

UCH-FC
B. ambiental
R457
C.1



FACULTAD DE CIENCIAS

UNIVERSIDAD DE CHILE

**INTERACCIÓN ENTRE DISPONIBILIDAD DE RECURSO Y
EXPOSICIÓN A DELTAMETRINA: EFECTOS EN EL DESEMPEÑO
BIOLÓGICO DE *DAPHNIA MAGNA***

Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los
requisitos para optar al Título de Biólogo con mención en Medio Ambiente

por

Claudio Andrés Reyes Reyes

Director de Seminario de Título: Dr. Rodrigo Ramos Jiliberto

Octubre, 2011

Santiago - Chile

ESCUELA DE PREGRADO – FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE



INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, de la Universidad de Chile que el Seminario de Título, presentado por

CLAUDIO ANDRÉS REYES REYES

Ha sido aprobado por la Comisión de Evaluación, en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Biólogo Ambiental.

Dr. Rodrigo Ramos Jiliberto.
Director Seminario de Título

A blue ink signature consisting of a stylized 'R' followed by a horizontal line and a wavy line below it.

Comisión de Evaluación

Dr. Ramiro Bustamante
Presidente Comisión

A complex blue ink signature with many overlapping loops and a horizontal line underneath.

Dr. Carlos Valdovinos
Evaluador

A blue ink signature consisting of a horizontal line with a wavy line underneath it.



Santiago de Chile, octubre de 2011

DEDICATORIA



*A mi Madre
quien simplemente ha dado su vida por mí*

*A mi abuela Susana,
gran parte de lo que soy te lo debo.
siempre te recordaré.*

*A mis Tíos Amelia y Raúl
que de una u otra forma me apoyaron*

Romper con las raíces sería derribar el árbol

Los amo.

AGRADECIMIENTOS

A mi tutor Rodrigo Ramos Jiliberto por darme la oportunidad de trabajar en su laboratorio, por su paciencia y disposición en todo momento.

Agradezco también a Ramiro Bustamante y Carlos Valdovinos por sus correcciones y comentarios.

A mi familia en especial a mi madre y mi abuela que me enseñaron a dar grandes pasos a base de cientos pequeños y a dar siempre el máximo esfuerzo. A mis tíos Amelia y Raúl que me han dado en gusto como sobrino único.

Agradezco a mis amigos de toda la vida, Mauricio Olivares, Christopher, Camilo, entre otros del barrio. A los que fueron apareciendo durante el camino, Víctor Gutiérrez, Cristóbal Narváez, Pablo galleta Muñoz, Cecilia Baeza, Nicolás Gómez y todos quienes vivieron el período de pregrado conmigo y aún seguimos compartiendo momentos agradables, anécdotas y las infaltables pichangas. A todos ustedes gracias por ayudarme a mantener el espíritu vivo.

A mis colegas y amigos del laboratorio de Biodiversidad del CENMA, con quienes prácticamente he compartido el día a día este último año. A Mauricio Fernández quien me ayudó logísticamente en mis experimentos y por ser una buena persona a pesar de su carácter sulfúrico. A Inger Heine gracias por sus masajes, por compartir sus almuerzos

conmigo y por encontrar siempre la excusa para pelear. A Leslie Garay por sus consejos, por aguantar y corregir incansablemente mi vocabulario poco pulcro durante las horas de relajo. A Javier Gonzáles (Gemelo) quien siempre estuvo dispuesto a resolver mis dudas académicas, por todos los momentos de carcajadas y conversaciones que hemos compartido en aquél escritorio. A Pasquinell Urbani por cooperar con pensamientos sin filtro y por tener en común lo extravagante (bizarro).

Cada uno tuvo su labor en el barco. Agradezco al tiempo y al lugar que nos encontró aquí navegando. No fue sólo el quién, sino también, el dónde y el cuándo....

BIOGRAFÍA



Claudio nace el 23 de Octubre de 1986, desde la infancia hasta la época ha vivido en un tranquilo barrio de Estación central. A temprana edad mostró interés y aptitudes por la ciencia realizando los llamados “*inventos*” con cuanto artefacto eléctrico en desuso encontraba en su patio. Ya en su adolescencia ingresó al Instituto Nacional lugar que marcó su personalidad e intereses por la ciencia, podría decirse que para siempre. En ese lugar también desarrollo habilidades deportivas que hasta la actualidad conserva, especialmente las relacionadas con el futbol. Ya en la Universidad de Chile, estudiando Biología Ambiental, tuvo altos y bajos académicamente hablando, momento en que se da cuenta que aún faltaba mucho trayecto. Pero gracias a su esfuerzo, dedicación y constancia logró pavimentar el camino. Ya prácticamente en el epilogo de su carrera se interesa por la ecotoxicología e ingresa al Centro Nacional del medioambiente, lugar donde conoce a su actual tutor Rodrigo Ramos y a sus colegas.

Claudio, a pesar de ser tener un aspecto serio y un tanto apático esta rodeado de muchas amigos, los cuales tras largas horas de autopsia han logrado darse cuenta que es una buena persona, humilde y leal, caracterizada principalmente por sus pocas palabras.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

ÍNDICE DE TABLAS.....	iv
ÍNDICE DE FIGURAS.....	v
RESUMEN.....	vi
ABSTRACT.....	vii
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Organismos de estudio	1
1.2. Factores ambientales que afectan al zooplancton	2
1.2.1. Factores de origen natural.....	2
1.2.2. Factores de origen antrópico: contaminantes.....	3
1.3 El problema.....	4
OBJETIVOS.....	6
2. MATERIALES Y METODOS	7
2.1. Cultivo de algas.....	7
2.2. Cultivos de Daphnia magna.....	7
2.2.1. Organismos Stock.....	7
2.2.2. Organismos Experimentales	8
2.3. Stock de Deltametrina y soluciones experimentales.....	9
2.4. Ensayo de toxicidad aguda para Deltametrina.....	10
2.5. Diseño del experimento principal.....	10
2.6. Evaluación de rasgos de Historia de vida	14
2.6.1. Estimación de reservas lipídicas	15

2.7. Tasa instantánea de crecimiento poblacional (r).....	16
2.8. Análisis estadístico.....	17
2.8.1. Ensayo de toxicidad aguda.....	17
2.8.2. Experimento principal.....	17
3. RESULTADOS	19
3.1. Ensayo de toxicidad aguda para Deltametrina.....	19
3.2. Rasgos fisiológicos y de historia de vida con alimento constante	19
3.3. Rasgos fisiológicos y de historia de vida con alimento variable	25
3.4. Tasa instantánea de crecimiento poblacional (r).....	29
4. DISCUSIÓN	30
4.1. Síntesis de resultados.....	44
4.2. Rasgos fisiológicos y de historia de vida con alimento constante	31
4.3. Rasgos fisiológicos y de historia de vida con alimento variable	36
4.4. Implicaciones ecológicas	39
5. CONCLUSIONES	41
5.1. Conclusiones generales.....	41
5.2. Direcciones futuras	42
6. REFERENCIAS	44
7. APÉNDICE	56

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Resultados de ANOVA de dos vías por aleatorizaciones para evaluar el efecto de la densidad (constante) de recurso (R) y la concentración de Deltametrina (D) sobre la sobrevivencia	21
Tabla 2. Resultados de ANOVA de dos vías por aleatorizaciones para evaluar el efecto de la densidad (constante) de recurso (R) y la concentración de Deltametrina (D) sobre parámetros de tamaño corporal.....	22
Tabla 3. Resultados de ANOVA de dos vías por aleatorizaciones para evaluar el efecto de la densidad (constante) de recurso (R) y la concentración de Deltametrina (D) sobre lípidos totales acumulados.....	23
Tabla 4. Resultados de ANOVA de dos vías por aleatorizaciones para evaluar el efecto de la densidad (constante) de recurso (R) y la concentración de Deltametrina (D) sobre los lípidos máximos acumulados.....	24

Tabla 5. Resultados de ANOVA de dos vías por aleatorizaciones para evaluar el efecto de la densidad (constante) de recurso (R) y la concentración de Deltametrina (D) sobre el decaimiento en la concentración de lípidos..... 25

Tabla 6. Resultados de ANOVA de dos vías por aleatorizaciones para evaluar el efecto de la concentración de Deltametrina (D) y la edad de exposición (E) sobre la sobrevivencia de individuos de *D. magna* sometidos a densidades variables (descendientes) de recurso..... 26

Tabla 7. Resultados de ANOVA de dos vías por aleatorizaciones para evaluar el efecto de la concentración de Deltametrina (D) y la edad de exposición (E) sobre los parámetros de tamaño corporal en individuos de *D. magna* sometidos a densidades variables (descendientes) de recurso..... 27

Tabla 8. Resultados de ANOVA de dos vías por aleatorizaciones para evaluar el efecto de la concentración de Deltametrina (D) y la edad de exposición (E) sobre los lípidos totales acumulados en individuos de *D. magna* sometidos a densidades variables (descendientes) de recurso..... 27

Tabla 9. Resultados de ANOVA de dos vías por aleatorizaciones para evaluar el efecto de la concentración de Deltametrina (D) y la edad de exposición (E) sobre los lípidos máximos acumulados en individuos de *D. magna* sometidos a densidades variables (descendentes) de recurso..... 28

Tabla 10. Resultados de ANOVA de dos vías por aleatorizaciones para evaluar el efecto de la concentración de Deltametrina (D) y la edad de exposición (E) sobre el decaimiento en la concentración de lípidos en individuos de *D. magna* sometidos a densidades variables (descendentes)de recurso..... 29

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema simplificado que representa la obtención de individuos experimentales.....	9
Figura 2. Diseño experimental para evaluar la interacción entre disponibilidad de recurso constante y exposición a Deltametrina en <i>Daphnia</i>	12
Figura 3. Diseño experimental para evaluar la interacción entre deltametrina y la edad de los organismos de <i>D. magna</i> expuestos bajo condiciones de recurso descendente.....	13
Figura 4. Estimación, mediante análisis de imágenes, de las áreas corporal y lipídica de <i>Daphnia</i>	16
Figura 5. Resumen de efecto de la exposición a deltametrina sobre rasgos fisiológicos y de historia de vida en individuos de <i>D. magna</i> sometidos a regimenes constantes de recurso.....	20
Figura 6. Resumen de efecto de la exposición a deltametrina sobre rasgos fisiológicos y de historia de vida en individuos de <i>D. magna</i> sometidos a regimenes variables (descendientes) de recurso.....	26

Figura 7A: Supervivencia y tamaño corporal de individuos de <i>D. magna</i> expuestos a deltametrina y sometidos a densidades constantes de recurso.....	56
Figura 8A: Supervivencia y tamaño corporal de individuos de <i>D. magna</i> expuestos a deltametrina y sometidos a densidades variables (descendientes) de recurso.....	57
Figura 9A: Reservas lipídicas en individuos de <i>D. magna</i> expuestos a deltametrina y sometidos a densidades constantes de recurso.....	58
Figura 10A: Reservas lipídicas en individuos de <i>D. magna</i> expuestos a deltametrina y sometidos a densidades variables (descendientes) de recurso.....	59
Figura 11A: Edad a la primera reproducción y tamaño primera camada de individuos de <i>D. magna</i>	60

