



Universidad Nacional de La Plata  
Facultad de Ciencias Naturales y Museo

Zooplancton de ambientes acuáticos de la cuenca del  
río Salado (Buenos Aires): estudio de relaciones interespecíficas  
y principales factores de control mediante experiencias de  
laboratorio y microcosmos

Lic. Noelia S. Ferrando

Directora: María Cristina Claps  
Codirector: Néstor A. Gabellone



2015



“El mejor científico está abierto a la experiencia, y ésta empieza con un romance,  
es decir, la idea de que todo es posible.”

R. Bradbury

A mis viejos.-





## Índice de contenidos

Resumen	v
Abstract	viii
Agradecimientos	xi
Introducción general	1
Hipótesis	11
Objetivos	12
Capítulo I: Fitoplancton	15
1. Cultivos en condiciones controladas de laboratorio	
1.1 Cultivo de <i>Chlorella vulgaris</i> en diferentes condiciones lumínicas.	17
1.2 Cultivo de <i>Chlorella vulgaris</i> y <i>Scenedesmus acutus</i> en medio Bold.	21
2. Crecimiento poblacional de <i>Chlorella vulgaris</i> y <i>Scenedesmus acutus</i> .	22
3. Técnica de recuento automatizado de células de <i>Chlorella vulgaris</i> .	26
Materiales y métodos	
3.1 Cultivos algales.	27
3.2 Obtención de las muestras.	27
3.3 Metodología de sedimentación.	28
3.4 Metodología de recuento.	29
3.5 Análisis estadístico de los resultados.	30
Resultados	30
Discusión	37
Capítulo II: Zooplancton	40
1. Características generales	41
1.1 Rotíferos	41
1.2 Cladóceros	46
1.3 Copépodos	49





2. Sitios de muestreo	52
3. Colecta de muestras	55
4. Cultivos de zooplancton	56
5. Crecimiento poblacional	62
5.1 Rotíferos (características específicas)	62
<i>Brachionus plicatilis</i>	
<i>Asplanchna sieboldii</i>	
<i>Euchlanis dilatata</i>	
<i>Plationus patulus</i>	
<i>Brachionus calyciflorus</i>	
5.2 Cladóceros (características específicas)	66
<i>Alona glabra</i>	
<i>Macrothrix triserialis</i>	
<i>Simocephalus vetulus</i>	
<i>Moina macrocopa</i>	
<i>Daphnia pulex</i>	
Materiales y métodos	67
Resultados	68
Discusión	76
6. Morfometría. Relación tamaño –tasa de crecimiento poblacional	78
Materiales y métodos	78
Resultados y Discusión	79
Capítulo III: <u>Experimentos de laboratorio</u> . Efectos de factores abióticos y bióticos en poblaciones de especies del zooplancton.	83
A. Conductividad	
Hipótesis y Objetivos	84
<u>Experimento 1</u> : Efecto de la disminución de la conductividad en las poblaciones de <i>Brachionus plicatilis</i>	
1.1 Materiales y métodos	85
1.2 Resultados	89
1.3 Discusión	98
<u>Experimento 2</u> : Efecto del aumento de la conductividad en las poblaciones de <i>Brachionus plicatilis</i> .	
2.1 Materiales y métodos	101
2.2 Resultados	101
2.3 Discusión	109





B. Temperatura	
Hipótesis y objetivos	111
<u>Experimento 3: Efecto de la temperatura en la dinámica poblacional</u> de <i>Brachionus plicatilis</i> .	111
3.1 Materiales y métodos	112
3.2 Resultados	114
3.3 Discusión	123
C. Pastoreo	
Hipótesis y objetivos	126
<u>Experimento 4: Efecto del pastoreo del rotífero <i>Brachionus plicatilis</i></u> sobre el alga unicelular <i>Chlorella vulgaris</i> .	127
4.1 Materiales y métodos	128
4.2 Resultados	130
4.3 Discusión	137
<u>Experimento 5: Efecto del pastoreo del copépodo calanoideo</u> <i>Notodiaptomus incompositus</i> sobre el alga unicelular <i>Chlorella</i> <i>Vulgaris</i> .	139
5.1 Materiales y métodos	140
5.2 Resultados	143
5.3 Discusión	150
<u>Experimento 6: Efecto del pastoreo de especies de cladóceros</u> planctónicos y perifíticos sobre el alga unicelular <i>Chlorella</i> <i>vulgaris</i> con y sin la presencia de plantas sumergidas.	153
6.1 Materiales y métodos	154
6.2 Resultados	157
6.3 Discusión	165
Consideraciones finales	168
Bibliografía	175





## Resumen

Hasta el momento, la mayoría de los estudios referidos al zooplancton de las lagunas y ríos pampeanos han sido llevados a cabo en el contexto de investigaciones limnológicas anuales o estacionales analizando aspectos acerca de su estructura y biomasa, acerca de su distribución espacial y temporal, o focalizados en el análisis de las relaciones de sus integrantes o algunas especies en particular con depredadores tanto vertebrados como invertebrados. El análisis de relaciones interespecíficas entre determinados zooplanctontes o la incidencia de factores de control tales como cambios en la conductividad, pH, temperatura, etc. en las poblaciones de los principales integrantes de la comunidad han tenido un escaso o nulo tratamiento. A partir del estudio de los ambientes someros pampeanos en el marco de los estados alternativos se han vislumbrado diferencias con lo registrado en el Hemisferio Norte, comprobando en el campo que en el caso de los rotíferos existen diferencias muy notorias respecto a la composición y densidad alcanzada de acuerdo a la fase del equilibrio alternativo en que se encuentren las lagunas de la región mientras que en los ambientes lóticos hay coincidencias faunísticas con lo registrado en ríos de llanura de regiones áridas y semiáridas del globo.

Las observaciones que se realizan en el campo, al igual que los experimentos, son esenciales para proveer importantes herramientas en la realización de una buena diagnosis de los cuerpos de agua. Como los interrogantes son numerosos y abarcan a un abundante número de intérpretes, se ha decidido focalizar este estudio en factores que presentan mayor incidencia en las lagunas y ríos pampeanos como son la variación de la salinidad, la temperatura, la cantidad y calidad de alimento y la presencia de macrófitas sumergidas (sólo en lagunas). Salinidad y temperatura son factores de control importantes en los ambientes pampeanos y se ha comprobado a campo que varias especies de rotíferos, principalmente del género *Brachionus* dominan a diferentes concentraciones de salinidad y estaciones climáticas. El alimento (calidad y cantidad de algas planctónicas) es un factor limitante que provoca una condición de hambre en los pastoreadores y puede llevar a una fuerte reducción en sus poblaciones, siendo tan importante como el efecto de la depredación por parte de vertebrados e invertebrados. Como el zooplancton herbívoro reduce las algas y cambia la estructura de la comunidad fitoplanctónica en los ambientes pampeanos debe analizarse el efecto de los rotíferos pastoreadores que alcanzan





una densidad considerable y que compiten con especies de cladóceros consideradas poco eficientes.

Por todo lo expuesto la utilización de experiencias de laboratorio y microcosmos para analizar relaciones interespecíficas así como determinar el efecto de algunos factores de control son experiencias complementarias con las investigaciones a campo ya realizadas. Sus principales bondades radican en la replicabilidad, velocidad de los procesos, control de las variables, y utilización a escalas de individuos y comunitarias. Como modelos vivos, los microcosmos tienden un puente entre los detalles de la realidad con las abstracciones de los sistemas generales, revelando los principios de las vías en que todos los sistemas trabajan.

En el desarrollo de esta tesis se han cultivado y establecido las tasas de crecimiento de dos especies de algas clorofíceas comúnmente utilizadas como cultivos en laboratorio (*Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus acutus*) y en experimentos con organismos herbívoros por ser. Se ajustó y optimizó la técnica de recuento digitalizado de células algales de manera de hacer más eficiente el procesamiento de datos en la fase de experimentación y se relacionó la densidad del alga con la turbidez mediante un modelo lineal que permitió el monitoreo inmediato de los cultivos, siendo una técnica innovadora y con la posibilidad de ampliar su utilización a otras especies de algas.

Se han cultivado y establecido la tasa de crecimiento de algunas de las especies de rotíferos y cladóceros presentes en las lagunas y ríos pampeanos (*Brachionus plicatilis*, *B. calyciflorus*, *Euchlanis dilatata*, *Plationus patulus* y *Asplanchna sieboldii* entre los rotíferos y *Moina macrocopa*, *Macrothrix triserialis*, *Alona glabra* y *Simocephalus vetulus* entre los cladóceros). Los valores obtenidos se relacionaron con la importancia numérica y frecuencia de estas especies en la naturaleza, explicando cómo algunas son dominantes mientras que otras sólo se presentan en determinadas épocas del año.

La cepa de *B. plicatilis* obtenida en el río Salado muestra una destacada plasticidad frente a diversos niveles de conductividad que junto a su elevada tasa de crecimiento poblacional le posibilitan ser protagonista destacado en el zooplancton ya que alcanza elevadas densidades en la mayoría de los sectores lóticos de la cuenca y en ciertas ocasiones en los ambientes lénticos que pertenecen a la misma. Así, se han analizado mediante experiencias de laboratorio y microcosmos cómo afectan los cambios de salinidad y temperatura





al representante más conspicuo de estos cuerpos de agua. Se evaluó la respuesta de *Brachionus plicatilis* ante la disminución y aumento de conductividad, generando rangos y óptimos en laboratorio que coincidieron con aquéllos observados en las poblaciones naturales de la región (conductividad mínima de 2 mS/cm y óptimos entre los 5 y 8 mS/cm), demostrándose así que la variación genética en cada cepa de esta especie es un factor clave para entender cómo ésta responde ante un disturbio determinado según su distribución geográfica, poniendo en evidencia la importancia de conocer entonces estos parámetros para las cepas locales. Para la misma especie se evaluó su desarrollo poblacional en respuesta a un cambio de temperatura. Los picos observados en la densidad para las poblaciones naturales de esta especie durante las temporadas de primavera-verano, muestran su preferencia por las temperaturas cálidas (25°C). Sin embargo, a nivel experimental pudo demostrarse que, en condiciones óptimas de salinidad esta especie también puede soportar temperaturas menores (15°C) manteniendo una población con menor densidad a lo largo del tiempo.

Finalmente se evaluó el efecto de pastoreo sobre el alga *C. vulgaris* por separado para especies de rotíferos (*B. plicatilis*), copépodos calanoideos (*Notodiaptomus incompositus*) y cladóceros (*Moina micrura*, *Diaphanosoma birgei* y *Simocephalus vetulus*) para éstos últimos en presencia y ausencia de vegetación sumergida. Se relacionó la biomasa de las distintas especies con su consumo y encontrándose una relación con los hábitos alimentarios de cada una de las especies, demostrando que *M. micrura* es un filtrador más eficiente respecto a *S. vetulus* y *B. plicatilis*. El copépodo *N. incompositus* a pesar de ser un raptor que debe capturar las partículas presentó valores similares a los de menor eficiencia filtradora, demostrando que este método de alimentación no constituye una desventaja. El rotífero *B. plicatilis*, a pesar de ser catalogado como filtrador poco eficiente, ha demostrado que con equivalente biomasa tiene una capacidad de consumo similar a los organismos de mayor porte como *S. vetulus* y *N. incompositus*, evidenciando de esta manera que es una especie a tener en cuenta a la hora de evaluar su efecto sobre el fitoplacton en los ecosistemas naturales ya que como se ha mencionado anteriormente es una especie que en la naturaleza puede alcanzar altas densidades en condiciones favorables.





## Abstract

Until now, most of the studies performed about the zooplankton community of the pampean lakes and rivers have been carried out in the context of annual or seasonal limnological investigations, analyzing aspects about its structure and biomass, in its spatial and temporal distribution, or focused on the analysis of relationships of its members or particular species with both vertebrate and invertebrate predators. The analysis of interspecific relationships between certain zooplankton and the incidence of control factors such as changes in conductivity, pH, temperature, among others, in the populations of key members of the community have been little or not analyzed at all. In studies performed in pampean shallow lakes in the context of the alternative states theory, notable differences have been reported in comparison with the results obtained in the Northern Hemisphere, for example, in the pampean region, the rotifers have always a prominent role. Moreover, in the Salado River and tributaries the composition of the zooplankton is similar to that recorded in lowland rivers in arid and semiarid regions of the world.

Field observations as well as laboratory experiments are essential to provide important tools for a good diagnosis of water bodies. Taking into account the numerous questions and the abundant number of players, this study will be focused on the factors with the greatest impact on the pampean lakes and rivers, such as changes in salinity, temperature, quantity and quality of food and the presence of submerged macrophytes (exclusively in lakes). Salinity and temperature are important factors in controlling pampean environments and extensive and intensive investigations have established that several rotifer species, mainly of the genus *Brachionus* dominate at different concentrations of salinity and at different seasons of the year. Food (quality and quantity of phytoplankton) is a limiting factor that causes a condition of hunger in grazers which can lead to a strong reduction in their populations, being as significant as the effect of vertebrate and invertebrate predation. The herbivorous zooplankton reduces algae density and changes the structure of the phytoplankton community in pampean environments. For this reason, the effect of rotifer grazers that reach considerable density and compete with non efficient cladocerans must be analyzed.

Taking into account the above mentioned points, the use of microcosm and laboratory experiments to examine interspecific relationships and to determine





the effect of some control factors are complementary experiences with field investigations already carried out. The main advantages of the experiments are linked to the replicability, speed processes, control of variables, and use of scales ranging from individuals to community. The microcosms, as live models, are the link between the reality details and the general system abstractions, revealing how systems are working.

In this study, it was possible to perform cultures of two Chlorophyceae species (*Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus acutus*), commonly used in laboratory cultures and in experiments as food for grazers. The growth rate was established for both species. In addition, the digitized count technique of algae was adjusted and optimized in order to simplify the data processing during the experimental phase. The algae density and the turbidity measurement were associated with a linear model that allowed the immediate monitoring of the cultures. The use of this innovative technique could be expanded to other algae species.

Cultures and their growth rates were established for some rotifer and cladoceran species present in the pampean lakes and rivers: *Brachionus plicatilis*, *B. calyciflorus*, *Euchlanis dilatata*, *Plationus patulus* and *Asplanchna sieboldii* among the rotifers and *Moina macrocopa*, *Macrothrix triserialis* *Alona glabra* and *Simocephalus vetulus* among cladocerans. The obtained values are in agreement with the occurrence of these species in nature, explaining why some of them dominate and others only occur at certain periods.

The strain of *Brachionus plicatilis* obtained in the Salado River shows a remarkable plasticity at different levels of conductivity coupled with its high growth rate allowing this species to predominate in most of the lotic sectors of the basin.

For this reason, we have analyzed by laboratory experiments the response of the most conspicuous zooplankton component of these bodies of water to salinity and temperature changes. We obtained the ranges and optimum value of conductivity for the species that coincided with those observed in natural populations of the basin (minimum conductivity of 2 mS/cm and optimum between 5 and 8 mS/cm), demonstrating that the genetic variation between each strain of this species is a key to understanding how it responds to a given disturbance according to its geographical distribution, highlighting the





importance of obtaining information for local strains. For the same species, population development was evaluated in response to a temperature change. The density observed in natural populations of this species during the seasons of spring and summer peaks show a preference for warm temperatures (25 ° C). However, it could be shown experimentally that, in optimal salinity this species can also withstand lower temperatures (15 ° C) to maintain a less dense population over time.

Finally, the effect of grazing was evaluated on the algae *C. vulgaris* separately for species of rotifers (*B. plicatilis*) calanoid copepods (*Notodiaptomus incompositus*) and cladocerans (*Moina micrura*, *Diaphanosoma birgei* and *Simocephalus vetulus*) to the latter in the presence and absence of submerged vegetation. Biomass of each species was related to its consumption and a relationship with the feeding habits of each species was found, showing that *M. micrura* is a more efficient filter in comparison with *S. vetulus* and *B. plicatilis*. The copepod *N. incompositus*, despite being a raptor that must capture particles, presented similar consumption values to those with minor filtering efficiency, showing that the copepod feeding behavior is not a disadvantage. The rotifer *B. plicatilis*, despite being considered as an inefficient filter, has shown that with an equivalent biomass it has a similar consumption capacity to larger sized organisms such as *S. vetulus* and *N. incompositus*. This demonstrates that this species can be taken into account when assessing its effect on phytoplankton in natural ecosystems due to its capacity to reach high densities in favorable conditions.





## Agradecimientos

A las instituciones y personas que hicieron posible la realización de este trabajo.

A la **Facultad de Ciencias Naturales y Museo**, por darme la posibilidad de realizar este trabajo doctoral en su nombre y al **CONICET** por haber sido el sostén económico para que pudiera llevarlo a cabo. Al **Instituto de Limnología Dr. Raúl A. Ringuelet** (ILPLA) por haberme permitido desarrollarlo en sus instalaciones y a sus directivos por su constante apoyo.

A mis directores María Cristina Claps y Néstor A. Gabellone. Estaré por siempre agradecida por haberme recibido en su grupo de investigación y por la posibilidad que me han brindado de emprender este trabajo, que era nuevo al menos para mí y que sin embargo ustedes confiaron en que iba a poder realizarlo. Gracias entonces por su confianza, por no haberla perdido y por apoyarme en mis decisiones. Por guiarme y corregirme, por darme la libertad de probar cosas y de equivocarme. Por estar siempre ahí, presentes. Quiero expresarles además la gran admiración que les tengo y hacerlo público en este, mi pequeño espacio.

Seguido a mis directores no podían faltar los “pichones”, mis hermosos compañeros de laboratorio (amigos y “colegas”): Lía, Hernán, Gaby, Sabi, Javi, Pana, Fer y Leo. Ustedes, sumados a Néstor y Cris, hacen que el laboratorio sea de verdad nuestro segundo hogar... trabajar y esperar a que llegue la hora del almuerzo para sentarnos alrededor de una misma mesa a charlar, reírnos e intercambiar opiniones no es algo que se vea comúnmente, asique agradezco ser parte de este hermoso grupo humano. Y por supuesto, mi agradecimiento hacia ustedes por toda su ayuda, sus consejos y el tiempo que me han dedicado, que también hicieron posible que llegue este momento. Y a vos Cris de nuevo un agradecimiento especial por tu paciencia, por “enseñarnos a volar”, por haber confiado en mí a pesar de mis locuras y por haber trabajado incansablemente este tiempo luego de mi retorno, por tus charlas de mujer que son tan valiosas como las profesionales, sos una gran mujer además de una gran científica y me siento afortunada de haber estado “bajo tu ala” en este aprendizaje.

A los chicos del Museo, en especial a Diego “Guti” y Verito Nuñez que fueron la inspiración en mis comienzos. Ustedes son una parte importante en mi formación y jamás me olvidaría de incluirlos, también les agradezco por esos años de trabajo y de enseñanza que fueron hermosos y me dieron la posibilidad de conocerlos.

Y luego de la parte profesional están aquellas personas que incansablemente nos apoyan, nos sostienen y nos toleran a pesar de nuestros faltazos y nuestros ánimos, que a veces son buenos y a veces no tanto. Aquellas personas que a pesar de no entender aún muy bien lo que hacemos se sienten orgullosas igual, esas personas que son tan importantes como nuestras guías profesionales, ya que en definitiva son nuestras guías en la vida y que nos mantienen son un pie en la tierra.





A mis viejos y mi hermano, por ser sencillamente incondicionales. No puedo expresar en palabras lo mucho que les agradezco, ustedes son mi primer pilar, me han tolerado y acompañado siempre, no tengo más que decirles gracias por estar ahí conmigo, los quiero más que a nada. Y a mi familia toda, aquella de sangre y de corazón que sonrío por cada triunfo y me ha palmeado y empujado a seguir en cada fracaso. Este logro es también gracias a todos ustedes.

A mis amigas y amigos que me llenan el corazón y que tengo la enorme fortuna de haberlos tenido al lado mío en este camino. A los de siempre Flor y Gastón que me esperan con un abrazo en cada retorno a mi ciudad natal. A mis eternas compañeras de estudio a las cuales esta facultad me unió y me han sostenido también en esta etapa (Ele, Nori, Mica, Vani, y Carlita, mis pequeñas Nati, Maru y Mumi), a mis chicas del “agua” incondicionales (Pana, Pau, Juli; Cari y Moni), a mis amigos que siguieron compartiendo horas de mates y consejos laborales allá, por Florencio Varela (Andrés, Diego y Ari). A mis “no tan normales” compañeros de estadística (Rodri, Mari, Gigia, Emi y Adri) que me han apoyado sin pensarlo en un momento decisivo de mi formación. Y a mi profe Anabella, por ayudarme a mantener la armonía.

Y a VOS, mi amigo, mi compañero de viajes y mi compañero de vida. Por tu ayuda, tu apoyo incondicional, tu paciencia, tu amor y tu confianza. Vos que confiaste en mí, que me acompañaste en esta etapa final y me empujaste para que siga adelante a pesar de ciertas adversidades. A Vos que estás ahí siempre, mi agradecimiento especial. Gracias por “ser vos” y serlo conmigo.

Y por último un agradecimiento especial al Dr. Sarma y la Dra. Nandini, quienes me recibieron y abrieron las puertas de su laboratorio, sus conocimientos y su grupo de trabajo. Y a mis amigos mexicanos a los cuales esta profesión me llevó a encontrarlos, a Rocío por haberme abierto las puertas de su casa y aún a la distancia ayudarme en este trabajo. Al igual que Vane, Diego, Aaron, Uriel, Brenda, César, Alma, Gerardo, Adan y al resto de los chicos del laboratorio que me recibieron y ayudaron en esos meses de estancia. Fue realmente un placer haber trabajado junto a ustedes y haber compartido su tiempo y su vida.

Muchas, muchas gracias!

Y finalmente a los jurados, la Dra. Santa Margarita Frutos, la Dra. Alicia Escalante y el Dr. Alberto Rodrigues Capítulo por dedicar su tiempo a las revisiones y generar aportes para el enriquecimiento de este manuscrito.





“Los científicos con imaginación creadora o creativa se caracterizan por su capacidad para encontrar ideas que conducen a soluciones originales e innovadoras y al mismo tiempo, realistas y útiles.”

P. Yúfera

# INTRODUCCIÓN GENERAL





## INTRODUCCION GENERAL

Los integrantes del zooplancton, tanto en ambientes lénticos como en lóticos, tienen un papel trascendental en la cadena trófica pelágica (Sommer et al., 2001; Gliwicz, 2002; entre otros).

La diversidad del zooplancton está influenciada por factores locales y regionales (Dodson, 1992; Hobaek et al., 2002) que incluyen características físicas y químicas del agua (Shurin et al., 2010; Claps et al., 2011; Wagner & Adrian, 2011), e interacciones interespecíficas (Shurin, 2000; 2001; Carpenter et al., 2001).

Estudios recientes han evaluado la biodiversidad global del zooplancton señalando que sus integrantes se ven afectados negativamente por las actividades humanas, que pueden llevar a una disminución de la diversidad o la extinción incluso local de algunas especies (Segers, 2008; Boxshall & Defaye, 2008; Forró et al., 2008). Sin embargo, el efecto de las actividades humanas no es similar entre los grupos zooplanctónicos debido a que su ecología e historia de vida son diferentes (Allan, 1976), mostrando respuestas divergentes a cambios ambientales, favoreciéndose a uno de ellos en detrimento del otro o estimulando la competencia entre ellos (Lampert & Sommer, 1997).

En lagos templados, el zooplancton presenta un patrón definido en su desarrollo sucesional y es repetible año tras año siendo factores fundamentales la temperatura, el alimento y la depredación por peces (Sommer et al., 1986), mientras que en lagos someros es más variable ya que además influyen otros factores como la turbidez y las precipitaciones, y las interacciones interespecíficas son más complejas (Rettig et al., 2006).

Dodson (1974) identificó el papel de peces e invertebrados depredadores en la regulación de la biomasa, el tamaño, y las estrategias reproductivas de crustáceos del zooplancton en lagos templados, perfeccionando la hipótesis de eficiencia del tamaño (Brooks & Dodson, 1965). En lagos subtropicales de USA se ha comprobado que el zooplancton está dominado por copépodos resistentes a la depredación y pequeños cladóceros (Havens & Beaver, 2011), reafirmando el modelo de tamaño decreciente con la latitud (Dodson, 1992). En estos ambientes, la riqueza de especies es relativamente alta y la biomasa total es escasa, con dominio de pequeños cladóceros, a veces ausentes en verano y baja proporción de la relación del zooplancton con la biomasa fitoplanctónica como respuesta a la





intensa depredación de peces, la palatabilidad algal y la temperatura estival. Hillbricht-Ilkowska (1977) observó que los valores más bajos de eficiencia de la producción del zooplancton herbívoro se obtienen en cuerpos de agua ultra-oligotróficos o eutróficos y sugirió que el predominio de nanoplancton en los lagos oligo y mesotróficos permite una alta eficiencia de consumo y producción de parte de los herbívoros, mientras que la mayor importancia de la cadena alimentaria del detritus en aguas eutróficas reduciría el pastoreo del fitoplancton. Asimismo, McCauley & Kalff (1981) postularon que la reducción en la proporción de nanoplancton con el aumento de trofia podría ser responsable de la disminución del cociente entre la producción del zooplancton respecto al fitoplancton.

El concepto de la cascada trófica fue aplicado por primera vez en sistemas pelágicos por Carpenter et al. (2001) para describir la influencia de los niveles superiores de la cadena trófica respecto a los inferiores y se ha convertido en una herramienta de restauración de lagos, incluso antes de que el concepto se formalizara como teoría. Con el fin de aumentar la transparencia del agua de los lagos eutrofizados, se eliminan a los peces zooplanctívoros para que prolifere el zooplancton herbívoro que a su vez controla al fitoplancton (Shapiro & Wright, 1984). Para la experimentación se utilizaron preferentemente mesocosmos, que respaldaron la teoría mientras que los resultados de manipulaciones en lagos no fueron del todo concluyentes (Benndorf, 1990; Brett & Goldman, 1996). En lagos someros, los peces planctívoros afectan negativamente a la biomasa de cladóceros, pero tienen poco o ningún efecto sobre la biomasa total del zooplancton y no se puede producir un efecto en cascada sobre el fitoplancton que promueve reducción de la transparencia. Según Gliwicz (2002), las fuerzas “top down” controlan la biomasa y la densidad zooplanctónica así como también el tamaño corporal de sus integrantes mientras que las fuerzas “bottom up” influyen en la tasa de crecimiento individual, en la de la asimilación y la reproducción.

Se considera que el zooplancton ayuda al fitoplancton en ambientes con limitación de nutrientes mediante la excreción de nutrientes disueltos y reduciendo la biomasa de algas palatables. El concepto de la limitación de nutrientes impulsada por el consumidor (Elser et al., 2001) reconoce la demanda de nutrientes para el crecimiento del zooplancton y la posibilidad de un desequilibrio entre la demanda de nutrientes por parte del zooplancton y el contenido de nutrientes de sus alimentos (Elser & Urabe, 1999). En un





pronunciado desequilibrio estequiométrico entre herbívoros y su alimento, algunos nutrientes serán retenidos en la biomasa de zooplancton en vez de ser reciclados, y la escasez de este nutriente para el fitoplancton será aún más pronunciado, mientras que el nutriente en exceso se recicla (Urabe et al., 1995). Los copépodos son generalmente más ricos en N, mientras que cladóceros son más ricos en P (Sommer & Sommer, 2006) por lo que el fitoplancton tendría limitación de P en presencia de *Daphnia* y de N si el dominio es de los copépodos (Feuchtmayr, 2004).

Hasta tres décadas atrás, el estudio del zooplancton se centraba principalmente en los crustáceos, principalmente en cladóceros del género *Daphnia* ya que son los herbívoros más importantes en lagos profundos mientras que a los copépodos y los rotíferos se los reconocía sólo a nivel regional. El descubrimiento de la red trófica microbiana (Pomeroy, 1974) implicó que existen uno o dos (nanoflagelados heterótrofos, ciliados, rotíferos) niveles tróficos entre el nanoplancton y los crustáceos planctónicos. Actualmente los crustáceos herbívoros son reconocidos como omnívoros, tomando en consideración el modo de alimentación individual y espectros de tamaño de alimento que se consideran más importantes que el carácter autótrofo o heterótrofo de la presa seleccionada. Los cladóceros herbívoros son filtradores que no pueden seleccionar las algas individualmente y para algunas especies de *Daphnia* el rango del alimento es de 1 a 20 - 30  $\mu\text{m}$  mientras que los copépodos seleccionan las partículas en forma individual, siendo los criterios de selección más importantes el tamaño de la presa, la motilidad y la calidad química (DeMott, 1988). Los copépodos tienden a alimentarse de algas de mayor tamaño que los filtradores pero evitan el consumo de algas tóxicas, con menor calidad nutricional o las que producen mucus o dinoflagelados (Mittra & Flynn, 2005). Los rotíferos, al ser mucho más pequeños que las especies de *Daphnia*, son importantes cuando los peces reducen la abundancia de este cladóceros debido a que los recursos pueden ser consumidos sin competencia por interferencia (Gilbert, 1985) ya que se alimentan dentro del espectro del tamaño de alimento de *Daphnia*.

En lagos someros, los rotíferos constituyen un eslabón importante en la cadena alimentaria (Gilbert, 1988). El desarrollo de los rotíferos está influenciado por factores abióticos y bióticos como por ejemplo la inestabilidad de la temperatura y salinidad del agua, la calidad del alimento, competencia y depredación (Dumont & Sarma, 1995; Rothhaupt, 1995; Kumar & Rao, 2001; Kumar, 2003). Algunos trabajos se han realizado para analizar el efecto





combinado de la temperatura y la salinidad sobre la dinámica poblacional de estos zooplanctones (Fernández-Araiza et al., 2005; Yin & Zhao, 2008). La depredación por parte de especies de *Asplanchna* y de copépodos ciclopoideos y calanoideos promueve una disminución estacional de las poblaciones de rotíferos y la sustitución de las especies (Brandl, 2005) más que la competencia por el alimento (Diéguez & Gilbert, 2002). Los cladóceros también pueden tener un efecto negativo debido a la interferencia mecánica en la toma de alimento (Gilbert, 1988; Fussmann, 1996; Kak & Rao, 1998; Nandini et al., 2002).

Los lagos someros del Hemisferio Norte pueden diferenciarse en aquellos dominados por macrófitas con o sin turbidez inorgánica y los dominados por el fitoplancton (Dokulil & Teubner, 2003; Rooney & Kalff, 2003). En estos ambientes se ha demostrado la existencia de dos estados alternativos de equilibrio determinados por la presencia o ausencia de macrófitas sumergidas, que promueve importantes cambios estructurales en el plancton tanto a nivel de productores como de herbívoros, provocando variación en la dinámica de nutrientes, con el consecuente cambio en el estado trófico (Goldsborough & Robinson, 1996; Cano et al., 2008). La presencia de macrófitas controla la acción de los pastoreadores (Jeppesen et al., 1997; Lauridsen et al., 1999). Cuando hay además macrófitas emergentes, éstas afectan la concentración de fósforo en el agua reduciendo la resuspensión desde los sedimentos (Horppila & Nurminen, 2001). Otro factor importante en la dinámica de las comunidades algales es la presencia de sustancias alelopáticas liberadas por las macrófitas sumergidas (Gross, 2003), mecanismo fundamental en el establecimiento y mantenimiento de la fase clara por Scheffer (1998).

El efecto de depredadores vertebrados e invertebrados (Matveev et al., 1989) sobre el zooplancton pastoreador es importante en la transición hacia el estado de equilibrio de aguas claras con macrófitas y menor eutrofización o de aguas turbias sin macrófitas y mayor eutrofización (Meijer et al., 1999; Scheffer et al., 1993). A partir de estas secuencias naturales y con técnicas de biomanipulación se ha logrado con éxito recuperar un gran número de lagos someros europeos (Jeppesen et al., 1991; Meijer & Hosper, 1997; Scheffer, 1998).

Cabe señalar que a pesar de la extensa existencia de literatura a escala mundial, ésta no se corresponde con las características particulares de los ambientes acuáticos presentes en nuestra región, no solamente por los protagonistas involucrados sino también por factores hidrometeorológicos implicados.





Las lagunas pampeanas se caracterizan porque su composición química está dominada por los aniones cloruro o bicarbonato y entre los cationes por el sodio influenciada por la litología de las cuencas (Miretzky et al., 2000). Los cambios en el nivel hidrométrico de las lagunas están vinculados al régimen de precipitaciones, estructuras hidráulicas para regular los efectos de inundaciones y sequías, el grado de vinculación con otros sistemas lénticos y el grado de conexión con un sistema lótico.

Según Quirós et al. (2002), al igual que en la diferenciación de lagos someros del Hemisferio Norte, se distinguen tres tipos de lagunas pampeanas: 1) aquellas dominadas por macrófitas sumergidas en un estado claro con una relativamente baja biomasa de fitoplancton, 2) las que no tienen vegetación sumergida y gran desarrollo de fitoplancton y son típicamente turbias, 3) las que presentan turbidez inorgánica que determinan ausencia de macrófitas sumergidas y escaso desarrollo del fitoplancton.

Se considera que las lagunas eran naturalmente claras por efecto de la vegetación sumergida, pero el aumento de las actividades humanas promovió que se volvieran más eutróficas (Sosnovsky & Quirós, 2006) y se convirtieran en turbias por fitoplancton o turbias inorgánicas (Quirós et al., 2002). Las algas nanoplanctónicas, principalmente flageladas dominan en las lagunas claras mientras que clorococales, diatomeas y cianobacterias lo hacen en las turbias por fitoplancton y los dos últimos grupos mencionados en las turbias inorgánicas (Allende et al., 2009; Silvoso et al., 2011).

De acuerdo a Casco et al. (2010), las lagunas pampeanas son resilientes a los cambios y que la alternancia de períodos húmedos y secos que ocurren naturalmente en la región las beneficia e impide una mayor eutrofización.

Los estudios realizados acerca de la estructura del zooplancton en las lagunas pampeanas son escasos, pudiéndose citar como pioneros los efectuados por Olivier (1961) y Ringuelet et al. (1972). En las últimas décadas, se han efectuado investigaciones en ambientes particulares como la laguna de Lobos (Boltovskoy et al. 1990), San Miguel (Gabellone et al. 2001; Solari et al. 2002), San Miguel del Monte (Benítez, 2008; Benítez y Claps 2000, Claps et al. 2002; 2004; 2011), Gómez y Carpincho (Rennella & Quirós, 2006), Lacombe (Ardohain, 2008; Ardohain et al., 2005), Chascomús (Diovisalvi et al., 2010), de Los Padres (Weigand, 2011). Todos los estudios pusieron de relieve la importancia de





rotíferos y estadios larvales de copépodos en la abundancia zooplanctónica de dichas lagunas. Asimismo, debe señalarse investigaciones en lagos someros de la provincia de La Pampa que incluyen ambientes subsalinos y salinos, por lo que la estructura del zooplancton puede ser similar a la de las lagunas previamente mencionadas en la provincia de Buenos Aires (Echaniz et al., 2008) o estar dominado por especies típicamente halófitas (Echaniz & Vignatti, 2002; Echaniz et al., 2006; 2013; Vignatti et al., 2007).

Asimismo, se han llevado a cabo estudios acerca de los efectos de depredadores principalmente peces en el zooplancton en experimentos “in situ” como González Sagrario & Balseiro (2003), experimentos en mesocosmos “ex situ” (Boveri, 2009) o del análisis de ambas comunidades (Rennella & Quirós, 2002; Chaparro, 2013). Las investigaciones que involucran la utilización de mesocosmos en las lagunas para evaluar relaciones tróficas con el fitoplancton son aún más escasas (González Sagrario & Balseiro, 2002; Sinistro et al., 2007; Llames et al., 2009; Fontanarrosa et al., 2010).

En el marco de la hipótesis de los estados alternativos, se pueden citar trabajos que analizan el efecto protector de las macrófitas sumergidas para el zooplancton (González Sagrario et al., 2009), relaciones tróficas en lagunas claras y turbias (Sosnovsky et al., 2010) o la distribución vertical de los rotíferos planctónicos (Claps et al., 2011).

También se han estudiado patrones de migración del zooplancton en su conjunto (Benítez & Claps, 2009; 2012) o de determinadas especies (Weigand & Escalante, 2008).

En ríos de llanura como el río Salado (Buenos Aires), en contraposición con lo que ocurre en los lagos, el zooplancton está expuesto a la deriva, a cambios bruscos de temperatura, a la turbulencia que pueden ser obstáculos para el mantenimiento de las actividades de alimentación, de depredación, y de reproducción (Dickerson et al., 2010).

Las llamadas “zonas muertas” que incluyen sectores del cauce con menor velocidad de corriente y la planicie de inundación son aprovechadas por los zooplanctones para la reproducción (Davidson Jr. et al., 2000; Lair, 2006) mientras que los crustáceos realizan migraciones diarias tanto verticales como laterales en los ríos similares a las efectuadas en los lagos (Casper & Thorp, 2007).

Se ha comprobado que en verano con bajo caudal, el zooplancton está más controlado por factores bióticos (Rossetti et al., 2009; Bertani et al., 2012) que





por los abióticos señalados previamente y que en esas circunstancias la composición fitoplanctónica está regulada por el pastoreo de los herbívoros (Goselain et al., 1998) mientras que la competencia y depredación definen la estructura zooplanctónica.

