress translate into ecological and evolutionary processes? Review. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A* 12: 11-16 pp.
- Calow, P. & Sibly, R. A. (1990) *A Physiological basis of population processes:*

- ecological implications. *Functional Ecology* 4: 283-288.
- Canavos, G. C. (1988) Probabilidad y Estadística. Aplicaciones y métodos. Mc. Graw Hill. 651 pp.
- Carpenter, S. R. & J. F. Kitchell (1993) The trophic cascade in lakes. Cambridge University Press. 484 pp.
- Connell, J.H. (1970) Notes on methods used in life-history studies pág 4-17 *in* Readings in Ecology and Ecological Genetics. Connel, J. D. Mertz & W. Murdoch eds. Harper & Row Publishers 397 pp.
- Correa, J.A. & P. Ojeda (1997) Effects of copper on aquatic biota: A look from ecological and regulatory perspectives. *in* Advances in risk assessment of copper in the environment. Editors: G.E. Lagos & R. Badilla-Ohlbaum. Chile.
- Cowgill, U. & Milazo, P. (1991) Comparison of the effects of Metallic Copper and Copper Nitrate on *Ceriodaphnia dubia* utilizing the three-brood test. *Bull. Environ. Contam. toxicol.* 46:141-145.
- Chi-Hsiang, L. & K. Armitage (1980) Growth, development and body size of field and laboratory populations of *Daphnia ambigua*. *OIKOS* 35:31-48.
- De Meester, L. C. C. & J. Vanoverbeke. (1998) Chemical interactions, maternal effects and the hatching of *Daphnia* diapausing eggs. *Arch. Hydrobiol. Spec. Issues Advanc. Limnol.* 52: 263-272.
- DeGraeve, G.M., J. D. Cooney, B. H. Marsh, T. Pollock & N. Reichenbach (1992) Variability in the performance of the 7-d *Ceriodaphnia dubia* survival and reproduction rates in two southeastern black-water rivers. *Limnol. & Oceanogr.* 32: 221-234.
- Evans, M. S. & D. Mc Naught (1988) The effect of toxic substances on zooplankton populations: a great lake perspective *in* Toxic contaminants and ecosystem health. *Journal of Aquatic Ecosystem Health* 2: 151:163.
- Ferrari, B. & J. Ferard (1996) Effects of nutritional renewal frequency on survival and reproduction of *Ceriodaphnia dubia*. *Environmental Toxicology and Chemistry*. Vol 15, N° 6:765-770.
- Filella, M. R. Town & J. Buffle (1995) Speciation in Fresh Waters. *in* Chemical Speciation in the Environment. A. Ure & C. Davidson eds.
- Fleming, C. A. & J. T. Trevors (1989) Cooper toxicity and chemistry in the environment: a review. *Water, Air and soil pollution* 44: 143-158.
- Forbes, V. E. & P. Calow (1996) Costs of living with contaminants: implications for assesing low-level exposures. *Belle Newsletter* (Publ of Northeast Regional Environmental Public Health Center, MA) 4: 1-8.
- Forbes, V. E. & P. Calow (1997) Responses of aquatic organisms to pollutant stress: theoretical and practical implications. In: Loeschcke V., Bijlsm K., eds. *Stress, Adaptation and evolution*. Basel:Birkhaeuser. 25-41.
- Frank, P. W. (1960) Prediction of population growth form in *Daphnia pulex* cultures. *Am. Nat.* Vol. XCIX, N° 876 *in* Readings in Ecology and Ecological Genetics. Connel, J. D. Mertz & W. Murdoch eds. Harper & Row Publishers 397 pp.
- Fryer, D. G. (1982) Contrasting strategies of gametogenesis in northern and southern populations of Cladocera. *Ecology* 63:224-241.