RESUMEN

Los organismos acuáticos están continuamente expuestos a una combinación de factores ambientales de distintos orígenes que afectan su adecuación biológica. Sin embargo se dispone de un entendimiento limitado acerca de la interacción entre estos factores, por lo que la proyección de sus consecuencias es a menudo débil. Se ha descrito que el zooplankton suele vivir en condiciones de recurso drásticamente variables y su éxito reproductivo está asociado a la disponibilidad ambiental de éste. Las variaciones temporales del recurso alimenticio pueden influir en las capacidades de los organismos para enfrentar diversos tipos de estrés. Bajo este escenario, es esperable que exista interacción entre el efecto de este tipo de variación natural y el efecto nocivo de un contaminante sobre la adecuación biológica de los organismos. En este trabajo se estudió la interacción entre la disponibilidad de recurso como factor ambiental y la exposición a deltametrina como factor antrópico, sobre atributos del desempeño biológico de organismos de *Daphnia magna*. Además, se estimó la condición alimenticia y fisiológica general de los individuos mediante la acumulación y consumo de reservas lipídicas. Los resultados revelaron que la disponibilidad de recurso y la exposición a deltametrina fueron factores que afectaron la expresión de los rasgos fisiológicos y de historia de vida. Sin embargo, su interacción fue significativa para algunos de los rasgos evaluados. En general, los efectos negativos de la baja disponibilidad de recurso se reflejaron en la capacidad de los individuos para enfrentar el estrés producido por deltametrina, comprometiendo su sobrevivencia, acumulación de reservas lipídicas, crecimiento y reproducción. Por otro lado, los efectos negativos más relevantes de la exposición a

deltametrina se observaron a densidades bajas de recurso y su magnitud tuvo relación con la edad a la cual los individuos fueron expuestos.

ABSTRACT

Aquatic organisms are continuously and simultaneously exposed to several environmental factors of different origin that affect their fitness. However there is a limited understanding about the interaction among these factors, and thus the projection of its consequences is often weak. It has been reported that zooplankton organisms usually face highly variable resource conditions and their reproductive success is associated to this environmental availability. Temporal variations of food resources may influence the organisms' ability to tolerate several types of stressors. Under this scenario, it is expectable that an interaction exists between the effect of this kind of natural variation and the harmful effect of pollutants on the fitness of the organisms. In this work we studied the interaction between resource availability and deltamethrin exposure on fitness-related traits of *Daphnia magna*. In addition, we assessed the physiological and nutritional status of individuals through the accumulation and consumption of stored lipids. The results revealed that resource availability and deltamethrin exposure were factors that affected the expression of physiological and life history traits. However, their interaction was significant for some of the evaluated traits. In general, the negative effects of low resource availability affected the ability of individuals to cope with the stress exerted by deltamethrin, trading off their survival, lipid storage, growth and reproduction. On the other hand, the most relevant negative effects of exposure to deltamethrin were observed under low resource densities and their magnitude was related to the age at which individuals were exposed.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Organismos de estudio

Dentro del zooplancton de aguas dulces, los cladóceros y especialmente los pertenecientes al género *Daphnia*, juegan un rol esencial en la transferencia de materia y energía desde la producción primaria (fitoplancton) hacia niveles superiores dentro de las redes tróficas acuáticas, debido a que son herbívoros altamente efectivos y una importante fuente de alimento para peces e invertebrados planctívoros.

El uso recurrente de *Daphnia* en estudios experimentales se explica por su fácil mantenimiento y manipulación en laboratorio, además de permitir diseños experimentales controlados gracias a su ciclo de vida partenogenético y de corta duración. Esta cualidad reproductiva confiere una escasa variabilidad genética dentro de una línea clonal, lo que permite la utilización de múltiples réplicas y facilita la evaluación de efectos de factores ambientales sobre el desempeño de estos organismos (Baird et al. 1988). Por otro lado, los individuos del género *Daphnia* presentan una sensibilidad relativamente alta a la exposición a contaminantes, lo que hace apropiado su uso en la evaluación de efectos ecotoxicológicos (Hanazato, 2001).

1.2. Factores ambientales que afectan al zooplancton

1.2.1. Factores de origen natural

El zooplancton está continuamente expuesto a factores ambientales ampliamente variables. La temperatura suele ser uno de los factores abióticos naturales de mayor importancia para estos organismos, debido a que afecta sus procesos metabólicos, promoviendo cambios en su crecimiento, desarrollo y maduración (Reichwaldt et al., 2004). Otro factor abiótico altamente variable es la salinidad, la cual provoca cambios fisiológicos, especialmente en aquellos organismos que no toleran condiciones de alta salinidad, deprimiendo su regulación osmótica y el balance iónico (Aladin & Potts, 1995).

Dentro de los factores bióticos a los que está sometido el zooplancton, la depredación y la disponibilidad de recurso tienen especial relevancia ecológica. El zooplancton es el principal recurso de niveles tróficos superiores como peces o depredadores invertebrados (Hanazato & Yazuno, 1989; Moss, 1998; Fulford et al., 2006). Esta presión induce cambios a nivel de rasgos individuales, atribuibles a efectos no-letales de la depredación, así como cambios a nivel de la estructura de poblaciones y ensamblajes de presas debido a efectos letales de la depredación (Zaret, 1980; Larsson & Dodson, 1993). Por otro lado, la disponibilidad de recursos es un factor que afecta directamente el presupuesto energético y condición fisiológica general de los organismos, a la vez que determina la ocurrencia y magnitud de interacciones competitivas dentro de una especie y entre diferentes especies.

1.2.2. Factores de origen antrópico: contaminantes

Un factor ambiental que puede afectar severamente el desempeño del zooplancton son los contaminantes. Se ha descrito extensamente que los ambientes acuáticos de aguas superficiales están constantemente sometidos al efecto de una serie de compuestos químicos como pesticidas y herbicidas principalmente provenientes de la agricultura, diseñados exclusivamente para matar a los organismos objetivo. Sin embargo, debido a procesos de percolación, lixiviación y drenaje (Cerejeira et al., 2003) o por descargas directas de desechos industriales (Roberts, 2008), estos contaminantes pueden ingresar a los ambientes acuáticos posicionando a los organismos de estos ecosistemas como objetivo indirecto de su aplicación, especialmente aquellos de sensibilidad elevada como el zooplancton. Los contaminantes pueden afectar directamente la sobrevivencia de los organismos. Sin embargo, en bajas dosis los contaminantes afectan su integridad fisiológica, disminuyendo los recursos disponibles para crecimiento y reproducción debido a la alta demanda asociada a mecanismos de detoxificación y reparación (Calow & Sibly, 1990; De Coen & Janssen, 2003).

El uso de Piretroides para el control de plagas de insectos en la agricultura y en ambientes urbanos se ha extendido ampliamente durante las últimas décadas, llegando incluso a reemplazar a los populares insecticidas organofosforados. Esta tendencia se debe al poder neurotóxico de los Piretroides (Shafer et al., 2005) y a su naturaleza hidrofóbica, que permite la adsorción en fases sólidas. Los estudios han demostrado que estos compuestos pueden ingresar a cuerpos de aguas superficiales a través de escorrentías o erosión (Laskowski, 2002; Weston et al., 2005). A pesar de estar

sujetos a diversos mecanismos de degradación como fotodegradación (Fernández-Álvarez et al., 2007) o hidrólisis (Maguire et al., 1985), los Piretroides presentan una elevada toxicidad aguda para organismos acuáticos, especialmente crustáceos, alcanzando valores de LC50 de 1 µg/L o menores en ensayos de laboratorio (Anderson, 1989; Mokry & Hoagland, 1990). Por lo tanto, debido a su elevada toxicidad y su creciente uso a nivel global y local, parece relevante comprender la significancia ecológica de esta clase de contaminantes en cuerpos de aguas superficiales.

Deltametrina es un tipo de piretroide sintético reportado por primera vez en 1974 (Elliott et al., 1974), y utilizado ampliamente en el tratamiento de infección por ectoparásitos en la salmonicultura. Este piretroide se caracteriza por su alta toxicidad aguda para crustáceos como *Daphnia*, pero además por ejercer efectos subletales a concentraciones extremadamente bajas, iguales o inferiores a 0,05 µg/L (Beketov, 2004; Ratushnyak et al., 2005)

1.3. El problema

Durante muchas décadas la evaluación del riesgo de contaminantes para la biota se ha llevado a cabo en condiciones experimentales controladas, donde todos los factores no focales son mantenidos en niveles constantes y cercanos al óptimo, para el desempeño de los organismos de prueba. Esto permite aislar los efectos del contaminante en cuestión. Sin embargo, en ambientes naturales los organismos rara vez experimentan condiciones óptimas en forma constante. Por el contrario, durante su ciclo de vida están forzados a enfrentar escenarios ambientales altamente variables y subóptimos. El

impacto de los contaminantes puede interactuar con diversos factores naturales de estrés (Heugens et al., 2001), produciéndose efectos mayores o menores a los esperados para su acción individual en condiciones controladas. En particular, en ambientes acuáticos se ha descrito que el zooplancton suele vivir bajo una disponibilidad de recurso drásticamente variable (McCauley et al., 1990). Esta condición fluctuante del recurso se manifiesta a distintas escalas de tiempo; desde horarias, asociadas a las migraciones verticales del zooplancton (Hutchinson, 1967; Haney, 1988), semanal y mensual según las sucesiones estacionales del fitoplancton (Sommer, 1989) influenciadas por la variación de nutrientes, temperatura y luz, hasta una escala interanual producto del cambio global (Edwards et al., 2002). Esta inestabilidad temporal puede influir en las capacidades de los organismos para enfrentar cualquier tipo de estrés, haciéndolos más vulnerables en condiciones alimenticias desfavorables y más exitosos en condiciones favorables (Smolders et al., 2005) Además se ha descrito que el zooplancton, en particular los cladóceros puede adaptar su estrategia reproductiva según la disponibilidad de recurso (Threlkeld, 1987). Bajo este escenario, es esperable que exista interacción entre el efecto de esta variación ambiental y el efecto nocivo de un contaminante sobre la adecuación biológica de los organismos expuestos. En este trabajo se pretende evaluar si la variación de recurso trófico altera el efecto de la exposición a Deltametrina sobre el desempeño biológico de *Daphnia magna* como organismo modelo.

OBJETIVO GENERAL

- Evaluar el efecto de la disponibilidad de recurso, la exposición a contaminantes y su posible interacción sobre el desempeño biológico de organismos acuáticos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Evaluar experimentalmente los efectos del pesticida deltametrina y del nivel de recurso (constante) sobre atributos fisiológicos y de historia de vida de organismos de *D. magna*.
- Evaluar experimentalmente los efectos del pesticida deltametrina y la edad de los organismos expuestos, sobre atributos fisiológicos y de historia de vida en *D. magna*, en condiciones de recurso variable (descendente).