El zooplancton se recupera rápidamente después de eventos de perturbación como son los incrementos de caudal, lo que evidencia la importancia de los mecanismos de autorregulación en las poblaciones que lo integran (Rossetti et al., 2009).

Los rotíferos predominan tanto en riqueza específica como en abundancia. Los braquiiónidos (*Brachionus* y *Keratella*) son los más destacados. El predominio de los rotíferos está vinculado a su menor susceptibilidad a los efectos de los sólidos en suspensión respecto a los crustáceos (Kirk & Gilbert, 1990; Holst et al., 2002), aunque especies de *Bosmina* y quidóridos pueden ser abundantes.

Se ha demostrado que el incremento de la biomasa del zooplancton debido al aumento de los crustáceos está en relación directa con la “edad del agua” (mayor tiempo de residencia del agua) (Baranyi et al., 2002).

Los estudios que involucran al zooplancton en ambientes de la provincia de Buenos Aires son muy escasos, pudiéndose mencionar los realizados en la cuenca Delta (Modenutti & Claps, 1988; Modenutti, 1991), en la cuenca del río Samborombón (Modenutti, 1998), en ambientes lóticos contaminados (Modenutti, 1987a; 1987b; Castañe et al., 1998; Olgún et al., 2004).

En la cuenca del río Salado se han efectuado investigaciones acerca del zooplancton en forma extensiva en toda la cuenca (Neschuk et al., 2002 a; Neschuk et al., 2002 b; Claps et al., 2009) y en sectores particulares de la misma (Gabellone et al. 2001; Solari et al. 2002; Dippolito et al., 2010; Gabellone et al., 2014). Como resultado de estos estudios se ha reconocido la contribución de inóculos al potamoplancton efectuada por ambientes lénticos asociados al río (Gabellone et al. 2001; 2003; Solari et al. 2002) y que la composición específica de los rotíferos responde a factores como la temperatura, conductividad, caudal y la disponibilidad de algas palatables (Neschuk et al., 2002 a; Claps et al., 2009; Gabellone et al., 2014).

Como lo ha señalado Bertolo (1998), los estudios en laboratorio o mesocosmos reducen al mínimo los efectos de confusión, siendo óptimos para el estudio de determinados parámetros (efectos de la luz, reciclaje, kairomonas). La comparación de los sistemas simples (mesocosmos) con modelos teóricos sencillos y sistemas naturales complejos parece ser un camino prometedor para





la mejora de nuestros conocimientos sobre el funcionamiento de los ecosistemas acuáticos (Bertolo et al., 1999). Los resultados son alentadores a pesar del pequeño número de repeticiones y la relativa simplicidad. Son adecuados para estudiar los mecanismos de estructuración de los sistemas ecológicos. Los sistemas naturales mucho más complejos es poco probable que respondan en forma tan lineal como los sistemas experimentales. Si se tiene en cuenta la heterogeneidad de los sistemas en los experimentos, la controversia sobre las escalas más apropiadas en ecología (replicación vs realismo) es probablemente un falso debate. Los mesocosmos pueden considerarse versiones “mínimas” de los ecosistemas y comprender las simplificaciones en que trabajan es probablemente un buen enfoque.

Sommer et al. (2001) definen que los experimentos a escala de mesocosmos son necesarios en lugar de estudios de campo comparativos o manipulaciones de lagos para poder diferenciar el efecto pastoreador de los integrantes del zooplancton ya que la exclusión total de los tipos funcionales de zooplancton es imposible cuando el zooplancton se manipula indirectamente eliminando los peces. Incluso los ensayos deben ser breves para analizar la respuesta del fitoplancton sin permitir una retroalimentación al cambiar los patrones de crecimiento del zooplancton. Una mayor duración de los experimentos posibilita que algas no palatables inicialmente indetectables dominen la biomasa.

La utilización de experiencias de laboratorio y microcosmos para analizar relaciones interespecíficas así como determinar el efecto de algunos factores de control son experiencias complementarias con las investigaciones a campo (Carpenter, 1996) ya realizadas y sus principales bondades radican en la replicabilidad, velocidad de los procesos, control de las variables, y utilización a escalas de individuos y comunitarias (Drake et al., 1996; Huston, 1999). Debido a las ventajas de replicabilidad, control y bajo costo, los microcosmos han sido utilizados en todas las áreas de la ecología moderna. Drake et al. (1996) y Huston (1999) definen los rasgos positivos que tiene este tipo de estudio en el conocimiento, principalmente a escala comunitaria, ya que en estas investigaciones los fenómenos registrados en el campo son exhaustivamente examinados en el laboratorio extendiendo y ajustando el conocimiento del rango dinámico de mecanismos y procesos. Los objetivos de utilizar esta metodología son generar nuevas hipótesis, testear predicciones teóricas, entender mecanismos causales en definitiva integrar las piezas conceptuales en una





ciencia. En todo momento, se deja claro que este tipo de investigación no reemplaza a las de campo sino que las complementa ya que ninguna de las dos alcanza de manera individual para conocer el sistema en forma completa. Como modelos vivos los microcosmos tienden un puente entre los detalles de la realidad con las abstracciones de los sistemas generales, revelando los principios de las vías en que todos los sistemas trabajan (Beyers & Odum, 1993).

A nivel mundial, existe una vasta bibliografía de trabajos experimentales referentes a integrantes particulares del zooplancton, siendo algunos de los pioneros los realizados por Starkweather (1981), Sarma (1985), Miracle & Serra (1989), Stemberger (1990), Sarma & Rao (1991).

Hay escasos antecedentes en lo referente a experiencias acerca de relaciones interespecíficas (depredación, herbivoría, etc.) de integrantes conspicuos del zooplancton de lagunas y ambientes lóticos bonaerenses. Pueden señalarse las realizadas acerca de *Keratella tropica* (Marinone & Zagarese, 1991; Zagarese & Marinone, 1992), *Daphnia spinulata* (Ardohain, 2008; Benítez, 2008, Ruiz et al., 2008) y *Notodiaptomus incompositus* (Weigand, 2011)

A partir del estudio de los ambientes someros pampeanos en el marco de los estados alternativos se han vislumbrado diferencias con lo registrado en el Hemisferio Norte (Jeppesen et al., 2005) dando como origen a interrogantes que solamente se pueden responder en un marco experimental en el laboratorio que permite un control más acabado de algunos de los factores involucrados. Se ha comprobado en el campo de acuerdo a la fase del equilibrio alternativo en que las lagunas se encuentren, que en el caso de los rotíferos existen diferencias muy notorias respecto a la composición y densidad alcanzada (Ardohain et al., 2005).

El zooplancton herbívoro reduce las algas y cambia la estructura de la comunidad, siendo importante en la mayoría de los lagos la acción de los cladóceros de mayor porte, mientras que en las lagunas pampeanas debe analizarse por ejemplo el efecto de los rotíferos que alcanzan una densidad considerable que compiten con especies de cladóceros consideradas poco eficientes (especies del género *Diaphanosoma*, *Moina*, *Simocephalus*, *Alona*). En general se considera que cuando la densidad de pastoreadores es baja, se promueve la presencia de algas grandes y menos palatables, mientras que si el pastoreo es considerable, esto no ocurre, ya que estas algas son eliminadas antes de alcanzar su tamaño máximo, por no poder evitar los pastoreadores. También hay que tener en cuenta que cuando el ambiente acuático presenta elevada





concentración de nutrientes, las algas se ven beneficiadas y el efecto de los pastoreadores sobre el fitoplancton es menos evidente (Burks et al., 2002).

La composición específica del zooplancton en los ríos de llanura del mundo es muy similar (Basu & Pick, 1997) debe tomarse en cuenta que las poblaciones locales pueden tener respuestas muy diferentes frente a factores abióticos (por ejemplo temperatura y salinidad) y bióticos (por ejemplo pastoreo).

En los ríos, cada especie tiene un conjunto de óptimos, que se pueden alcanzar sólo por un tiempo relativamente corto y que se refleja en un rápido incremento en la densidad por lo que es vital conocer la biología de los zooplanctontes más destacados (Lair, 2006).

Por todo lo expuesto la utilización de experiencias de laboratorio y microcosmos para analizar relaciones interespecíficas así como para determinar el efecto de algunos factores de control son experiencias complementarias con las investigaciones a campo (Carpenter, 1996) ya realizadas y brindarán información valiosa para el conocimiento integral de los ambientes lénticos y lóticos pampeanos.

#### HIPÓTESIS GENERAL

Las variaciones naturales que se producen en variables abióticas y bióticas del ambiente así como las promovidas por actividades antrópicas influyen en los patrones de diversidad del zooplancton en ambientes lénticos y lóticos pampeanos, siendo que especies de los principales grupos zooplanctónicos (rotíferos, cladóceros y copépodos) responden a esos cambios con modificaciones en su dinámica poblacional.

La respuesta del zooplancton frente a un cambio en las condiciones ambientales está relacionada a características fisiológicas de sus integrantes y a la variación genética presente para hacer frente a dicha modificación. Como resultado de esta respuesta se producen variaciones espaciales y temporales en la estructura y dinámica de la comunidad.

Las observaciones que se realizan en el campo, al igual que los experimentos, son esenciales para proveer importantes herramientas en la realización de una buena diagnosis de los cuerpos de agua (Scheffer & Carpenter, 2003) a pesar del carácter caótico del plancton que implica que su dinámica sea intrínsecamente poco previsible (Scheffer et al., 2003).






## OBJETIVOS

- ✓ Establecer la tasa de crecimiento de rotíferos y cladóceros integrantes del zooplancton de lagunas y ríos pampeanos. Los integrantes de la comunidad suelen mostrar diferencias en su abundancia (Rusak et al., 1999) o en su permanencia en el tiempo por lo cual es vital conocer sus características poblacionales a nivel regional porque se ha demostrado que las cepas no responden siempre de la misma manera (Gilbert, 1990; Kotani & Hagiwara, 2003; Jung, 2011; entre otros).
- ✓ Analizar mediante experiencias de laboratorio y microcosmos los factores claves responsables de los cambios en la estructura y dinámica del zooplancton de lagunas y ambientes lóticos pertenecientes a la cuenca del río Salado. Los factores forzantes pueden deberse tanto a condiciones hidro-meteorológicas como a biológicas internas o a una combinación de ambas (Claps et al., 2004; 2009; 2011).

Dado que los interrogantes son numerosos y abarcan un abundante número de intérpretes, se ha decidido focalizar el estudio en factores que presentan mayor incidencia en las lagunas pampeanas y el río Salado como son la variación de la salinidad y de la temperatura y la disponibilidad de alimento de algunos de los principales zooplanctontes.



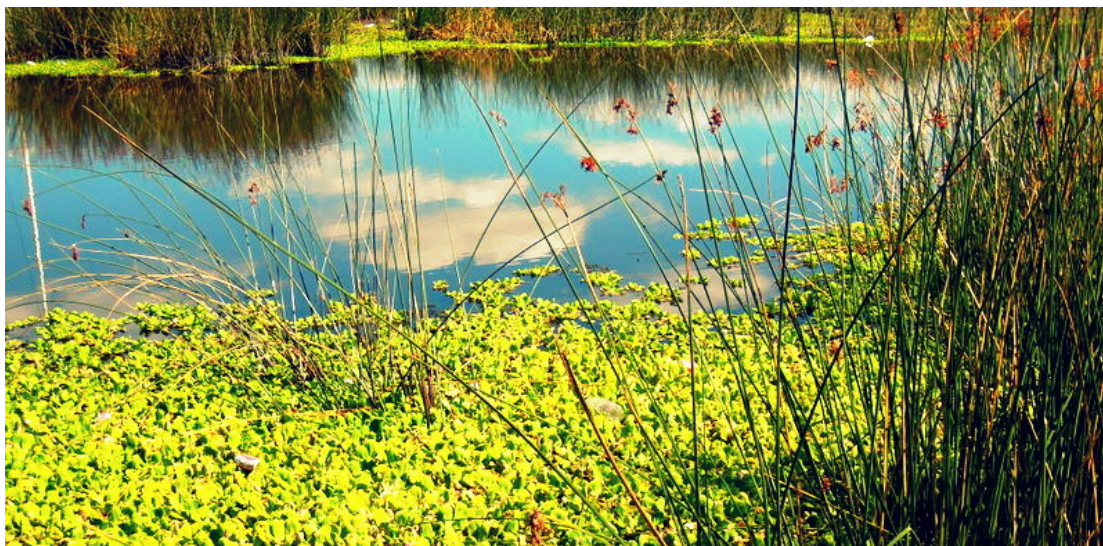



“La ciencia es el simple sentido común llevado al máximo:  
observación cuidadosa y rigor ante las falacias lógicas.”

T.H. Huxley

# I

## FITOPLANKTON



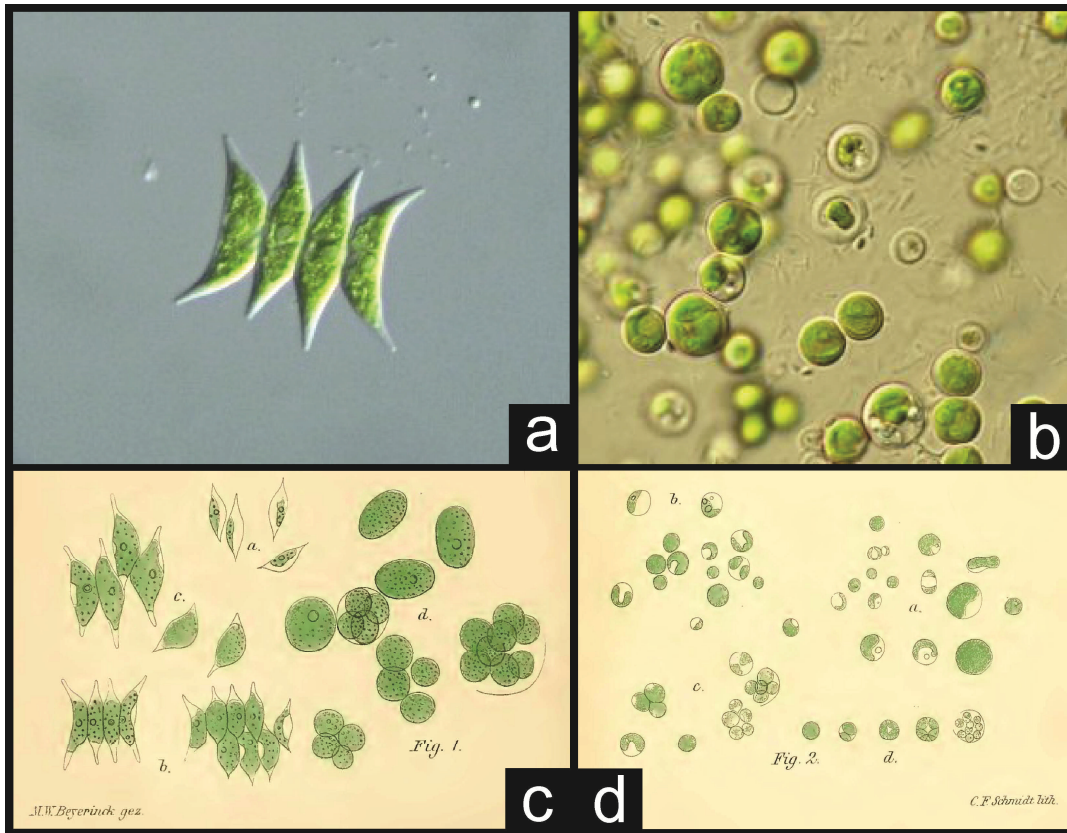


## Capítulo I: Fitoplancton.

*Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus acutus* son dos especies de algas clorofíceas planctónicas presentes en cuerpos de agua tanto lénticos como lóticos de la cuenca del Río Salado (Solari et al., 2002; Bazzuri et al., 2010; Solari et al., 2014). Una de las principales características e importancia de estas especies es su palatabilidad para los herbívoros del zooplancton (Ahlgren et al., 1990; Mayeli et al., 2004). Por esta razón han sido muy utilizadas como alimento vivo en cultivos de rotíferos, copépodos y cladóceros; así como en experimentos en laboratorio, incluyéndolas como un factor biótico influyente en la dinámica poblacional de muchas especies (Morales Ventura et al., 2012).

*Chlorella vulgaris* se caracteriza por presentar un rápido crecimiento en cultivo y por su capacidad de utilizar compuestos orgánicos e inorgánicos como sustrato nutricional (Xu et al., 2006; Chinnasamy et al, 2010). Por estos motivos, especies de *Chlorella* han sido ampliamente estudiadas para incluirlas en procesos biotecnológicos. Se utilizan como agente de remediación (Travieso et al, 2006; Manisha, 2007; Altenburger et al, 2008) y de retención del dióxido de carbono atmosférico (Converti et al, 2009; Brennan & Owende, 2010). También son utilizadas en la producción de agentes químicos específicos como oxígeno, fármacos, pigmentos, carbohidratos o lípidos (Lee & Palsson, 1994; Chisti, 2007; Converti et al, 2009; Brennan et al, 2010; Mata et al, 2010). Una de las aplicaciones de mayor proyección a nivel económico y ecológico es la producción de biocombustibles como fuente energética alternativa y de mayor sustentabilidad (Brennan et al, 2010; Mata et al, 2010; Pittman et al, 2011; Singh et al, 2011). Y en lo que a las ciencias biológicas compete, es utilizada como alimento del zooplancton, moluscos, microcrustáceos, peces, y otros grupos de interés (De Pauw et al, 1984; Shah et al, 2003; Brennan et al, 2010; Mata et al, 2010).

Los representantes del género *Scenedesmus* constituyen un modelo para estudios de plasticidad fenotípica ya que son normalmente unicelulares en la naturaleza, pero puede producir cenobios de dos, cuatro, o más células en respuesta a diversos factores abióticos y bióticos. En muchos casos se considera como una defensa a la depredación por parte de los zooplanctontes aunque las ventajas y desventajas (incremento de la tasa de sedimentación y dificultad en la toma de nutrientes) asociadas con la formación de cenobios todavía no se conocen bien (O' Donnell et al., 2013).



**Figura 1: Fotografías de *Scenedesmus acutus* (a) y *Chlorella vulgaris* (b); y dibujos tomados de Beyerinck, 1890 (c) y (d).**

Como primer paso antes de desarrollar los cultivos y las experiencias con los zooplanctones se debió ajustar las técnicas de cultivo en condiciones controladas de laboratorio y evaluar el crecimiento poblacional de ambas especies. Asimismo, se planteó ajustar las técnicas de recuento que permitan una más rápida y eficiente metodología para poder ser utilizada posteriormente en la parte experimental.

## 1. Cultivos en condiciones controladas de laboratorio

### 1.1. Cultivo de *Chlorella vulgaris* en diferentes condiciones lumínicas.

Se probaron tres condiciones lumínicas:

- 1) Luz Natural
- 2) Luz Fluorescente
- 3) Diodos Emisores de Luz (LEDs).

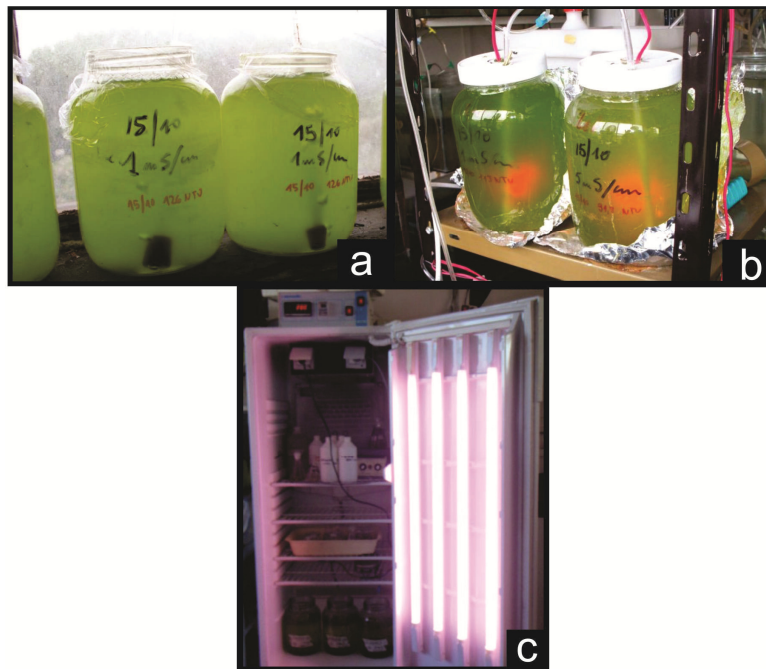




La condición de LUZ NATURAL se obtuvo directamente a través de la ubicación de los frascos para recibir la luz del sol a través de una ventana y por lo tanto tuvo un fotoperíodo natural (primavera), mientras que las 2 restantes se establecieron en condiciones controladas de laboratorio. La LUZ FLUORESCENTE se proporcionó mediante cuatro tubos (40W) colocados dentro de una cámara de incubación donde se controló el fotoperíodo, permitiendo una iluminación continua (fotoperíodo 24:0). Y finalmente el tercer tipo de iluminación (LED) se aplicó aislando cada frasco de cultivo de la luz natural por medio de papel de aluminio y se le colocó en la parte superior una placa con 8 LEDs, cada uno de 1100 mCd y 660 nm. La iluminación en este caso también fue continua (Fig. 2).

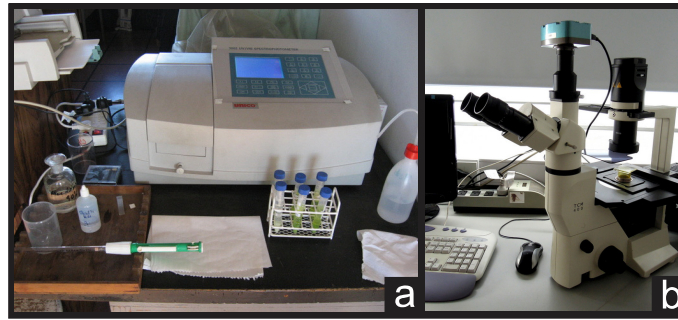
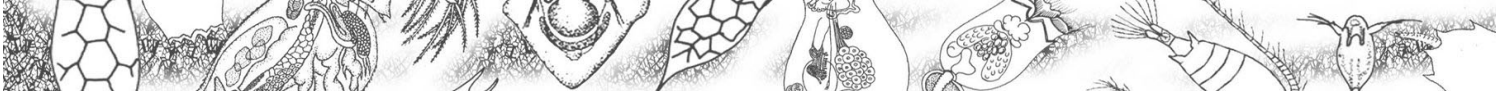
Para prevenir la sedimentación de las algas se instalaron aireadores en forma permanente en los tres tipos de cultivo. La turbidez de cada cultivo fue monitoreada a diario por medio de un turbidímetro de laboratorio Hatch (2100P) y medida en unidades nefelométricas (NTU).

La densidad algal se estimó mediante conteos con microscopio invertido (Labomed) de las alícuotas obtenidas de cada cultivo y previamente fijadas con lugol (1%) para favorecer su sedimentación en las cámaras de Utermöhl (APHA, 1995). Se estimó también la biomasa algal por análisis espectrofotométrico de clorofila "a" de cada uno de los cultivos (Fig. 3).



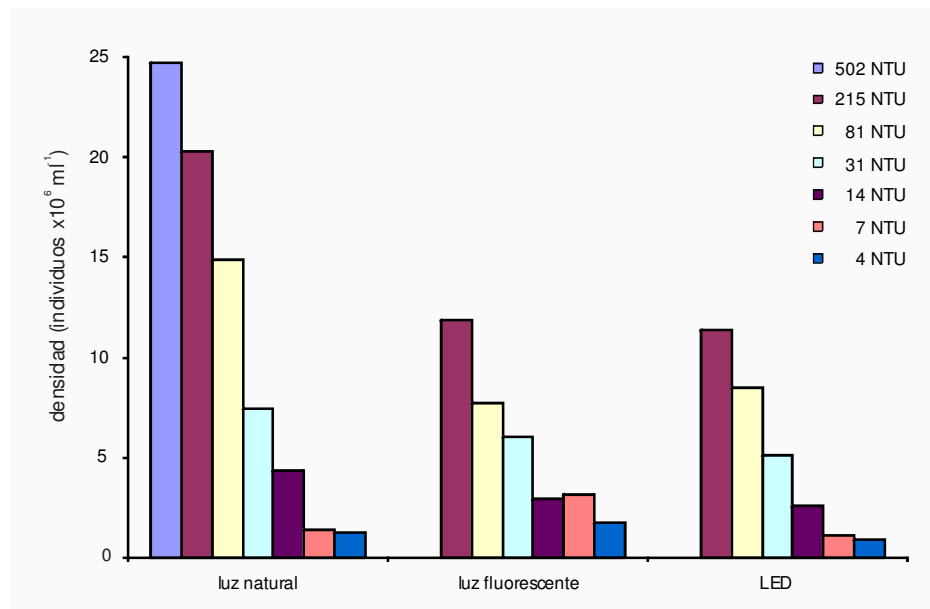
**Figura 2: Cultivos de *Chlorella vulgaris* con diferentes condiciones lumínicas. a) Luz Natural; b) LEDs; c) Luz Fluorescente.**





**Figura 3: a) espectrofotómetro para medición de clorofila; b) cámaras de Utermöhl en microscopio invertido para el recuento de células.**

Al finalizar la incubación, los tratamientos expuestos a luz natural alcanzaron aproximadamente el doble de turbidez (500 NTU) y densidad algal ( $25 \times 10^6$  individuos/ml) que los tratamientos realizados con luz artificial con densidad promedio de  $12 \times 10^6$  individuos/ml aproximadamente para la máxima turbidez alcanzada de 214 NTU (Fig. 4).



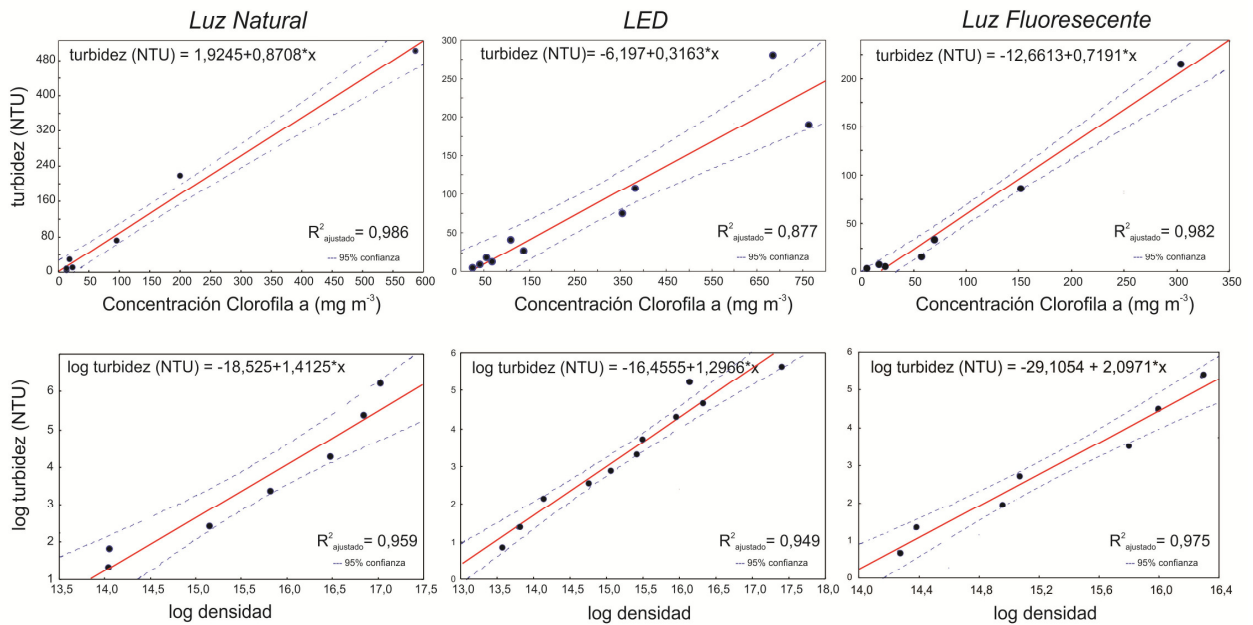
**Figura 4: Densidad algal en los distintos niveles de turbidez de las tres condiciones lumínicas para el cultivo.**

Por medio de las rectas de regresión y el coeficiente de correlación de Pearson calculado para cada tipo de luz en relación a la turbidez y a la concentración de clorofila “a” se observó que las relaciones entre turbidez~clorofila y turbidez~densidad fueron significativas ( $p < 0,05$ ) (Fig. 4).





Para el caso de la clorofila se observa una relación similar entre el tratamiento de LUZ NATURAL y LUZ FLUORESCENTE ( $R_{ajustado} = 0,98$ ) a pesar de que la segunda como se mencionó anteriormente alcanzó la mitad de la turbidez, sin embargo la relación de ambas sugiere que a niveles bajos de turbidez la concentración de clorofila “a” es similar en ambas técnicas. Para el caso de la luz de tipo LED la relación entre ambas variables fue alta ( $R_{ajustado} = 0,87$ ) pero menor y con menor pendiente a las anteriores evidenciando que a mayores niveles de Cl “a” a menores niveles de turbidez. Respecto a la densidad se transformaron las variables a logaritmo para cumplir con la relación lineal y se pudo observar que las rectas fueron similares entre las fuentes lumínicas ( $R_{ajustado} = 0,92$  a  $0,95$ ) con el mejor ajuste en ambos tipos de luz artificial (Fig. 5, tabla 1).



**Figura 5: Relación entre la densidad algal y la clorofila respecto a niveles de turbidez en las tres condiciones lumínicas para el cultivo.**

**Tabla 1: Resultado de las regresiones realizadas para la clorofila “a” y el log de la densidad para cada tipo de luz, resumiendo el coeficiente de Fisher, la probabilidad y el R2 ajustado para cada uno.**

	Luz Natural	LED	Luz Fluorescente
<b>Cl a</b>	F <sub>1,5</sub> = 441,77 p < 0,0000 R <sup>2</sup> <sub>ajust</sub> = 0,986	F <sub>1,8</sub> = 65,33 p < 0,00004 R <sup>2</sup> <sub>ajust</sub> = 0,877	F <sub>1,5</sub> = 336,66 p < 0,0000 R <sup>2</sup> <sub>ajust</sub> = 0,982
<b>Log Densidad</b>	F <sub>1,5</sub> = 4 p < 0,0001 R <sup>2</sup> <sub>ajust</sub> = 0,959	F <sub>1,5</sub> = 4 p < 0,0000 R <sup>2</sup> <sub>ajust</sub> = 0,949	F <sub>1,5</sub> = 4 p < 0,0000 R <sup>2</sup> <sub>ajust</sub> = 0,975





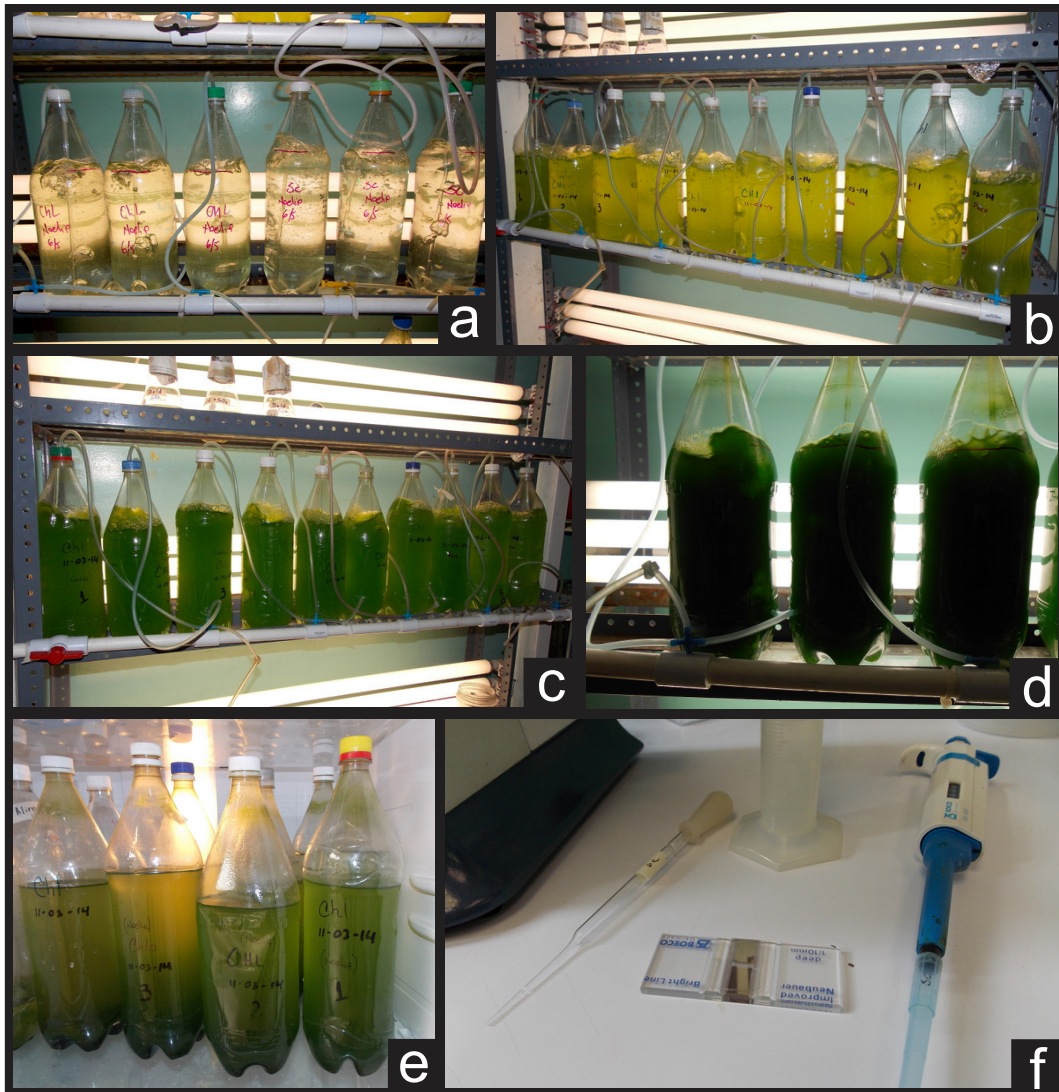
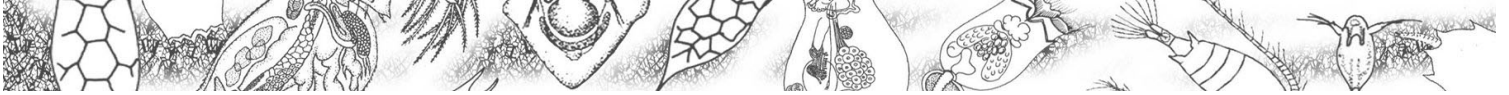
## 1.2. Cultivo de *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus acutus* en medio Bold.

En una segunda etapa se realizaron cultivos de ambas microalgas, *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus acutus* en medio Bold basal (Nichols, 1973). Se utilizaron 10 recipientes transparentes de dos litros de capacidad donde se colocaron 30 ml de los nutrientes en las proporciones requeridas (Tabla 2), y se completaron con 1,8 l de agua destilada. Posteriormente se sembraron con 5-10 ml de un cultivo puro de cada alga. Se agregaron 0,5 mg de bicarbonato de sodio ( $\text{NaHCO}_3$ ), y se repitió esta aplicación día por medio hasta finalizar el cultivo a fin de regular el pH del medio. Se mantuvieron con aireación continua para evitar la sedimentación de las células y luz fija (24 horas) proporcionada por lámparas fluorescentes de luz blanca (60 watts) (Fig. 6). Se monitoreó a diario la densidad de las algas por conteos mediante cámara de Neubauer (Guillard, 1978). Una vez que la población alcanzó la fase estacionaria de crecimiento, se retiraron los cultivos para evitar el descenso poblacional y la contaminación del cultivo y se conservaron en heladera a  $4 \pm 1^\circ\text{C}$ .