- Fryer, G. (1996) Diapause, a potent force in the evolution of freshwater crustaceans. *Hydrobiologia* 320: 1-14.
- Gliwicz, Z. M (1990). Food thresholds and body size in cladocerans. *Nature* 343: 638-640.
- Gliwicz, Z. M. & W. Lampert (1993) Body-size related survival of cladocerans in a trophic gradient: an enclosure study. *Arch Hydrobiol.* 129, 1: 1-23.
- Gonzalez, M. & T. Frost (1996) Comparisons of laboratory bioassays and a whole-lake experiment: rotifer responses to experimental acidification. *Ecological applications* 4 (1) 69-80.
- Goulden, C.E, L. Henry, & A. Tessier (1982) Body size, energy reserves, and competitive ability in three species of cladocera. *Ecology* 63 (6) 1780-1789.
- Gurevitch J & S.T. Chester Jr. (1986) Analysis of repeated measures experiments. *Ecology* 67: 251-255.
- Hairston, N. G. Jr. (1996) Zooplankton egg banks as biotic reservoirs in changing environments. *Limnol. Oceanogr.* 41: 1087-1092.
- Hall, D. J. (1964) An experimental approach to the dynamics of a natural population of *Daphnia galeata mendotae*, *Ecology* Vol 45, N° 1: 94-112.
- Havas, M. & T. Hutchinson (1982). Aquatic invertebrates from the Smoking Hills, N.T.W.: effect of pH and metals on mortality. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 39: 890-903.
- Havens, K. E. (1993) Pelagic food web structure in Adirondack Mountain, USA, lakes of varying acidity. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 50: 149-155.
- Hebert, P. D. N. (1980) The genetics of Cladocera. *Evolution and Ecology of Zooplankton Community*. Ed. W. C. Kerfoot 329-336 pp.
- Horne, A. & C. Goldman (1994) *Limnology*. 2nd Edition. Mc Graw-Hill, Inc. 576 pp.
- Jakson, T. A. & T. Bistricki (1994) Selective scavenging of copper, zinc, lead and arsenic by iron and manganese oxyhydroxide coatings on plankton in lakes polluted with mine and smelter wastes: results of energy dispersive X-ray micro-analysis. *Journal of Geochemical Exploration*. Elsevier 97-125 pp.
- Keller, W. & N. D. Yan (1991) Recovery of crustacean zooplankton species richness in Sudbury Area Lakes following water quality improvements. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* Vol 48:1635-1644.
- Kersting, Kees (1984) Development and use of aquatic micro-ecosystem as a test system for toxic substances. *Int. Revue ges Hydrobiol.* 69:4 567-607 pp.
- Kerfoot, W. C.(1974) Egg-size cycle of cladoceran. *Ecology* 55: 1259-1270.
- Kerrison, P. H., D. Annoni, S. Zarini, O. Ravera & B. Moss (1988) Effects of low concentrations of heavy metals on plankton community dynamics in a small, shallow, fertile lake. *Journal of Plankton Research* Vol. 10 N°4 779-812 pp.
- Kimmerer, W. J. (1987) The theory of secondary production calculations for continuously reproducing populations. *Limnology and Oceanography* Vol 32, N°1:1-13.
- Kluttgen, B., N. Kuntz & H. T. Ratte (1996) Combined effects of 3,4-Dichloroaniline and food concentration on life-table data of two related cladocerans, *Daphnia magna* and