2. MATERIALES Y METODOS

2.1. Cultivo de algas

La microalga verde *Pseudokirchneriella subcapitata* (ex *Selenastrum capricornutum*) fue utilizada como fuente de alimento para *Daphnia* durante su mantenimiento en cultivos y los experimentos. El alga fue cultivada en laboratorio, en balones de vidrio de 2L con medio MBL (Stemberger, 1981). El cultivo fue mantenido a $20 \pm 1^\circ\text{C}$, con un fotoperiodo 16:8 (Luz:oscuridad) y aireado constantemente a través de un filtro de 0.2 μm . A partir de un centrifugado a 3500 r.p.m durante 20 minutos se obtuvo un concentrado de algas que se mantuvo bajo refrigeración ($5 \pm 1^\circ\text{C}$) previo a su dilución y utilización como alimento.

2.2. Cultivos de *Daphnia magna*

2.2.1. Organismos Stock

Individuos de un único clon de *Daphnia magna* fueron mantenidos en recipientes de vidrio de 400 mL con aproximadamente 15 individuos adultos por cada uno. Cada dos semanas el cultivo fue renovado a partir de juveniles (> 72 horas). El medio estaba compuesto por agua dura reconstituida ASTM (American Society for Testing and Materials, 1980), una suspensión del alga *P. subcapitata* a una densidad de 10^6 cel / mL

y enriquecido con 2.5 mL/L de suplemento nutricional (Hayashi et al., 2008), compuesto de extracto de algas (Phyllum by ANASAC, Lampa, Chile). El medio fue renovado cada 2 días para mantener las condiciones de oxigenación y los niveles de alimento. La temperatura fue mantenida a $20 \pm 1^\circ\text{C}$ y el pH ajustado a 7.8 ± 0.1 , con un fotoperíodo de 16:8 (Luz:oscuridad)

2.2.2. Organismos Experimentales

Para cada ensayo, desde el cultivo *stock* se extrajeron hembras juveniles (F0), de las cuales se tomaron al azar hembras recién nacidas (< 24 horas) desde su segunda camada (F1). Posteriormente, de la segunda camada de estas últimas se tomaron aleatoriamente los individuos neonatos (F2) necesarios para el experimento. Cada individuo fue dispuesto individualmente en un vaso de 50 mL con 40 mL de medio y alimentado con una suspensión del alga *P. subcapitata* a una densidad de 10^6 cel/mL. La temperatura fue mantenida en un baño termorregulado a $24 \pm 1^\circ\text{C}$, el pH ajustado a 7.8 ± 0.1 , con un fotoperíodo 16:8 (luz:oscuridad). El esquema de la Figura 1 resume el procedimiento de obtención de individuos.

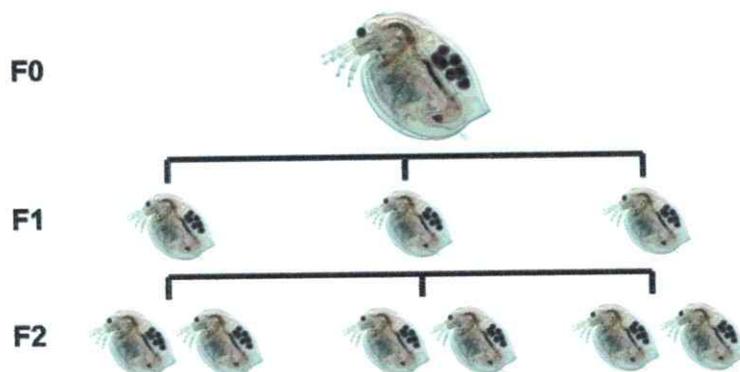


Figura 1: Esquema simplificado que representa la obtención de individuos para los experimentos. Los organismos son escogidos aleatoriamente de la segunda camada de la generación anterior.

2.3. Stock de Deltametrina y soluciones experimentales

Una solución *stock* de Deltametrina fue preparada disolviendo 10 mg del compuesto en 1L de Acetona, obteniendo una concentración de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Esta fue refrigerada a $5 \pm 1^\circ\text{C}$ y mantenida en oscuridad.

Para cada experimento, se preparó una solución acuosa de Deltametrina según lo descrito por Medina *et al.* (2002): se agregó 500 μL de la solución *stock* a una botella de vidrio. Se dejó evaporar el solvente a temperatura ambiente, esperando la aparición de un residuo cristalino en el fondo. La botella fue rellena con 500 mL de agua dura reconstituida ASTM y mezclada durante 2 días a $9 \pm 1^\circ\text{C}$ en un agitador orbital (140 r.p.m) en oscuridad.

2.4. Ensayo de toxicidad aguda para Deltametrina

Para estimar la concentración subletal de Deltametrina a utilizar en el experimento central, se determinó la EC_{50} para el clon, evaluando el efecto inhibitorio del contaminante sobre la movilidad de neonatos (< 24 horas) de *D. magna*. El ensayo fue realizado de acuerdo a lo descrito por la OECD (Organization for Economic Cooperation and Development, 2004), donde los neonatos fueron expuestos durante un periodo de 48 horas al contaminante de ensayo en un rango de concentraciones en progresión geométrica, a concentraciones nominales de 0, 0.05, 0.1, 0.4, 0.8 $\mu\text{g/L}$ de Deltametrina. La inmovilización fue registrada a las 24 y 48 hrs. Se incluyó un grupo control, con el cual comparar los resultados de la exposición.

Para cada tratamiento fueron dispuestos veinte individuos en grupos de cinco, en vasos de 50 mL con 40 mL de solución de agua dura reconstituida y el contaminante de ensayo. La temperatura se mantuvo constante a $20 \pm 1^\circ\text{C}$ y el fotoperíodo fue de 16:8 (luz:oscuridad) Los individuos fueron alimentados durante el ensayo, con 10^6 cel/mL de *P. subcapitata*.

2.5. Diseño del experimento principal

Con el fin de evaluar la interacción entre la disponibilidad de recurso y la exposición a Deltametrina sobre el desempeño biológico de *D. magna* se utilizó un diseño que contempló dos niveles de densidad de *P. subcapitata* como recurso: Máximo (*Max*: 10^6 cel/mL) y Mínimo (*Min*: 10^4 cel/mL), los que permitieron 3 regímenes alimenticios,

designados como alto (*A*), bajo (*B*) y descendente (*D*). Se realizaron dos experimentos, en primera instancia bajo niveles constantes de recurso y luego un segundo experimento bajo niveles descendentes. Cada experimento tuvo una duración de 7 días y consideró dos niveles de exposición a Deltametrina: con (+) y sin (-). La exposición al químico consistió en un pulso de 24 h de duración.

2.5.1. Niveles constantes de recurso

Dentro de los regímenes constantes de recurso (*A* y *B*), se designaron los tratamientos de exposición $A0^+$, $A1^+$ y $A2^+$, para la densidad alta de recurso y $B0^+$, $B1^+$ y $B2^+$, para la densidad baja de recurso. Para cada serie la Deltametrina fue aplicada los días 0, 1 y 2, respectivamente (Figura 2). Por otro lado, los tratamientos A^- y B^- representaron alto y bajo recurso sin exposición a deltametrina (Figura 2).

2.5.2. Niveles descendentes de recurso

Para el régimen descendente de recurso (*D*), la disminución de la densidad de algas (del máximo al mínimo) se ejecutó después de 24 h de la exposición a Deltametrina, que mantuvo los tiempos descritos para el experimento anterior. Así, el régimen *D* estuvo formado por los tratamientos $D0^+$, $D1^+$ y $D2^+$, sometidos a variación en recurso y exposición al químico (Figura 3a) y los tratamientos $D0^-$, $D1^-$ y $D2^-$, sometidos sólo a la variación temporal en la disponibilidad de recurso (Figura 3b).

Cada tratamiento incluyó 5 réplicas y cada unidad experimental consistió de 4 neonatos (< 24 h) de *D. magna* en un vaso de 50 mL con 40 mL de medio.

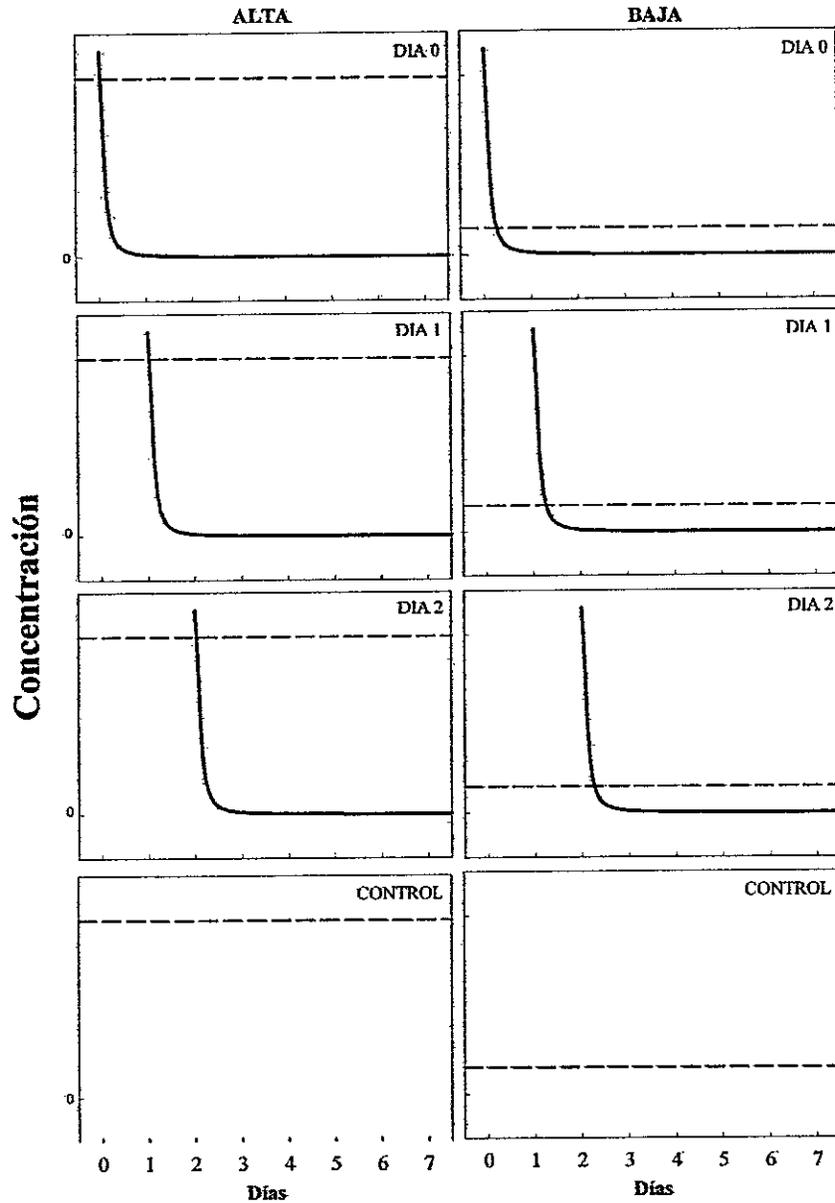


Figura 2: Diseño experimental para evaluar el efecto de la disponibilidad de recurso (constante) y la exposición a Deltametrina en *Daphnia*. Las líneas discontinuas (---) indican la densidad del recurso *P. subcapitata* a lo largo del experimento. Las líneas continuas (—) indican la aplicación y duración del pulso de Deltametrina.