**Tabla 2: Nutrientes con las respectivas proporciones para la preparación del medio de cultivo basal Bold.**

<b>Cultivo Bold Basal (Nichols, 1973)</b>			
1.- $\text{NaNO}_3$	250 g $\text{L}^{-1}$	8.- $\text{H}_3\text{BO}_3$	1,42 g $\text{L}^{-1}$
2.- $\text{MgSO}_4$	75 g $\text{L}^{-1}$	9.- $\text{CaCl}_2$	25 g $\text{L}^{-1}$
3.- $\text{K}_4\text{HPO}_4$	75 g $\text{L}^{-1}$	10.- Elementos traza:	
4.- $\text{KH}_2\text{PO}_4$	75 g $\text{L}^{-1}$	a) $\text{ZnSO}_4$	8,82 g $\text{L}^{-1}$
5.- $\text{NaCl}$	75 g $\text{L}^{-1}$	b) $\text{MnCl}_2$	1,44 g $\text{L}^{-1}$
6.- EDTA	50 g + 31 g $\text{KOH L}^{-1}$	c) $\text{MoO}_3$	0,71 g $\text{L}^{-1}$
7.- $\text{FeSO}_4$	4,98 g $\text{L}^{-1}$ + (1ml 31g $\text{H}_2\text{SO}_4 \text{L}^{-1}$ )	d) $\text{CuSO}_4$	1,75 g $\text{L}^{-1}$
		e) $\text{Co}(\text{NO}_3)_4$	0.49 g $\text{L}^{-1}$



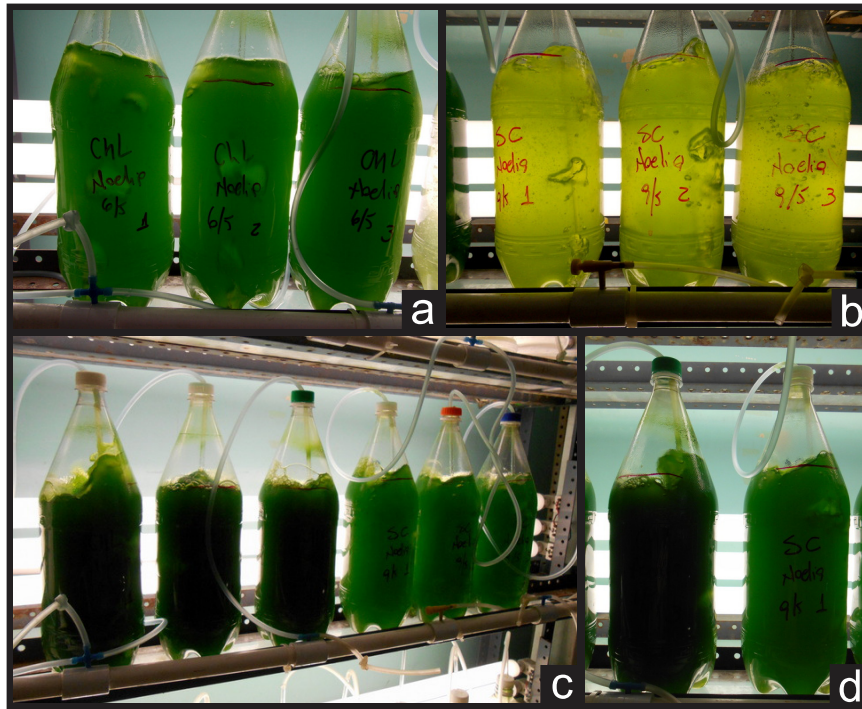
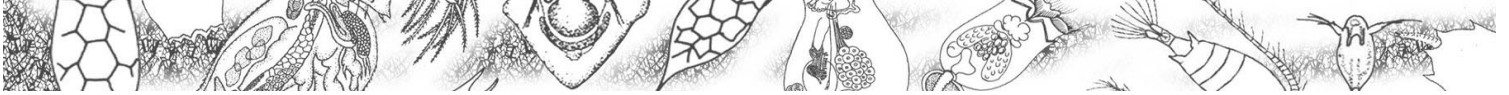


**Figura 6: Cultivos de microalgas. a) día 0; b) día 3; c) día 5; d) día 7; e) almacenamiento/refrigeración; f) material de conteo- pipetas y cámara de Neubauer.**

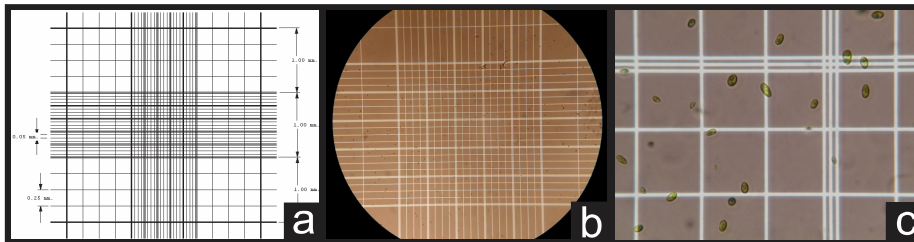
## 2. Crecimiento poblacional de *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus acutus*.

Con el fin de conocer la dinámica poblacional de estas especies de microalgas, se efectuó un experimento en condiciones controladas de laboratorio. Se colocaron por triplicado recipientes de cultivo en medio Bold basal con el mismo procedimiento que se describió en el apartado anterior. El experimento finalizó una vez alcanzada la fase estacionaria, la cual fue similar en ambas especies (10 días) (Fig. 7). El seguimiento del cultivo se realizó mediante conteos diarios y por triplicado de las células en cámaras de Neubauer con microscopio óptico (Fig. 8).





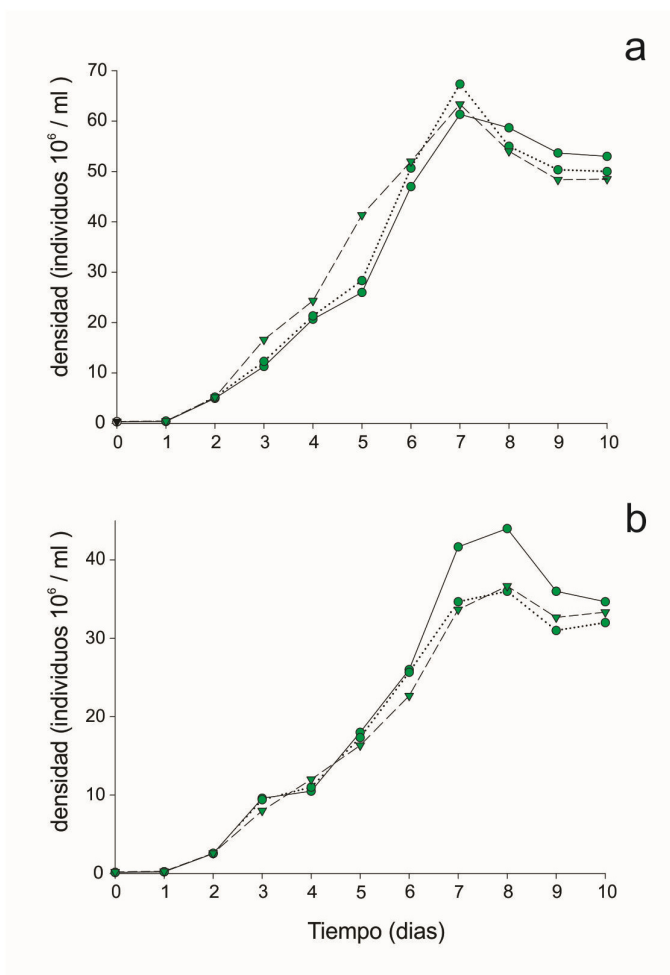
**Figura 7: Cultivos de *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus acutus*: experimento de crecimiento poblacional. a) *C. vulgaris* día 3 (fase exponencial); b) *S. acutus* día 3; c) ambas especies día 5 (fase exponencial); d) día 7 final de experimento (fase estacionaria)**



**Figura 8: Cámara de Neubauer. A) esquema de superficie de conteo; b) vista con microscopio óptico (4x); c) detalle de células de *Chlorella vulgaris* (40 x).**

Se realizaron curvas de crecimiento poblacional (Fig. 9) que mostraron en ambas especies, una fase de crecimiento exponencial durante los primeros 7 días, y una posterior fase estacionaria entre los días 8 a 10. En este caso, y por ser un experimento, fue necesario prolongar el estudio más allá de los 7 días para evidenciar el momento exacto en el que la población alcanza su punto máximo y comienza a decaer numéricamente. Se pudo observar que si bien los días en los que se desarrolla cada fase son similares, *Chlorella vulgaris* creció un 40 % más que *Scenedesmus acutus*. Alcanzando *C. vulgaris* un máximo de  $67,33 \times 10^6$  individuos/ml, mientras que el pico máximo de *S. acutus* fue de  $41,67 \times 10^6$  individuos/ml.

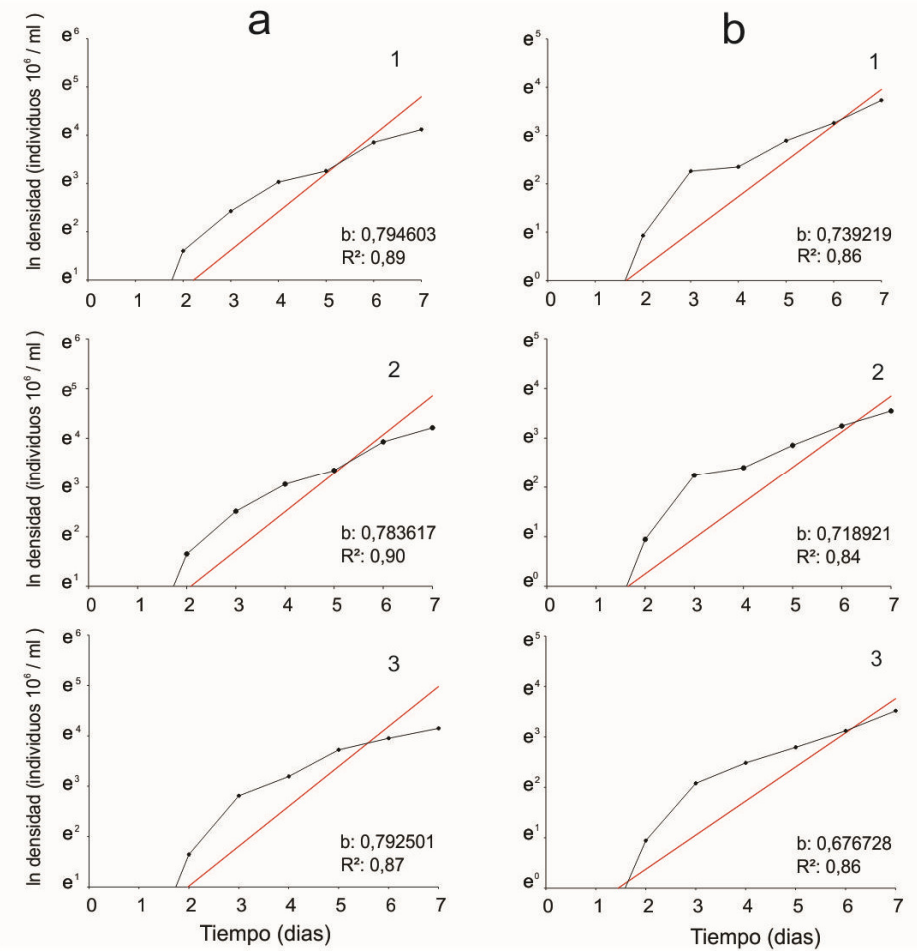




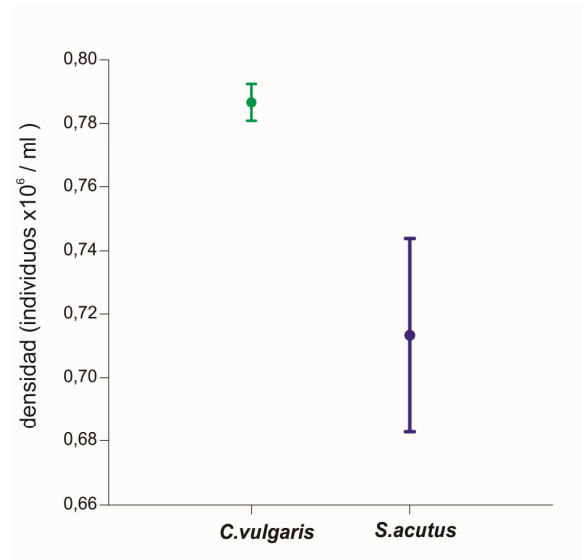
**Figura 9: Curvas de crecimiento poblacional de *Chlorella vulgaris* (a) y *Scenedesmus acutus* (b).**

La tasa de crecimiento poblacional ( $r$ ) de ambas especies se calculó por el método de la pendiente a partir de la recta de regresión obtenida de la curva de crecimiento poblacional en su fase exponencial y en relación al logaritmo natural de la densidad (Cabrera, 2008). Los valores de dicha pendiente oscilaron entre los 0,78 y 0,79 para *Chlorella vulgaris* y entre 0,67 y 0,73 para *Scenedesmus acutus* (Fig. 10). Para testear si estas cifras fueron estadísticamente diferentes entre sí se realizó un análisis de la varianza de una vía, el cual evidenció diferencias significativas ( $F_{1,4} = 16,69$ ;  $p = 0,015$ ) para la tasa de crecimiento entre ambas especies, con los mayores valores promedio para *C. vulgaris*. El test a posteriori realizado (Fig. 11) mostró de manera gráfica estas diferencias y donde también pudo observarse una menor variación y mejor ajuste de los datos en el caso de *C. vulgaris*, lo que puede sugerir que esta cepa sería más fiable a la hora de su utilización en laboratorio.





**Figura 10: Curvas de crecimiento poblacional durante la fase exponencial de cada réplica de *Chlorella vulgaris* (a) y *Scenedesmus acutus* (b). En el mismo gráfico se superpone la recta de regresión (rojo) y se obtiene los datos de su pendiente (b) equivalente a la tasa de crecimiento poblacional (r).**



**Figura 11: Test a posteriori Holm-Sidak mostrando la evidente separación de los grupos homogéneos de ambas especies.**





### 3. Técnica de recuento automatizado de células de *Chlorella vulgaris*.

Entre las diversas metodologías propuestas para monitorear el estado de cultivos algales existen recuentos automatizados por medio de contadores electrónicos (Javanmardian & Paison, 1992), análisis de clorofila (Travieso *et al*, 2006), mediciones de turbidez por lectura espectrofotométrica a 560 nm (Wang *et al*, 2007), mediciones de turbidez por un transistor fotosensible incluido en un turbidostato (Skipnes *et al*, 1980) y recuentos a microscopio en cámaras de Neubauer (Aguirre Ramírez *et al*, 2007; Ortiz Moreno *et al*, 2012; Rodas Gaitán *et al*, 2012). Sin embargo, uno de los puntos críticos en estas metodologías sigue siendo la determinación rápida y confiable de la densidad algal que permita el ajuste de sus parámetros en tiempo real. Las técnicas tradicionales de recuento directo (Lund *et al*, 1958) y la estimación por clorofila (APHA, 1995), resultan inviables para cumplir con este propósito por no ser técnicas de resolución inmediata. A diferencia de ellas, las mediciones de turbidez pueden efectuarse instantáneamente.

La turbidez es una medida de la dispersión y absorción de la luz causada por la presencia de partículas suspendidas en un fluido. La naturaleza de las partículas puede ser inorgánica (limo, arcilla, etc) u orgánica (bacterioplancton, fitoplancton, zooplancton) (Wetzel & Likens, 1991). La turbidez de una suspensión no sólo depende de la concentración de partículas sino también del tamaño y forma de las mismas.

En el caso de un cultivo monoespecífico de fitoplancton, puede asumirse que todas las partículas en suspensión son semejantes y por lo tanto es posible emplear a la turbidez para estimar su densidad. En este aspecto existen referencias de estimación del crecimiento de *C. vulgaris* a partir de la turbidez (Aguirre Ramírez *et al*, 2007). Sin embargo la vinculación de estos dos parámetros por medio de un modelo matemático ha sido poco empleada. En base a lo expuesto, durante el desarrollo de esta tesis se sumó como un objetivo más de la misma, el perfeccionamiento de una metodología que permita salvar estas deficiencias y sustentar el desarrollo de cultivos y experimentos con mayor eficiencia.

De esta manera se realizó un experimento en laboratorio donde se pretendió: 1) Evaluar el uso de la turbidez como método sencillo e inmediato de estimación de la densidad de cultivos algales, 2) Determinar una técnica rápida y fiable de recuentos de individuos para el monitoreo de dicha estimación, 3) Identificar los





errores metodológicos que incidan sobre el ajuste del modelo determinado, 4) Proponer técnicas específicas que permitan reducirlos y 5) Definir alcances y limitaciones de la técnica propuesta.

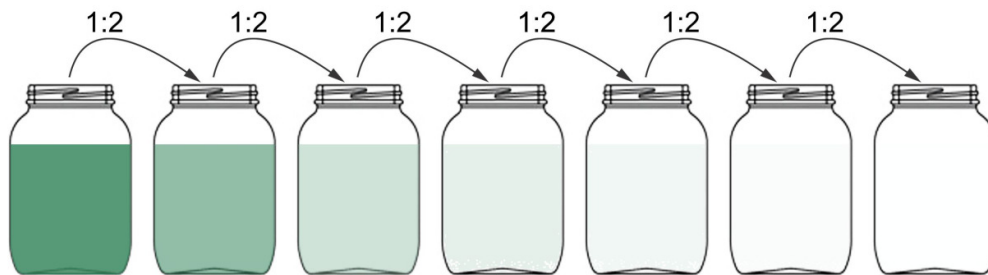
## **Materiales y métodos**

### **3.1 Cultivos algales:**

Se realizaron dos cultivos de *Chlorella vulgaris* en recipientes de 3 litros con agua de red ( $1000 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$  aproximadamente) con el aporte de los nutrientes  $\text{PO}_4\text{HK}_2$  ( $600 \mu\text{g P/l}$ ) y  $\text{NO}_3\text{K}$  ( $6.000 \mu\text{g N/l}$ ). Cada frasco de cultivo fue aislado de la luz natural por medio de papel de aluminio y se le colocó en la parte superior una placa con 8 LEDs, con una baja irradiancia de  $50 \mu\text{moles fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$  y longitud de onda de 660 nm. La iluminación fue continua (fotoperíodo 24:0) y para prevenir la sedimentación de las algas se instalaron aireadores en forma permanente. La turbidez de cada cultivo fue monitoreada por medio de un turbidímetro de laboratorio Hatch (2100P) y medida en unidades nefelométricas (NTU). La incubación se prolongó por dos semanas, al cabo de las cuales el cultivo 1 alcanzó una turbidez de 214 NTU, y el cultivo 2 una turbidez de 280 NTU.

### **3.2 Obtención de las muestras:**

A partir de estos dos cultivos concentrados, se obtuvieron suspensiones de algas de turbidez decreciente por medio de seis diluciones (1:2) sucesivas, estableciendo un total de siete niveles de turbidez (Fig. 12, Tabla 3).



**Figura 12: Esquema de dilución sucesiva de los cultivos algales.**





Posteriormente, de estos nuevos cultivos así obtenidos se extrajeron dos muestras de 5 ml para cada dilución y se fijaron con lugol acético (1%) para favorecer su posterior sedimentación en las cámaras de Utermöhl (APHA, 1995).

### 3.3 Metodología de sedimentación:

Para la sedimentación de las células, se emplearon en todos los casos cámaras de Utermöhl de 5ml. Debido a la alta concentración algal fue necesario efectuar una dilución específica para cada muestra, con el objeto de mantener la densidad del extracto dentro del rango óptimo para su recuento en la cámara de sedimentación (Tabla 3).

**Tabla 3: Diluciones y alícuotas utilizadas en cada cultivo.**

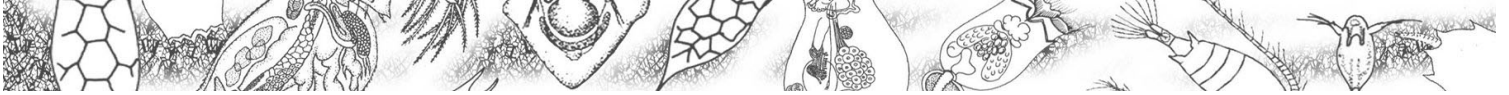
<b>Factor de dilución (frasco)</b>	<b>Cultivo 1 turbidez (NTU)</b>	<b>Cultivo 2 turbidez (NTU)</b>	<b>Factor dilución Uthermöhl</b>	<b>Alícuota Sedimentación (ml)</b>
1:1	214	280	2:100	0,1
1:2	86,1	108	4:100	0,2
1:4	34,7	41,8	8:100	0,4
1:8	15,5	18,3	12:100	0,6
1:16	6,78	8,61	16:100	0,8
1:32	3,77	4,07	20:100	1,0
1:64	2,03	2,36	24:100	1,2

La sedimentación de las alícuotas se realizó aplicando dos metodologías:

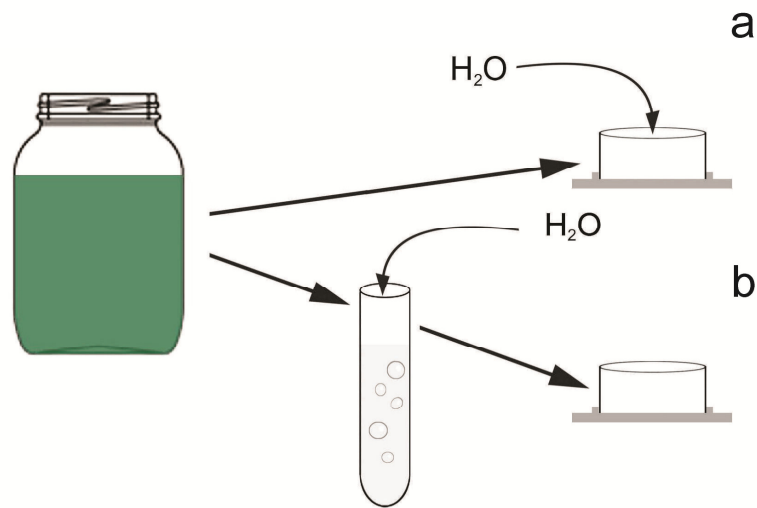
A. Sedimentación directa (SD): a partir de las suspensiones obtenidas del cultivo 1, se colocó en cada cámara de Utermöhl la alícuota de la muestra a sedimentar y se agregó el volumen restante de agua hasta completar la capacidad total de la cámara. Así, la dilución se realizó durante el llenado de la cámara de sedimentación (Fig. 13).

B. Sedimentación con homogeneización previa (SH): a partir de las suspensiones obtenidas del cultivo 2 se realizó una suspensión de 15 ml diluida en el factor correspondiente a cada turbidez detallado en la tabla 3.





Posteriormente se sometió a la suspensión a un burbujeo de 5 segundos para finalmente tomar los 5 ml necesarios para el llenado de la cámara (Fig. 13).



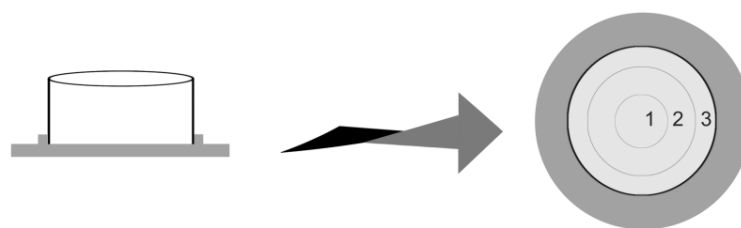
**Figura 13: Esquema de técnicas de sedimentación. a) Sin homogeneización previa, a) Con homogeneización previa.**

En virtud de la altura de la cámara de sedimentación (2 cm) y del pequeño tamaño de *C. vulgaris* todas las muestras tuvieron un tiempo de reposo de 24 horas, excesivo según HELCOM (2001) para asegurar la completa sedimentación de las algas.

#### 3.4. Metodología de recuento:

El recuento de las muestras se realizó por medio de imágenes digitalizadas tomadas con un objetivo de 40x en microscopio invertido. Con el propósito de comparar el ajuste de las metodologías de sedimentación arriba mencionadas, las fotografías se tomaron con un esquema de regiones establecidas para cada cámara. En un eje radial de la cámara se fotografiaron las regiones: Central, Intermedia y Periférica (Fig. 14).





**Figura 14: Esquema de las zonas definidas en la cámara. 1) Central, 2) Intermedia, 3) Periférica.**

Todas las imágenes fueron procesadas con el software “Image J” (v 1.47). Los resultados obtenidos se transformaron a densidades algales (individuos/ml), para su posterior análisis estadístico.

### 3.5. Análisis estadístico de los resultados:

La relación entre la densidad de algas y la turbidez se calculó mediante el análisis de regresión y correlación de Pearson ajustado a un modelo lineal. Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) factorial para testear el efecto de la turbidez y las zonas de la cámara de sedimentación sobre de la densidad de algas. La variable densidad fue transformada a Ln a fin de cumplir el supuesto de homogeneidad de varianzas. En los casos en que la prueba F resultó significativa, se empleó la prueba de rango múltiple de Tukey para identificar el o los grupos diferentes.

## **Resultados**

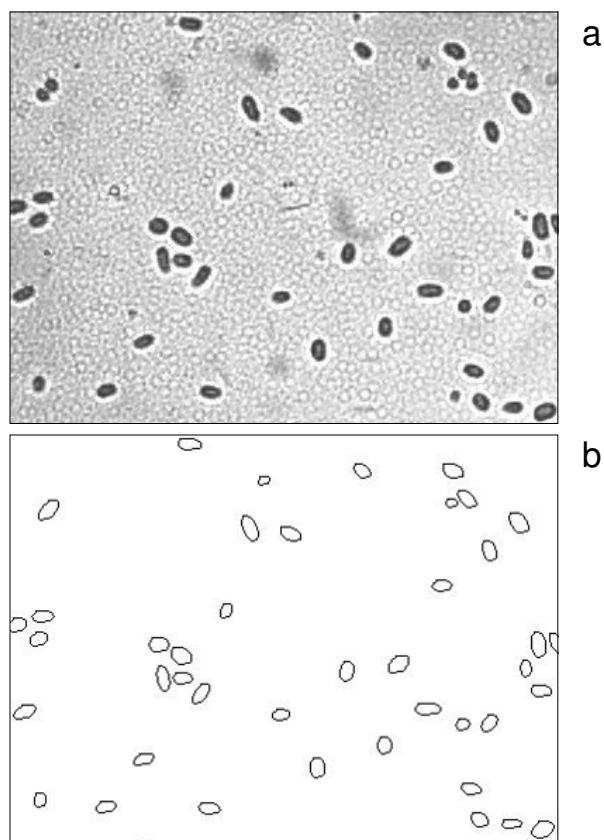
Las observaciones al microscopio y la verificación de las imágenes digitales almacenadas corroboran el hecho de que prácticamente la totalidad de las partículas relevadas en la cámara de sedimentación corresponden a las algas cultivadas (Fig. 15).

El tiempo requerido para el recuento automatizado de las algas una vez sedimentadas (alrededor de un minuto por campo) fue marcadamente inferior al tiempo que normalmente se emplea para el recuento personalizado de cultivos monoespecíficos (no menos de cinco minutos por campo).





En términos generales, se pudo observar que el volumen de las alícuotas de sedimentación utilizado para cada nivel de turbidez generó valores de conteos similares entre las diferentes diluciones, sin la presencia de aglomeraciones ni campos con falta de algas (Fig. 15).



**Figura 15: Fragmento de micrografía: a) fotografía original; b) imagen procesada por medio del software “Image J”.**

El conteo automatizado de la totalidad de las muestras de ambas técnicas de sedimentación arrojó un mínimo absoluto de 17 individuos foto<sup>-1</sup> y un máximo absoluto de 404 individuos foto<sup>-1</sup>. Los valores medios oscilaron entre 102 y 215 individuos foto<sup>-1</sup> para la técnica SD; y entre 66 y 357 individuos foto<sup>-1</sup> para la técnica SH. En cuanto al error de conteo, se observaron dos grupos de datos. El primero reúne a los niveles de turbidez mayores a 30 NTU donde el rango de error de la técnica SD (31-49 %) fue mayor a la técnica SH (4-12 %). Los niveles de menor turbidez (<20 NTU) no mostraron una clara diferenciación entre técnicas, superando todos el 15 % de error (Tabla 4).





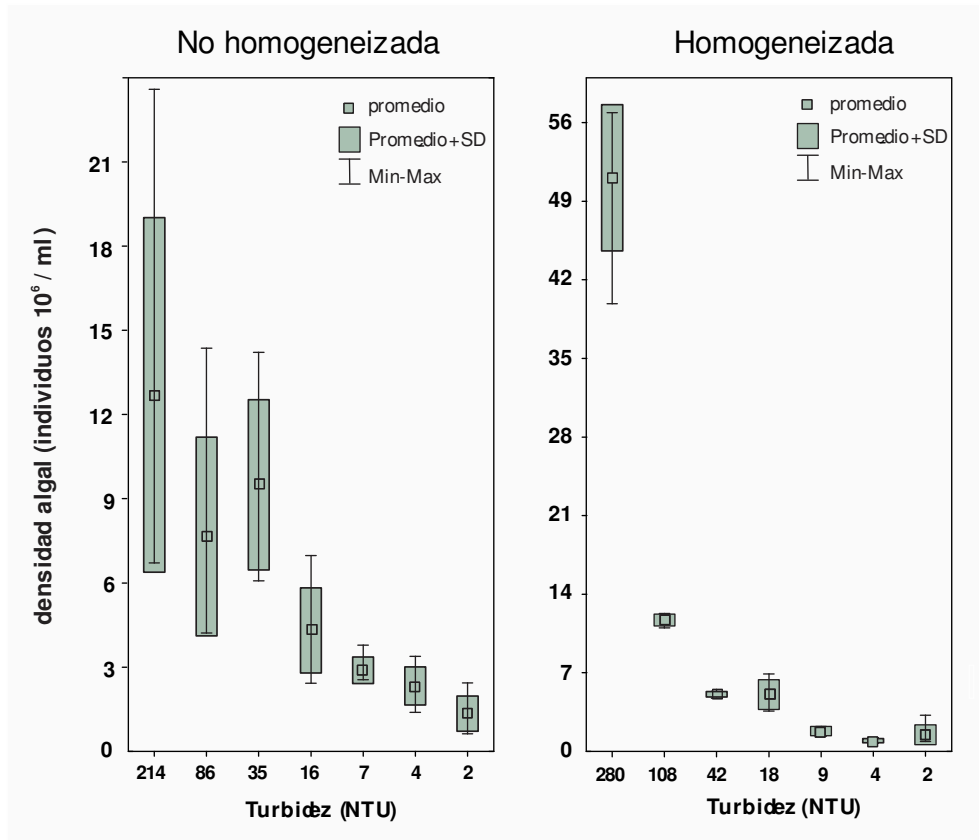
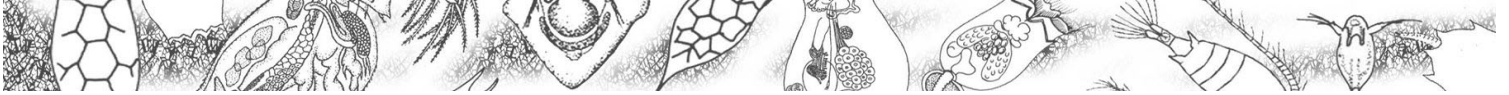
**Tabla 4: Resultados de los recuentos y error estandar asociado para cada técnica de sedimentación. a) No homogeneizado, b) Homogeneizado.**

a)	<b>Turbidez (NTU)</b>	<b>Promedio (individuo imagen<sup>-1</sup>)</b>	<b>Promedio (individuo ml<sup>-1</sup>)</b>	<b>Error (%)</b>
	214,0	136	12701	49,7
	86,1	153	7661	46,2
	34,7	215	9502	31,9
	15,5	157	4313	35,2
	6,8	140	2896	16,4
	3,9	148	2332	29,2
	2,0	102	1348	46,5

b)	<b>Turbidez (NTU)</b>	<b>Promedio (individuo imagen<sup>-1</sup>)</b>	<b>Promedio (individuo ml<sup>-1</sup>)</b>	<b>Error (%)</b>
	280,0	357	51088	12,7
	108,0	164	11700	4,5
	41,8	143	5099	4,7
	18,3	213	5071	26,3
	8,6	101	1808	22,5
	4,1	66	946	19,5
	2,4	125	1491	59,3

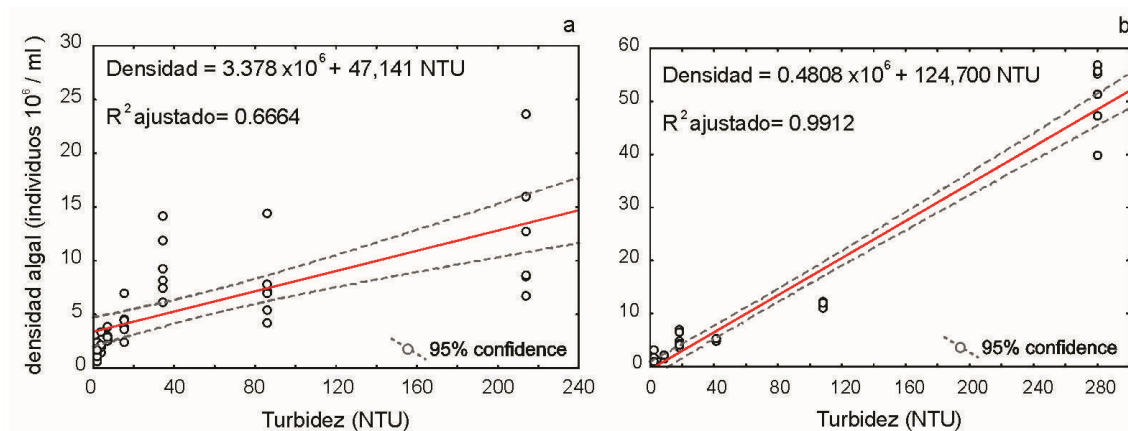
Ambas técnicas mostraron diferencias en cuanto a la distribución de los datos. El desvío estándar fue mayor para la técnica SD y en este método los valores extremos se alejaron más de la media en todo el rango de diluciones tratado (Fig. 16).





**Figura 16: Box-plot: Densidades algales registradas en cada nivel de turbidez, para ambas técnicas de sedimentación.**

Se observó una relación lineal positiva ( $p < 0,01$ ) entre la turbidez y la densidad de algas (Fig. 17). En el caso de la técnica SD se halló un ajuste bajo de esta relación ( $R^2_{ajustado} = 0,66$ ). La técnica SH en cambio, mostró una menor dispersión y un consiguiente mejor ajuste ( $R^2_{ajustado} = 0,99$ ).

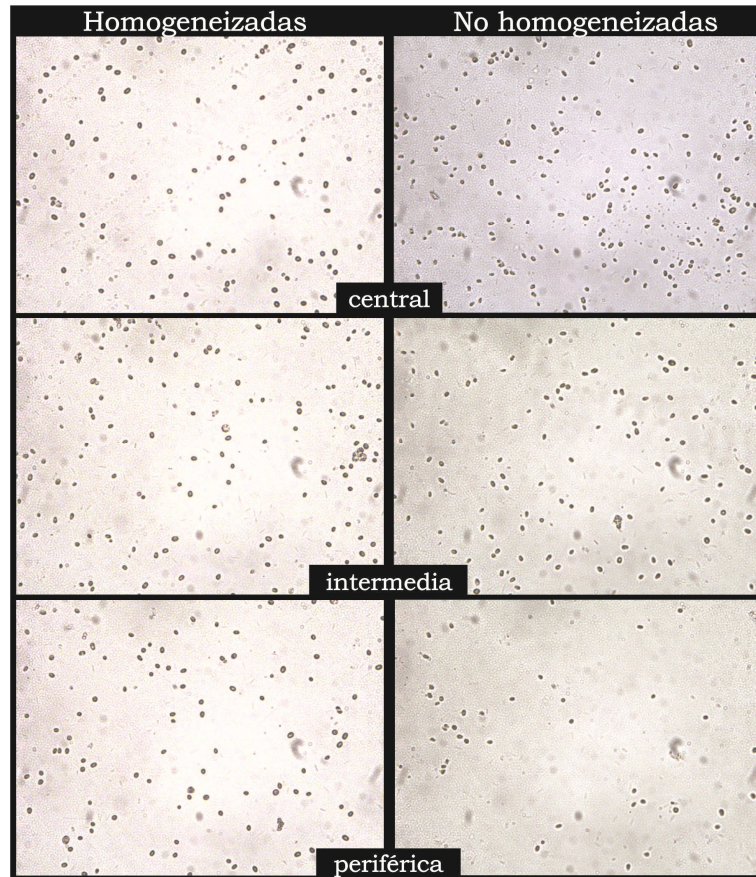


**Figura 17: Relación entre Turbidez (NTU) y Densidad de algas (individuos  $10^6$ /ml). Sedimentación Directa (a) y Sedimentación con homogeneización previa (b).**





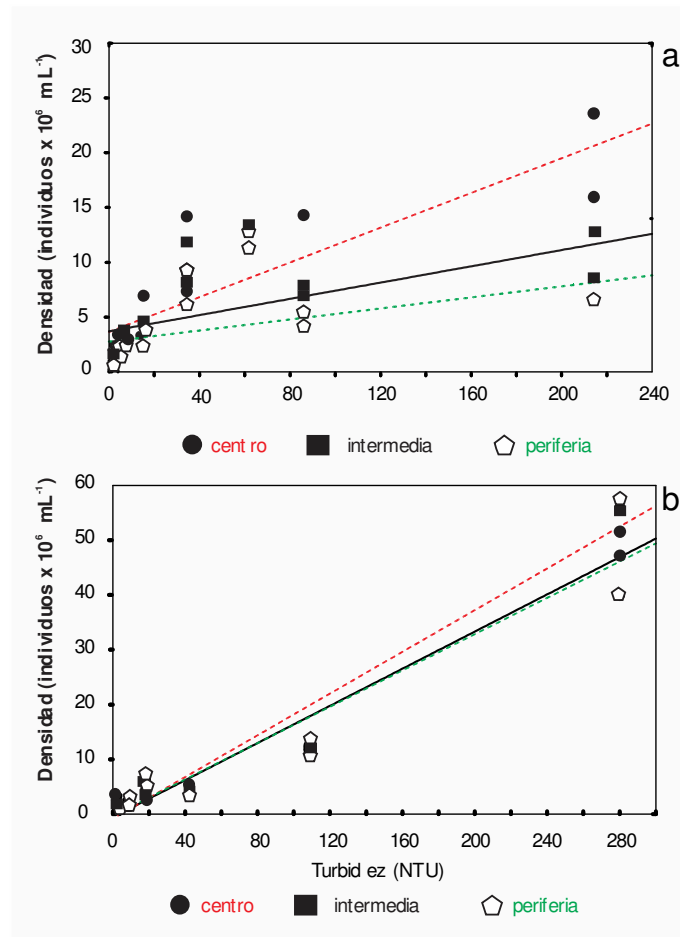
A partir de las imágenes digitales se observó al momento de la sedimentación una diferenciación en la distribución de las células en las 3 zonas planteadas (Central, Intermedia y Periférica) más acentuada en la técnica no homogeneizada (SD) siendo mayor la densidad en la zona central disminuyendo hacia la periferia (Fig. 18).