- Ceriodaphnia quadrangula*. Chemosphere, Vol. 32, N° 10: 2015-2028.
- Kubitz, J.A., E. C. Lewek, J. M. Besser, J. B Drake & J. P. Giesy (1995) Effects of copper-contaminated sediments on *Hyalella azteca*, *Daphnia magna* and *Ceriodaphnia dubia*: survival, growth and enzyme inhibition. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 29, 97-103.
- Lande, R. (1982) A quantitative genetic theory of life history evolution. Ecology 63: 607-615.
- Lampert, W. (1974) A method for determining food selection for zooplankton. Limnology & Oceanography Vol. 19 N° 6: 995-998.
- Lawton, J. H. (1994) What do species do in ecosystems? Oikos 71: 367-374.
- Locke, A. (1992) Factors influencing community structure along stress gradients: zooplankton responses to acidification. Ecology 73 (3) 903-909.
- Locke, A. & W. G. Sprules (1994) Effects of lake acidification and recovery on the stability of zooplankton food webs. Ecology 75 (2) 498-506.
- Luoma, S.N. (1996) Prediction of Metal Toxicity in Nature from Bioassays: Limitations and research needs. in Metal Speciation and Bioavailability in Aquatic Systems. André Tessier & D. Turner eds. John Wiley & Sons.
- Lynch, M. (1978) Complex interactions between natural coexploiters -*Daphnia* and *Ceriodaphnia*. Ecology 59 (3) 552-564.
- Lynch, M (1980) The evolution of cladoceran life histories. Quarterly Review of Biology 55: 23-41.
- Lynch, M. (1982) How well does the Edmondson-Paloheimo model approximate instantaneous birth rates? Ecology 63 (1): 12-18.
- Lynch, M. (1989) The life history consequences of resource depression in *Daphnia pulex*. Ecology 70 (1) 246-256.
- Lynch, M. (1992) The life history consequences of resource depression in *Ceriodaphnia quadrangula* and *Daphnia ambigua*. Ecology 73: 1620-1629.
- Martinez, G. (1996) Evaluación del modelo de competencia aparente mediada por generalista (CAMG). Tesis de Magister en Biología con mención en Ecología. Facultad de Ciencias. Universidad de Chile. 86 pp.
- Marshall, J.S. (1978) Population Dynamics of *Daphnia galeata mendotae* as modified by chronic cadmium stress. J. Fish. Res. Board Can. 35: 461-469.
- Niedelehner, B. R., K. W. Pontsch, J. R. Pratt & J. Cairns, Jr. (1990) Field evaluation of predictions of environmental effects from a multispecies-microcosm toxicity test. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 19: 62-71.
- Paggi, C. P. (1995) Crustacea Cladocera en Ecosistemas de Aguas Continentales. Metodologías para su estudio. Estela Lopretto y Guillermo Tell eds. Ediciones Sur. Buenos Aires, Argentina. 1401 pp.
- Peterson, B. J., J.E. Hobbie & J. F. Haney (1978) *Daphnia* grazing on natural bacteria. Limnol. Oceanogr. 23: 1039-1334.
- Pianka, E. (1982) Ecología Evolutiva. Ed. Omega. 365pp.
- Porter, K. G., Gerritsen J., Orcutt J. D. Jr. (1983) Functional response and fitness in a

- generalist filter feeder, *Daphnia magna* (Cladocera: Crustacea). Ecology 64: 735-742.
- Reynolds, G.L. & J. Hamilton-Taylor (1992) The role of planktonic algae in the cycling of Zn and Cu in a productive soft-water lake. Limnol. Oceanogr. 37:1759-1769.
- Robertson, A. P. & J. G. Leckie (1998) Acid/base, copper binding, and $\text{Cu}^{+2}/\text{H}^{+}$ exchange properties of goethite, an experimental and modeling study. Environ. Sci. Technol. 32: 2519-2530.
- Roch, M., R.Nordin, A. Austin, C.Mckean, J. Deniseger, R. Kathman, J. McCarter & M. Clark (1985) The effects of heavy metal contamination on the aquatic biota of Buttle Lake and the Campbell River Drainage (Canada). Arch. Environ. Contam. Toxicol. 14, 347-362.
- Ruiz, R. y N. Bahamonde (1989) Cladóceros y Copépodos límnicos en Chile y su Distribución Geográfica. Lista sistemática. Publicación Ocasional N° 45/1989. Museo Nacional de Historia Natural Santiago. Chile.
- Schalscha, B. & I. Ahumada (1998) Heavy metals in rivers and soils of Central Chile. Wat. Sci. Tech. 37,N° 8: 251-255.
- Schlenk, D. & T. Moore (1994) Effect of pH and time on the acute toxicity of copper sulfate to the ciliate protozoan *Tetrahymena thermophila*. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 53: 800-804.
- Sibly, R. M. & P. Calow (1986) Physiological Ecology of Animals. Blackwell Scientific Publications. 179 pp.
- Sigg, L. & H. Xue (1994) Metal Speciation: Concepts, analysis and effects. *in* Chemistry of Aquatic Systems: Local and Global Perspectives, 153-181 pp. G. Bidoglio & W. Stumm eds.
- Slobotkin, L. B. (1954) Population dynamics in *Daphnia obtusa* Kurz. Ecol. Monog. 24: 69-88.
- Sosnoswski, S.L., D. J. Germond & J. H. Gentile (1979) The effects of nutrition on the response of field populations of the calanoid copepod *Acartia tonsa* to copper. Water Research 13: 449-452.
- Sokal, R.R. & Rohlf, F. J. (1969). Biometría. Ed. Blume 832 pp.
- Soto, D. (1989) The relevance of reproductive characteristics of zooplankters to experimental studies in outdoor enclosures. Hydrobiologia 182: 35-47.
- Soto D. & L. Zúñiga (1991) Zooplankton assemblages of Chilean temperate lakes: a comparison with North American counterparts. Revista Chilena de Historia Natrural 64: 569-581.
- STATISTICA. Release 4.5. Statsoft, Inc (1993).
- Stearns, S.C. (1994) The Evolution of Life Histories. Oxford University Press. 243pp.
- Sterner, R, W., D.D. Hagemeyer, W. L. Smith & R. F. Smith (1993). Phytoplankton nutrient limitation and food quality for *Daphnia*. Limnol. Oceanogr. 38:857-871.
- Shi, B., H. E. Allen, M. T. Grassi & H. M. Huizhong (1998) Modeling copper partitioning in surface waters. Wat. Res. Vol 32. N° 12: 3756-3764.
- Shi, B., H. E. Allen & M. T. Grassi (1998) Changes in dissolved and particulate copper following mixing of potw effluents with Delaware river water. Wat. Res. Vol 32, N° 8:

2413-2421.

Sylva, R. N. (1975) The environment chemistry of copper (II) in aquatic systems. *Water Research* vol 10. 789-792 pp.

SYSTAT versión 5.05 para Windows (1990-1994). SPSS Inc.

Taylor, B. E. & M. Slatkin (1981) Estimating birth and death rates of zooplankton. *Limnology and Oceanography* 26:144-159.

Threlkeld, S. T. (1979) Estimating cladoceran birth rates: The importance of egg mortality and the egg age distribution. *Limnology and Oceanography* Vol 24, N° 4, 601-612 pp.

Vanni, M. J. (1986) Fish predation and zooplankton demography: Indirect effects. *Ecology* 67: 337-354.

Vanni, M. J. & Lampert, W. (1992) Food quality effects on life history traits and fitness in the generalist herbivore *Daphnia*. *Oecología* 92: 48-57.

Vila, I, M. Contreras & J. Pizarro (1997) Eutrophication and phytoplankton selective responses in a temperate reservoir. in *Internat. Verein.- Limnol.* 26: 798-802.

Wetzel, R. G. (1983) *Limnology*. 2°ed. CBS College Publishing. 767 pp.

Wiens, J. A. (1984) On understanding a non-equilibrium world: myth and reality in community patterns and processes *Ecological Communities. in Conceptual Issues and the Evidence*. Princeton University Press. 439-458 pp. D. R. Strong, D. Simberloff, L. Abele and A. B. Thistle Eds.

Wiens, J.A. (1990) Ecology 2000: an essay on future directions in ecology. *Revista Chilena de Historia Natural* 63: 309-315.

Whittaker, R. & D. Goodman (1979) Classifying species according to their demographic strategy I. Population fluctuations and environmental heterogeneity. *Am Nat.* Vol 113, N° 2:185-200.

Winner, R. & M. Farrell (1976) Acute and chronic toxicity of copper to four species of *Daphnia*. *J. Fish. Res. Board Can.* 33: 1685-1691.

Xue, H. & L. Sigg (1993) Free cupric ion concentration and Cu (II) speciation in a eutrophic lake. *Limnol. Oceanogr.* 38 (6)1200-1213.

Xue, H., D. Kistler & L. Sigg (1995 a) Competition of copper and zinc for strong ligands in a eutrophic lake. *Limnol. Oceanogr.* 40 (6) 1142-1152.

Xue, H., A. Oestreich, D. Kistler & L. Sigg (1995 b) What forms of copper are there in different lakes and rivers? *EAWAG NEWS* 39 E, 13-16.

Zou, E. & S. Bu (1994) Acute toxicity of copper, cadmium and zinc to the water flea, *Moina irrasa* (Cladocera). *Bul.52 Il. Environ. Contam. Toxicol.* 52: 742-748.

Zúñiga, L. R. & J. Araya (1982) Estructura y distribución, durante un período otoñal, del zooplancton en el Embalse Rapel. *An. Mus. Hist. Nat. Valparaíso. Chile.* Vol 15, 45-57.