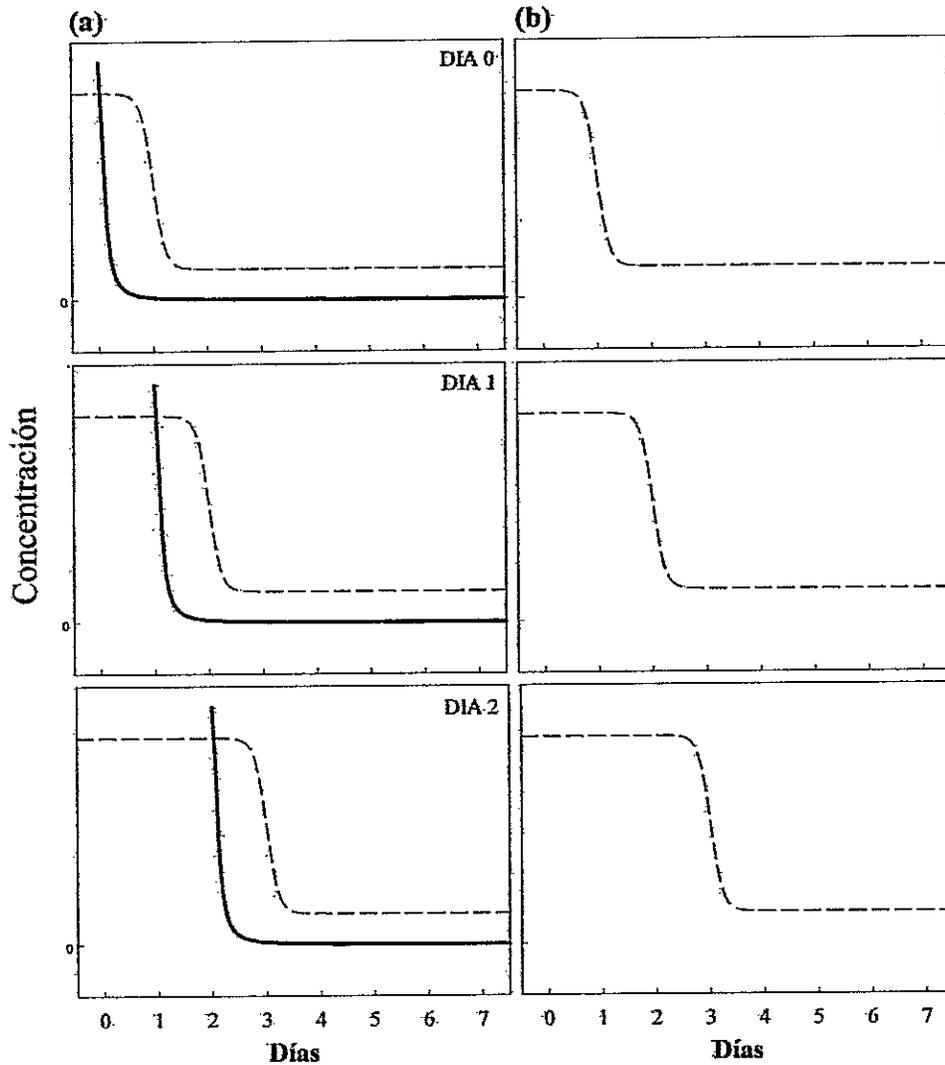


Figura 3: Diseño experimental para evaluar el efecto de la exposición a deltametrina y la edad de los organismos expuestos de *D. magna*, bajo condiciones de recurso variable. (a) Tratamientos sometidos a ambos factores y (b) tratamientos sometidos sólo al descenso de disponibilidad de recurso. Las líneas discontinuas (---) indican la densidad del recurso *P. subcapitata* a lo largo del experimento y las líneas continuas (—) indican la aplicación y duración del pulso de Deltametrina..

2.6. Evaluación de rasgos de Historia de vida

Cada unidad experimental fue examinada diariamente para determinar la sobrevivencia, tamaño corporal, número de mudas, edad a la primera reproducción, tamaño a la primera reproducción y fertilidad de los individuos.

Para medir el tamaño corporal de cada individuo, se tomaron diariamente imágenes digitales a través de una cámara acoplada a un microscopio binocular Leica S8apo. La medición consideró la distancia entre el extremo superior de la cabeza y la base de la espina caudal. Las imágenes fueron analizadas través del programa computacional Biopix IQ 2.0 (BioPix. AB, Gothenburg, Suecia). El tamaño corporal a través del tiempo fue ajustado para cada unidad experimental al siguiente modelo sigmoideo utilizando el programa Sigmaplot 10.0 (Systat, 2006):

$$L(t) = \left(\frac{L_{\max} - L_{\min}}{1 + (t/t_{50})^a} \right) + L_{\min}$$

Donde $L(t)$ = tamaño corporal al tiempo t , L_{\max} = tamaño corporal máximo, L_{\min} = tamaño corporal inicial, t_{50} = tiempo al cual la mitad del tamaño máximo es alcanzado, y a = pendiente de la curva de ajuste.

2.6.1. Estimación de reservas lipídicas

Los lípidos de almacenamiento en cladóceros corresponden principalmente a triacilglicéridos (Farkas, 1970; Goulden & Hornig, 1980) de una coloración anaranjada y se encuentran dispersos en gotas esféricas dispuestas lateral y ventralmente a la cavidad intestinal (Goulden & Henry, 1984), lo que hace fácil su identificación permitiendo evaluar la historia alimenticia reciente del zooplancton.

La cantidad de lípidos de reserva de cada individuo fueron evaluadas diariamente a través del análisis de imágenes digitales, utilizando el programa Biopix IQ 2.0, en el cual se separó el color de las esferas de lípidos presentes alrededor del intestino de los individuos. El contenido lipídico se expresó como la razón entre el área total de estas esferas y el área corporal de los individuos. La Figura 4 ilustra el tratamiento de imágenes utilizado para la medición. Una vez estimada la curva de acumulación de reservas para cada día, se determinó: (a) La cantidad total de reservas lipídicas acumuladas en el tiempo, estimada a partir del área bajo la curva entre los días 0-5 (inicio del experimento y aparición de huevos en la cámara de crías, respectivamente), mediante una aproximación geométrica, (b) la cantidad máxima de reservas lipídicas acumuladas en un instante, dentro del período señalado anteriormente. A partir del máximo se determinó: (c) el tiempo en que los individuos tardaron en consumir el 50% (ET_{50}), utilizando una interpolación lineal de los datos.

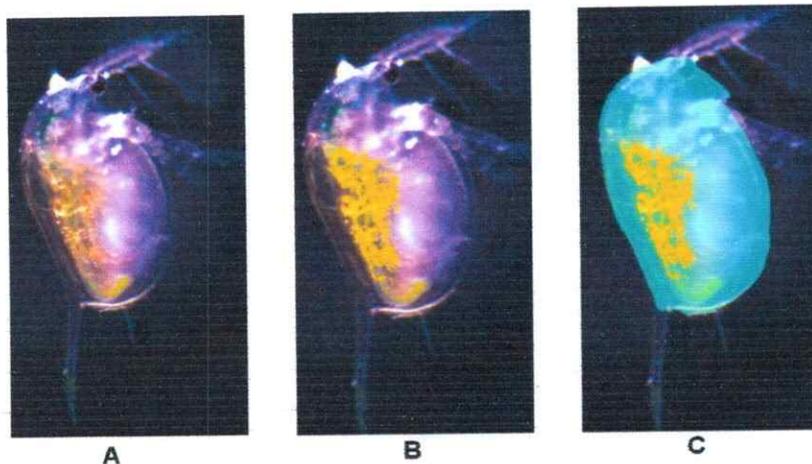


Figura 4: Estimación, mediante análisis de imágenes, de las áreas corporal y lipídica de *Daphnia*. Las imágenes corresponden a: (A) original. (B) Selección de lípidos de reserva (Amarillo). (C) Selección de lípidos (amarillo) y área corporal (Celeste). El aumento utilizado fue de 40x.

2.7. Tasa instantánea de crecimiento poblacional (r)

Se construyó una tabla de vida a partir de los datos de sobrevivencia y fecundidad específicos por edad para los individuos ($n = 4$) dentro de las réplicas de cada tratamiento. A partir de los datos de las tablas de vida obtenidos, se calculó r por medio de:

$$R_0 = \sum l_x m_x$$

$$T_c = \sum (x l_x m_x) / R_0$$

$$r = \log_e (R_0 / T_c)$$

Donde R_0 = tasa de reproducción básica, x = edad en días, l_x = sobrevivencia a la edad x , m_x = número promedio de crías por hembra de edad x y T_c = tiempo generacional.

2.8. Análisis estadístico

2.8.1. Ensayo de toxicidad aguda

En este ensayo, el valor de EC_{50} para 24 fue calculado mediante análisis probit utilizando el Método de Sperman-Karber (Hamilton et al., 1977) con el programa estadístico Probit (US EPA, 1988).

2.8.2 Experimento principal

La magnitud de los efectos de deltametrina sobre cada rasgo de historia de vida (R) se estimaron a partir del promedio de cada replica y su control utilizando la siguiente ecuación:

$$E_R \pm \delta Q = R_T \pm (\delta q_T) - R_0 \pm (\delta q_0),$$

donde E_R es la magnitud media del efecto de Deltametrina sobre el rasgo, R_T el valor medio del rasgo estimado en cada tratamiento, R_0 el valor medio del rasgo en el control y δq_i sus respectivos errores. El valor del error del efecto (δQ) fue calculado mediante propagación del error de acuerdo a:

$$\delta Q = \sqrt{(\delta q_T)^2 + (\delta q_0)^2}$$

Cada valor de error δq_i fue obtenido de los respectivos intervalos de confianza del 95%.

Por otro lado, los intervalos de confianza fueron estimados mediante *bootstrap* con un tamaño de muestra de 1000, utilizando el método de los percentiles.

Los cambios en el presupuesto energético producto de la disponibilidad de recurso y de la exposición a deltametrina tendrían repercusiones negativas sobre las reservas energéticas de los individuos. En este trabajo el efecto negativo de la exposición sobre la acumulación de reservas lipídicas solo se observó en el régimen bajo de recurso, mientras que el efecto negativo sobre su decaimiento se extendió en ambos regímenes. Se ha descrito que la energía obtenida de los recursos tiene directa relación con la acumulación de reservas en forma de esferas lipídicas (Goulden & Place, 1990). Si bien a densidades constantes y variables de recurso la energía es utilizada en procesos fisiológicos, la diferencia está en el presupuesto obtenido y su asignación. En todos los tratamientos la cantidad de reservas lipídicas iniciales es similar y está asociada a la condición alimenticia de sus madres (Goulden & Henry, 1982). Sin embargo, el régimen bajo no presentó posterior acumulación de lípidos debido a la insuficiente energía entregada por el recurso, produciendo un rápido decaimiento de las reservas maternas en los tratamientos de exposición tempranos (~2 días post exposición) asociado al estrés producido por deltametrina. En cambio los individuos sometidos a tratamientos de alto recurso se destacaron por una elevada acumulación de reservas lipídicas, observándose una mayor cantidad en los tratamientos de exposición respecto al control. Estos son efectos no esperados y no son explicables a partir de los resultados de este trabajo. Probablemente se deben a efectos sobrecompensatorios de la exposición. Existe evidencia de este tipo de respuesta en *D. magna* y otros invertebrados a concentraciones subletales de pesticidas, donde los principales atributos afectados son fisiológicos, sobrevivencia y reproducción (Bodar, 1988; Posthuma & Van Straalen, 1993; Calabrese, 2005; Duquesne et al., 2006). Estas reservas comenzaron a ser consumidas

conjuntamente con la aparición de huevos en la cámara de crías, lo que sugiere que estuvieron destinadas a la producción de descendencia. Esto concuerda con Tessier (1983), quien indica que los lípidos de almacenamiento son transferidos a la descendencia, como energía utilizable en procesos metabólicos de los embriones o como energía auxiliar de neonatos durante el crucial periodo de desarrollo en el que deben buscar alimento y comenzar sus procesos digestivos.