**Figura 18: Fotografías digitales con microscopio invertida de las algas sedimentadas en ambas técnicas, mostrando ejemplos de las 3 zonas establecidas para el recuento.**

Los scatterplot con las zonas discriminadas muestran el detalle de la dispersión antes mencionada para ambas técnicas. En ausencia de homogeneización existió una clara separación entre las líneas de tendencia de las tres zonas (central, intermedia y periférica). En presencia de homogeneización, se observó el solapamiento de dichas líneas de tendencia (Fig. 19).

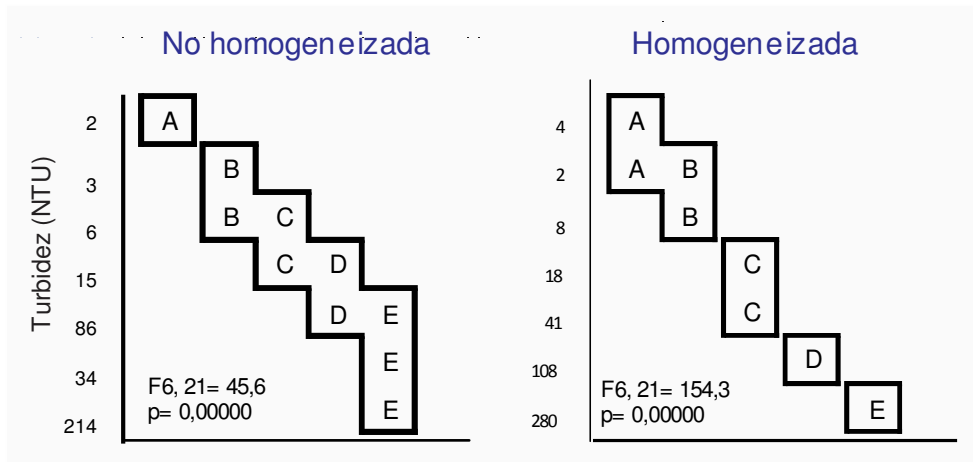




**Figura 19: Scatterplot de las tres zonas de la cámara de sedimentación (Central-Intermedia-Periférica). a) Sin homogeneización previa; b) Con homogeneización previa.**

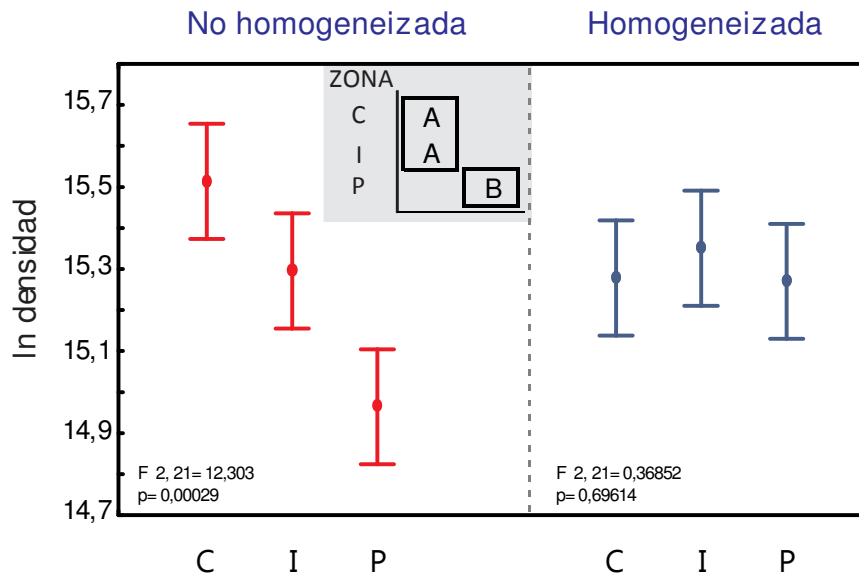
El análisis de varianza factorial (ANOVA) no arrojó diferencias significativas para la interacción entre los factores TURBIDEZ y ZONA en ninguna de las técnicas empleadas. En el caso de la TURBIDEZ se encontraron diferencias significativas ( $F_{6,21} = 154,3$ ;  $p < 0,0001$ ) entre los tratamientos para ambas técnicas. La Figura 20 muestra los grupos homogéneos derivados del test a posteriori realizado. En ausencia de homogeneización se observó el solapamiento de los grupos en casi todo el rango de turbidez estudiado, a excepción del menor nivel de turbidez, que se diferencia de los restantes. La separación de los grupos homogéneos fue mayor para la técnica SH. En este caso el solapamiento estuvo restringido a niveles bajos de turbidez, en tanto que en el resto del rango pudieron diferenciarse niveles intermedios y altos como grupos separados.





**Figura 20: Test a posteriori (Tuckey) mostrando grupos homogéneos para la turbidez en ambas técnicas.**

En el análisis de las ZONAS dentro de la cámara de sedimentación, se encontraron diferencias significativas sólo para el tratamiento de sedimentación directa (SD) ( $F_{2,21}=12,3$ ;  $p<0,01$ ) (Fig. 21). El análisis a posteriori (Tuckey) de esta técnica diferenció significativamente la zona periférica, de menor densidad algal, de las restantes (Fig. 21, recuadro gris). La técnica SH no mostró diferencias significativas entre las zonas, las cuales conformaron un solo grupo homogéneo.



**Figura 21: ANOVA para las zonas en ambas técnicas. Recuadro gris: Test a posteriori (Tuckey) mostrando los grupos homogéneos para la técnica no-homogeneizada; C) Central, I) Intermedia, P) Periférica.**





### **Discusión:**

Si bien numerosos autores utilizan contadores electrónicos automatizados para el recuento de algas como indicador inmediato del estado del cultivo (Javanmardian & Paisson, 1992), este sistema resulta de alto costo económico cuando la producción se realiza a escalas intermedias (eg. como fuente de alimentación animal en laboratorios y acuicultura). Los análisis de clorofila *a* (Travieso *et al*, 2006) presentan el inconveniente de no ser de resolución inmediata, impidiendo un monitoreo y ajuste en tiempo real de las condiciones de los cultivos. El mismo problema presentan los recuentos algales tradicionales (Lund, *et al*, 1958) que además implican un gran inversión de tiempo, esfuerzo y capacitación (Embleton *et al*, 2003) y presentan un alto rango de error cuando se observan campos con numerosas células de una misma especie (Rodas Gaitán *et al*, 2012), aunque al trabajar con muestras diluidas provenientes de ecosistemas naturales (multiespecíficas y de densidad algal <16 individuos/campo) Embleton *et al* (2003) han verificado mayor fiabilidad en los recuentos a ojo en comparación con sistemas automatizados que combinan determinación específica y recuento algal.

Nuestros resultados, de acuerdo con los presentados por Held (2011), señalan que empleo de la turbidez tiene la capacidad de ser una herramienta útil para el monitoreo de la densidad de cultivos algales en tiempo real, con la ventaja de permitir diagnósticos sin pérdida de cultivo y ajustes en las condiciones en el mismo momento en que el cultivo lo requiere. Para poder hacer uso de la turbidez en este sentido, es necesario desarrollar una relación empírica que vincule los resultados de recuentos de densidad algal con valores de turbidez asociados. De acuerdo con este mismo autor se señala que la relación debe ser actualizada con curvas de calibración propias para cada especie de algas y más aún, teniendo en cuenta la relación variable que existe entre el tamaño de las algas y las condiciones del cultivo (Lee y Palsson 1994) se concluye que la relación entre el número de algas y la turbidez puede variar en un mismo cultivo en función del el tiempo, por lo que la generación de curvas de calibración debe ser planificada como un proceso de actualización continuo que incluya el recuento de algas y su correlación con la turbidez de la suspensión.

La disminución del esfuerzo de recuento es un beneficio importante que debe reinvertirse para efectuar un seguimiento más estricto de la relación





empírica propuesta debido a la variabilidad existente en el tamaño de las algas dependiendo de ciertas condiciones del cultivo, como lo observaron Lee y Palsson (1994) respecto de la densidad.

Entre las dificultades más importantes que se hallaron al intentar establecer la relación que vincula a la densidad algal con la turbidez de un cultivo puede citarse la necesidad de diluir las alícuotas de los recuentos de manera que las imágenes a procesar permanezcan dentro de un rango de densidad aceptable para la correcta individualización de las algas. Esta dificultad afecta principalmente a los cultivos de algas de densidades elevadas. En los análisis cuantitativos que se llevaron a cabo para construir las curvas de calibración de este trabajo no se observaron aglomeraciones que impidieran la individualización de las algas por parte del software de recuento automatizado, ni tampoco campos con una densidad demasiado baja o ausencia de individuos. Estas dos fuentes de error, reconocidas por diferentes autores como Embleton *et al*, (2003) y Mazziotti & Vadrucci (2007) se eludieron gracias a la elección cuidadosa de las alícuotas a sedimentar para cada densidad algal.

Otra dificultad importante es la dispersión de los resultados de los recuentos, que disminuye la capacidad del método para estimar con precisión la densidad algal a partir de la turbidez. En nuestro estudio este inconveniente fue evidente al emplear la técnica SD que generó una marcada heterogeneidad en la distribución espacial de las algas dentro de la cámara de Utermöhl, y una consiguiente heterogeneidad de los resultados de los recuentos para cada muestra. En su trabajo con cámaras de Neubauer, Rodas-Gaitán *et al* (2012) encontraron la misma dificultad, acentuada al utilizar suspensiones de alta densidad algal. El logro de una sedimentación uniforme gracias al empleo de la técnica SH permitió la construcción de una relación turbidez - densidad mucho más sólida principalmente cuando la turbidez fue superior a los 40 NTU.

La implementación de los cultivos con una fuente de baja irradiancia (West, 2005) se caracteriza por requerir un bajo costo de mantenimiento, permite la obtención de cultivos que pueden alcanzar la máxima eficiencia fotosintética con concentraciones superiores a los 330 mg m<sup>-3</sup> de clorofila “a” y con una baja mortalidad de algas. Esta última característica es importante para los propósitos de conteo por imágenes ya que la probabilidad de encontrar esporas y células muertas es mínima.





Se considera que esta técnica es adecuada para el uso en laboratorio con fines experimentales. El método de recuento digitalizado de algas permite acelerar significativamente el proceso de validación de la relación entre la turbidez y la densidad de las algas, al contrario de lo propuesto por Embleton et al. (2003) que lleva a cabo recuentos manuales en un corto período de tiempo debido a las densidades muy bajas de los cultivos (16 individuos/campo). En casos de cultivos de alta densidad, la abundancia de las algas en el campo microscópico así como su pequeño tamaño han sido señalados por Lund *et al* (1958) como factores que elevan el error del observador, de manera que el empleo de un sistema automatizado fue determinante para incrementar la precisión de los recuentos.

Finalmente se puede considerar que esta técnica puede ser aplicable a aquellas algas unicelulares que posean una forma geométrica definida y reconocida por el procesador de imágenes. Durante este trabajo, el método también se aplicó con éxito para *Monoraphidium minutum* y *M. salomonicas*. Potencialmente este método también podría ser aplicado para monocultivos de otros géneros tales como *Scenedesmus* y *Chlamydomonas* o para Cryptomonadales.





“La frase más excitante que puede oír la ciencia, la que anuncia nuevos descubrimientos, no es “Eureka” sino ‘es extraño’...”

Isaac Asimov

## II

# ZOOPLANKTON

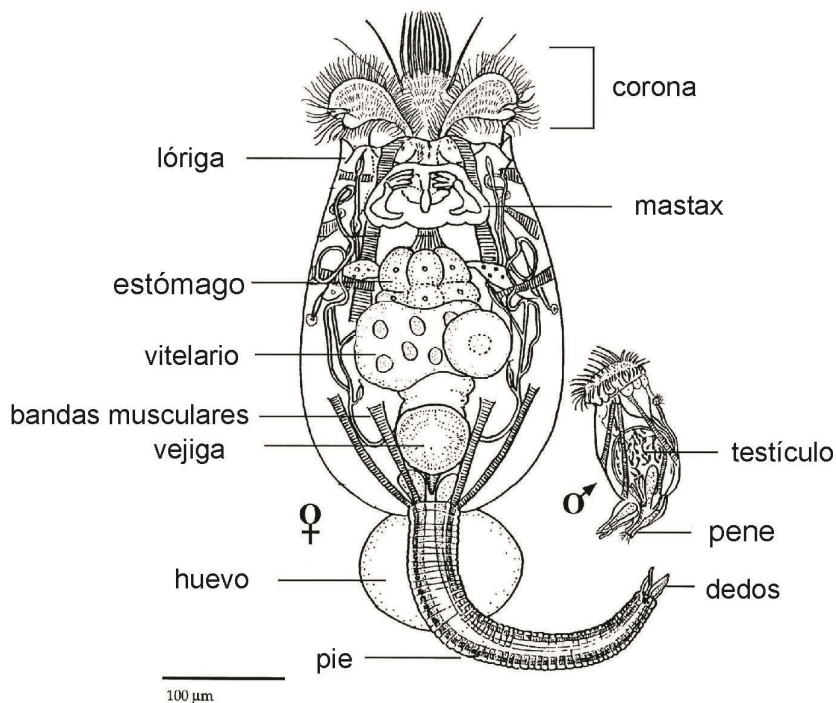


## Capítulo II: Zooplancton

En el zooplancton de los ambientes dulceacuícolas de la provincia de Buenos Aires, los rotíferos y crustáceos (cladóceros y copépodos) son grupos predominantes. A continuación se detallarán las principales características de cada grupo.

### 1. Características generales

#### 1.1 Rotíferos:



**Figura 22. Hembra gravida y macho de *Brachionus plicatilis* (modificado de Nogrady et al. 1993)**

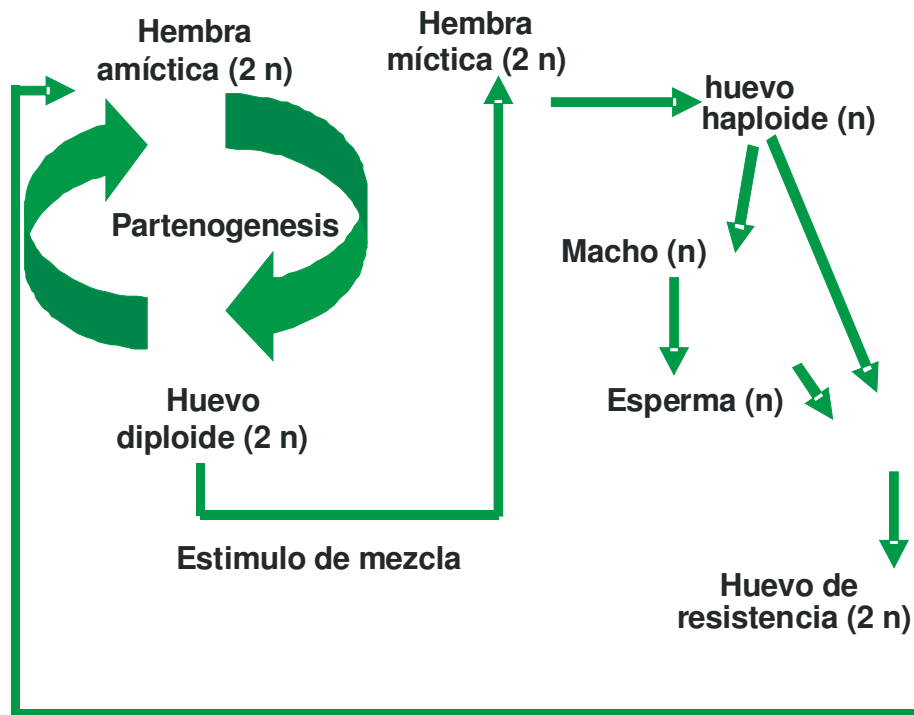
Los rotíferos son asquelmintos eutelios (1000 células) con simetría bilateral. El phylum está integrado por aproximadamente 2.000 especies (Segers, 2007). Son mayormente cilíndricos o sacciformes con un tamaño que oscila entre 50 y 2.000 µm y generalmente con la presencia de tres regiones: corona, tronco y pie. La corona ciliar apical es utilizada para la locomoción y la recolección de alimento. Cuentan con un mastax quitinoso que está compuesto por numerosas piezas duras y musculatura con diferente desarrollo de acuerdo al tipo de



alimentación y que reviste importancia taxonómica para reconocer desde clases hasta especies (Wallace, 2002). Las distintas especies de rotíferos pueden ser encontradas prácticamente en todos los lugares donde haya agua; poseen hábitos planctónicos en lagos y ríos, litorales, bentónicos así como perifíticos (Nogrady et al., 1993).

La mayoría de las especies son ovíparas, aunque algunas son ovovivíparas. Muchos rotíferos planctónicos transportan los huevos mientras que otros los fijan a un sustrato o los liberan al agua (Wallace, 2002).

Los rotíferos bdelloideos se reproducen exclusivamente por partenogénesis mientras que los monogontos son partenogénéticos cíclicos. La reproducción asexual por apomixis produce hembras clónicas y se realiza la mayor parte del año. Las hembras amícticas son diploides y producen huevos diploides que se desarrollan mitóticamente. En ciertas condiciones parte de la población comienza a producir hembras tanto míticas como amícticas (Fig. 23).



**Figura 23. Esquema del ciclo reproductivo de los rotíferos monogontos.**

Los factores internos más importantes para la producción de hembras míticas son la edad de las hembras parentales y su genotipo mientras que entre los factores externos se ha demostrado que en algunas especies influyen el





fotoperíodo, la densidad poblacional y aspectos cualitativos y cuantitativos de la dieta (Pourriot & Snell, 1983; Carmona et al., 2011). En la mayoría de los rotíferos, la señal ambiental que induce la producción de hembras míticas no ha sido identificada (Gilbert & Schröder, 2004). Se ha observado una variación considerable en la respuesta a formar hembras míticas entre clones de una misma especie. Las hembras míticas producen huevos haploides que si no son fertilizados desarrollan machos haploides mucho más pequeños que las hembras. La fertilización del óvulo haploide sólo es posible si la hembra sexual es inseminada a las pocas horas de nacer. La producción de huevos de diapausa está influenciada por la posibilidad que tengan los machos de encontrar a las hembras míticas susceptibles a la fecundación y, una vez producido el encuentro, la probabilidad de los machos de copular con estas hembras. La probabilidad del encuentro macho-hembra está relacionada con la densidad de población mientras que la probabilidad de copulación depende del contacto quimiorreceptor del macho de una sustancia producida por la hembra. Los machos fertilizan a las hembras míticas formándose un huevo diploide de diapausa con paredes gruesas, a menudo esculpidas. La reproducción sexual tarda más en completarse que la asexual y requiere más recursos. La reproducción sexual se compone de varios pasos en una cascada de eventos de la iniciación sexual a la producción del huevo de resistencia que involucra tres generaciones y toma varios días para completar (Serra et al., 2004). Existen modelos que muestran que el tiempo y el alcance de la reproducción sexual óptima depende de la densidad poblacional, el crecimiento y en la previsibilidad y la capacidad de carga del medio ambiente (Ricci, 2001). Estos modelos indican que la producción de hembras míticas a veces debe retrasarse hasta el inicio del deterioro de las condiciones ambientales (Serra & King, 1999). Alternativamente, se ha sugerido que la reproducción sexual debe producirse en condiciones favorables para la población en crecimiento por lo que un gran número de hembras míticas pueden ser fertilizadas por machos y producir muchos huevos de diapausa ricos en energía para un banco de óvulos de sedimentos. En esta estrategia, el objetivo es producir muchos huevos siempre que sea posible, en lugar de esperar y producirlos al final del período de crecimiento cuando la disponibilidad de alimentos y el tamaño de la población puede haber disminuido (Gilbert & Schröder, 2004). No hay ninguna evidencia experimental que demuestre que la producción de hembras míticas sea inducida directamente por las condiciones desfavorables. De hecho, la tendencia a producirlas en *Brachionus plicatilis* es mayor cuando las condiciones ambientales (concentración





de alimento, temperatura, salinidad) son buenos para el crecimiento de la población y cuando las tasas de población en crecimiento son altas (Snell & Boyer, 1988). Del mismo modo, la inducción en la producción de hembras míticas por hacinamiento en otras especies se produce sin ningún tipo de disminución de la fecundidad (Gilbert, 2002; 2003). En rotíferos, el único caso conocido de la influencia del deterioro del medio ambiente promueve la producción de estas hembras es el de *Synchaeta pectinata*. La reproducción sexual puede ser seguida por una disminución en el crecimiento poblacional. El descenso puede resultar del compromiso para producir machos y huevos de diapausa. Estos huevos son resistentes a condiciones ambientales adversas y pueden ser dispersados a otros ambientes por viento, agua o animales migratorios. La mayoría de las hembras míticas producen sólo dos o tres huevos de resistencia, ya que los machos entregan unos tres espermatozoides por cópula, y esto significa que la fertilización es difícil que se produzca más de dos veces por hembra (Snell et al., 2007). Si la hembra mítica fertilizada tiene la capacidad de almacenar espermatozoides en el celoma para el próximo desove, el envejecimiento del esperma almacenado debe afectar a la calidad de los huevos. La fecundidad de estas hembras es menor que las partenogenéticas, sugiriendo que asignan más recursos por huevo. Además se ha demostrado que las hembras de *Brachionus calyciflorus* que provienen de los huevos de diapausa tienen una mayor tolerancia a la inanición que las hembras que se originan de huevos partenogenéticos (García Roger et al., 2006).

Los estímulos que inducen la eclosión de los huevos de resistencia son cambios lumínicos, térmicos, de salinidad o concentración de oxígeno disuelto (Schröder, 2005).

A pesar de que algunos rotíferos presentan dietas muy especializadas (Bogdan & Gilbert, 1987), muchas especies consumen una amplia variedad de presas (algas, flagelados heterótrofos, ciliados y bacterias) que posibilita definirlos como consumidores generalistas de alimento en suspensión. Según Kirk (2002), los rotíferos herbívoros pueden ser en ciertos momentos cosechadores selectivos y en otros comportarse como oportunistas por lo cual son capaces de adaptarse rápidamente a los cambios y las fluctuaciones de físico-química y condiciones hidrológicas que existen en los ambientes dulceacuícolas. En general, representan más del 50% de la productividad de zooplancton (Walz, 1995) y son un componente esencial en la red trófica del plancton de agua dulce. Debido a su elevada eficiencia de asimilación del





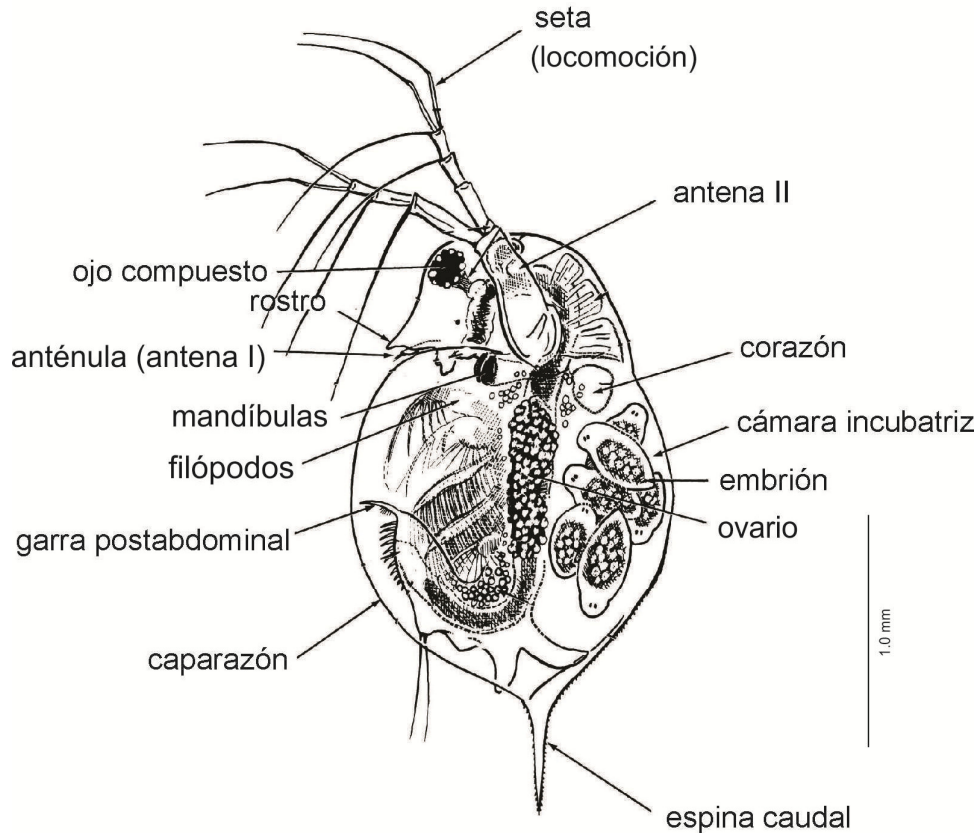
alimento y su alta tasa reproductiva, los rotíferos son muy importantes en el ciclo de materia orgánica y el flujo de energía en el plancton de agua dulce (Bogdan & Gilbert, 1987; Arndt, 1993; entre otros). Aunque los cladóceros a menudo presentan tasas de crecimiento tan altas o superiores a las de los rotíferos, estos últimos tienen un tiempo de respuesta más rápido a cambios en el fitoplancton que les provee una ventaja en la explotación de esas nuevas fuentes de alimento. Esto se debe a que poblaciones del género *Daphnia* no logran una tasa de crecimiento positiva en menos de 12 días aunque sean más eficientes en condiciones de baja concentración de alimento y logran con el tiempo excluir a los rotíferos (Gilbert, 1988). En teoría, cuando en un ambiente hay suministro constante de recursos la especie competidora con el  $R^*$  más bajo excluye a las demás (Kirk, 2002). Sin embargo, en el zooplancton de ambientes lóticos y lénticos en la región Neotropical, muchas especies de rotíferos herbívoros coexisten e incluso algunas pueden codominar numéricamente (José de Paggi 1993; Frutos, 1998; Aoyagui & Bonecker, 2004; Frutos et al., 2006; 2009) coincidiendo con lo expuesto por Hutchinson (1961) para el fitoplancton y con que la máxima riqueza específica en general se registra con condiciones intermedias de la variación ambiental (Grover & Holt, 1998). Se ha comprobado que cuando a las poblaciones de rotíferos en los ambientes naturales se les incorporan algas de elevada calidad nutricional para complementar la del fitoplancton disponible se observa un incremento de la tasa de crecimiento (Merriman & Kirk, 2000). Además las especies cuentan con una capacidad de almacenamiento para soportar momentos de inanición (Kirk et al., 1999). Debe destacarse que además la composición fitoplanctónica puede variar significativamente en una semana. En la columna de agua de los ambientes, la alimentación se inicia con la localización de las algas y su reconocimiento como palatable mediante células quimio y mecanosensoriales que rodean a la corona ciliar (Wallace & Snell, 2001). Para seleccionar su presa el rotífero depende de la información táctil (mecanorrecepción) y de las sustancias químicas producidas por el alga, mostrando una clara selección del tamaño algal (DeMott, 1989; Rothhaupt, 1990a; 1990b). Los rotíferos modifican su comportamiento de natación y alimentación en respuesta al tipo de alimento y a su densidad (Starkweather, 1980; Snell et al., 1987). El incremento de la densidad algal promueve un aumento de la tasa de filtración e ingestión hasta un punto máximo, más allá del cual se produce un abrupto descenso. La efectividad en la utilización del alimento se ve afectada por varios factores como características algales (pared celular, densidad y volumen celular), el estado fisiológico de los





rotíferos (por ejemplo grado de ayuno) y condiciones ambientales (temperatura y salinidad) (Hotos, 2003).

### 1.2 Cladóceros:



**Figura 24. Anatomía de un cladócero dáfnido (modificado de Dodson & Frey, 2001)**

El término “cladóceros” no tiene significado taxonómico pero se lo utiliza por conveniencia. Estos branquiópodos se agrupan en cuatro órdenes, estando representados en los ambientes dulceacuícolas de la región Neotropical solo los Ctenopoda y los Anomopoda (Paggi, 2004). Es un grupo monofilético principalmente de agua dulce aunque con integrantes en ambientes salinos. En la actualidad se reconocen 620 especies, estimando que el número es 2.4 veces mayor (Forró et al., 2008).





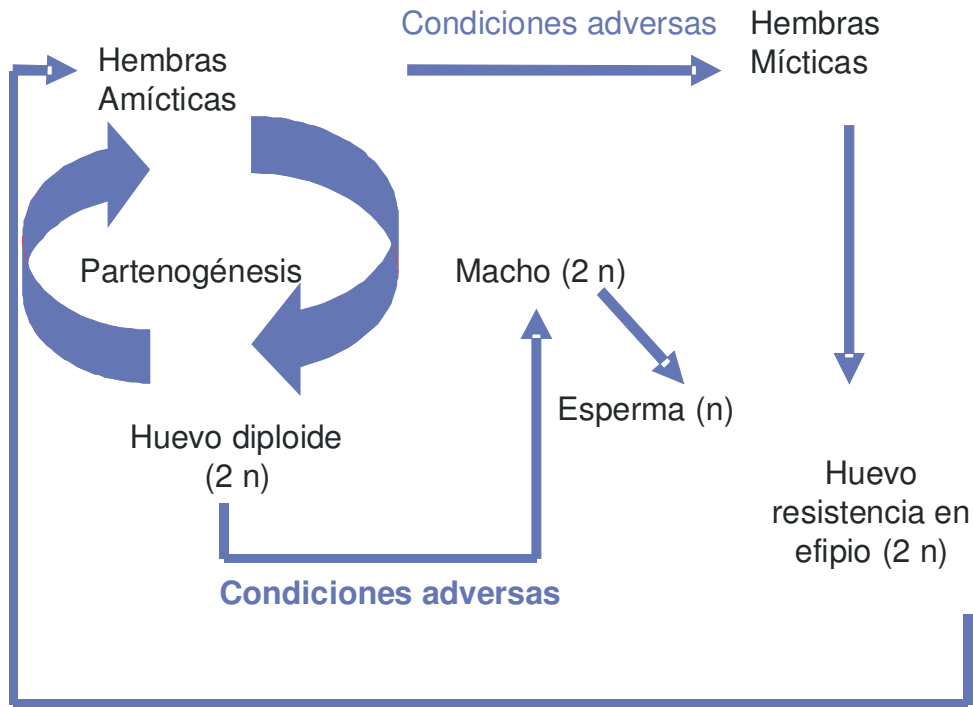
Los cladóceros son integrantes destacados del plancton así como del bentos y epifiton (Dodson & Frey, 2001; Dole-Olivier et al., 2000; Lemke & Benke, 2003; Yarwood-Buchanan, 2005; De Bie et al., 2008).

Los adultos pueden medir desde 0,2 a 18,0 mm de largo sin un cuerpo claramente segmentado. La mayoría de los cladóceros tienen un caparazón que se utiliza como cámara de cría. Cuentan con un ojo compuesto y un pequeño ocelo negro (ojo sencillo) justo por detrás del ojo compuesto. La cabeza presenta cinco pares de apéndices: dos pares de antenas, un par de mandíbulas, y dos pares de maxilas. Por encima de la boca hay un labio (labrum) y en el margen dorsal de la cabeza se encuentra el órgano nupal o uno o más poros. El caparazón está unido a la parte posterior del cuello y protege parte o todo el cuerpo, excepto la cabeza. En muchas especies, los 4-6 pares de patas torácicas están cubiertos por el caparazón. Las anténulas (primer par de antenas) suelen ser pequeñas, no segmentadas, con función quimiosensorial. Las antenas segmentadas (segundo par de antenas) pueden ser grandes y utilizarse para el desplazamiento. El caparazón transparente a menudo está ornamentado y puede presentar una espina posterior. Contiene al tórax y al abdomen y el cuerpo termina en un postabdomen con un par de garras que pueden estar fuera del caparazón. En el tórax se observan cuatro o seis pares de filópodos que se utilizan para la manipulación y filtrado del alimento así como también en los machos para aferrarse a las hembras. Los machos y hembras son morfológicamente similares. Debido a que la mayoría de los cladóceros se reproducen asexualmente al menos parte del tiempo, la mayoría de los individuos que se colectan serán hembras. Los machos son más pequeños con ganchos copuladores o anténulas muy alargadas, setas en las patas torácicas anteriores o un par de penes en el postabdomen. La producción de machos es inducida por algunas señales ambientales como modificaciones en la concentración del alimento, elevada densidad poblacional o por lo general la disminución del fotoperíodo. Se reproducen por partenogénesis la mayor parte del tiempo. La embriogénesis comienza, y por lo general se completa, en la cámara de cría, un espacio entre el cuerpo y el caparazón. Los huevos pueden ser: 1) diploides que se desarrollan de inmediato en hembras jóvenes; 2) de resistencia que vienen de huevos haploides que se fertilizan y que se desarrollan en embriones tempranos para luego entrar en una diapausa y 3) de resistencia diploides (sin fertilización). Estos últimos huevos son la solución para poder soportar las condiciones inhóspitas sin necesidad de incorporar al ciclo una





generación sexual para obtener el huevo de resistencia. Son el resultado de la supresión de la meiosis por un gen. Los huevos de resistencia soportan tanto la congelación como la desecación y representan una forma exitosa de dispersión ya que las poblaciones restablecen su densidad en primavera a partir de esos huevos (Fig. 25).



**Figura 25. Esquema del ciclo reproductivo de los cladóceros.**

Los cladóceros tienen mayor éxito reproductivo, producción de huevos y supervivencia a temperaturas cercanas a 20°C. Asimismo el tiempo generacional se reduce. Los cladóceros mudan para aumentar de tamaño y el número de mudas es variable y más o menos específico dependiendo más de la temperatura que del alimento (Dodson & Frey, 2001).

Los cladóceros, especialmente representantes del género *Daphnia* son utilizados en investigaciones tanto básicas como aplicadas debido a que su cultivo es sencillo, a su corto tiempo generacional y a su reproducción clonal. También se las utiliza como alimento de peces en acuicultura (Forro et al., 2008).

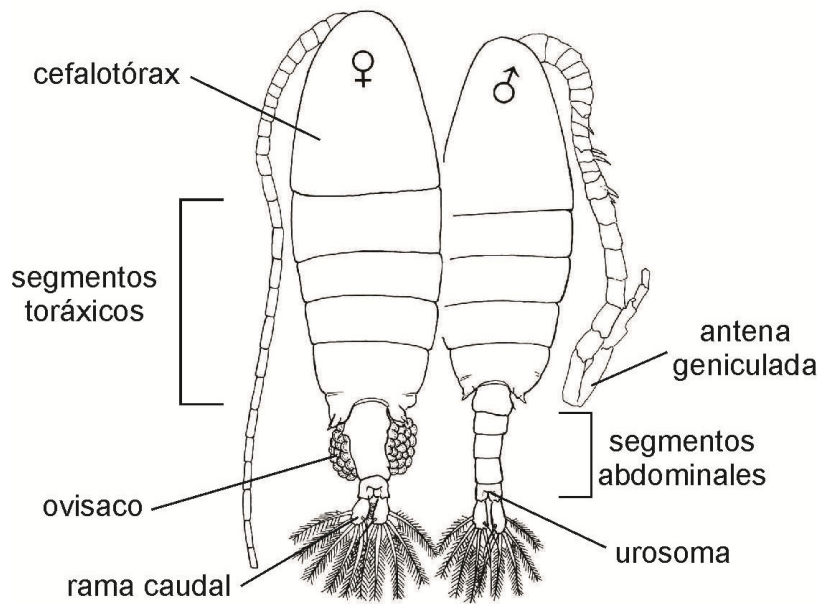
Los cladóceros se alimentan de una importante variedad de partículas: bacterias, algas, ciliados, rotíferos pequeños y nauplii de copépodos (Nandini et al., 2007; Kumar & Hwang, 2008). Las algas de 1 a 25 µm (pico y nanoplancton) son el componente principal de la dieta mientras que se evita la ingesta de cianobacterias, de las algas de mayor tamaño o de aquellas ornamentadas.





Cuando el alimento es escaso los cladóceros tienden a ser más pequeños y a producir menor descendencia (Tessier & Consolatti, 1991) con mayores posibilidades de sobrevivir a períodos de inanición (Gliwicz & Guisande, 1992), aunque se considera que la concentración de alimento no tiene efecto en la relación talla-peso como se ha demostrado en *Daphnia pulex* (Lynch, 1989). La competencia entre las distintas especies de cladóceros puede depender en gran medida de la rapidez en su crecimiento a un nivel determinado de alimento. Especies pequeñas como las de *Ceriodaphnia* y *Bosmina* pueden ser capaces de crecer junto a las de gran tamaño como *Daphnia* cuando la concentración de alimento es baja pero no a concentraciones elevadas (Tessier & Goulden, 1987).