Finalmente los efectos de la disponibilidad de recurso y la exposición a deltametrina sobre rasgos de historia de vida como sobrevivencia, edad a la primera reproducción y tamaño de camada a la primera reproducción fueron integrados en la tasa de crecimiento poblacional (r) como herramienta proyectiva de consecuencias sobre un nivel jerárquico superior (Forbes & Calow, 1999). En este trabajo la exposición a deltametrina en los tratamientos de recurso alto sólo tuvo efectos negativos sobre r en los individuos expuestos a edad más temprana, donde los atributos afectados fueron la sobrevivencia y el tamaño de camada en la primera reproducción. Esto es resultado probablemente de la mayor sensibilidad de los estadios tempranos de desarrollo junto a una disminución temporal en la adquisición de recursos, que se traduce posteriormente en menores reservas energéticas disponibles para asignar a su descendencia. Por otro lado, la edad a la primera reproducción no presentó diferencias significativas entre los tratamientos de este régimen. Esto indica que la densidad de recurso permitió que todos los tratamientos alcanzaran el tamaño corporal adecuado para la reproducción en un tiempo similar. En contraste, el régimen bajo presentó crecimiento poblacional negativo incluso en el tratamiento control, lo que indica que la densidad de recurso actúa como factor limitante

afectando gran parte de los atributos integrados en r , principalmente la sobrevivencia y el tamaño corporal. Estudios realizados con piretroides han indicado que la exposición de *D. magna* durante 24-h tiene efectos negativos en la sobrevivencia y el crecimiento corporal, los que se traducen finalmente sobre r cuando la disponibilidad de recurso es reducida (Reynaldi & Liess, 2005; Pieters et al., 2005).

4.3. Rasgos fisiológicos y de historia de vida con alimento variable

Este régimen se caracterizó por un descenso en la densidad de recurso 24-h después de la exposición a deltametrina, observándose que gran parte de los efectos de la exposición guardan relación con la edad a la cual los individuos fueron expuestos.

El pulso de deltametrina tuvo efectos negativos en la sobrevivencia de *D. magna* sobre todas las edades expuestas, registrándose la mayor mortalidad en los individuos expuestos a edad más temprana. Esto se explica por la mayor sensibilidad de estadios tempranos a la exposición del piretroide que conduce a disminuciones en los procesos mecánicos de movilidad y de obtención de energía, como se explicó anteriormente.

Por otro lado, el estrés producido por deltametrina tuvo consecuencias sobre el crecimiento y reproducción. En los individuos expuestos a edad temprana el efecto sobre el tamaño corporal fue negativo y similar al observado en el régimen bajo, alcanzándose un máximo no superior a los ~1.2 mm. En comparación a su control que superó los ~1.5 mm. (Fig. 8A). Esto se debe a que en este tratamiento la densidad de recurso sólo fue favorable durante el período en el que la adquisición energética es deprimida por la acción de deltametrina. Posterior a esto y durante el resto de los días evaluados los individuos fueron sometidos a densidad baja de recurso con consecuencias energéticas negativas para su crecimiento y desarrollo. En los individuos expuestos a edades media y tardía el efecto de deltametrina también fue negativo sobre el tamaño corporal, alcanzándose máximos de ~1.4 y ~2.0 mm., respectivamente. En comparación a sus controles que superaron los ~1.9 y ~2.3 mm. (Fig. 8A). Previo a su exposición estos individuos estuvieron sometidos a densidad alta de recurso, por lo que se observó mayor

disponibilidad de reservas lipídicas para destinar energía a su crecimiento corporal y enfrentar el estrés producido por deltametrina. Sin embargo, hubo un efecto positivo sobre el tiempo de crecimiento medio (t_{50}) lo que indica un retardo en el incremento del tamaño corporal, posiblemente debido a un cambio en la asignación de recursos asociado a la condición de estrés.

La nula fertilidad observada en los tratamientos de exposición temprana, media y sus respectivos controles puede estar asociada al tamaño corporal insuficiente para la maduración, debido al reducido presupuesto energético obtenido por la densidad de recurso a la que fueron sometidos. Por otro lado, los individuos de exposición tardía y su control alcanzaron tamaños corporales comparables con los del régimen alto. Sin embargo, solo los individuos del tratamiento control llegaron a ser reproductivos. Lo que sugiere que el tamaño corporal no fue un factor limitante para la reproducción y la exposición a deltametrina condujo a un rápido consumo de las reservas lipídicas impidiendo la asignación a reproducción.

Las reservas lipídicas y su tiempo de consumo medio fueron menores en todos los individuos sometidos a deltametrina, especialmente en los de exposición media y tardía. Se debe destacar que este régimen consistió en un descenso en de la disponibilidad recurso posterior a un periodo de densidad favorable. Cuando fueron sometidos al descenso de recurso ocurre un déficit energético para mantener los procesos desarrollados en la densidad de recurso previo. Este fenómeno es de mayor magnitud en los individuos expuestos a deltametrina produciendo un rápido consumo de las reservas lipídicas. Esta respuesta se observa principalmente en los individuos

expuestos a edades media y tardía, los cuales estuvieron sometidos durante más tiempo a una densidad favorable de recurso.

Finalmente, en los tratamientos de alimento variable, la exposición a deltametrina tuvo efectos negativos sobre r en todas las edades expuestas. En los individuos expuestos a edad temprana y media el nulo crecimiento poblacional fue causado por el bajo crecimiento corporal alcanzado que impidió su maduración. Por otro lado, en los individuos expuestos a edad tardía no se observó reproducción a pesar de los tamaños corporales alcanzados (> 2.0 mm), lo que sugiere que el presupuesto energético no fue el suficiente para destinar a descendencia. Sin embargo, en el control de estos tratamientos, es decir, individuos experimentales sometidos solo al descenso de recurso, se obtuvo descendencia en menor número y de mayor tamaño corporal comparado con el régimen alto de recurso. Se ha observado repetidamente que existe un compromiso entre el tamaño de la camada y el tamaño de los neonatos, caracterizado por un menor número de crías de mayor tamaño corporal cuando la disponibilidad de recurso es desfavorable (Hutchinson, 1967; Sibly & Calow, 1986; Goulden et al., 1987; Gliwicz & Guisande, 1992; Boersma, 1997). Por otro lado, la edad a la primera reproducción no presentó diferencias respecto al resto de los tratamientos fértiles de este trabajo, lo que indica una asignación adecuada de energía al incremento de tamaño corporal gracias a las reservas energéticas acumuladas durante el periodo previo al descenso de recurso.

4.4. Implicaciones ecológicas

Daphnia, como muchas especies del zooplancton de agua dulce, está sujeta a constantes limitaciones en la disponibilidad de recurso que controlan su dinámica poblacional (Larsson et al., 1985; Vanoverbeke, 2008).

En este trabajo el estado fisiológico (condición alimenticia) de los individuos experimentales fueron estimados a través de las reservas de lípidos. Según Goulden & Henry (1987) estas reservas pueden ser utilizadas en el metabolismo o transferidas a la descendencia para ser utilizadas en el desarrollo inicial y potenciar su capacidad de soportar períodos de escasez. Además, pueden ser consideradas como indicadores de la condición fisiológica general, permitiendo asociar su acumulación y consumo a una potencial condición de estrés como el producido por contaminantes (De Coen & Janssen, 2003; Villarroel et al., 2009).

En *Daphnia* existe un compromiso entre el tamaño de la camada y el tamaño de los neonatos asociado a su condición alimenticia y de reservas lipídicas. Donde a densidades bajas de recurso producen reducidas camadas con neonatos de gran tamaño, mientras que a densidades altas producen grandes camadas con neonatos pequeños (Ebert, 1993; Enserink et al., 1995; Coors et al., 2004). Los neonatos de mayor tamaño contienen mayores cantidades de reservas lipídicas (Enserink et al., 1993), suponiendo una mejor calidad. Algunos autores han observado un aumento en la sobrevivencia y en la capacidad de resistir condiciones desfavorables de recurso (Gliwicz & Guisande, 1992; Enserink et al., 1995; Knops et al., 2001; Coors et al., 2004) o el estrés producido por contaminantes (Enserink et al., 1990; Smolders et al., 2005) por neonatos de mayor

tamaño. En este trabajo se obtuvieron neonatos de mayor tamaño y con mayor cantidad de reservas lipídicas en el régimen de alimento descendente, lo que apoyaría la hipótesis del compromiso cantidad-calidad mencionado anteriormente.

A nivel poblacional, la tasa de crecimiento (r) estimada en este trabajo no permite predicciones respecto de poblaciones naturales, ya que su cálculo no integra factores como denso-dependencia (Liess, 2002) o depredación (Vijverberg & Richter, 1982). Aún así, provee de una medida de mayor relevancia ecológica que la estimación de atributos de historia de vida individualmente. Los mayores cambios en r estuvieron conducidos por la disponibilidad de recurso más que por la exposición a deltametrina; obteniéndose una nula tasa de crecimiento en el régimen bajo. Los resultados también muestran que las variaciones en r son producto de una disminución en el tamaño de la camada, ya que la edad a la primera reproducción no tuvo diferencias en los tratamientos reproductivos (Fig. 11A).

Finalmente, la influencia de los factores estudiados puede conducir a modificaciones en la respuesta de *Daphnia* a diversas presiones ecológicas. Por ejemplo, reducciones en las habilidades competitivas, pueden ser influenciadas por cambios en el tamaño corporal y capacidades de adquisición de recursos. La depredación, puede aumentar sus efectos letales, debido a disminuciones en las respuestas morfológicas y fisiológicas de los organismos en condiciones de estrés. Éstos entre otros factores, tienen potenciales repercusiones sobre la transferencia de materia y energía dentro de los sistemas acuáticos, debido a que estos organismos son el vínculo entre la producción primaria y el resto de la cadena trófica acuática.

5. CONCLUSIONES

5.1. Conclusiones generales

Este trabajo sugiere que la disponibilidad de recursos modifica la condición fisiológica y alimenticia de *D. magna*, alterando finalmente su capacidad para enfrentar la exposición a compuestos nocivos de origen antrópico. Adicionalmente, la estimación de las reservas lipídicas mediante análisis de imágenes se postula como un buen indicador de la condición energética y permite registrar su dinámica temporal bajo condiciones de estrés. En particular el desarrollo de esta investigación permitió concluir que:

- La disponibilidad de recurso fue el factor limitante sobre el desempeño biológico de los individuos, modulando significativamente todos sus rasgos fisiológicos y de historia de vida evaluados.
- Los efectos negativos de deltametrina guardaron relación con la disponibilidad de recurso y con la edad de exposición. A densidades constantes los efectos fueron significativos para sobrevivencia y decaimiento de reservas lipídicas, observándose con mayor magnitud sobre los individuos expuestos a edad temprana (neonatos). Por otro lado, a densidad variable fueron significativos tanto sobre rasgos de historia de vida como en la acumulación y decaimiento de reservas lipídicas, siendo de mayor magnitud sobre juveniles.