### 1.3 Copépodos:



**Figura 26. Hembra y macho de copépodo calanoideo adulto (modificado de Williamson & Reid, 2001)**

Los copépodos se registran en casi todos los hábitats de agua dulce y son integrantes destacados de las comunidades con la presencia de casi 3.000 especies. En forma frecuente, constituyen la biomasa más importante de consumidores y son fuente de alimento de otros invertebrados y peces. En los ambientes dulceacuícolas se registra la presencia abundante y con amplia





distribución geográfica de representantes de tres órdenes (Calanoida, Cyclopoida y Harpacticoida). La región Neotropical es una de las más diversas con 561 especies conocidas (Silva, 2008). Los representantes más destacados pertenecen a la familia Cyclopidae (*Eucyclops*, *Metacyclops* y *Mesocyclops*), Canthocamptidae (*Attheyella*), Diaptomidae (*Notodiaptomus* y *Argyrodiaptomus*). Los diaptómidos, provenientes de América del Norte, han reemplazado a los boequeledos excepto en los ambientes patagónicos (Paggi, 1995; Suárez-Morales et al., 2005; Boxshall & Defaye, 2008).

El tamaño fluctúa desde menos de 0,5 a 2,0 mm de longitud, aunque algunas especies pueden alcanzar entre 3 a 5 mm. La mayoría son transparentes aunque pueden presentar coloración (negro, rojo, naranja, rosa, morado, verde y azul) (Williamson & Reid, 2001).

Tienen un cuerpo cilíndrico que se divide en un prosoma (cabeza y mayor parte del tórax), en un urosoma (segmentos finales del tórax y abdomen) y ramas caudales. La cabeza se fusiona con el primero y a veces con el segundo segmento torácico para formar el cefalosoma. Cuenta con cinco pares de apéndices articulados: anténulas, antenas, mandíbulas, maxílulas y maxilas. Las anténulas sirven para reproducción, locomoción y alimentación ya que cuentan con quimiorreceptores (Lonsdale et al, 1998) y mecanorreceptores (Hwang & Strickler, 2001). En los machos son geniculadas y modificadas para sostener a la hembra durante la cópula. El tórax está formado por siete segmentos, empezando por el segmento que lleva los maxilípedos y terminando con el segmento genital. Presenta cuatro pares de patas biramosas. El quinto par de patas está muy reducido en los ciclopoideos y harpacticoideos. En calanoideos está bien desarrollada siendo simétrica en las hembras mientras que en los machos es asimétrica y modificada para asir a las hembras durante la cópula. El sexto par de patas está atrofiado en ciclopoideos y harpacticoideos. En el urosoma puede haber entre tres y cinco segmentos sin apéndices con dos ramas caudales setosas en su extremo posterior (Williamson & Reid, 2001).

La reproducción es sexual. Presentan dimorfismo sexual en la estructura de antena, patas del quinto y sexto par, así como el número de segmentos del urosoma. Además las hembras son más grandes. El comportamiento de apareamiento es similar en harpacticoideos y ciclopoideos con machos más activos nadadores que las hembras y encuentros de parejas al azar, sin evidencia





de feromonas sexuales. En los calanoideos, los machos localizan a las hembras y se necesita apareamiento para producir huevos (Williamson & Reid, 2001).

Las hembras pueden almacenar espermatozoides (espermátforo depositado por el macho) y por lo tanto producen huevos fértiles en la ausencia de machos en ciclopoideos y harpacticoideos. Los huevos están contenidos en dos sacos en ciclopoideos, en un saco en calanoideos y harpacticoideos. Los calanoideos producen dos tipos de huevos: subitáneo (con eclosión inmediata) y el de diapausa que puede ser viable después de cientos de años (Hairston et al., 1995). En los ciclopoideos, la diapausa está a cargo de alguno de los copepoditos (Frisch, 2002) o adulto al igual que los harpacticoideos. La diapausa se produce por condiciones ambientales adversas, cambios en el fotoperíodo y el hacinamiento (Walton, 1985; Santer, 1998; Gyllström & Hansson, 2004). La disponibilidad de alimentos y la depredación son factores que limitan la tasa de producción de huevos, desarrollo de copepoditos y el tamaño corporal (Caramujo & Boavida, 1999). Los depredadores también influyen en la proporción de sexos, pigmentación del cuerpo, o el momento de la diapausa.

Los copépodos presentan seis estados larvales naupliares y cinco de copepodito antes de llegar a adulto. La primera larva cuenta con segmentos de las anténulas, antenas y mandíbulas. En los sucesivos estados el cuerpo se va alargando y aparecen apéndices adicionales. Los copepoditos son morfológicamente similares a los adultos.

La mayoría de las especies pueden tener diversos ítems alimentarios: detritus, algas, ciliados, rotíferos (Lapesa et al., 2002), cladóceros (Brandl, 1998; Chang & Hanazato, 2003), nauplii (Cryer & Townsend, 1989), oligoquetos, larvas de dípteros (Fryer, 1957) e incluso larvas de peces aunque selectivos (Sommer et al., 2001). Entre los diaptómidos, las partículas de menos de 5  $\mu\text{m}$  son incorporadas en forma pasiva con corrientes de agua promovidas por sus apéndices mientras que las mayores de 50  $\mu\text{m}$  son capturadas activamente. Los ciclopoideos incorporan las presas siempre en forma activa ya sea por contacto en caso de las menores o por ataque en el de las más grandes (Lapesa et al., 2002; Chang & Hanazato, 2003). En general, los ciclopoideos se alimentan de presas de mayor tamaño que los calanoideos pudiéndose alimentar incluso de larvas de sus propios depredadores. Los harpacticoideos mayormente son raspadores del alimento presente en los sedimentos, aunque también pueden ser filtradores.



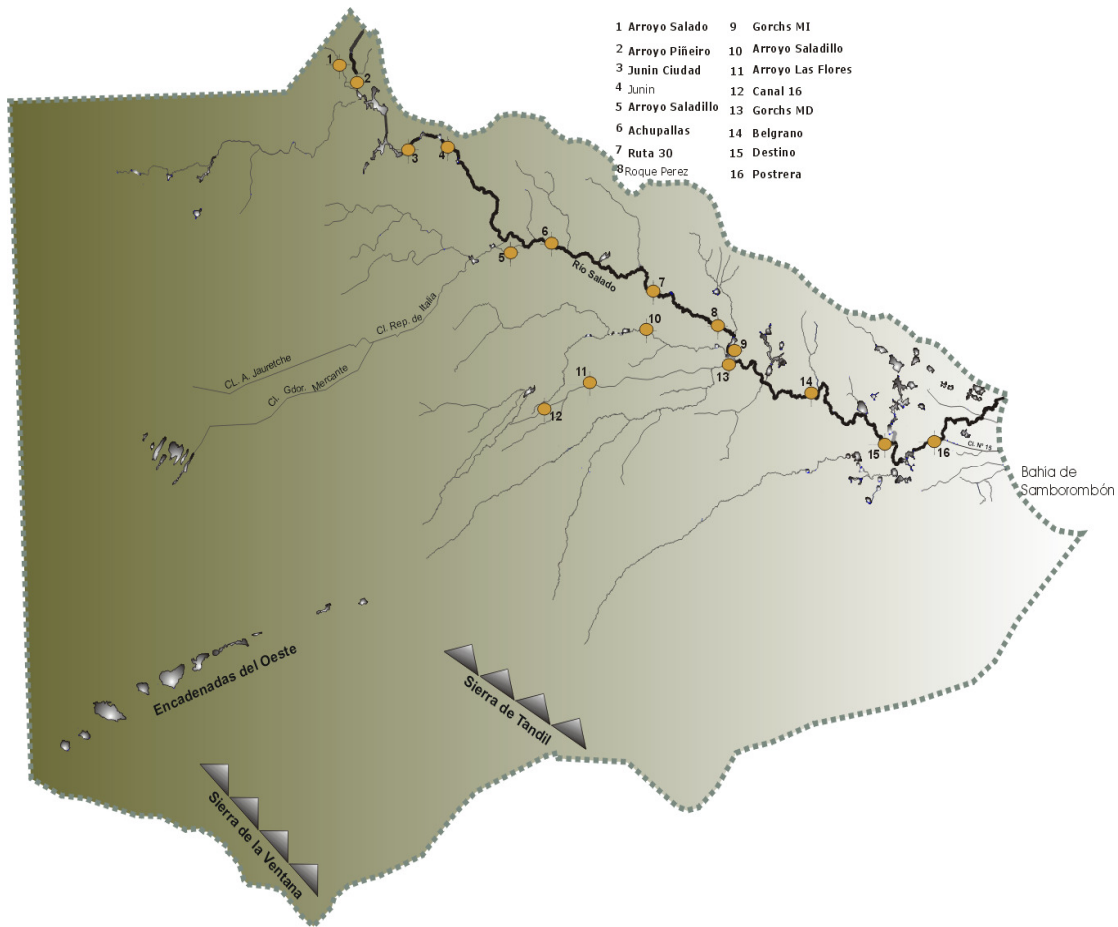


La dieta puede variar con la etapa de desarrollo, especialmente en las especies más carnívoras. Los nauplii y primeros copepoditos son generalmente más herbívoros. Muchas especies de ciclopoideos son caníbales (Brandl, 1998; García-Chicote et al., 2007).

## 2. Sitios de Muestreo

Se realizaron campañas de muestreo con el fin de coleccionar los individuos de estos 3 grupos descriptos y que posteriormente serían utilizados para cultivos en el laboratorio. Los muestreos se realizaron en cuerpos de agua de la cuenca del río Salado, (Buenos Aires) (Fig. 27) que han sido sitios de muestreo en investigaciones previas del equipo de trabajo y que involucraron no sólo al plancton sino también análisis de nutrientes, composición iónica del agua, entre otros aspectos y de las que se cuenta en algunos casos con información desde 1997 tanto del río propiamente dicho (Neschuk, 2001; Neschuk et al., 2002b; Solari et al., 2002; 2014; Gabellone et al., 2005; 2008; 2010; Claps et al., 2009; Bazzuri et al., 2010) como de una laguna de la cuenca (Benítez & Claps, 2000; Solari et al., 2003; Claps et al., 2004; 2011; Benítez, 2008).





**Figura 27. Cuenca del río Salado (provincia de Buenos Aires)**

Los rotíferos fueron obtenidos de las muestras colectadas en los canales artificiales que drenan el agua con elevada conductividad de la Pampa Arenosa (Figs. 27; 28) que se conectan al curso principal del río Salado en adyacencias de la ciudad de Bragado, así como también en un sector del río en la cuenca inferior (Fig. 29). Con estas colectas se garantizaban la obtención de especies con diferente tolerancia a la salinidad en una densidad superior al registro de las lagunas.





**Figura 28. a) río Salado en ruta 42; b) Canal Mones Cazón; c) Canal Mercante; d) Canal de Vinculación.**

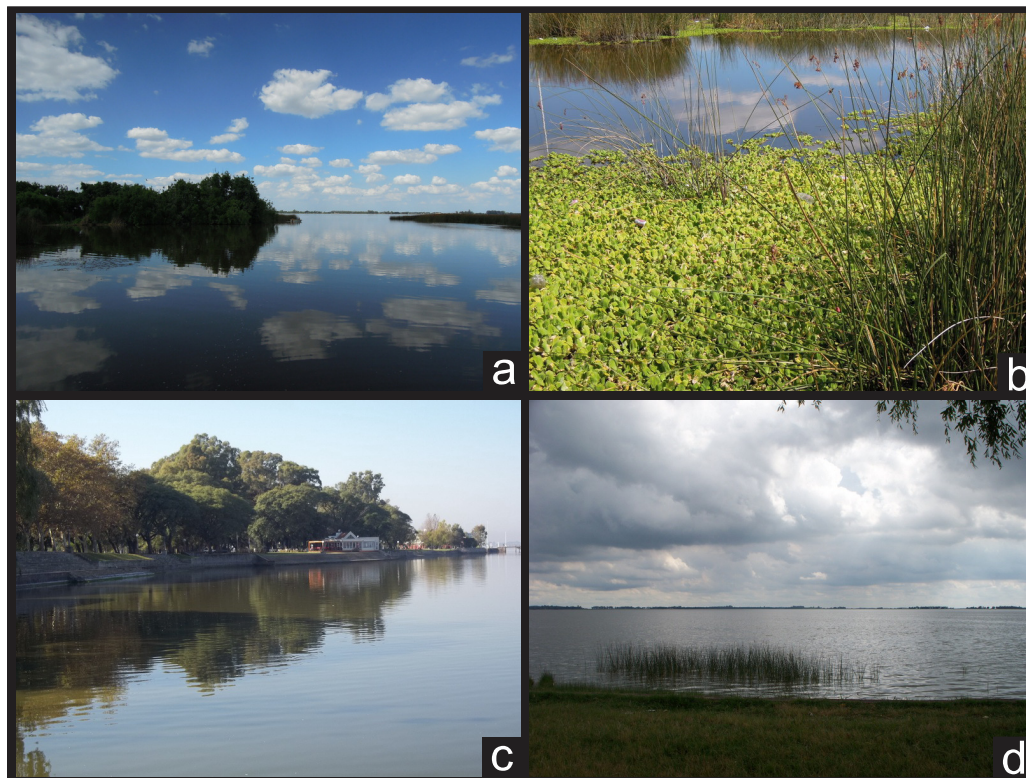


**Figura 29. Río Salado en el sitio de muestreo Guerrero (RN 2)**





En las lagunas de Monte y Chascomús (Fig. 30) se recolectaron muestras para la obtención de rotíferos pero principalmente de crustáceos que en estos ambientes presentan una mayor abundancia respecto a lo registrado en el río Salado y sus afluentes.



**Figura 30. Sectores litorales de la laguna San Miguel del Monte (a y b) y laguna de Chascomús (c y d).**

### 3. Colecta de muestras

En todos los muestreos se determinaron *in situ* parámetros físicos y químicos de relevancia para conocer las condiciones en las que se desarrollaban las poblaciones del zooplancton en ese momento. Se midió la temperatura del agua, conductividad, pH, oxígeno disuelto y turbidez mediante un sensor multiparamétrico Horiba U10. La transparencia del agua fue estimada a partir de la distancia a la que deja de observarse el disco de Secchi.

Se colectaron muestras de agua por medio del bombeo de 1000 litros de agua y filtrado con red de plancton de 35  $\mu\text{m}$  de apertura de malla. Una parte de la muestra (250ml) fue apartada en botellas plásticas, y fijada con una solución de formol al 4% para su posterior uso en la determinación taxonómica de los





integrantes del zooplancton. El volumen restante fue llevado al laboratorio para obtener los cultivos. También se colectaron muestras de sedimento de cada sitio por medio de un corer (Fig. 31). El sedimento se secó en estufa y se almacenó como reserva en caso de necesitar las estructuras de resistencia en él presentes para reiniciar un nuevo cultivo.



**Figura 31: Colecta de muestras. a) Toma de parámetros físico-químicos; b) medición de transparencia; c) filtrado de agua; d) toma de muestras de sedimento; e) detalle de muestras de sedimento.**

#### 4. Cultivos de zooplancton

Una vez colectadas las muestras se procedió a identificar las especies con bibliografía específica para algún grupo en particular (Koste, 1978) o para cada género (Paggi, 1978; 1995; Orlova-Bienkowskaja, 1998; Sinev, 2001b). Luego se separaron ejemplares de algunas especies para generar cultivos monoespecíficos de los integrantes más representativos y de importancia ecológica de cada uno de los cuerpos de agua muestreados. Para ello se utilizaron distintos recipientes que variaron en forma y tamaño (Fig. 32). En un principio se emplearon recipientes pequeños y luego se fue escalando en el tamaño de manera tal que la aclimatación de los individuos fuera gradual. También se probó el tamaño y forma más conveniente según los requerimientos de cada especie. La primera





separación se realizó en cámaras de cultivo multicelda (Fig. 32 a) que debido a su pequeño tamaño resulta muy útil para individualizar los organismos más pequeños como los rotíferos, y también realizar la separación de sexos en el caso de los copépodos. Posteriormente se utilizaron cápsulas de petri de vidrio (Fig. 32 b), éstas también se mantuvieron a lo largo de todo el tiempo de cultivos, ya que son recipientes apropiados para el manejo y control de los cultivos, y resultaron ser las preferidas de los rotíferos para generar un rápido crecimiento poblacional. Finalmente, a partir de las réplicas de estas cápsulas, se escaló a frascos transparentes de 100 ml, matraces erlenmeyer de 250 ml (Fig. 32 c) y por último a frascos de vidrio de 3000 ml (Fig. 32 c-f). Todos los cultivos se realizaron con réplicas. La mitad de ellos se colocaron en una cámara de incubación con fotoperiodo y temperatura controlados (14:10 horas luz y  $24 \pm 1$  °C) (Fig. 32 e-f). Las restantes se colocaron a temperatura ambiente con luz natural. Cabe destacar que este último tipo de cultivos se realizó sólo en temporadas de primavera-verano por no presentar problemas respecto a la temperatura, mientras que en invierno sólo se mantuvieron los cultivos en las cámaras de incubación con control de los niveles de temperatura.





**Figura 32: Variantes de recipientes donde se realizaron los cultivos de distintos integrantes del zooplancton dentro y fuera de la cámara de incubación.**

Se testaron diferentes tipos de alimento para algunas de las especies cultivadas:

- a) Trigo
- b) Levadura
- c) *Chlorella vulgaris* + levadura
- d) *Chlorella vulgaris*





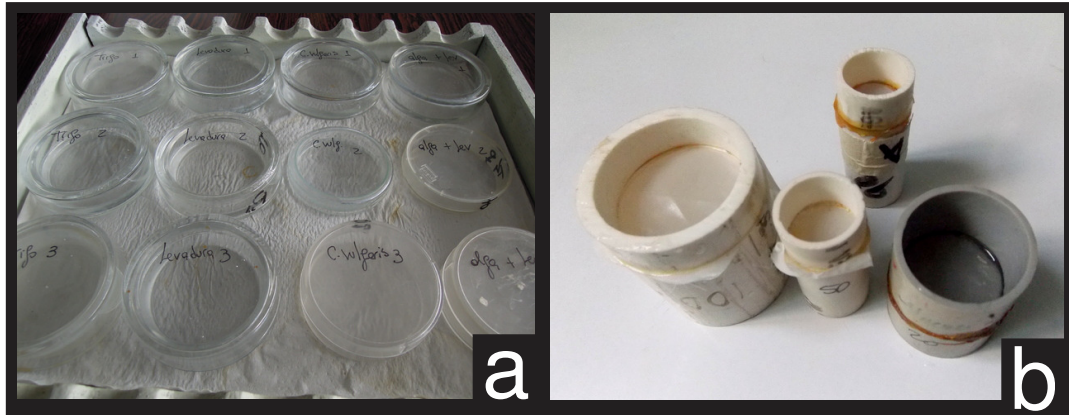
Se colocaron individuos de algunas de las especies de rotíferos obtenidos de las muestras (*Brachionus plicatilis*, *B. calyciflorus*, *B. angularis* y *Keratella tropica*) en cápsulas de petri y se las inoculó con los cuatro tipos de dieta (Fig. 33 a). Se colocaron cinco cápsulas de cada uno, las dos primeras se mantuvieron por dos semanas sin cambiar el medio de cultivo, mientras que a las restantes se lo renovaba cada dos días. En el caso del trigo y la levadura ninguna especie se adaptó de manera eficiente al medio. Esto se evidenció al observar una rápida generación de estructuras de resistencia, al mismo tiempo que la población no prosperó en número más allá de los 15 días de inicio del experimento. También se notó una rápida colonización por ciliados, lo cual podría ejercer un efecto negativo en las poblaciones de los rotíferos, en especial en recipientes tan pequeños. El medio de cultivo se empobreció rápidamente en todas las cápsulas. En el caso del tipo de alimento mixto (levadura + *C. vulgaris*) si bien hubo una importante colonización por ciliados, demoró más en aparecer que en los dos casos anteriores. Las cápsulas que no tuvieron recambio del medio se contaminaron en los primeros días, mientras que las que se repicaron tardaron más en empobrecerse. Los individuos tuvieron un aumento en el número poblacional importante en la primera semana, para luego estabilizarse y comenzar a producir estructuras de resistencia. Finalmente, el último caso, en el que sólo se los alimentó con el alga *C. vulgaris* fue el más exitoso. La contaminación por ciliados fue esporádica y fácilmente controlada con cada cambio de medio. Las cápsulas que permanecieron sin renovación del medio de cultivo se empobrecieron casi culminando la experiencia (10-12 días) y en todas ellas prosperaron aunque en menor número, los individuos de las cuatro especies. La población, principalmente en el caso de *Brachionus plicatilis* y *B. calyciflorus* creció exponencialmente, y a diferencia de los casos anteriores no aparecieron estructuras de resistencia en el tiempo ensayado.

También se probaron dos tipos de agua para el medio de cultivo: agua de red y medio de cultivo EPA. El procedimiento de aclimatación de los organismos a estos distintos medios se realizó de manera paulatina para evitar un shock en las especies que pueda generar un perjuicio en su dinámica poblacional o desarrollo. Para ello, el cambio de medio se realizó sustituyendo sólo el 50% del agua original. Una vez aclimatados, en el caso de los rotíferos, el cambio de medio de cultivo se realizó 3 veces por semana, mientras que para los copépodos y cladóceros fue de 2 veces por semana. Este procedimiento se realizó por medio del filtrado con pequeñas redes de distinta abertura de malla según las especies





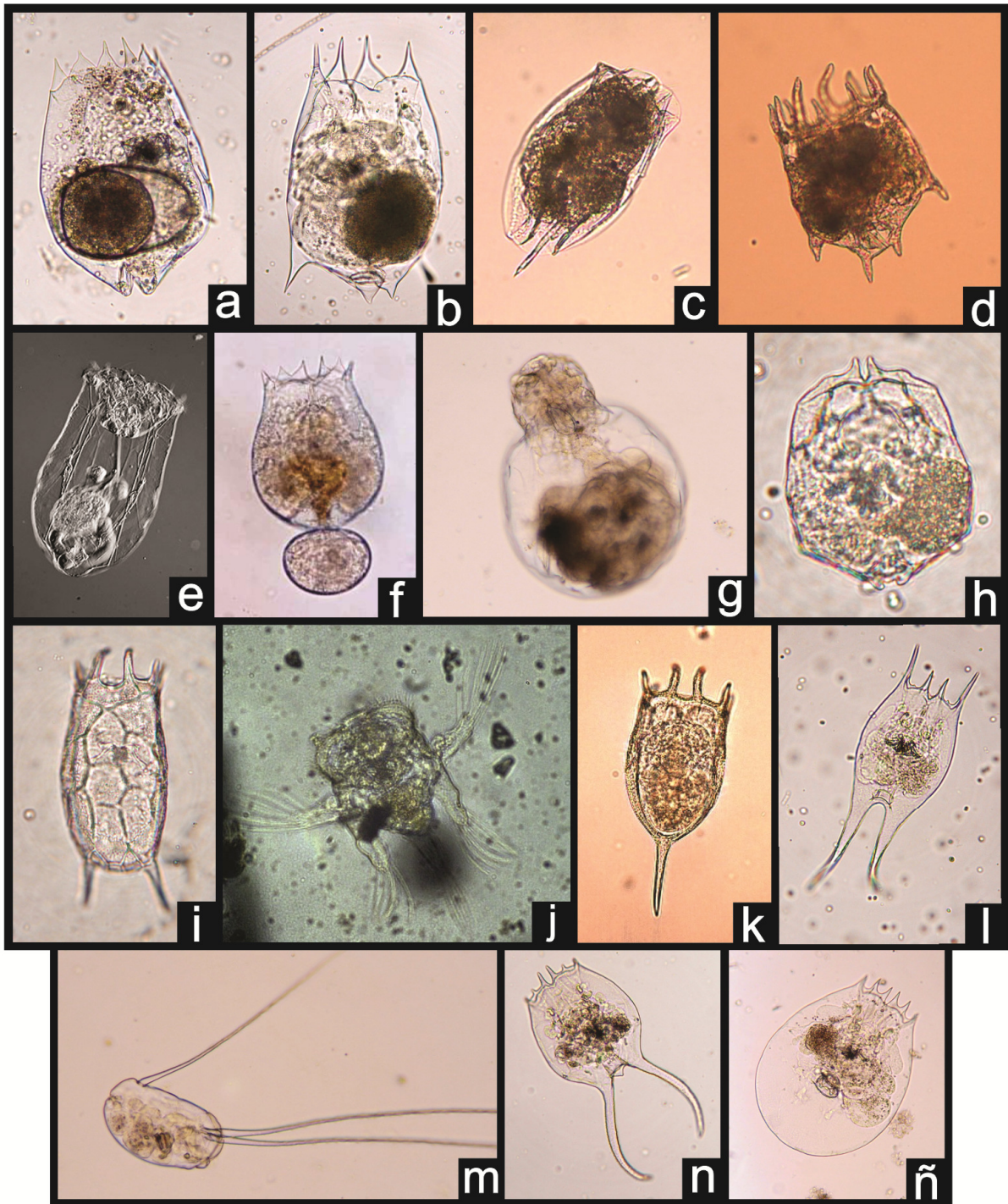
(20  $\mu\text{m}$ , 50  $\mu\text{m}$ , 90  $\mu\text{m}$  y 100  $\mu\text{m}$ ) construidas con tubos de PVC de diferente diámetro (Fig. 33). El medio EPA se preparó disolviendo 96 mg  $\text{NaHCO}_3$ , 60 mg de  $\text{CaSO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4$  60 mg y 0,4 mg de  $\text{KCl}$  por litro de agua destilada (EPA, 1985).



**Figura 33: a) Cápsulas de petri con las variantes de alimento (Trigo, Levadura, alga *C. vulgaris* y alga + levadura); b) Redes de plancton de distinta abertura de malla (50, 90, 100 y 200  $\mu\text{m}$ ) para cultivos de rotíferos, copépodos y cladóceros en laboratorio.**

Las especies de rotíferos que se cultivaron en laboratorio a partir de las muestras colectadas en campo fueron: *Brachionus plicatilis*, *B. calyciflorus*; *B. rotundiformis*, *Euchlanis dilatata*, *Plationus patulus*, *Asplanchna sieboldii*, *A. girodi*, *B. angularis*, *B. havanensis*, *B. caudatus*, *B. pterodinoides*, *Keratella tropica*, *K. cochlearis*, *Hexarthra sp.*, y *Filinia longiseta* (Fig. 34). Pero sólo las primeras seis especies alcanzaron una densidad poblacional suficiente para realizar los experimentos.



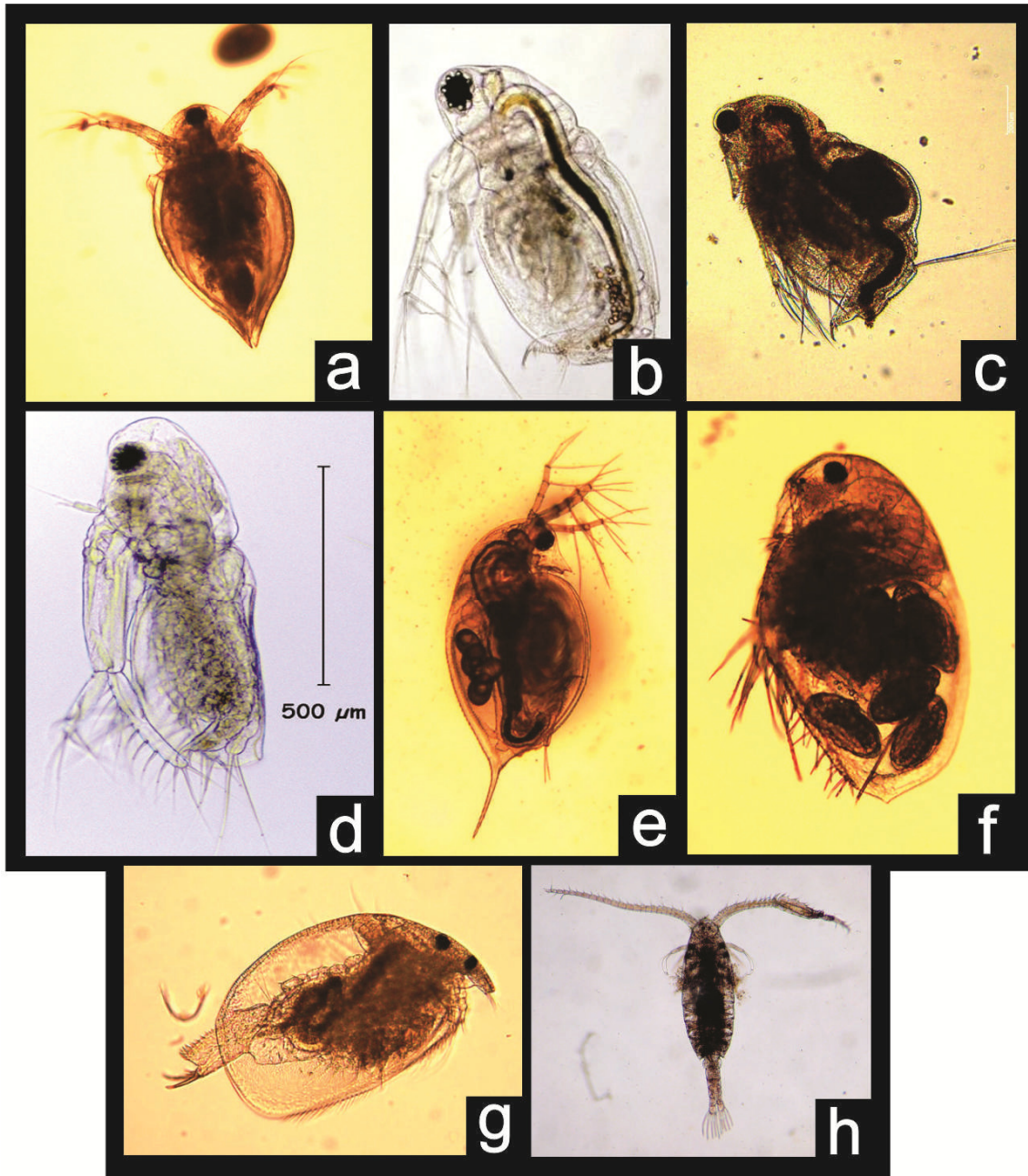


**Figura 34: Especies de rotíferos cultivadas en laboratorio.**  
 a) *Brachionus plicatilis* b) *B. calyciflorus* c) *Euchlanis dilatata* d) *Platyonus patulus* e) *Asplanchna sieboldii* f) *Brachionus rotundiformis* g) *Asplanchna girodi*  
 h) *Brachionus angularis* i) *Keratella tropica* j) *Hexarthra* sp. k) *Keratella cochlearis* l) *Brachionus havanensis* m) *Filinia longiseta* n) *Brachionus caudatus*  
 ñ) *B. pterodinoides*.





Entre los cladóceros, *Simocephalus vetulus*, *Moina micrura*, *M. macrocopa*, *Diaphanosoma birgei*, *Daphnia pulex*, *Macrothrix triserialis*, y *Alona glabra* se cultivaron y utilizaron en las experiencias en laboratorio así como también *Notodiaptomus incompositus* como representante de los copépodos calanoideos (Fig. 35).



**Figura 35: Especies de cladóceros y copépodos cultivadas en laboratorio.**  
**a) *Simocephalus vetulus* b) *Moina micrura* c) *M. macrocopa* d) *Diaphanosoma birgei* (imagen tomada de internet) e) *Daphnia pulex* f) *Macrothrix triserialis* g) *Alona glabra* h) *Notodiaptomus incompositus*.**





## 5. Crecimiento poblacional

En esta etapa se evaluó el crecimiento poblacional de cinco especies de rotíferos y cinco especies de cladóceros con el fin de conocer su dinámica poblacional en condiciones controladas de laboratorio. Esto permitió generar un parámetro propio de la dinámica poblacional de las especies cultivadas, de manera de poder compararlo con los datos obtenidos en los subsiguientes experimentos. La tasa de crecimiento poblacional “r” resume todos los parámetros de una tabla de vida combinando fecundidad, supervivencia y tiempo de reproducción y desarrollo (Miracle & Serra, 1989) y aquellos organismos que alcancen altos valores tendrán una ventaja crucial al momento de responder ante un cambio en la condición del ambiente. A su vez, este parámetro estará sujeto a las condiciones en las que se encuentren las especies y en cuanto a su fisiología y genética propia (Serra et al., 1998).

A continuación se describen brevemente características de las especies utilizadas de cada grupo en estas experiencias de crecimiento poblacional.

### 5.1 Rotíferos:

#### *Brachionus plicatilis* Müller, 1786

Este rotífero eurihalino es cosmopolita, con registro tanto en lagos salinos, aguas salobres y agua dulce ya que es tolerante a diferentes condiciones ambientales (Walter, 1981). Se cultiva fácilmente (Navarro & Yúfera, 1998; Ohmori et al., 2011) y se utiliza en la acuicultura como alimento vivo para larvas de peces, camarones y cangrejos (Lubzens et al., 2001; Yin & Zhao, 2008; Sulehria, 2010). A nivel mundial, existe una profusa literatura acerca de aspectos ecológicos y taxonómicos (Esparcia et al., 1989; Miracle & Serra, 1989; Serra et al., 1994; 1998; Gómez & Serra, 1995; Gómez, & Snell, 1996; Ciros Pérez et al., 2001, Campillo et al., 2005; Kotani et al., 2005; entre otros).

Se ha demostrado que la salinidad es el modulador de la tasa de reproducción de *B. plicatilis* y que la tasa de filtración disminuye en los ambientes marinos drásticamente entre 17 a 36 g l<sup>-1</sup> (Hirayama & Ogawa, 1972). Se ha sugerido que la necesidad de energía para la osmoregulación promueve la disminución de las tasas de alimentación y reproducción. La salinidad también afecta a la eclosión de huevos. La energía generada en los rotíferos que excede la





requerida para la partenogénesis se desvía hacia la mixis y la producción de huevos de resistencia.

Es un filtrador no selectivo ya que puede alimentarse de cianobacterias, clorofitas, bacterias y levaduras (Walter, 1981).

El tamaño y la forma de la loriga varían mucho de acuerdo a la cepa ya que se puede registrar la presencia de dos taxa, los denominados 'L' (grande) y 'S' (pequeño) que corresponden a *B. plicatilis* Müller, 1786 y *B. rotundiformis* Tschugunoff 1921, respectivamente (Anitha & George, 2006). La loriga es oval con seis espinas occipitales de base amplia, casi iguales y cuatro lóbulos, sin espinas posteriores. La longitud de la loriga fluctúa entre 171-277  $\mu\text{m}$  y el ancho máximo entre 156-225  $\mu\text{m}$ .

Este rotífero planctónico es una de las especies dominantes en ambientes lénticos y lóticos de la provincia de Buenos Aires que se caracterizan por una elevada salinidad que puede ser permanente o transitoria (Modenutti, 1998; Neschuk et al., 2002; Ardohain et al., 2005; Claps et al., 2009).

#### *Asplanchna sieboldii* (Leydig, 1854)

El rotífero *Asplanchna* es cosmopolita (Segers, 2007) y puede encontrarse comúnmente en ambientes dulceacuícolas de regiones templadas y tropicales. Su presencia por medio de señales químicas induce la ciclomorfosis en algunos otros rotíferos que son sus presas como en *Brachionus calyciflorus*, *B. patulus* y *Anuraeopsis fissa* (Gilbert 1980; Stemberger 1990; Dumont & Sarma 1995) o inhibe su reproducción (Gilbert, 2013). Las especies del género *Asplanchna* son abundantes en ambientes eutróficos (Chang et al., 2010) y tienen diferentes hábitos alimentarios. En general, se considera al género como omnívoro, aunque se alimentan preferentemente de otros rotíferos (Kappes et al., 2000). Los factores que determinan los hábitos de alimentación de rotíferos incluyen los internos como la estructura del mastax y la capacidad de alimentación (habilidad de captura e ingestión) y los externos (físicoquímicos y la abundancia del alimento). Los morfotipos y el tipo de mastax influyen en los hábitos alimentarios específicos de cada especie (Hampton & Starkweather, 1998). La intensidad de la presión de depredación de la mayoría de las especies de *Asplanchna*, es controlada por la morfología de la presa y su densidad así como su nivel de apetito (Nandini et al., 2003). En los ambientes, en general, las especies de *Asplanchna* cuando no son muy abundantes no ejercen una presión de depredación y si es lo





suficientemente elevada produce una merma extrema en las poblaciones de sus presas (Chang et al., 2010). Se ha señalado que *Asplanchna herricki* es detritívoro mientras que *Asplanchna girodi* y *A. silvestrii* son depredadores. Con respecto a *Asplanchna priodonta* se lo ha categorizado como depredador (Salt, 1989) y como herbívoro (Kappes et al., 2000; Pocięcha & Wilk-Woźniak, 2008). Aunque la depredación se considera más ventajosa energéticamente, se ha comprobado que *A. priodonta* alcanza tasas intrínsecas de crecimiento hasta  $r = 0,57$  cuando se alimenta exclusivamente de algas (Kappes et al., 2000). *Asplanchna sieboldii* es uno de los depredadores más voraces a menudo caníbal y capaz de alimentarse de casi todos los Brachionidae (Gilbert, 1980).