- La interacción entre la disponibilidad de recurso y la exposición a deltametrina fue significativa sólo sobre rasgos fisiológicos, principalmente sobre la cantidad de reservas lipídicas acumuladas. Este efecto fue observado en los tratamientos de alimento constante.

5.2. Consideraciones finales y direcciones futuras

Si bien este trabajo se centró en un sistema experimental relativamente simplificado en relación a la multiplicidad de variaciones e interacciones entre estresores que habitualmente se encuentran en sistemas acuáticos, entrega evidencia de cómo condiciones naturales (disponibilidad de alimento) pueden modificar el efecto nocivo de contaminantes sobre el desempeño biológico de los organismos. Esta información es de utilidad y entrega una perspectiva ecológica más relevante a los ensayos de toxicidad realizados bajo condiciones estándar definidas.

Generalmente los efectos nocivos de la contaminación son evaluados a través de sobrevivencia y reproducción. Este trabajo propuso una metodología alternativa simple para la estimación de la condición fisiológica de los individuos. Estos rasgos pueden ser utilizados como una alerta temprana de toxicidad y potencialmente vincularse a los efectos encontrados en niveles superiores. Por lo tanto, es necesaria la validación de metodologías para su extrapolación y uso en programas de evaluación del riesgo ambiental y ecológico.

Finalmente, la naturaleza del contaminante también corresponde a un factor importante y debe tenerse en cuenta a la hora de interpretar resultados y establecer posibles generalizaciones. En este trabajo se utilizó deltametrina, que pertenece a una familia particular de compuestos orgánicos con un mecanismo de acción neurotóxico y de vida media relativamente corta en ambientes acuáticos debido a su naturaleza hidrofóbica. Por lo tanto, se debe evaluar si contaminantes con distintos mecanismos de acción y características físicas generan los efectos equivalentes al interactuar con variaciones de recurso u otros estresores de relevancia ecológica como factores abióticos o depredación.

6. REFERENCIAS

Aladin, N.V. & Potts, W.T.W. 1995. Osmoregulatory capacity of the cladocera. *Journal of Comparative Physiology B* 164: 671-683.

Amweg, E.L., Weston, D.P. & Ureda, N.M. 2005. Use and toxicity of pyrethroid pesticides in the Central Valley, California, USA. *Environmental Toxicology and Chemistry* 24: 966-972.

Anderson, R.L. 1989. Toxicity of synthetic pyrethroids to freshwater invertebrates. *Environmental Toxicology and Chemistry* 8: 403-410.

Bodar, C.W.M., Van Leeuwen, C.J., Voogt, P.A., Zandee, D.I. 1988. Effect of cadmium on reproduction strategy of *Daphnia magna*. *Aquatic Toxicology* 12: 301-309.

Boersma M. 1997. Offspring size and parental fitness in *Daphnia magna*. *Evolutionary Ecology* 11(4): 439-450.

BioPix 2008, BioPix software, ver. iQ 2.0, computer program, BioPix Software, Gothenburg, Sweden.

Bodar, C.W.M., Van Der Sluis, I. & Voogt, P.A. 1988. Effects of cadmium on consumption, assimilation and biochemical parameters of *Daphnia magna*: possible implications for reproduction. *Comparative Biochemical Physiology* 90C (2): 341-346.

Calabrese, E.J. 2005. Paradigm lost, paradigm found: the re-emergence of hormesis as a fundamental dose response model in the toxicological sciences. *Environmental Pollution*. 138: 379-412.

Calow, P. & Sibly, R.M. 1990. A physiological basis of population processes: Ecotoxicological implications. *Functional Ecology*. 4: 283-288.

Carpenter, S. R. & others. 1987. Regulation of lake primary productivity by food web structure. *Ecology* 68: 1863-1876.

Cerejeira, M.J., Viana, P., Batista, S., Pereira, T., Silva, E., Valerio, M.J., Silva, A., Ferreira, M. & Silva-Fernandes, A.M. 2003. Pesticides in Portuguese surface and ground waters. *Water Research*. 37: 1055-1063.

Coors, A., Hammers-Wirtz, M. & Ratte, H.T. 2004. Adaptation to environmental stress in *Daphnia magna* simultaneously exposed to a xenobiotic. *Chemosphere* 56: 395-404

Day, N.K. & Kaushik, N.K. 1987. Short-term exposure of zooplankton to the synthetic pyrethroid fenvalerate, and its effects on rates of filtration and assimilation of the alga, *Chlamydomonas reinhardtii*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 16: 423-432.

Day, N.K. & Maguire, R.J. 1990. Acute toxicity of isomers of the pyrethroid insecticide deltamethrin and its major degradation products to *Daphnia magna*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 9 (10): 1297-1300.

De Coen, W.D. & Janssen, C.R. 2003. The missing biomarker link: relationship between effects on the cellular energy allocation biomarker of toxicant stressed *Daphnia magna* and corresponding population characteristics. *Environmental Toxicology and Chemistry* 22: 1632-1641.

Duquesne, S., Reynaldi, S., Liess, M. 2006. Effects of the organophosphate paraoxon-methyl on survival and reproduction of *Daphnia magna*: importance of exposure duration and recovery. *Environmental Toxicology and Chemistry* 25: 1196-1199

Ebert, D. 1992. A food-independent maturation threshold and size at maturity in *Daphnia magna*. *Limnology and Oceanography*. 37: 878-881.

Ebert, D. 1993. The trade-off between offspring size and number in *Daphnia magna*: The influence of genetic, environmental and maternal effects. *Archiv für Hydrobiologie Supplement* 90: 453-473.

Elendt, B.P. 1989. Effects of starvation on growth, reproduction, survival and biochemical composition of *Daphnia magna*. *Archiv für Hydrobiologie* 116: 415-433.

Elliott, M., Farnham, A.W., Janes, N. F., Needham, P.H. & Pulman, D.A. 1974. Synthetic insecticide with a new order of activity. *Nature* 248: 710-711.

Enserink, L., de la Haye, M. & Maas, H. 1993. Reproductive strategy of *Daphnia magna*: implications for chronic toxicity tests. *Aquatic Toxicology* 25: 111-124.

Enserink, E.L., Kerkhofs, M.J.J., Baltus, C.A.M. & Koeman, J.H. 1995. Influence of food quantity and lead exposure on maturation in *Daphnia magna*; evidence for a trade-off mechanism. *Functional Ecology* 9: 175-185.

Farkas, T. 1970. Fats in freshwater crustaceans. *Acta Biologica Academiae Scientiarum Hungaricae* 21: 225-233.

Folt C.L., Chen C.Y., Moore M.V. & Burnaford J. 1999. Synergism and antagonism among multiple stressors. *Limnology and Oceanography* 44: 864-877.

Forbes, V. & Calow, P. 1999. Is the per capita rate of increase a good measure of population-level effects in ecotoxicology?. *Environmental Toxicology and Chemistry* 18: 1544-1556.

Fulford, R.S., Rice, J.A., Miller, T.J., Binkowski, F.P., Dettmers, J.M. & Belonger, B. 2006. Foraging selectivity by larval yellow perch (*Perca flavescens*): implications for understanding recruitment in small and large lakes. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 63: 28-42.

Glazier, D.S. 1998. Does body storage act as a food-availability cue for adaptive adjustment of egg size and number in *Daphnia magna*?. *Freshwater Biology*. 40: 87-92.

Gliwicz, Z.M. & Guisande C. 1992. Family planning in *Daphnia*: resistance to starvation in offspring born to mothers grown at different food levels. *Oecologia*. 91: 463-467.

Goulden, C. E. & Hornig, L.L. 1980. Population oscillations and energy reserves in planktonic cladocera and their consequences to competition. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)* 77: 1716-1720.

Goulden, C. E., Henry, L.L. & Berrigan, D. 1987. Egg size, postembryonic yolk, and survival ability. *Oecologia (Berlin)* 72: 28-31.

Goulden, C.E. & Place A.R. 1990. Fatty acid synthesis and accumulation rates in daphnids. *Journal of Experimental Zoology* 256: 168-178.

Hall D.J. 1964. An experimental approach to the dynamics of a natural population of *Daphnia galeata mendotae*. *Ecology* 45: 94-112.

Haney, J.F. 1988. Diel Patterns of Zooplankton Behavior. *Bulletin of Marine Science* 43: 583-603.

Hanazato T., Yasuno M. & Hosomi, M. 1989. Significance of a low oxygen layer for a *Daphnia* population in Lake Yunoko, Japan. *Hydrobiologia*, 185: 19-27.

Hanazato, T. & M. Yasuno. 1989. Zooplankton community structure driven by vertebrate and invertebrate predators. *Oecologia* 81: 450-458.

Hanazato, T. 1998. Growth analysis of *Daphnia* early juvenile stages as an alternative method to test the chronic effect of chemicals. *Chemosphere* 36: 1903-1909.

Hanazato, T. 2001. Pesticide effects on freshwater zooplankton: an ecological perspective. *Environmental Pollution* 112: 1-10.

Hoagland, K.D., Drenner, R.W., Smith, J.D. & Cross, D.R. 1993. Freshwater community responses to mixtures of agricultural pesticides: Effects of atrazine and bifenthrin. *Environmental Toxicology and Chemistry* 12: 627-637.

Hutchinson, G. E. 1967. A treatise on limnology II. Introduction to lake biology and the limnoplankton. John Wiley and Sons, New York, USA.

Jakobsen, P.J. & Johnsen, G.H. 1987. Behavioural response of the water flea *Daphnia pulex* to a gradient in food concentration. *Animal Behaviour* 35: 1891-1895.

Knops, M., Altenburger, R. & Segner, H. 2001. Alterations of physiological energetics, growth and reproduction of *Daphnia magna* under toxicant stress. *Aquatic Toxicology*. 53: 79-90.

Laskowski, D.A. 2002. Physical and chemical properties of pyrethroids. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* 174: 49-170.

Lampert, W. 1977. Studies on the carbon balance of *Daphnia pulex* de Geer as related to environmental conditions. II. The dependence of carbon assimilation on animal size, temperature, food concentration and diet species. *Archiv fur Hydrobiologie, Supplement* 48: 310-335.

Larsson, P., Johnsen G. & Steigen, A.L. 1985. An experimental study of the summer decline in a *Daphnia* population. *Verhandlungen der Internationalen Vereinigung für Theoretische und Angewandte Limnologie* 22: 3131-3136.

Larsson, P. & Dodson, S. 1993. Invited review—chemical communication in planktonic animals. *Archiv für Hydrobiologie* 129: 129-155.

Liess, M. 2002. Population response to toxicants is altered by intraspecific interaction. *Environmental Toxicology and Chemistry* 21: 138-42.

Lynch, M., Weider, L.J. & Lampert, W. 1986. Measurement of the carbon balance in *Daphnia*. *Limnology and Oceanography* 31: 17-33.

Manly, B.F.J. 1997. A Program for Randomization Testing. Centre for Applications of Statistics and Mathematics University of Otago. Dunedin, Otago, New Zealand.

McWilliam R.A. & Baird D.J. 2002. Postexposure feeding depression: A new toxicity endpoint for use in laboratory studies with *Daphnia magna*. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 21: 1198-1205.

Maguire, R.J., Carey, J.H., Hart, J.H., Tkacz, R.J. & Lee, H.B. 1989. Persistence and fate of deltamethrin sprayed on a pond. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 37: 1153-1159.

Mourelatos, S & Lacroix, G. 1990. In situ filtering rates of Cladocera: effect of body length, temperature, and food concentration. *Limnology and Oceanography* 35: 1101-1111.

Moss, B. 1998. *Ecology of freshwaters: man and medium, past to future*, 3rd edition. Blackwell Science, Oxford.

Mokry, L.E. & Hoagland, K.D. 1990 Acute toxicity of 5 synthetic pyrethroid insecticides to *Daphnia magna* and *Ceriodaphnia dubia*. *Environmental toxicology and chemistry* 9: 1045-1051.

Noonburg, E.G. & Nisbet, R.M. 2005. Behavioural and physiological responses to food availability and predation risk. *Evolutionary Ecology Research*, 7: 89-104.

Pieters B.J., Paschke, A., Reynaldi S., Kraak M.H.S., Admiraal W. & Liess, M. 2005. Influence of food limitation on the effects of fenvalerate pulse exposure on the life history and population growth rate of *Daphnia magna*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 24: 2254-2259.

Porter, K., Orcutt Jr., J.O. & Gerritsen, J. 1983. Functional response and fitness in a generalist filter feeder, *Daphnia magna* (Cladocera: Crustacea). *Limnology and Oceanography* 64: 735-742.

Posthuma, L. & Van Straalen, N.M. 1993. Heavy-metal adaptation in terrestrial invertebrates: a review of occurrence, genetics, physiology and ecological consequences. *Comparative Biochemistry and Physiology* 106C: 11-38.

Reynaldi, S. & Liess, M. 2005. Influence of duration of exposure to the pyrethroid fenvalerate on sublethal responses and recovery of *Daphnia magna* Straus. *Environmental Toxicology and Chemistry* 24: 1160-1164.

Reynaldi S., Duquesne S., Jung, K., Liess, M. 2006. Linking feeding activity and maturation of *Daphnia magna* following short-term exposure to fenvalerate. *Environmental Toxicology and Chemistry* 25: 1826-1830.

Rinke K. & Petzoldt, T. 2003. Modelling the effects of temperature and food on individual growth and reproduction of *Daphnia* and their consequences on the population level. *Limnologica* 33: 293-304

Rose, R.M., Warne, M.S. & Lim, R.P. 2002. Some life history responses of the cladoceran *Ceriodaphnia* cf. *Dubia* to variations in population density at two different food concentrations. *Hydrobiologia* 481: 157-164.

Sancho, E., Villarroel, M.J., Andreu-Moliner, E. & Ferrando, M.D. 2009. Disturbances in energy metabolism of *Daphnia magna* after exposure to tebuconazole. *Chemosphere* 74: 1171-1178.

Schmoker, C. & Hernández-León, S. 2003. The effect of food on the respiration rates of *Daphnia magna* using a flow-through system. *Scientia Marina* 67 (3): 361-365.

Shafer, T.J., Meyer, D.A. & Crofton, K.M. 2005. Developmental neurotoxicity of pyrethroid insecticides: critical review and future research needs. *Environmental Health Perspectives* 113: 123-136.

Sibly, R. & Calow, P. 1986. *Physiological ecology of animals, an evolutionary approach*. Blackwell Scientific, Oxford, England.

Stearns, S.C. 1976. Life history tactics: a review of the ideas. *The Quarterly Review of Biology* 51: 3-47.

Stemberger, R.S. 1981. A general approach to the culture of planktonic rotifers. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 38: 721-724.

Systat. 2006. Systat Software, Incorporation. SigmaPlot for Windows version 10.0.

Tessier, A.J., Henry, L.L., Goulden, C.E. & Durand, M.W. 1983. Starvation in *Daphnia*: Energy reserves and reproductive allocation. *Limnology and Oceanography* 28: 667-676.

Tessier, A.J. 1986. Comparative population regulation of two planktonic cladocera (*Holopedium gibberum* and *Daphnia catawba*). *Ecology* 67: 285-302.

Vanoverbeke, J. 2008. Modeling individual and population dynamics in a consumer-resource system: behavior under food limitation and crowding and the effect on population cycling in *Daphnia*. *Ecological Modelling* 216: 385-401.

Vijverberg, J. & Richter, A.F. 1982. Population dynamics and production of *Daphnia hyalin* a Leydig and *Daphnia cucullata* Sars in Tjeukemeer. *Hydrobiologia* 95: 235-259.

Villarroel, M.J., Sancho, E., Andreu-Moliner, E. & Ferrando, M.D. 2009. Biochemical stress response in tetradifon exposed *Daphnia magna* and its relationship to individual growth and reproduction. *Science of the Total Environment* 407: 5537-5542.

Weston, D.P., Holmes, R.W., You, J. & Lydy, M.J. 2005. Aquatic toxicology due to residential use of pyrethroids insecticides. *Environmental Science and Technology* 39: 9778-9884.

Zaret, T.M. 1980. *Predations and freshwater Communities*. New Haven and London Yale University Press: 187 pp.

7. APÉNDICE

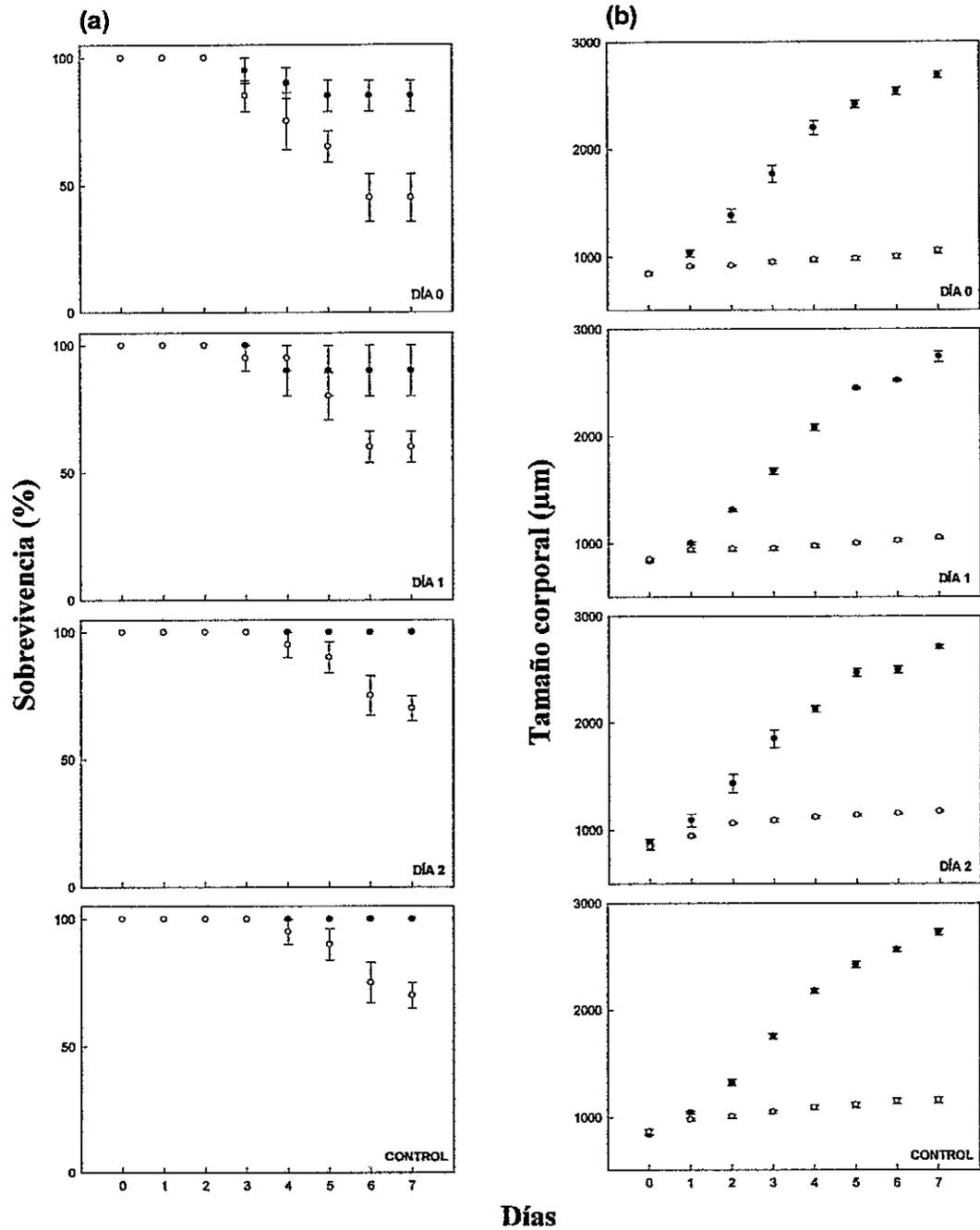


Figura 7A: Sobrevivencia (a) y tamaño corporal (b) de individuos de *D. magna*, expuestos a deltametrina a distintas edades. Los valores indican (Promedio \pm error estándar) tratamientos de exposición a densidad alta (●) y baja (○) de recurso.