En Argentina, la presencia de *A. sieboldii* se ha registrado en la provincia de Tierra del Fuego, Corrientes y Buenos Aires (José de Paggi, 1990; Frutos & Carnevali, 2008).

Las hembras de *A. sieboldii* presentan una longitud entre 500 y 2500  $\mu\text{m}$  mientras que los machos entre 300 y 1200  $\mu\text{m}$ . Las hembras cuentan con tres morfotipos posibles: sacciforme, cruciforme y acampanado. El primer morfotipo siempre es amictico mientras que los otros dos pueden ser amicticos o micticos. Son vivíparas. Los machos presentan dos gibas laterales cuya finalidad es tratar de evitar el canibalismo de las hembras (Nogrady & Segers, 2002).

### *Euchlanis dilatata* Ehrenberg, 1832

*Euchlanis dilatata* es considerada una especie perifítica que muestra una clara preferencia por determinadas macrófitas sumergidas (Dugan, 2001; Kuczyńska-Kippen & Nagengast, 2003). Se alimenta de algas verdes, diatomeas, de cianobacterias filamentosas (Koste, 1978) y ciliados (Joaquim-Justo et al., 2004). Es común su registro en la columna de agua de lagos someros así como también en la zona litoral. Se la considera cosmopolita, con alta tolerancia a diversos factores ambientales ya que por ejemplo existen hallazgos en ambientes con salinidad variable (Adamkiewicz-Chojnacka, 1988).

El cuerpo ovoide presenta la placa dorsal y ventral de similar tamaño, con mastax maleado y un pie con dos dedos fusiformes. La longitud de las placas oscila entre 200 y 240  $\mu\text{m}$ , el ancho entre 110 y 120  $\mu\text{m}$  y la longitud de los dedos entre 60 y 70  $\mu\text{m}$ .





En las lagunas de la provincia de Buenos Aires es una especie común en el zooplancton, es decir muy frecuente con baja abundancia, sobre todo en aquellas lagunas que presentan macrófitas sumergidas (Arдохain, 2008; Benítez, 2008).

#### *Plationus patulus* (Müller, 1786)

Este rotífero cosmopolita (Alhstrom, 1940) puede registrarse en la columna de agua de los ambientes acuáticos aunque también se fija a sustratos (Hampton & Gilbert, 2001). Es una especie que se utiliza como alimento en piscicultura (Prieto & Atencio, 2008).

La lorica rectangular (longitud hasta 135  $\mu\text{m}$  y ancho hasta 154  $\mu\text{m}$ ) presenta seis espinas anteriores, de las cuales las medianas son más largas y cuatro posteriores, siendo las laterales las de mayor longitud. Pie terminal pseudosegmentado, con dos dedos de igual longitud. Mastax maleato: unci con dientes subiguales, Manubrio con cavidades proximales cerradas, presencia de los procesos anteriores en el rami, eje del manubrio casi recto.

En las lagunas de la provincia de Buenos Aires es una especie planctónica que se registra en forma esporádica con baja abundancia (Boltovskoy et al., 1990; Arдохain et al., 2005; Arдохain, 2008; Benítez, 2008). Es común que la especie sea citada como *Brachionus patulus* a pesar de que Segers et al. (1993) erigieran el género *Plationus* que lo incluye.

#### *Brachionus calyciflorus* Pallas, 1776

La lorica es flexible, lisa y ovalada. Margen dorsal anterior con cuatro espinas de base amplia. Las espinas posteriores pueden estar presente o ausente. Esta especie tiene muchas formas polimórficas. Las mayoría de las hembras provenientes de huevos de resistencia no tienen espinas posterolaterales (Yin & Niu, 2008). Se ha comprobado que este polimorfismo y la plasticidad fenotípica se deben a la depredación de *Asplanchna* (Gilbert, 1985; Gilbert & Schröder, 2004). Es una especie muy utilizada a nivel experimental, principalmente en estudios ecotoxicológicos y por eso es importante conocer su dinámica poblacional.





Se alimenta de clorofitas, preferentemente especies de *Chlamydomonas* pero también puede hacerlo de cianofitas (Starkweather, 1981; Sterner, 1989; Gilbert, 1996; DeMott, 1989; Ooms-Wilms et al., 1999; Liu et al., 2002).

En las lagunas de la provincia de Buenos Aires es una especie planctónica muy común y que puede llegar a ser dominante (Olivier, 1961; Ringuelet et al., 1972; Boltovskoy et al., 1990; Ardohain et al., 2005; Ardohain, 2008; Benítez, 2008; Claps et al., 2011).

## 5.2 Cladóceros:

### *Alona glabra* Sars, 1901

Esta especie es muy similar a *Alona cambouei* y *Alona pulchella* por lo cual los registros sudamericanos de estas dos especies son erróneos ya que su distribución es exclusiva del Hemisferio Norte (Sinev, 2001a;b) mientras que *Alona glabra* es una especie sudamericana. El cuerpo es ovoide sin dentículos en el ángulo postero-ventral de la valva. Tiene tres poros cefálicos interconectados. El postabdomen cuenta con siete a ocho dentículos marginales bien desarrollados hacia la parte distal y garra terminal larga.

Su registro en el plancton puede considerarse esporádico ya que el agua libre no es su hábitat preferido (Elmoor-Loureiro et al., 2004).

En las lagunas de la provincia de Buenos Aires es una especie con registro frecuente en el plancton pero en escaso número (Boltovskoy et al., 1990; Ardohain et al., 2005; Ardohain, 2008; Benítez, 2008).

### *Macrothrix triserialis* (Brady, 1886)

Se ha propuesto que la identificación de esta especie en Sudamérica puede ser errónea (Elmoor-Loureiro et al., 2004) pero en este caso no se cuenta con suficiente evidencia para considerarla otra especie por lo que se mantiene su identificación.

En las lagunas de la provincia de Buenos Aires es una especie con registro esporádico en el plancton y en escaso número (Boltovskoy et al., 1990; Ardohain et al., 2005; Ardohain, 2008; Benítez, 2008).





### *Simocephalus vetulus* (Müller, 1776)

Este cladóceros se alimenta de algas, protozoos y detritus. Está asociado a la vegetación acuática. Es una especie fácil de cultivar por lo cual se utiliza como alimento en acuicultura y para estudios ecotoxicológicos (Juárez & Villagra de Gamundi, 2007).

En las lagunas de la provincia de Buenos Aires es una especie con registro frecuente en el plancton pero en escaso número (Boltovskoy et al., 1990; Ardohain et al., 2005; Ardohain, 2008; Benítez, 2008; Chaparro, 2013).

### *Moina macrocopa* (Straus, 1820)

Es una especie del Hemisferio Norte que ha sido introducida accidentalmente en los ambientes acuáticos pampeanos por la siembra de peces de criaderos de la provincia de Buenos Aires, donde es utilizada como alimento. Es una especie ubicua que podría desplazar a especies cogenéricas autóctonas (Vignatti et al., 2013), aunque en laboratorio se comprobó que con temperaturas mayores a 35 y menores de 10 °C, su crecimiento se detenía (Benider et al., 2002).

### *Daphnia pulex* Leydig, 1860

De acuerdo a Benzie (2005), los registros de esta especie en Sudamérica podrían ser *Daphnia pulicularia* o formas de *Daphnia obtusa*. Es imposible distinguir utilizando caracteres morfológicos a *D. pulex* y *D. pulicularia* aunque son genéticamente distintas (Crease et al., 2012). Es una especie fácil de cultivar por lo cual se utiliza como alimento en acuicultura y para estudios ecotoxicológicos. En los últimos años se ha establecido en ambientes dulceacuícolas de Nueva Zelanda, sin poder demostrarse efectivamente como se produjo la invasión (Duggan et al., 2012).

## **Materiales y métodos**

Todos los experimentos se realizaron por triplicado, en condiciones controladas de temperatura (24 ±1°C). Se alimentaron a diario con 0,5 x10<sup>6</sup> individuos/ml de *C. vulgaris*, a excepción de *A. sieboldii* que, por ser un organismo depredador, se alimentó con 40 individuos/día de *P. patulus*. El





volumen en el cual se desarrolló la experiencia fue de 20 ml para los rotíferos y 50 ml para los cladóceros. El número inicial de rotíferos fue de 0,5 individuos/ml, excepto para *A. sieboldii* que fue de 0,05 individuos/ml. Todas las especies de cladóceros tuvieron una densidad inicial de 0,2 individuos/ml. Los conteos se realizaron cada 24 horas al mismo tiempo que se realizó el cambio de medio de cultivo. Se contaron los adultos y en el caso de poder discriminar la presencia de huevos, éstos también fueron contabilizados. La experiencia duró hasta registrar un notorio descenso en la densidad poblacional (7-10 días según la especie en cuestión). Se realizaron análisis descriptivos, y se calculó la tasa de crecimiento poblacional ( $r$ ), la cual se sometió a análisis de la varianza (ANOVA de una vía) utilizando el programa Sigma plot 11.0 para evidenciar diferencias entre las especies de ambos grupos. Por último se fotografiaron 20 individuos de cada especie (a excepción de *A. sieboldii*) con microscopio óptico y se midieron por medio del programa Motic 2.0, para su posterior análisis morfométrico y correlación del tamaño con la tasa de crecimiento poblacional para cada especie.

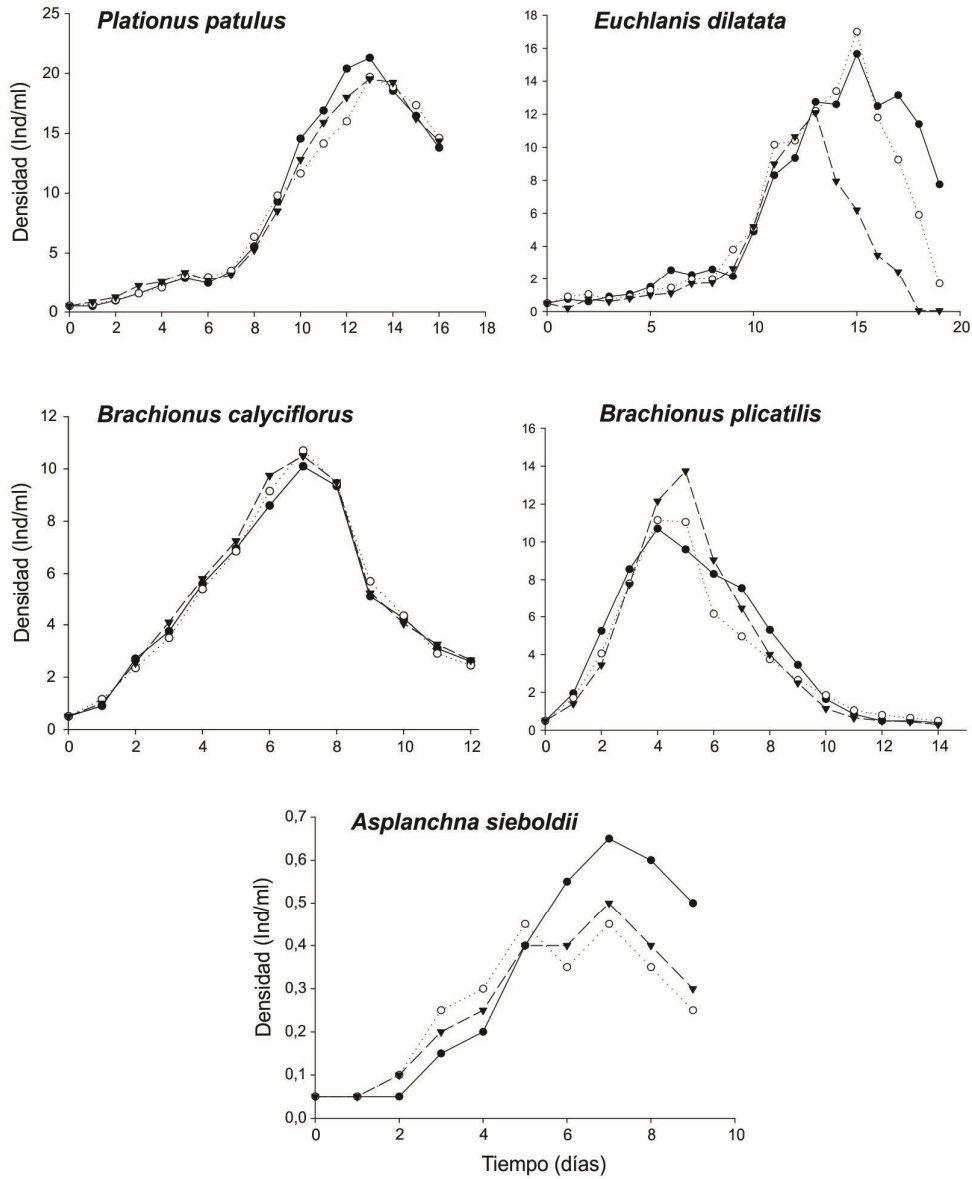
## Resultados

Los gráficos a continuación (Fig. 36) muestran el crecimiento poblacional expresado por la densidad en función del tiempo para cada especie y por triplicado para cada tratamiento.

*Plationus patulus* alcanzó el mayor pico de densidad (21 individuos/ml) en 13 días de experiencia, le siguió *E. dilatata* con 16 individuos/ml también en la segunda semana, mientras que *B. plicatilis* alcanzó un similar desarrollo (14 ind/ml) pero en los primeros seis días del experimento. *B. calyciflorus* también alcanzó su pico máximo al finalizar la primer semana pero con valores un poco menores (11 ind/ml).

El caso de *A. sieboldii* se evalúa por separado ya que se inició con un número menor de individuos, pero al igual que en el caso de *B. calyciflorus*, la densidad máxima (0,7 ind/ml) fue alcanzada al finalizar la primera semana.

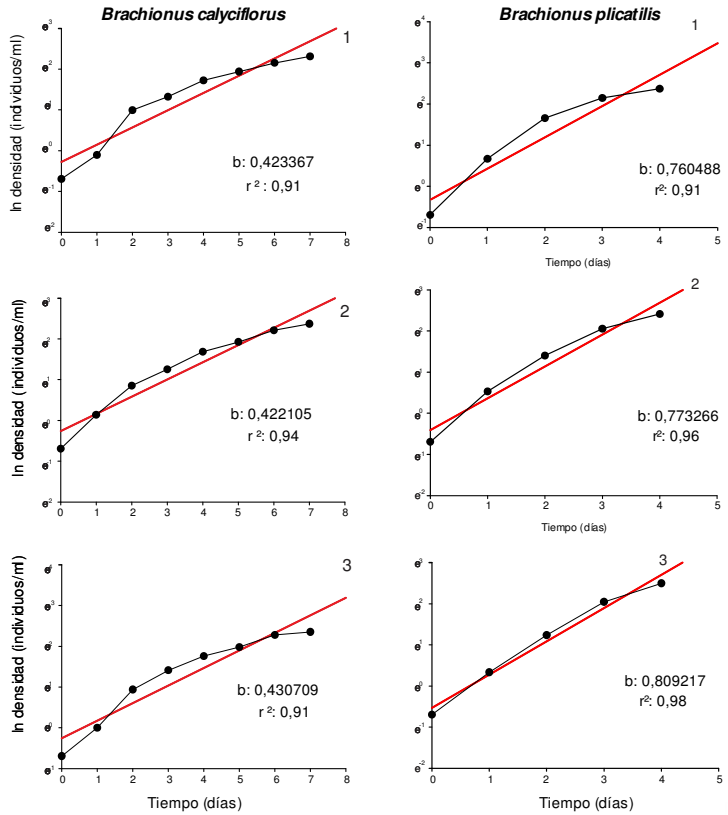
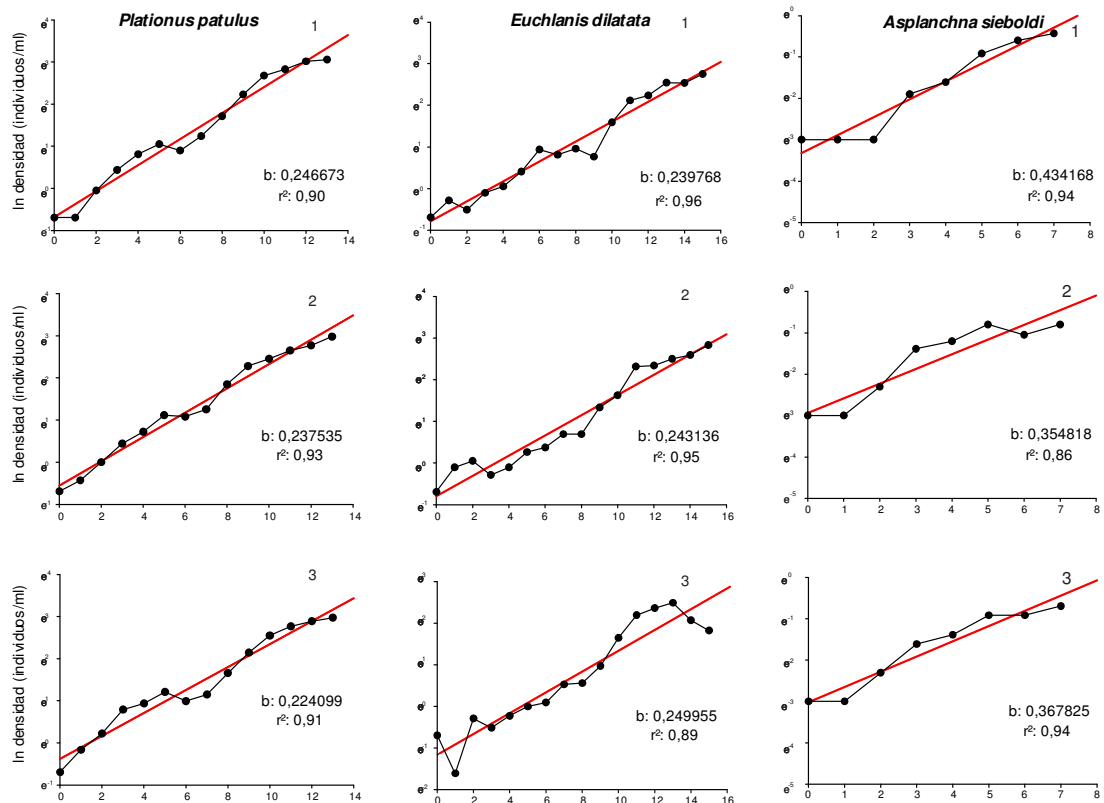




**Figura 36: Curvas de crecimiento poblacional de las cinco especies de rotíferos utilizadas en este experimento (cada línea corresponde a una réplica de cada tratamiento).**

La tasa de crecimiento poblacional ( $r$ ) se calculó de manera gráfica por medio de las curvas de crecimiento de cada triplicado (Fig. 37). Ésta se vio representada como la pendiente de la recta de regresión aplicada a cada curva en el periodo de crecimiento exponencial y hasta que alcanza su pico máximo de crecimiento. Así, se obtuvieron tres “ $r$ ” poblacionales para cada especie, las cuales fueron sometidas al ANOVA de una vía.





**Figura 37: Curvas de crecimiento poblacional durante la fase exponencial y rectas de regresión (en rojo que responde a la pendiente “b” equivalente al “r” poblacional). En números arábigos las tres réplicas de cada especie.**





El análisis de varianza arrojó diferencias significativas para la tasa de crecimiento poblacional dentro del grupo de los rotíferos ( $p < 0,001$ ) (Tabla 5, Fig. 38). El análisis a posteriori de Holm-Sidak, evidenció que estas diferencias se encontraron entre todas las especies excepto entre *P. patulus* y *E. dilatata*, las cuales compartieron los menores valores de pendiente (tasa de crecimiento poblacional) ( $\approx 0,24$ ), y entre *A. sieboldii* y *B. calyciflorus* con valores de pendiente intermedios (0,39 y 0,42 respectivamente) y por último *B. plicatilis* con la mayor tasa de crecimiento promedio (0,78).

Esto demuestra que si bien *P. patulus* y *E. dilatata* fueron los que alcanzaron las densidades más elevadas a lo largo de la experiencia, *B. plicatilis* es el que crece más rápido, lo que lo convierte en un organismo ideal para experimentos de corta duración.

**Tabla 5: Resultados de ANOVA para la tasa de crecimiento poblacional**

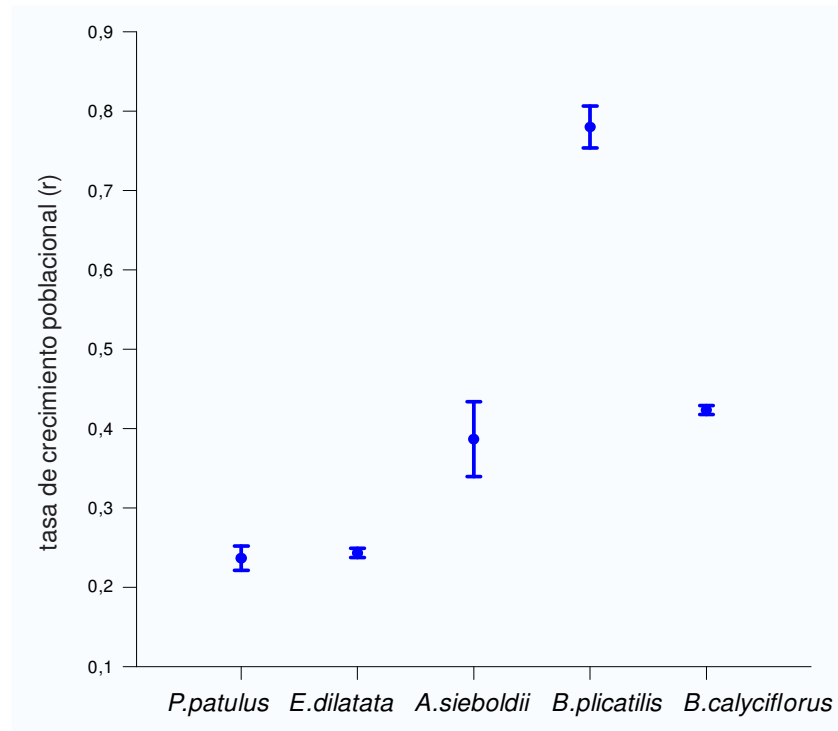
Análisis de Varianza de una vía (Sigma plot 11.0)					
<b>Test de Normalidad:</b>	Pasó	(P = 0,282)			
<b>Test de Homocedasticidad:</b>	Pasó	(P = 0,407)			
<b>Grupo</b>	<b>N</b>	<b>Media</b>	<b>Desvío</b>	<b>SCM</b>	
<i>Plationus</i>	3	0,237	0,0153	0,0088	
<i>Euchlanis</i>	3	0,243	0,0057	0,0033	
<i>Asplanchna</i>	3	0,387	0,0473	0,0273	
<i>B. plicatilis</i>	3	0,780	0,0265	0,0153	
<i>B. calyciflorus</i>	3	0,423	0,0057	0,0033	
<b>F.Variación</b>	<b>g.l</b>	<b>SC</b>	<b>CM</b>	<b>F</b>	<b>P</b>
Entre Grupos	4	0,586	0,147	226,582	<b>&lt;0,001</b>
Residuo	10	0,00647	0,000647		
Total	14	0,593			

método de comparación múltiple Holm-Sidak  
alpha = 0,050: 0,842

**Test a posteriori de comparación múltiple de Holm-Sidak**

Comparación	Dif. Medias	t	PCritico	nivel	Significancia
<i>B. plicatilis</i> vs. <i>Plationus</i>	0,543	26,168	<0,001	0,005	Si
<i>B. plicatilis</i> vs. <i>Euchlanis</i>	0,537	25,847	<0,001	0,006	Si
<i>B. plicatilis</i> vs. <i>Asplanchna</i>	0,393	18,944	<0,001	0,006	Si
<i>B. plicatilis</i> vs. <i>B. calyciflorus</i>	0,357	17,178	<0,001	0,007	Si
<i>B. calyciflorus</i> vs. <i>Plationus</i>	0,187	8,990	<0,001	0,009	Si
<i>B. calyciflorus</i> vs. <i>Euchlanis</i>	0,180	8,669	<0,001	0,010	Si
<i>Asplanchna</i> vs. <i>Plationus</i>	0,150	7,224	<0,001	0,013	Si
<i>Asplanchna</i> vs. <i>Euchlanis</i>	0,143	6,903	<0,001	0,017	Si
<i>B. calyciflorus</i> vs. <i>Asplanchna</i>	0,0367	1,766	<b>0,108</b>	<b>0,025</b>	<b>No</b>
<i>Euchlanis</i> vs. <i>Plationus</i>	0,0067	0,321	<b>0,755</b>	<b>0,050</b>	<b>No</b>

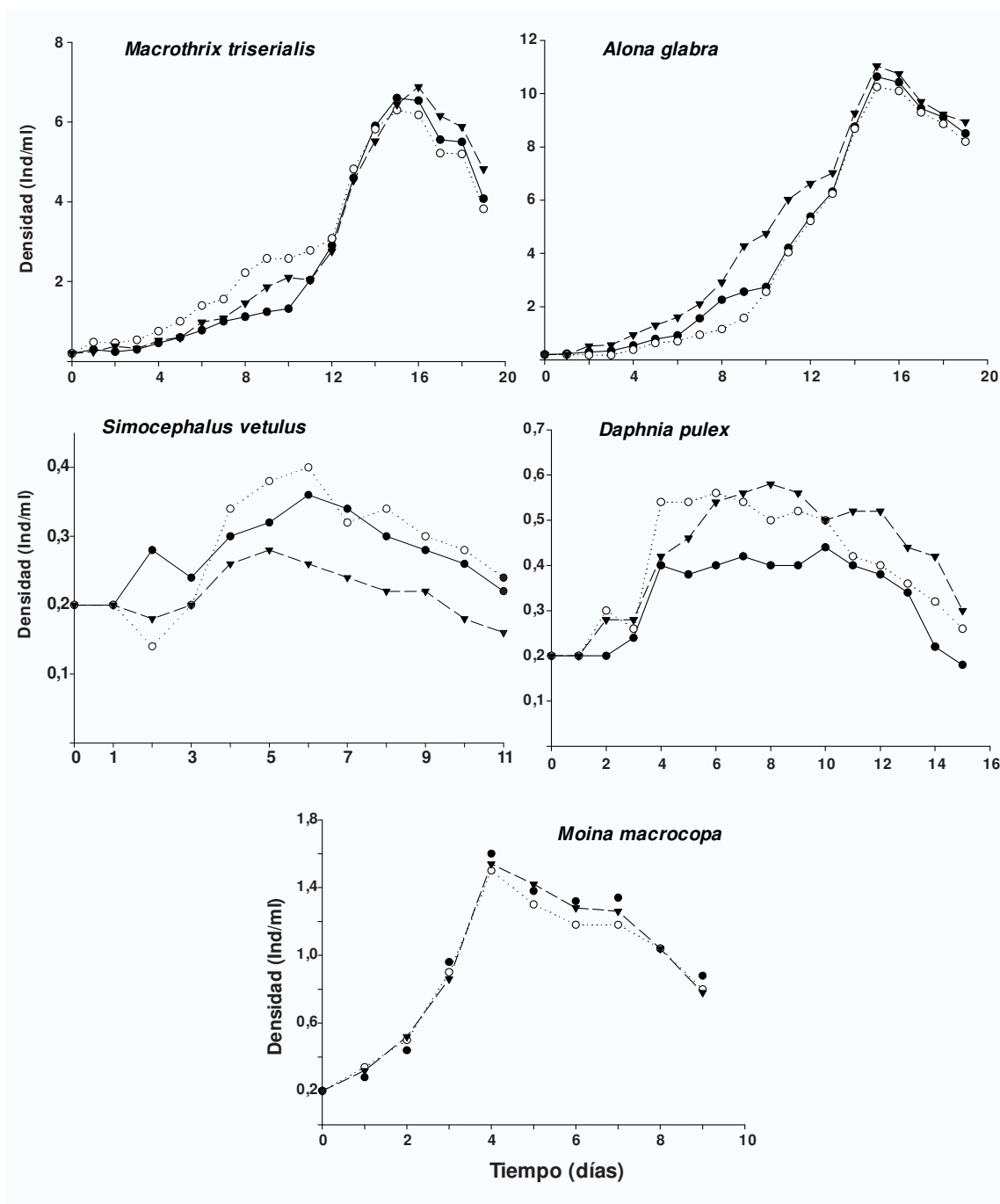




**Figura 38: Gráfico de ANOVA para la tasa de crecimiento poblacional de las cinco especies de rotíferos.**

En cuanto a la densidad poblacional de los cladóceros durante el experimento (Fig.39), *M. triserialis* y *A. glabra* tuvieron sus picos máximos a los 15 días de la experiencia (7 y 11 individuos/ml respectivamente). Les siguió *M. macrocopa* con 1,6 individuos/ml en tan sólo 4 días. Mientras que *D. pulex* mostró una estabilidad entre los días 6 y 10 (0,6 individuos/ml) antes de decaer abruptamente. Lo mismo sucedió con *S. vetulus* entre los días 4 y 6 con densidades similares. Esta última especie también evidenció la menor densidad poblacional (0,3 - 0,4 individuos/ml).

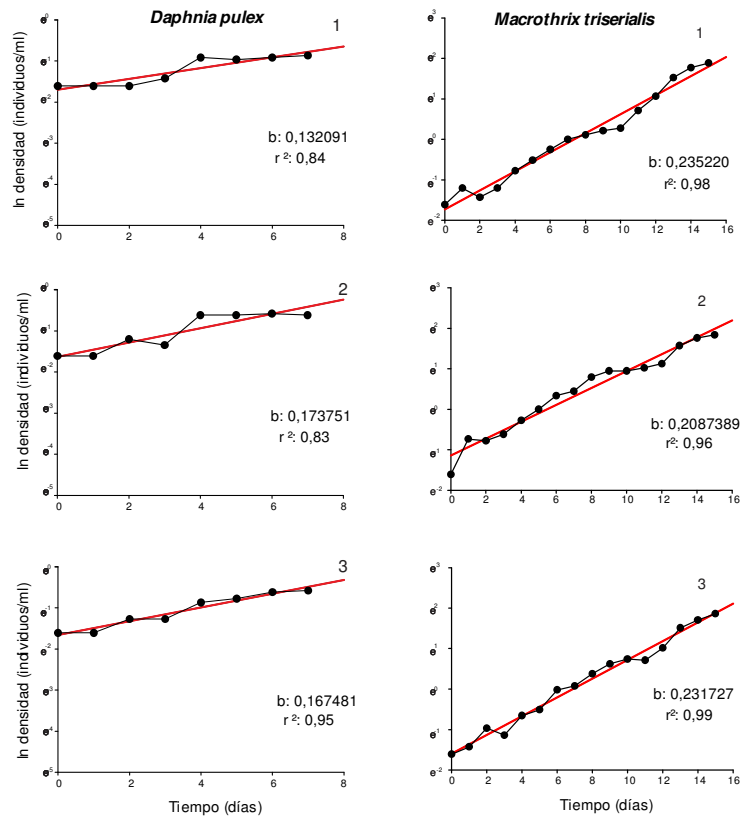
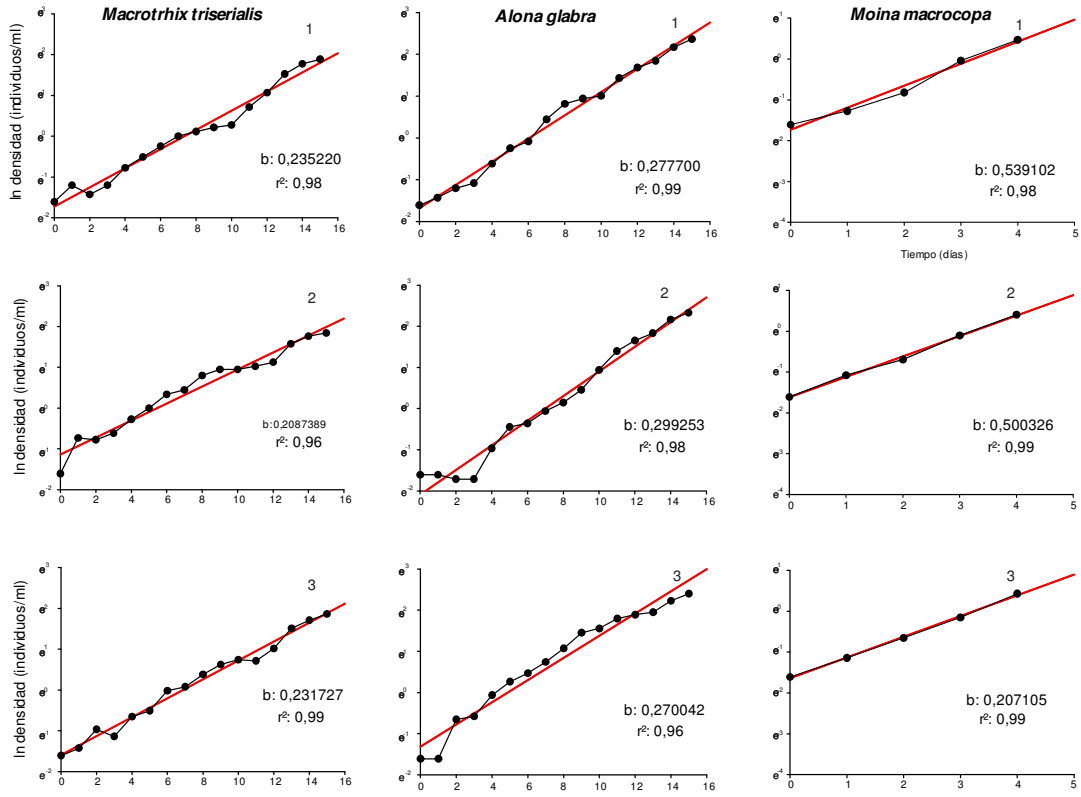




**Figura 39: Curvas de crecimiento poblacional de las cinco especies de cladóceros utilizadas en este experimento (las curvas indican las réplicas de cada tratamiento).**

La tasa de crecimiento poblacional ( $r$ ) se calculó, al igual que para los rotíferos, de manera gráfica por medio de las curvas de crecimiento de cada triplicado (Fig. 40) para luego someter los coeficientes obtenidos a un análisis de varianza.





**Figura 40: Curvas de crecimiento poblacional durante la fase exponencial y rectas de regresión (en rojo que responde a la pendiente “b” equivalente al “r” poblacional). En números arábigos las tres réplicas de cada especie.**





El análisis de la varianza efectuado para la tasa de crecimiento poblacional ( $r$ ) de las especies de cladóceros arrojó también diferencias significativas para este grupo ( $p < 0,001$ ) (Tabla 6, Fig. 41). El análisis a posteriori de Holm-Sidak, evidenció que estas diferencias se encontraron entre todas las especies de cladóceros estudiadas. *S. vetulus* fue la especie con menor “ $r$ ” (0,09) seguido por *D. pulex* (0,16), mientras que *M. triserialis* y *A. glabra* se mantuvieron con valores intermedios similares (0,22 y 0,28 respectivamente). Por último la especie con mayor “ $r$ ” poblacional y que se separó ampliamente del resto fue *M. macrocopa* (0,52).