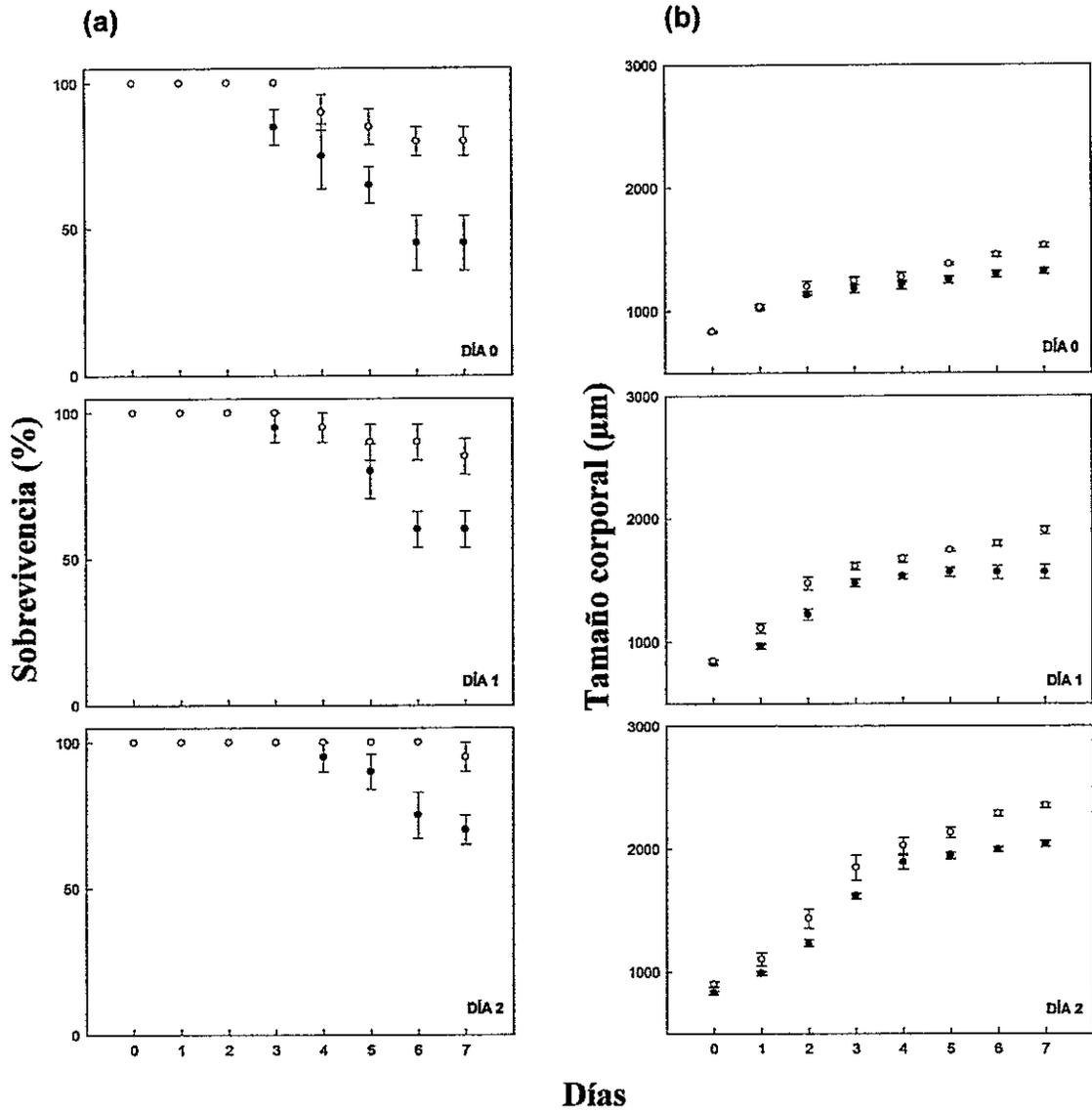


Figura 8A: Sobrevivencia (a) y tamaño corporal (b) de individuos de *D. magna* sometidos a densidades variables de recurso. Los valores indican (Promedio \pm error estándar) tratamientos de exposición a distintas edades (●) y su control (○).

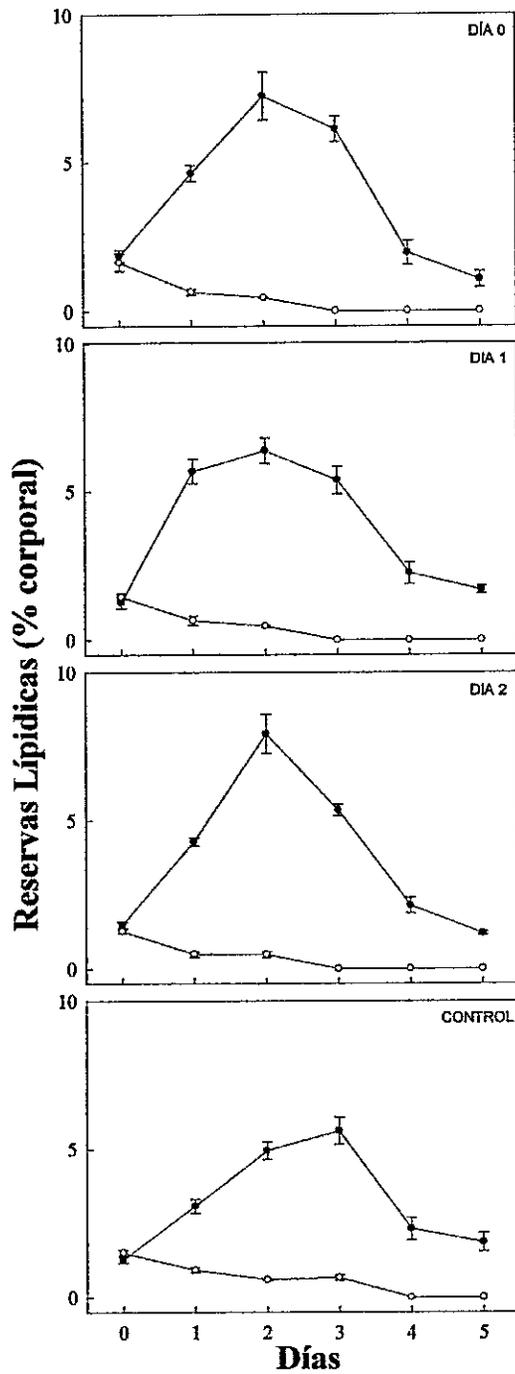


Figura 9A: Reservas lipídicas de individuos de *D. magna*, expuestos a deltametrina a distintas edades. Los valores indican (Promedio \pm error estándar) tratamientos de exposición a densidad alta (●) y baja (○) de recurso.

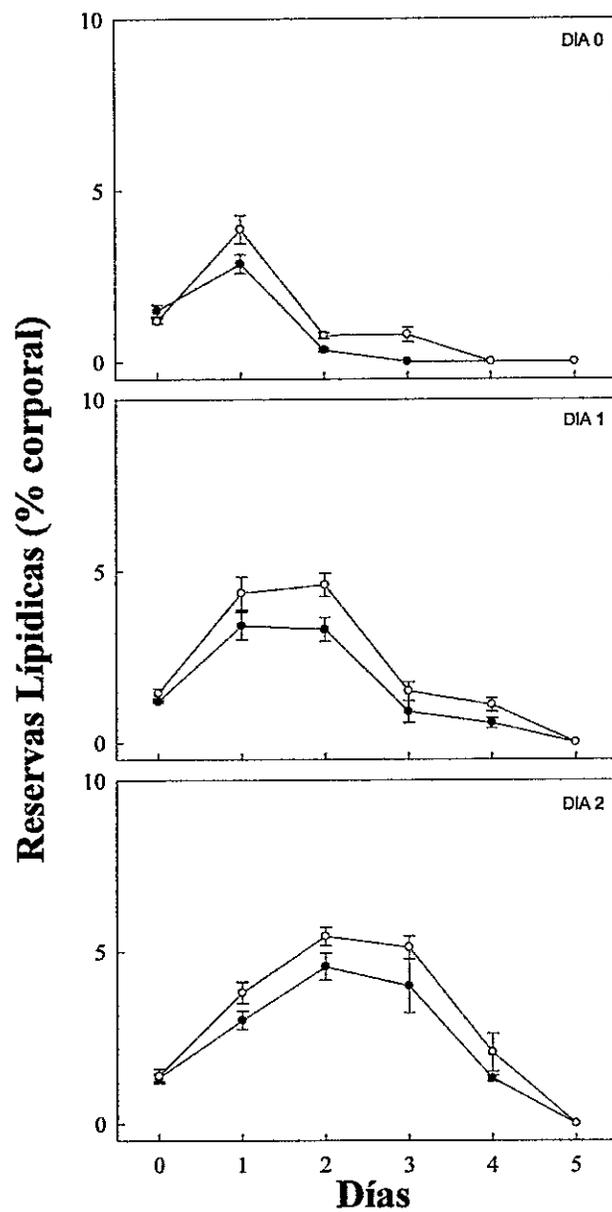


Figura 10A: Reservas lipídicas de individuos de *D. magna* sometidos a densidades variables de recurso. Los valores indican (Promedio \pm error estándar) tratamientos de exposición a distintas edades (●) y su control (O).

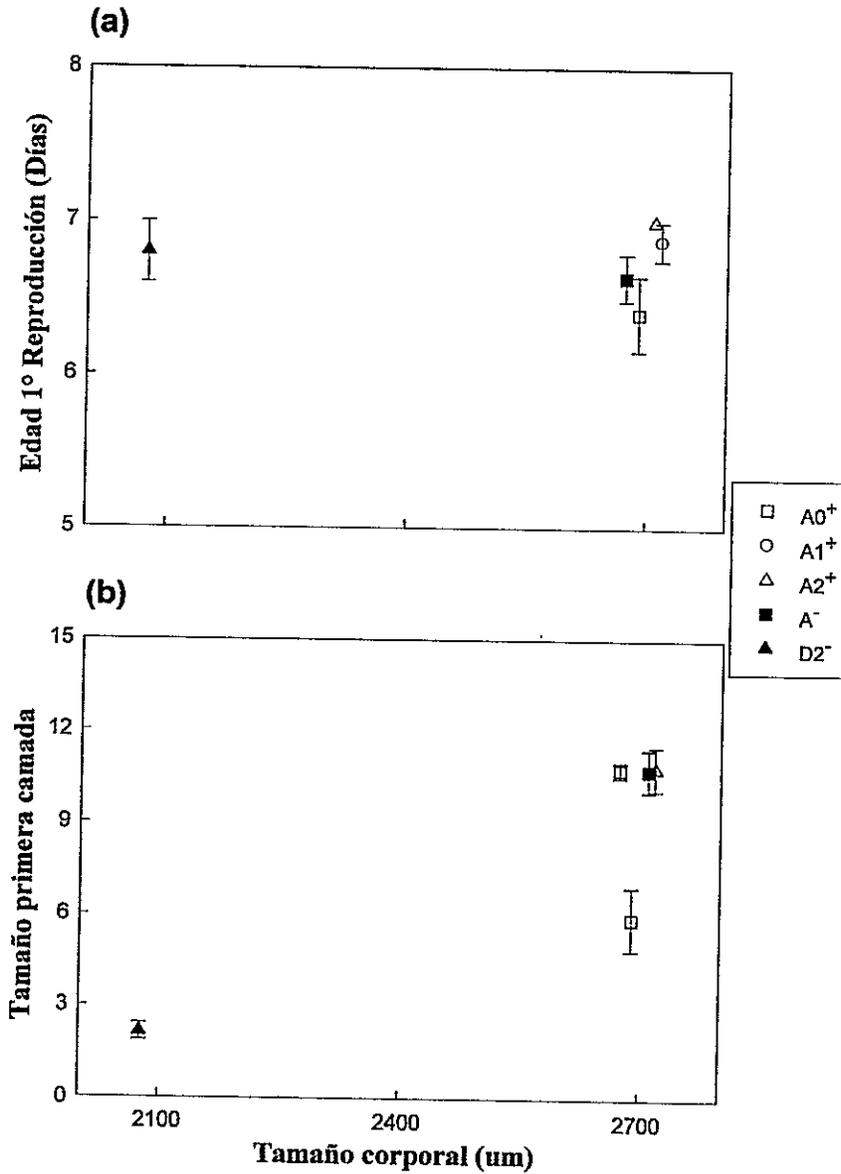


Figura 11A: Edad a la primera reproducción (a) y tamaño primera camada (b) de individuos de *D. magna*. Sólo se consideran tratamientos reproductivos. Los valores indican Promedio \pm error estándar.