**Tabla 6: ANOVA para la tasa de crecimiento poblacional.**

Analisis de Varianza de una vía (Sigma plot 11.0)

**Test de Normalidad:** Pasó (P = 0,994)

**Test de Homocedasticidad:** Pasó (P = 0,164)

Grupo	N	Media	Desvío	SCM
<i>Macrothrix</i>	3	0,223	0,0115	0,0066
<i>Alona</i>	3	0,283	0,0153	0,0088
<i>Simocephalus</i>	3	0,087	0,0351	0,0203
<i>Daphnia</i>	3	0,157	0,0231	0,0133
<i>Moina</i>	3	0,517	0,0208	0,0120

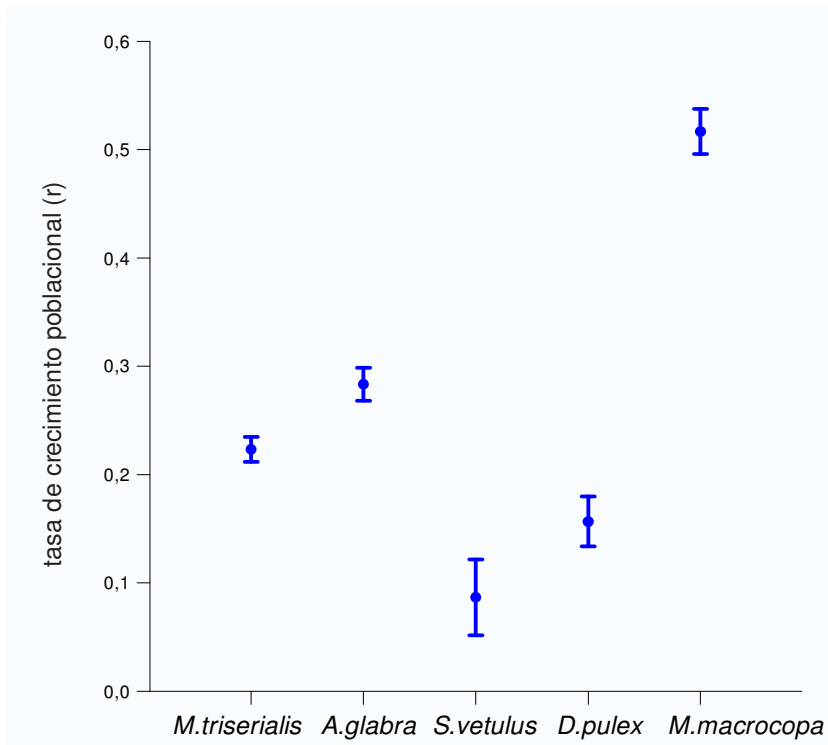
F.Variación	g.l	SC	CM	F	P
Entre Grupos	4	0,325	0,0812	158,182	<b>&lt;0,001</b>
Residuo	10	0,0051	0,000513		
Total	14	0,330			

método de comparación múltiple Holm-Sidak  
alpha = 0,050: 0,842

**Test a posteriori de comparación múltiple de Holm-Sidak**

Comparación	Dif. de Medias	t	PCritico	nivel	Significancia
<i>Moina</i> vs. <i>Simocephalus</i>	0,430	23,244	<0,001	0,005	Si
<i>Moina</i> vs. <i>Daphnia</i>	0,360	19,460	<0,001	0,006	Si
<i>Moina</i> vs. <i>Macrothrix</i>	0,293	15,856	<0,001	0,006	Si
<i>Moina</i> vs. <i>Alona</i>	0,233	12,613	<0,001	0,007	Si
<i>Alona</i> vs. <i>Simocephalus</i>	0,197	10,631	<0,001	0,009	Si
<i>Macrothrix</i> vs. <i>Simocephalus</i>	0,137	7,388	<0,001	0,010	Si
<i>Alona</i> vs. <i>Daphnia</i>	0,127	6,847	<0,001	0,013	Si
<i>Daphnia</i> vs. <i>Simocephalus</i>	0,070	3,784	0,004	0,017	Si
<i>Macrothrix</i> vs. <i>Daphnia</i>	0,067	3,604	0,005	0,025	Si
<i>Alona</i> vs. <i>Macrothrix</i>	0,060	3,243	0,009	0,050	Si





**Figura 41: Gráfico de ANOVA para la tasa de crecimiento poblacional de las cinco especies de cladóceros.**

### Discusión

Nandini et al. (1998) señalan que en general los rotíferos alcanzan su pico máximo de abundancia en la primera semana mientras que los cladóceros tardarán al menos dos semanas. En este trabajo, esto se cumplió para los cladóceros a excepción de *M. macrocopa* que alcanzó su pico máximo en la primera semana. Mientras que entre los rotíferos, *E. dilatata* y *P. patulus* fueron la excepción ya que recién alcanzaron su máxima densidad al cabo de la segunda semana.

La tasa de crecimiento registrada en condiciones favorables para *B. plicatilis* (0,78) coincide con lo citado para la especie por Miracle & Serra (1989) cuando testearon su cepa a la misma temperatura.

La tasa de *B. calyciflorus* duplica la tasa señalada por Nandini et al. (1998) y coincide con lo registrado por Peña-Aguado et al. (2005) cuando fue alimentado sólo con *C. vulgaris* mientras que con distintos alimentos (*Scenedesmus acutus* y levadura) tuvo menores tasas.





Al relacionar las tasas obtenidas para ambas especies de braquiiónidos con los registros de estas especies en los ambientes naturales locales se hace evidente el motivo por el cual son dominantes en estos ambientes pampeanos cuando se presentaban las condiciones óptimas de temperatura y conductividad para cada una de las especies ya que *B. plicatilis* predomina a elevados valores de conductividad principalmente en los ambientes lóticos (Claps et al., 2009) mientras que *B. calyciflorus* domina en los de menor conductividad y en los ambientes lénticos (Benítez, 2008; Claps et al., 2011).

Por otra parte la elevada tasa de crecimiento de *B. plicatilis*, junto al corto período en el cual alcanza su máxima densidad, pone a esta especie como óptima para la realización de experimentos en laboratorio.

Para *E. dilatata* los valores obtenidos fueron menores a los citados por King (1967) y Nandini & Sarma (2002a). El valor de “r” más bajo de este trabajo también puede haber estado influenciado por la falta de sustrato en los recipientes que podría haber afectado su comportamiento al ser considerado un organismo típicamente perifítico, no así la dieta ya que para Nandini & Sarma (2002a) *C. vulgaris* es su alimento de preferencia. Cabe señalar que los niveles de abundancia registrados a modo experimental se condicen con aquéllos de las poblaciones naturales locales, donde en general su presencia es frecuente pero con baja abundancia (Modenutti & Claps, 1988; Ardohain, 2008).

Similares resultados se obtuvieron en el caso de *P. patulus*, que mostró una menor tasa de crecimiento que lo citado por Nandini & Sarma (2002a) pero acorde con lo que se observa en los cuerpos de agua locales ya que se presenta con muy baja abundancia y muy esporádicamente (Ardohain, 2008).

En el caso de *A. sieboldii* el valor intermedio obtenido de la tasa de crecimiento podría relacionarse con lo observado en los ambientes naturales, donde suele encontrarse en bajas densidades, exceptuando algunos picos ocasionales. El alimento utilizado en este trabajo (*P. patulus*) para la experimentación con *A. sieboldii* fue distinto al utilizado por Miracle & Serra (1989) quienes obtuvieron una alta tasa de crecimiento, posiblemente gracias al ofrecimiento de *Paramecium* sp. que es uno de sus alimentos preferidos.

En cuanto a los cladóceros puede mencionarse a *A. glabra* como una especie constante en ríos y lagunas de la región pampeana siempre en baja densidad (Ardohain, 2008; Claps et al., 2009) lo que se corresponde con la baja





tasa de crecimiento obtenida en el laboratorio, la cual a su vez estuvo dentro del rango de lo observado a nivel experimental por Sarma et al. (2005).

*Daphnia pulex*, *S. vetulus* y *M. triserialis* presentaron los menores valores de “r” lo que se corresponde con el bajo número de individuos que se registra en las muestras obtenidas en los ambientes acuáticos locales al mismo tiempo que coinciden con el nivel inferior de lo citado en la literatura para los trabajos experimentales con estas especies (Nandini et al. 1998; Nandini & Sarma, 2003; Sarma et al., 2005).

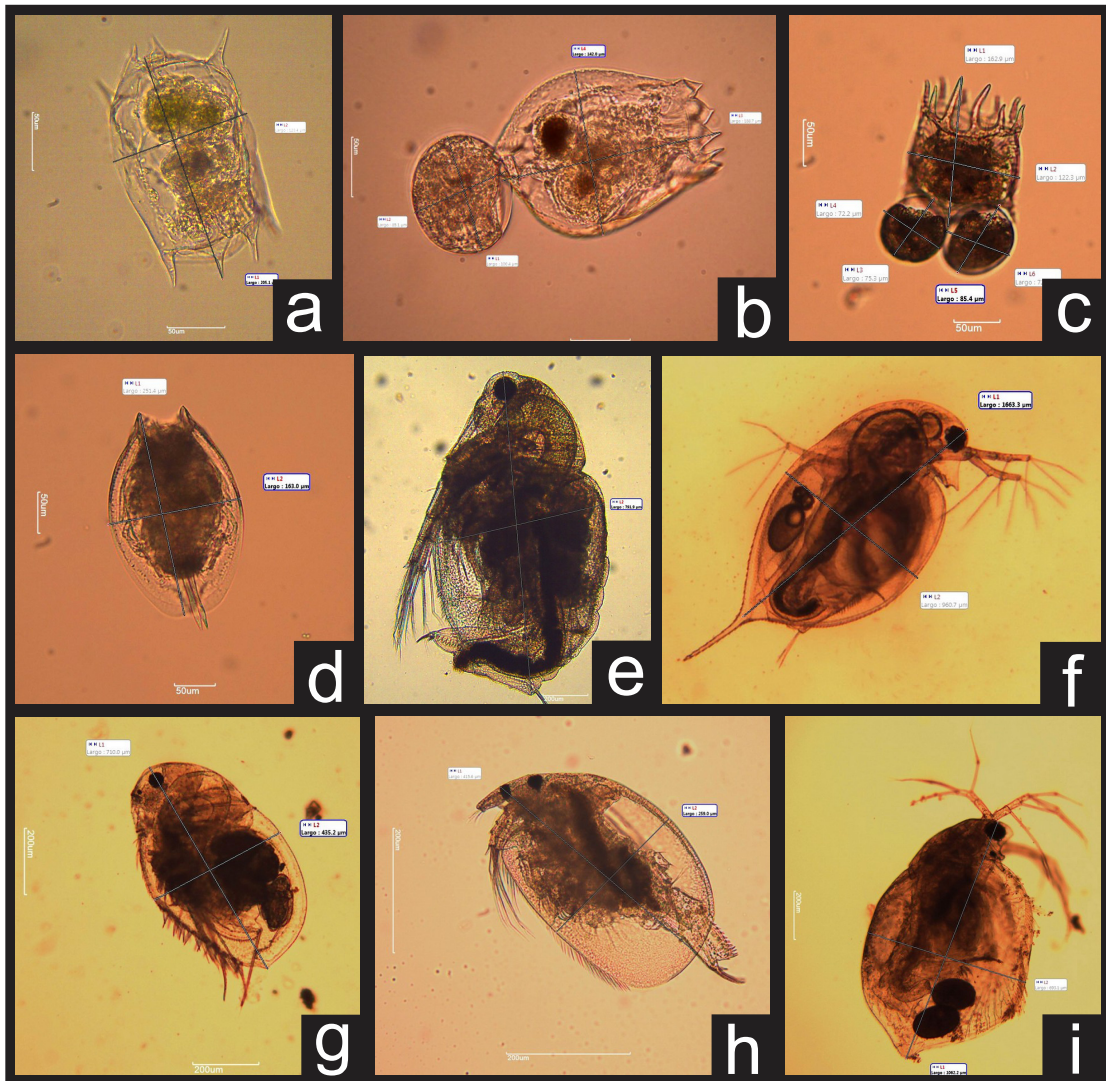
*Moina macrocopa* es una especie exótica que fue registrada por primera vez en el país para la provincia de Corrientes (Paggi, 1997) y posteriormente también en La Pampa en ambientes salinos lénticos por Echaniz et al. (2005). La elevada tasa de crecimiento obtenida en este trabajo la ubica como una especie con alta capacidad de colonizar nuevos ambientes como lo mencionan Elmoor-Loureiro et al. (2010) y definiéndola como una especie de rápida dispersión. Los valores obtenidos aquí coinciden con los valores superiores observados por otros autores con la misma calidad de alimento y condiciones estipuladas (Nandini & Sarma, 2000; Nandini et al., 2002b) y superan los registrados por Peña-Aguado et al. (2005), cuando su alimento fue diferente (*S. acutus* y levadura).

## 6. Morfometría. Relación tamaño –tasa de crecimiento poblacional

### **Materiales y métodos**

Al finalizar los experimentos se fijaron con formol (4%) entre 10 y 20 individuos de cada especie y posteriormente se fotografiaron en microscopio con una cámara digital adaptada. Por último estas imágenes fueron procesadas con el programa Motic 2.0 registrándose el largo y ancho de cada individuo (Fig. 42).





**Figura 42: Fotografías digitales en microscopio óptico mostrando las medidas corporales (largo y ancho) generadas con el programa MotiC 2.0. a) *Brachionus calyciflorus*, b) *B. plicatilis*, c) *Plationus patulus*, d) *Euchlanis dilatata*, e) *Moina macrocopa*, f) *Daphnia pulex*, g) *Macrothrix triserialis*, h) *Alona glabra*, i) *Simocephalus vetulus*.**

### Resultados y discusión

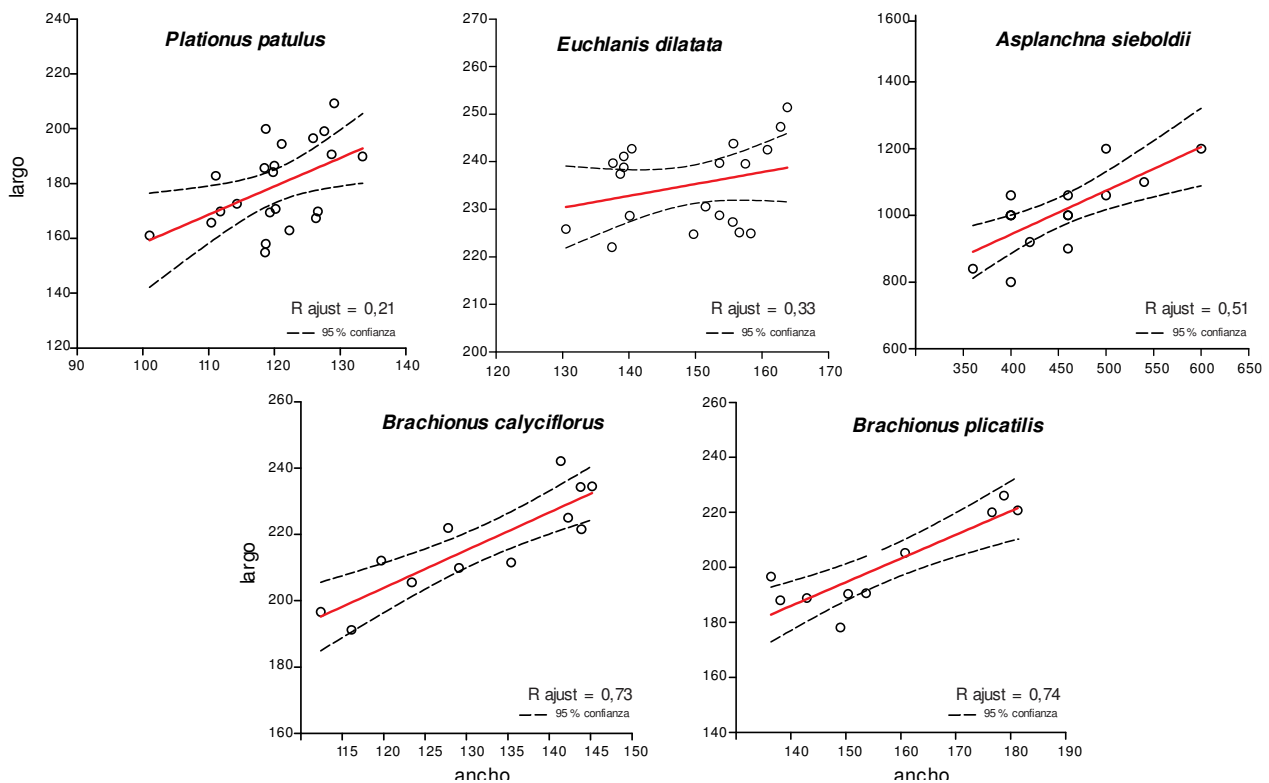
Se graficaron las relaciones entre el largo y ancho de los individuos de cada especie para observar si existe relación entre ambos. Se ajustó un modelo lineal y se calculó dicha relación con el análisis de regresión y correlación de Pearson (Sigma plot 11.0).

En el caso de los rotíferos (Fig. 43), *P. patulus* y *E. dilatata* presentaron los menores niveles de correlación entre ambas variables ( $R_{ajustado} = 0,21$  y  $0,33$





respectivamente). Para *P. patulus* esto podría atribuirse a su forma cuadrangular mencionada anteriormente, donde incluso algunos individuos pueden ser más anchos que largos. En el caso de *E. dilatata* su placa dorsal suele ensancharse por sobre la ventral en diferentes grados, lo cual podría estar ocasionando esta baja relación, pero que bien estaría reflejando los valores de su forma ovoide típica. En contraposición, *B. calyciflorus* y *B. plicatilis* fueron los que obtuvieron el mejor ajuste lineal para ambos parámetros ( $R_{\text{ajustado}} = 0,73$  y  $0,74$  respectivamente). Estas especies se caracterizan por presentar una estrecha relación entre largo y ancho de la lorica por las características estructurales de ésta. *B. plicatilis* presenta una lorica más rígida y el desarrollo de espinas posteriores en *B. calyciflorus* no afecta esta relación, ya que éstas quedan por fuera de las mediciones como se explicó anteriormente. *A. sieboldii* no evidenció una estrecha relación en cuanto a sus proporciones corporales ( $R_{\text{ajustado}} = 0,51$ ). Esto podría deberse a la complicación que surge al realizar las mediciones a causa del característico cuerpo blando que presentan las especies de este grupo, o bien por la presencia de individuos polimórficos que como bien se mencionó anteriormente suelen estar representados en alto grado en las poblaciones de esta especie.

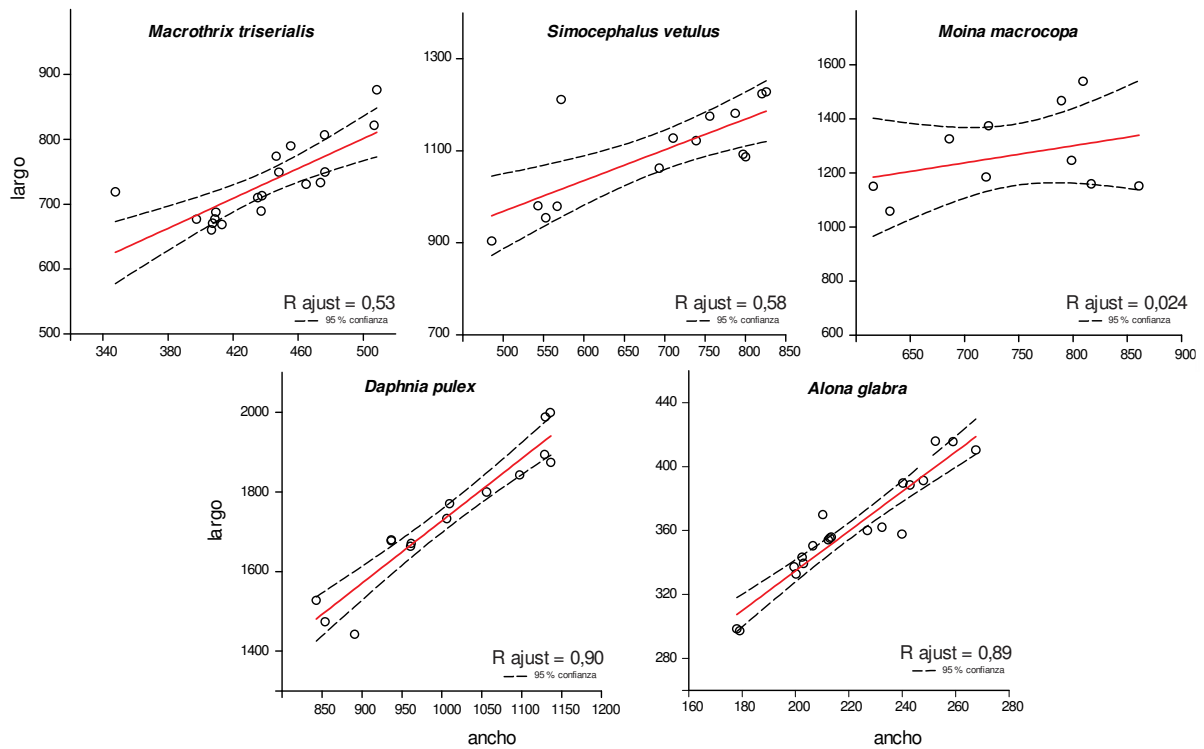


**Figura 43: Rectas de regresión para las variables largo y ancho expresadas en micrómetros de las 5 especies de rotíferos analizadas.**





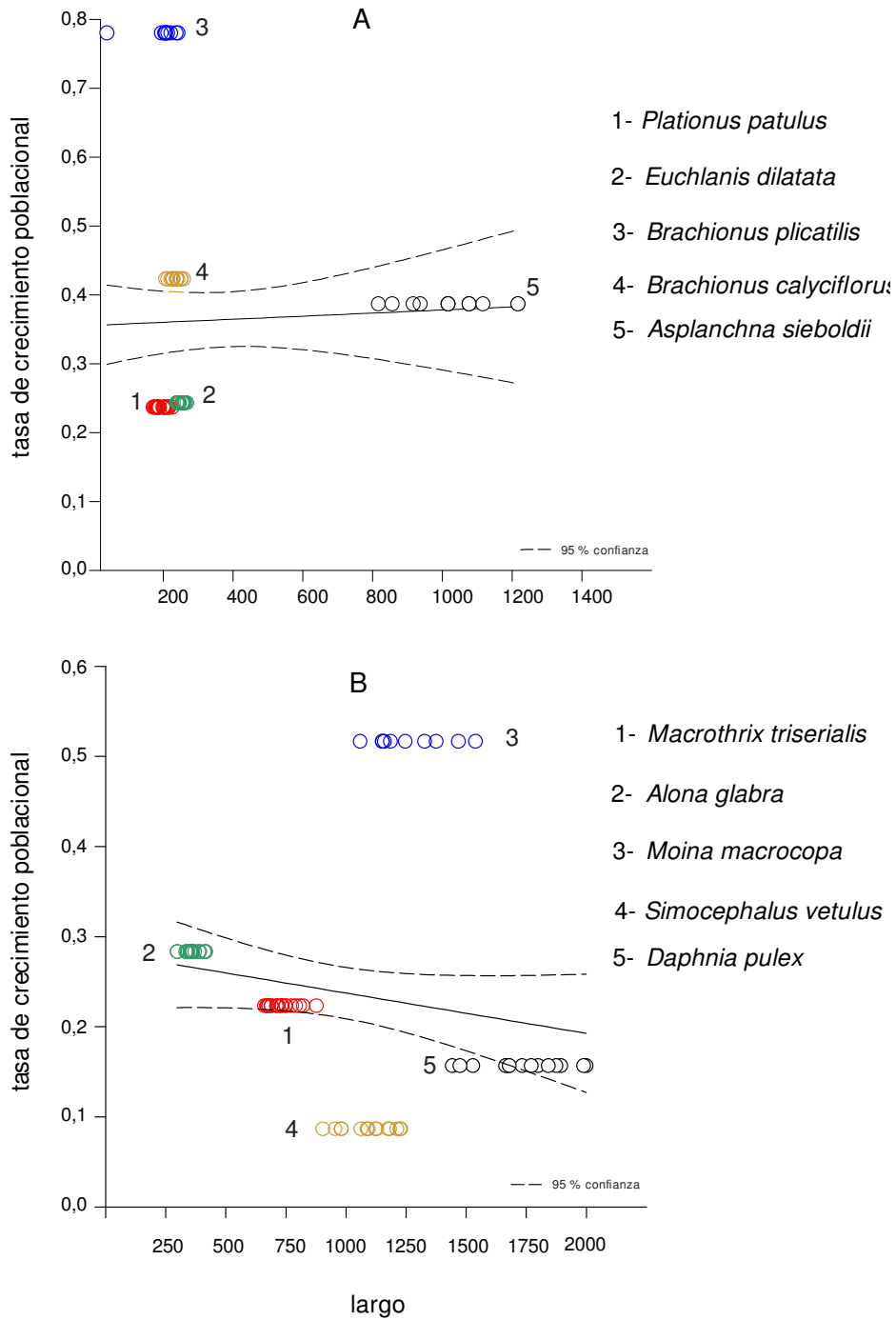
Al evaluar las mismas relaciones lineales entre largo y ancho corporal de las especies de cladóceros (Fig. 44), puede observarse que *A. glabra* y *D. pulex* fueron las especies con mayor correlación entre ambos parámetros ( $R_{\text{ajustado}} = 0,89$  y  $0,9$  respectivamente), seguidas por *M. triserialis* y *S. vetulus* ( $R_{\text{ajustado}} = 0,53$  y  $0,58$  para cada una) y por último por *M. macrocopa* con el menor coeficiente de correlación ( $R_{\text{ajustado}} = 0,024$ ) evidenciando una relación prácticamente nula entre ambas variables.



**Figura 44: Rectas de regresión para las variables largo y ancho expresadas en micrómetros de las 5 especies de cladóceros analizadas.**

La aplicación del modelo de regresión lineal a la relación entre el tamaño corporal y la tasa de crecimiento poblacional para las especies de cada grupo en su conjunto, no evidenció en ninguno de ellos una marcada relación de estos parámetros (Fig. 45), registrándose para los rotíferos un  $R_{\text{ajustado}}$  nulo, y muy similar para los cladóceros ( $R_{\text{ajustado}} = 0,018$ ).





**Figura 45: Rectas de regresión para las tasas de crecimiento poblacional de rotíferos (A) y cladóceros (B) en relación al largo corporal de los individuos medidos para cada especie.**





“Quien no haya cometido un error,  
nunca ha intentado algo nuevo.”

Albert Einstein

### III

## EXPERIMENTOS DE LABORATORIO

# Efectos de factores abióticos y bióticos en poblaciones de especies del zooplancton





## A. Conductividad

La conductividad es la medida en la que una solución acuosa es capaz de conducir una corriente eléctrica (APHA, 1995), es un método indirecto para determinar la cantidad de iones presentes en la solución (principalmente sodio, calcio, potasio, magnesio entre los cationes y cloruro, sulfato, carbonato y bicarbonato entre los aniones). Existe una relación entre la conductividad y la salinidad. Entre los trabajos que abarcan la temática de experimentación se encuentran aquellos que se expresan en salinidad (Fielder et al., 2000; Anitha & George, 2006; Yin & Zhao, 2008; entre otros) y aquellos que utilizan el término de conductividad como los señalados en los capítulos anteriores. La influencia de la salinidad en los rotíferos está directamente relacionada con la capacidad de osmoregulación de estos organismos, lo cual dependerá de cada especie con la que estemos tratando (Anitha & George, 2006).

La conductividad es uno de los factores de control más importante en los cuerpos de aguas pampásicos y se ha comprobado a campo que varias especies de rotíferos, principalmente del género *Brachionus* dominan a diferentes niveles de conductividad (Modenutti, 1998; Ardohain et al., 2005; Neschuk et al., 2002; Claps et al., 2011). Existen numerosos trabajos que evalúan las respuestas de los integrantes de este grupo ante cambios en la conductividad (Pascual & Yúfera 1983; Vallejo et al., 1993; Sarma et al., 2002; 2006). En nuestro país (José de Paggi & Paggi, 1998) y más específicamente en la cuenca del río Salado, se cuenta con información de óptimos y rangos en trabajos de campo (Claps et al., 2009; Gabellone et al., 2014), sin embargo es inexistente dicha información en trabajos experimentales en relación a cepas locales.

**Hipótesis: el efecto producido por eventos de lluvia y desecación de los cuerpos de agua pampásicos se refleja en los cambios en la conductividad. Estas variaciones ambientales definen tanto la presencia (rango) como el predominio (óptimo) de la especie eurihalina *B. plicatilis* en los ríos y lagunas pamásicos.**

Objetivos: Evaluar el efecto de la disminución (experimento 1) y aumento (experimento 2) de la conductividad en la dinámica poblacional de la cepa local de *B. plicatilis*.





## **EXPERIMENTO 1: EFECTO DE LA DISMINUCIÓN DE LA CONDUCTIVIDAD EN LA DINÁMICA POBLACIONAL DE *BRACHIONUS PLICATILIS*.**

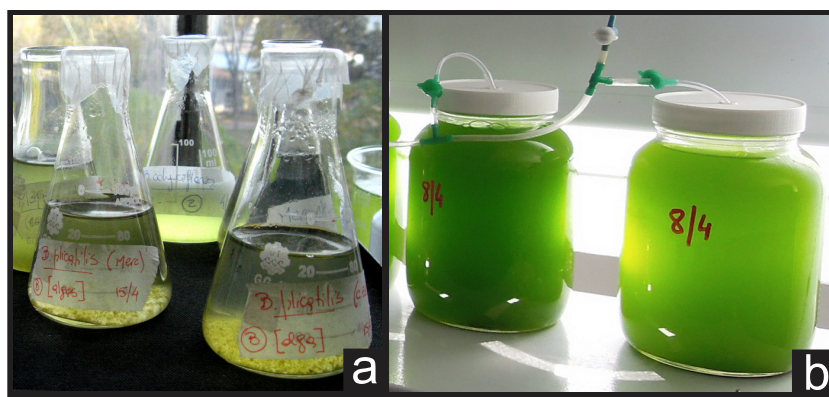
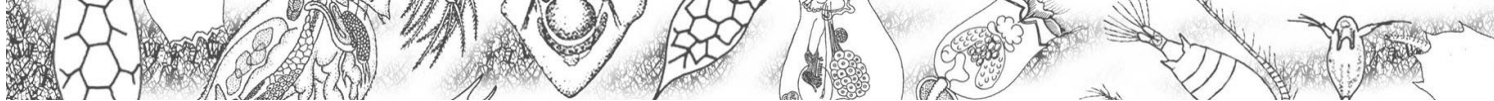
En los ambientes pampásicos caracterizados por una baja conductividad no se registra la presencia de *B. plicatilis* por lo que puede considerarse que a pesar de ser una especie eurihalina, su crecimiento estará comprometido a valores bajos de conductividad. De esta manera, se pretende evaluar el crecimiento poblacional de una cepa local de *B. plicatilis* en condiciones controladas de laboratorio en respuesta a valores de conductividad en orden decreciente respecto al registrado a campo en el momento de la colecta de muestras.

### **1.1 Materiales y métodos.**

El trabajo en laboratorio consistió de dos fases: la primera consistió en la aclimatación de los organismos (rotíferos y algas) y la segunda abarcó la experimentación propiamente dicha.

Durante la fase de aclimatación, los rotíferos fueron cultivados en erlenmeyers de 500 ml, en condiciones físico-químicas estables y similares a las medidas en campo al momento de la obtención de la muestra (temperatura, conductividad y pH), durante un tiempo de dos generaciones (15 días) (Cabrera, 2008) (Fig. 46a). La conductividad durante la fase experimental se logró a partir de la disolución de NaCl en el medio de cultivo. El conteo y la separación de individuos se realizaron con microscopio estereoscópico y con pipetas pasteur de 1 ml que permitieron la individualización de cada hembra. Los rotíferos fueron alimentados con el alga cloroficea unicelular *Chlorella vulgaris* en densidades de  $2 \times 10^6$  individuos/ml y cada tres días para eliminar el alimento como factor limitante (Cabrera, 2008). Esta alga además de ser una especie palatable para estos organismos, posee la característica de ser tolerante y adaptable a los cambios de conductividad (Vallejo et al., 1993) lo que la convierte en el alimento ideal para este tipo de experimentos asegurando su buen estado celular en todos los tratamientos de manera de no influir negativamente sobre los pastoreadores. Los cultivos de *C. vulgaris* se realizaron a la par y como parte de este trabajo, en recipientes de tres litros con luz natural (Fig. 46b). Se midió la turbidez con un turbidímetro de laboratorio (Hatch 2100P) y posteriormente se la correlacionó con el número de individuos/ml siguiendo la curva de correlación correspondiente a este tipo de cultivo (Ferrando et. al., en prensa), de manera que todos los tratamientos fueran inoculados con la misma cantidad de algas.





**Figura 46: a) aclimatación de los cultivos de *Brachionus plicatilis*; b) cultivos del alga *Chlorella vulgaris* utilizada como alimento.**

La fase de experimentación se llevó a cabo en una cámara de incubación que permitió controlar la temperatura ( $24 \pm 1^\circ\text{C}$ ) y el fotoperíodo (14 horas luz). Se utilizaron 20 tubos tipo Nessler con 30 ml de medio (agua + algas) que se colocaron en un agitador orbital a 50 rpm, para evitar la sedimentación de las algas. Dichos tubos fueron distribuidos en el espacio experimental al azar (por sorteo) (Fig. 47). Las experiencias se realizaron por cuadruplicado, con cinco niveles de conductividad: un CONTROL de 5 mS/cm (que corresponde al promedio medido en campo al momento de la toma de la muestra) y cuatro TRATAMIENTOS en orden descendiente de 4, 3, 2 y 1 mS/cm respectivamente (5 niveles de conductividad X 4 réplicas = 20 tratamientos). La cantidad inicial de hembras no grávidas con la que se inoculó el medio fue de 2 individuos/ml (60 individuos por tratamiento; 1200 individuos en total). Se monitoreó la temperatura y pH del agua antes de cada conteo y el volumen de agua evaporado se completó con agua destilada para mantener el volumen total constante.

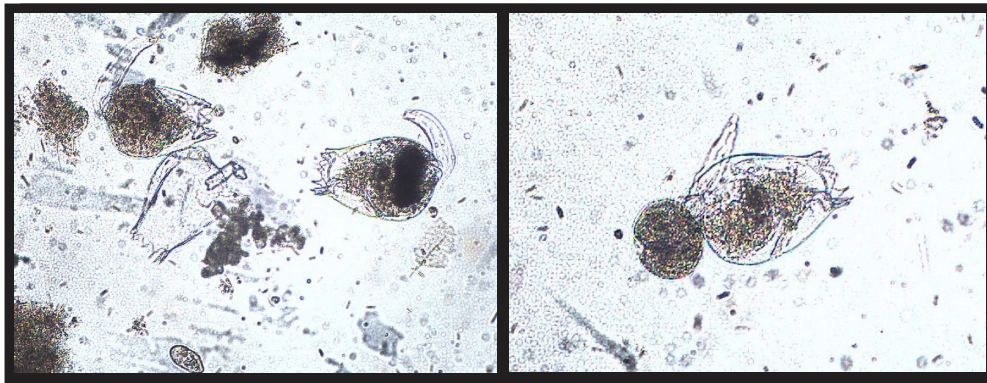


**Figura 47: Distribución espacial al azar de las unidades experimentales dispuestas sobre el agitador orbital.**





La densidad de los rotíferos (individuos/ml) se determinó por medio de conteos con microscopio estereoscópico (Olympus SZ61) que se realizaron cada dos días, en vivo, con reposición. De cada tubo se contabilizaron dos alícuotas (de 10 ml en un comienzo y 5 ml al aumentar el número de individuos obtenidos). Se contabilizaron hembras adultas discriminando las hembras grávidas y se cuantificó el número de huevos que éstas portaban y la presencia de huevos de resistencia. La experiencia se prolongó durante 14 días (dos generaciones). Al finalizar la experiencia el volumen total de cada unidad experimental se fijó con formol al 4% para la posterior observación en microscopio óptico (Olympus CX31) (Fig. 48). Se registraron las medidas morfométricas correspondientes (largo y ancho de loriga), se calculó el biovolumen y se transformó a biomasa para los individuos de cada tratamiento por separado de acuerdo con McCauley (1984).



**Figura 48: Fotografías en microscopio óptico de las hembras de *Brachionus plicatilis* presentes en los distintos tratamientos.**

El crecimiento de la población a nivel experimental se evaluó en términos de la tasa instantánea de crecimiento ( $r$ ), tiempo de duplicación ( $td$ ) (Vallejo et. al, 1993), y productividad ( $R$ ) (Cisneros, 2011).

$$r = \frac{\ln N_f - \ln N_o}{t}$$

$N_f$  = número final de individuos/ml

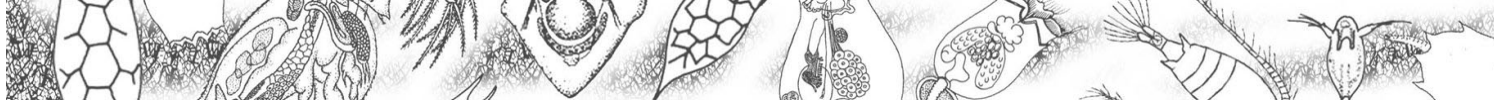
$$td = \frac{\ln 2}{r}$$

$N_o$  = número inicial de individuos/ml

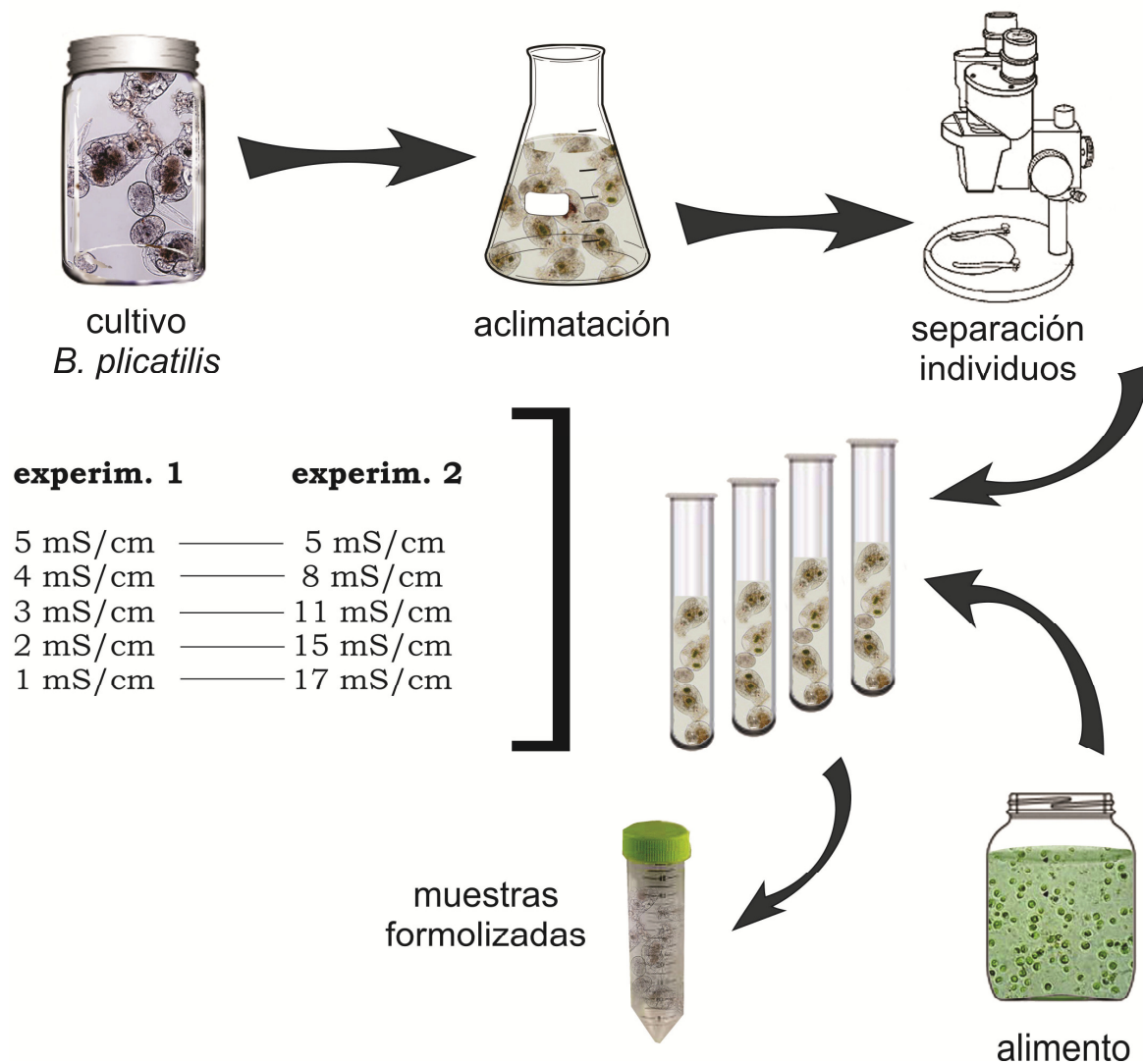
$t$  = tiempo (días)

$$R = \frac{N_f - N_o}{t}$$





Los datos obtenidos se evaluaron estadísticamente por medio del análisis de la varianza (ANOVA simple, factorial y de dos vías para medidas repetidas) según el requerimiento de cada factor a evaluar y que serán detallados en cada caso. Se contempló el cumplimiento de los supuestos para cada uno de ellos (homogeneidad de varianzas por test de Levene y esfericidad por test de Mauchley para el RM ANOVA).



**Figura 49: Esquema del diseño experimental y desarrollo de los experimentos de CONDUCTIVIDAD (1: disminución de la conductividad y 2: aumento de la conductividad).**





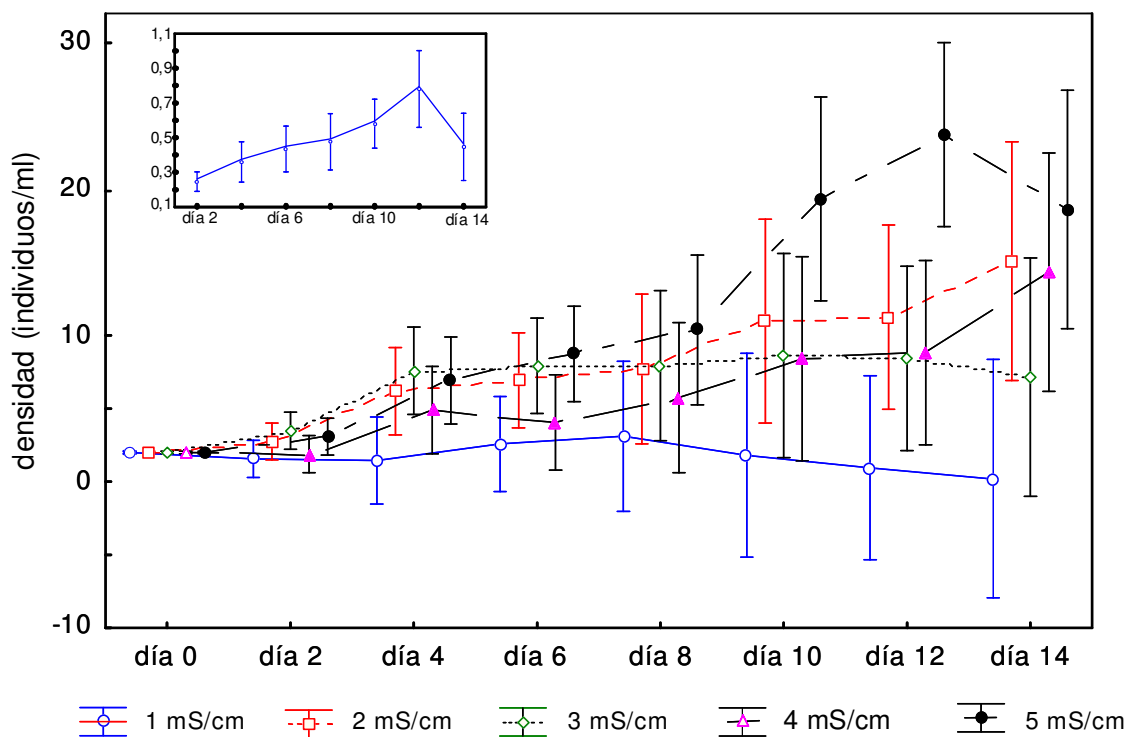
## 1.2 Resultados

Respecto a la densidad poblacional se pudo observar un marcado solapamiento durante la primera semana del experimento y ya a partir del día 10 se distingue más claramente como se comienzan a apartar los tratamientos entre sí. La mayor densidad poblacional registrada en los distintos tratamientos para las poblaciones de *B. plicatilis* se obtuvo a un valor de conductividad de 5 mS/cm (23,7 individuos/ml) en el día 12, mientras que en el nivel más bajo de conductividad (1 mS/cm) se observó una clara disminución de la población (<1 individuos/ml). Hacia el final del experimento (día 14) se observa una disminución en los niveles de conductividad de 5, 3 y 1 mS/cm, mientras que los restantes siguen incrementando levemente su densidad, pero sin alcanzar los valores del CONTROL. El ANOVA de dos vías para medidas repetidas (RM ANOVA) confirmó las diferencias observadas para estos tratamientos. De este análisis resultaron significativas las diferencias tanto para la interacción entre los factores TIEMPO y TRATAMIENTO ( $F_{28,105} = 4,67$ ;  $p < 0,000$ ) (Fig. 50), como para cada factor por separado. Las diferencias en cuanto a los tratamientos se dividieron en dos grupos homogéneos ( $F_{4,15} = 3,76$ ;  $p < 0,02$ ), siendo el tratamiento de 1mS/cm y 5mS/cm los extremos de ambos, mientras que el resto de los tratamientos mostraron valores intermedios (tabla 7, Fig. 51). Respecto al tiempo las diferencias obtenidas ( $F_{7,105} = 24,24$ ;  $p < 0,000$ ) evidenciaron una clara separación entre la primera semana del experimento (hasta el octavo día) y la semana posterior, donde ya los tratamientos comienzan a apartarse entre ellos (Fig. 50).

**Tabla 7. Test a posteriori (Tukey) para el factor CONDUCTIVIDAD, mostrando los grupos homogéneos (Gr. H.) y la densidad media total y de las hembras grávidas.**

Conductividad	Gr. H.		Densidad total (individuos/ml)	Densidad grávidas (individuos/ml)
1 mS/cm	<b>a</b>		<b>1,70</b>	<b>0,16</b>
3 mS/cm	a	b	6,27	0,48
4 mS/cm	a	b	6,64	0,49
2 mS/cm	a	b	7,86	0,56
5 mS/cm	<b>b</b>		<b>11,59</b>	<b>0,74</b>

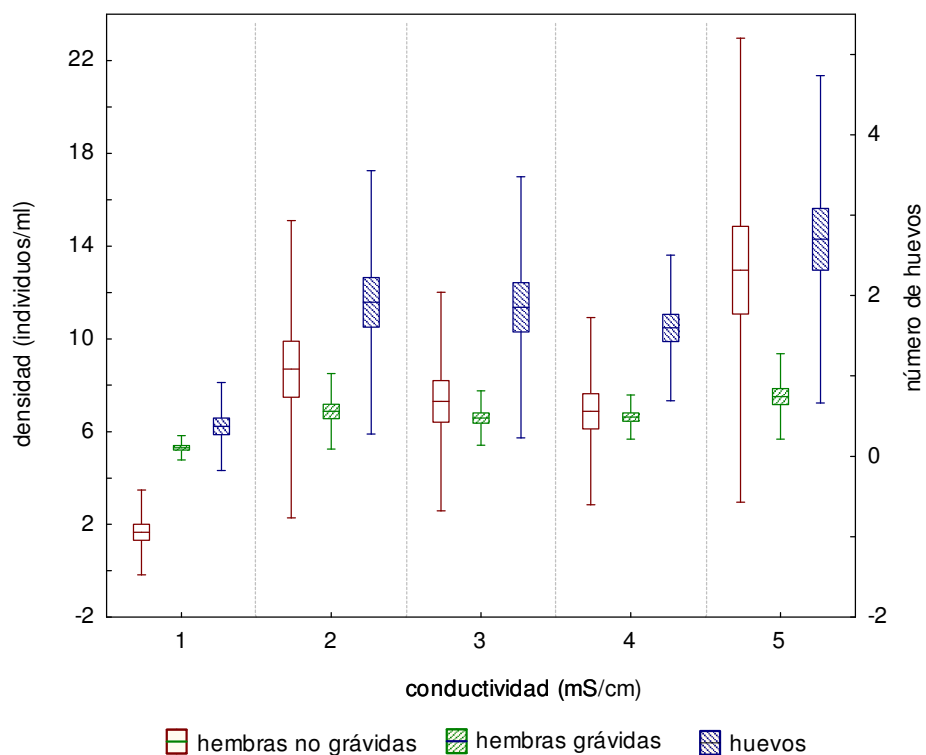
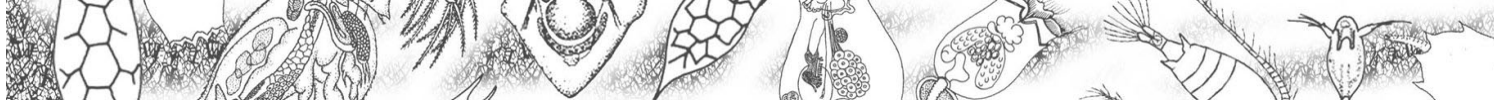




**Figura 50: Interacción (RM ANOVA) entre los factores tiempo y tratamiento para la densidad total de hembras. Recuadro: densidad promedio de hembras grávidas en cada tratamiento en función del tiempo.**

La densidad de hembras grávidas tomó valores promedios que corresponden aproximadamente a un 6% de la densidad total observada. En cada tratamiento y a lo largo del tiempo, tuvo un comportamiento similar a la densidad total (recuadro de Fig. 50 y Fig. 51) obteniéndose diferencias significativas en el RM ANOVA ( $F_{24,90}=3,45$  ;  $F_{4,15}=3,98$  ;  $F_{6,90}=9,66$ ;  $p<0,05$ ) que conformaron los mismos grupos homogéneos para el factor TRATAMIENTO separando el nivel de conductividad menor del mayor. Para el factor TIEMPO se pudo observar un marcado descenso hacia el final del experimento. El día final (día 14) tomó una posición intermedia por sus bajos valores de densidad, conformando así un total de tres grupos homogéneos (tabla 8). Lo mismo se observó en el caso del número de huevos, siendo significativas las diferencias para los tratamientos y el tiempo, conformando los mismos grupos homogéneos que se observaron para las hembras grávidas ( $F_{6,105}=4,63$ ;  $F_{4,105}=11,94$ ;  $p<0,000$ ) (tabla 8; Fig. 51).





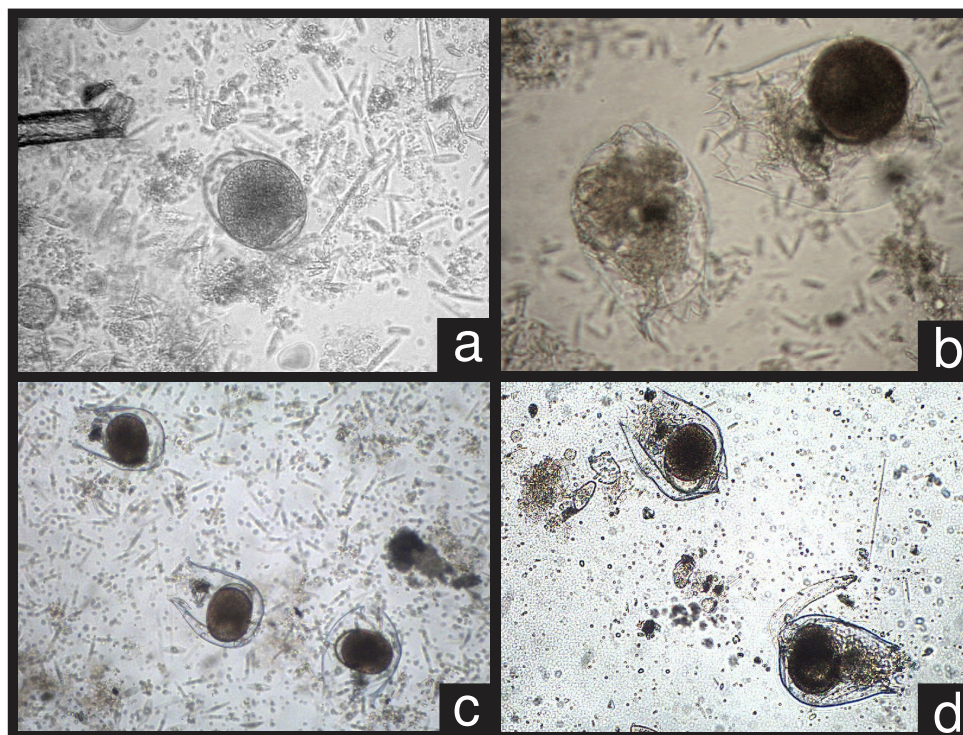
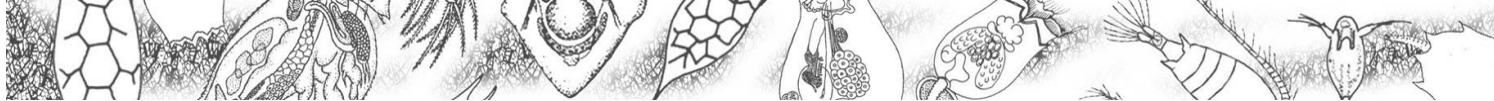
**Figura 51: Box-plot de la densidad total de hembras, densidad de hembras grávidas y número de huevos por tratamiento.**

**Tabla 8. Test a posteriori (Tukey) para el factor TIEMPO, mostrando los grupos homogéneos (Gr. H.) y la densidad media de las hembras grávidas y el número de huevos total por día.**

Tiempo	Gr. H.		Densidad grávidas (individuos/ml)	Número huevos (total)
día 2	a		0,25	0,85
día 4	a	b	0,36	1,34
día 6	a	b	0,43	1,45
<b>día 14</b>	a	b	0,45	1,53
día 8	a	b	0,48	1,72
día 10		b	<b>0,58</b>	<b>2,12</b>
día 12		<b>c</b>	<b>0,78</b>	<b>2,80</b>

Al finalizar el experimento se observó que en los tres niveles de menor conductividad (1 a 3 mS/cm) aparecieron huevos de resistencia sueltos al igual que hembras portando este tipo de huevos, algunas de ellas con las lorigas más deformadas o ya muertas (Fig. 52) En tanto que en los niveles de conductividad de 4 y 5 mS/cm no se observaron dichas estructuras.

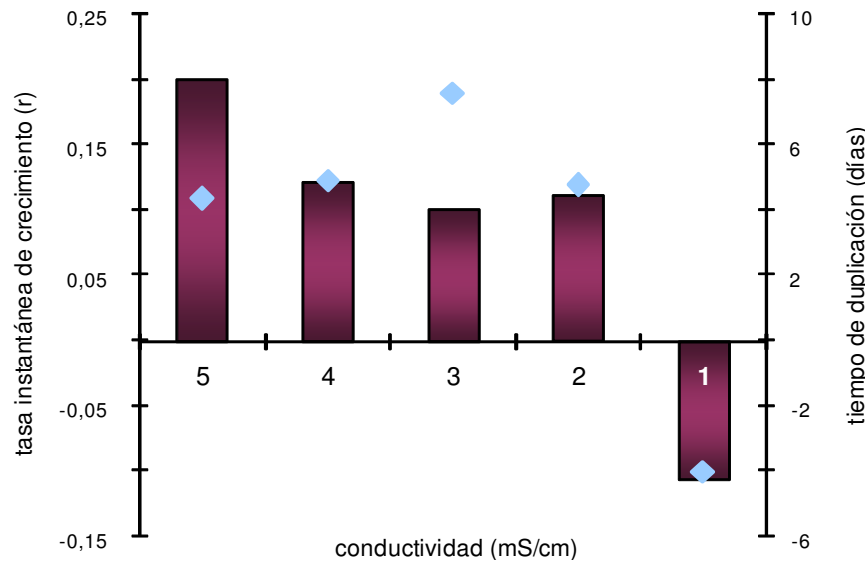




**Figura 52: Imágenes tomadas con microscopio óptico al finalizar el experimento en los tres niveles de menor conductividad. a) Huevo de resistencia suelto y b-d) huevos de resistencia dentro de la loriga de cada hembra.**

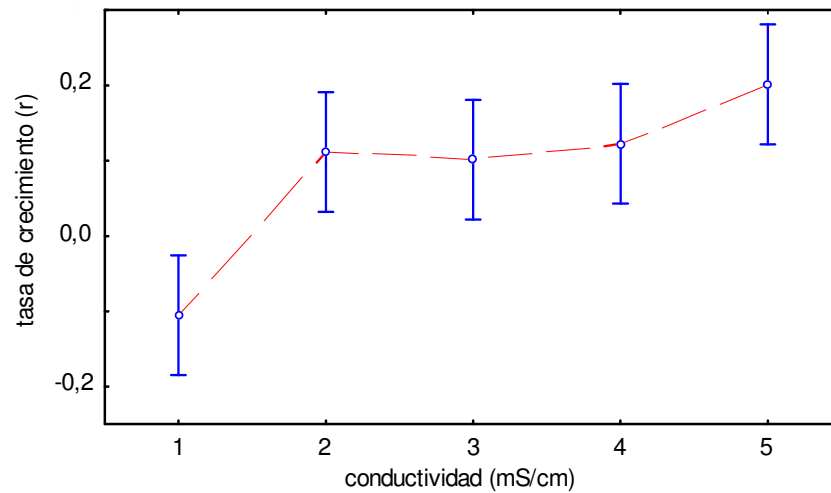
La tasa instantánea de crecimiento poblacional ( $r$ ) se calculó en el día 12 del experimento, que fue considerado como el último día de la fase exponencial de la segunda semana. El tratamiento de 3 mS/cm fue el que obtuvo los menores valores ( $r_{promedio} = 0,10$ ) correspondiéndose con un mayor tiempo de duplicación de 7,6 días. Los tratamientos de 2 y 4 mS/cm también mostraron tasas de crecimiento bajas ( $r_{promedio} = 0,11$  y  $0,12$ ) respecto a las mencionadas anteriormente para la especie. Finalmente el tratamiento que mostró la mayor tasa de crecimiento en este experimento fue el CONTROL de 5mS/cm con un valor de  $r_{promedio}$  de 0,20 y un máximo de 0,24. El tratamiento de 1 mS/cm mostró valores negativos que correspondieron a una disminución de la población en esa condición ( $r_{promedio} = -0,10$ ) y donde también se encontró el menor valor para todos los replicados ( $r = -0,19$ ) (Fig. 53).





**Figura 53: Tasa instantánea de crecimiento “r” (barras) y tiempo de duplicación (rombos) de las poblaciones de *Brachionus plicatilis* en los 5 niveles de conductividad.**

Al mismo tiempo, la tasa instantánea de crecimiento fue sometida al análisis estadístico por medio de un ANOVA de una vía que evidenció diferencias significativas para este factor entre un nivel de conductividad y otro ( $F_{4,15} = 5,55$ ;  $p < 0,006$ ). Se identificaron dos grupos homogéneos; el primero incluye al nivel de conductividad de 1 mS/cm siendo su valor significativamente menor al segundo grupo homogéneo compuesto por los tratamientos de conductividad superior (2 a 5 mS/cm) (tabla 9, Fig. 54).



**Figura 54: Gráfico de ANOVA para la tasa instantánea de crecimiento (r) por cada tratamiento de conductividad.**

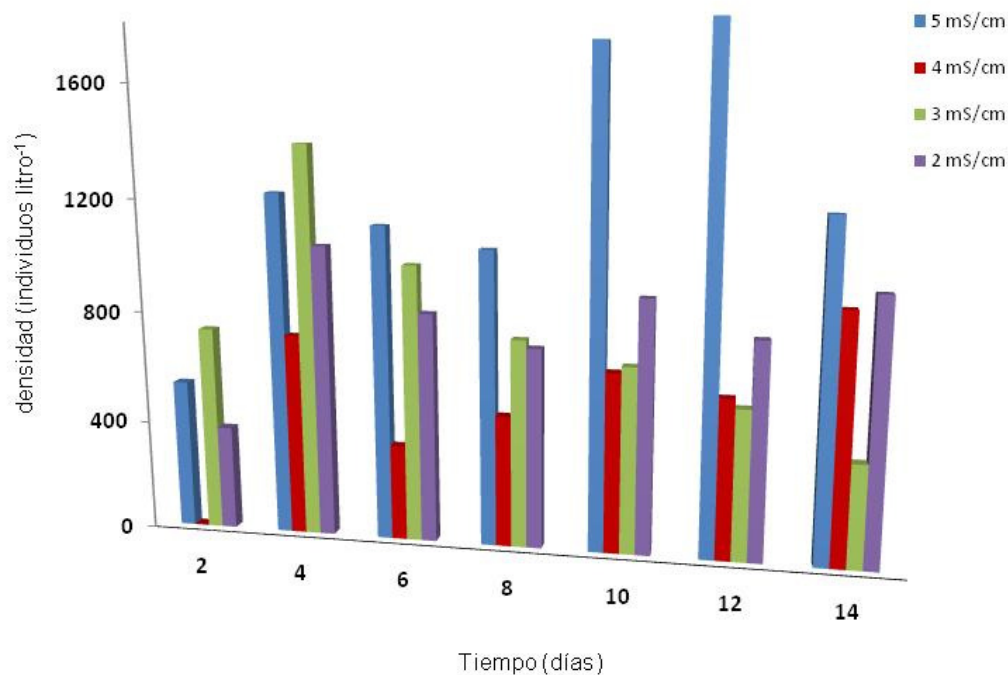




**Tabla 9. Test a posteriori (Tukey) para el factor CONDUCTIVIDAD, mostrando los grupos homogéneos (Gr. H.) y la densidad media de la tasa de crecimiento poblacional (r).**

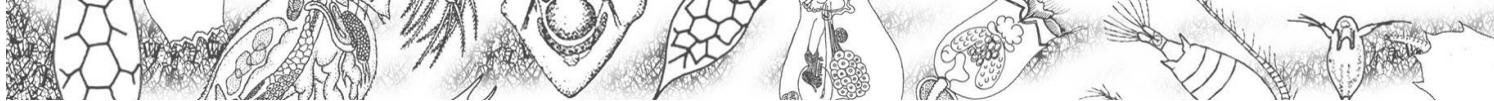
Conductividad	r	Gr. H.
1 mS/cm	<b>-0,1055</b>	<b>a</b>
3 mS/cm	0,1013	b
2 mS/cm	0,1116	b
4 mS/cm	0,1226	b
5 mS/cm	0,2013	b

En cuanto a la productividad (R) no se observaron grandes diferencias entre los tratamientos en la primera semana. En la segunda semana de la experiencia el valor máximo se encontró en el tratamiento de 5 mS/cm (1810 ind/l/d), apartándose de los restantes. Los mayores niveles de productividad se observaron en los días 10 y 12. El nivel de conductividad de 1 mS/cm no fue tomado en cuenta ya que como se mencionó anteriormente la población decayó a niveles muy bajos en los días sucesivos y no se recuperó (Fig. 55).

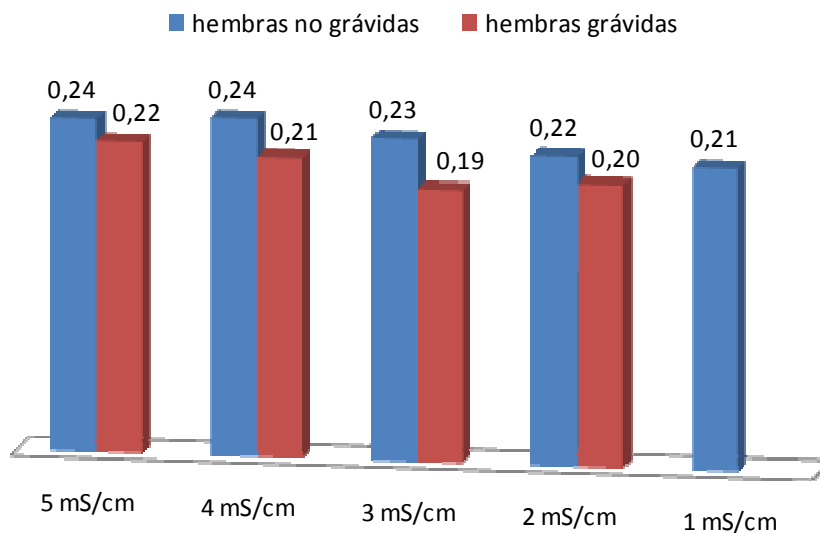


**Figura 55: Productividad de las poblaciones de *Brachionus plicatilis* en los cuatro niveles de conductividad superiores.**





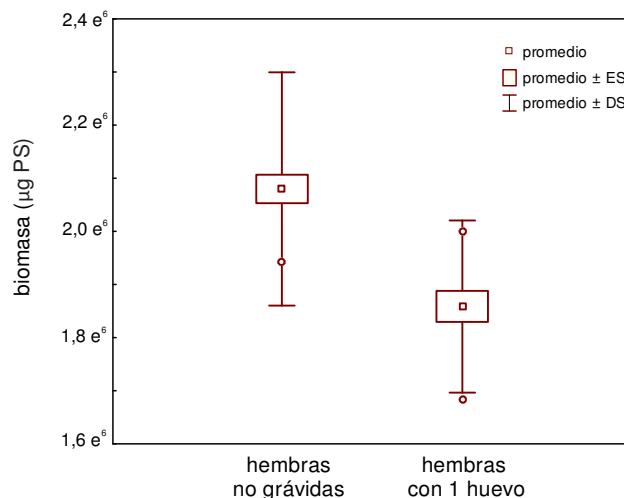
En cuanto a la morfometría, los valores promedio del largo de la loriga para las hembras no grávidas oscilaron entre los 189  $\mu\text{m}$  y 196,5  $\mu\text{m}$ , siendo los menores valores los obtenidos para el nivel de 1mS/cm y los mayores correspondientes al nivel de conductividad de 5mS/cm. Las hembras grávidas por el contrario no mostraron una clara tendencia en cuanto a este parámetro, tomando valores promedio de 183 a 196  $\mu\text{m}$  aproximadamente. Para el nivel de conductividad menor (1mS/cm) no pudo obtenerse ningún dato ya que no hubo hembras grávidas en este nivel al final del experimento. Estos datos fueron transformados y expresados en términos de biomasa en microgramos de peso seco ( $\mu\text{g PS}$ ) para la biomasa promedio de los organismos en cada tratamiento (Fig. 56).



**Figura 56: Biomasa promedio expresada en microgramos de peso seco ( $\mu\text{g PS}$ ) de las hembras grávidas y no grávidas de *Brachionus plicatilis* al finalizar la experiencia.**

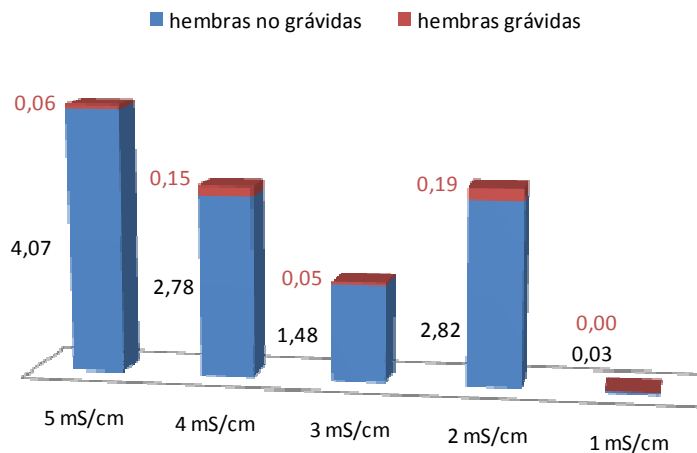
Se discriminaron las hembras grávidas de las no grávidas y se testeó la diferencia entre ambas respecto a cada tratamiento por medio de un ANOVA de 2 vías, el cual resultó significativo ( $F_{1,87}=28,57$ ;  $p<0,000$ ) siendo las hembras grávidas significativamente menores que las no grávidas (Fig. 57).





**Figura 57: Box-plot para la biomasa promedio de las hembras no grávidas y grávidas al finalizar el experimento.**

Si evaluamos entonces la biomasa final de los rotíferos en cada tratamiento ( $\mu\text{g PS/ml}$ ) se pudo observar que el valor promedio fue de  $2,79 \mu\text{g PS/ml}$  (sin contar el tratamiento de  $1\text{mS/cm}$ , en el cual quedaban muy pocos organismos vivos) y la mayor biomasa total final se obtuvo en el tratamiento de  $5 \text{mS/cm}$  con un total de  $4,07 \mu\text{g PS/ml}$  para las hembras no grávidas. Para las hembras grávidas, como ya se mencionó anteriormente estuvieron presentes en menor proporción, por lo que la biomasa final promedio fue de tan sólo  $0,063 \mu\text{g PS/ml}$  con valores máximos de  $0,19 \mu\text{g PS/ml}$  para la conductividad de  $2 \text{mS/cm}$  (Fig. 58).

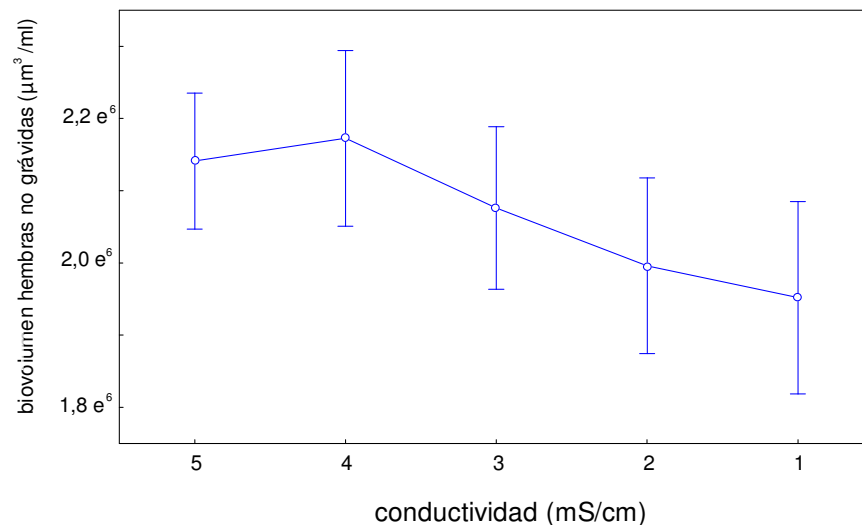


**Figura 58: Biomasa final expresada en microgramos de peso seco por mililitro ( $\mu\text{g PS/ml}$ ) de las hembras grávidas y no grávidas de *Brachionus plicatilis*.**





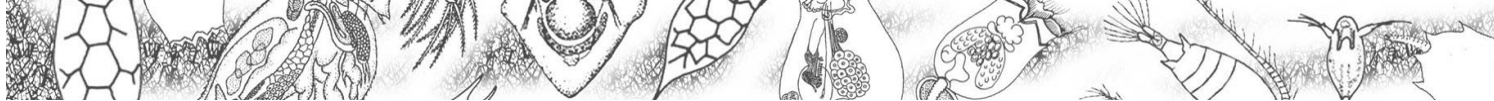
Posteriormente se testearon por separado las posibles diferencias entre los tratamientos para las hembras no grávidas ya que fueron las únicas presentes en todos los niveles de conductividad. En este caso en ANOVA de una vía no evidenció diferencias significativas entre los tratamientos ( $F_{4,63}=2,39$ ,  $p=0,59$ ), sin embargo el valor de probabilidad se encuentra muy cercano al crítico, y como se puede observar en la figura 59, si se pudo ver una tendencia a disminuir el biovolumen de los organismos a medida que disminuyen los niveles de conductividad.



**Figura 59: Gráfica del ANOVA una vía para el biovolumen de las hembras no grávidas en función de los cinco niveles de conductividad testeados.**

Con la misma metodología de cultivo descrita para *B. plicatilis*, se cultivó también a individuos de *Brachionus rotundiformis* traídos de la misma localidad de muestreo. Al alcanzar el número poblacional suficiente se programó y llevó a cabo la misma experiencia de DISMINUCIÓN DE CONDUCTIVIDAD. A fin de poder evaluar la respuesta de esta especie, y poder compararla con los resultados obtenidos para *B. plicatilis* se mantuvieron las mismas condiciones, incluyendo la distribución de las unidades experimentales en el espacio. De esta manera entonces se replicó exactamente el experimento 1. El primer día de conteo se observó una notable disminución de la población y ya para el segundo día la mortandad fue masiva y el experimento debió cancelarse. Se prosiguió con los cultivos de esta especie pero lamentablemente no volvieron a alcanzar un tamaño poblacional suficiente para volver a repetir la experiencia.





### 1.3 Discusión

En cuanto a la densidad poblacional el solapamiento de todos los tratamientos en los primeros 8 días puede relacionarse con la fase de latencia característica de una población aclimatada a una condición específica (Pascual & Yúfera, 1983) como lo fue en este caso la conductividad control. Durante esta primera semana se observó entonces valores similares de densidad tanto de las hembras aclimatadas previamente a uno de los niveles de conductividad, como aquellas que se incorporaron durante los días posteriores a la inoculación inicial, ya nacidas en condiciones de conductividad distintas en cada caso. Pascual & Yúfera (1983) mencionan que las poblaciones de *B. plicatilis* crecen muy bien después de ser trasladadas directamente a distintas conductividades, indicando como único efecto un aumento de la fase de latencia.

La presencia de hembras míticas no se registró en la primera generación en coincidencia con lo observado por Hagiwara & Hino (1989) ya que la edad de la hembra progenitora es un factor para la producción de hembras míticas (Kim & Hagiwara, 2011).

Se ha obtenido tasas de reproducción asexual que indican que las poblaciones se han desarrollado en un entorno favorable en las mayores conductividades en este experimento (Lubzens et al., 1985). Esto concuerda con lo planteado por diversos autores que mencionan el efecto directo de influencia de la salinidad sobre la tasa de crecimiento, y que depende de la especie y el genotipo con el que se esté trabajando (Miracle & Serra, 1989; Serra et al., 1998). Cada genotipo, entonces, estará adaptado a un óptimo de salinidad en el cual su tasa de crecimiento será mayor (Anitha & George, 2006) y de ahí la importancia de determinar este “r” específico para cada genotipo en cuestión. Cabe mencionar que estas tasas fueron menores a las observadas en el capítulo II para esta especie, lo que se corresponde al tiempo en el cual se realizó el cálculo y no con una respuesta a la condición. En este caso la tasa de crecimiento fue calculada para la fase exponencial antes de finalizar la segunda semana del experimento ya terminando la segunda generación, duplicando así el tiempo utilizado en el cálculo del crecimiento anterior (5 días).

Las conductividades entre 3 y 1 mS/cm pueden ser consideradas como poco favorables para el crecimiento de estas cepas ya que a esos niveles se hallaron huevos de resistencia que son producidos por las hembras míticas en





condiciones desfavorables de salinidad (Hagiwara & Hino, 1989) a pesar de tener un ambiente favorable en cuanto a alimento y temperatura.

En los niveles de conductividad de 4 y 5 mS/cm no se hallaron huevos de resistencia durante todo el experimento a pesar de las elevadas densidades registradas que pueden considerarse un factor desencadenante en la producción de hembras míticas (Stelzer & Snell, 2003). Esto sugiere que la poblacional no alcanzó su máxima densidad en la fase amicitica.

Dentro del rango experimental, el límite inferior de tolerancia fue entre los niveles de conductividad de 1 y 2 mS/cm, lo que concuerda con lo observado por Pascual & Yúfera (1983) en sus experimentos de salinidad para esta especie.

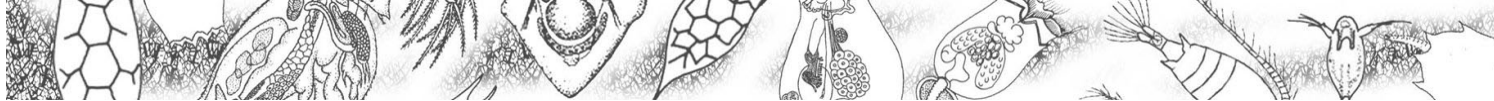
Las diferencias entre estos resultados y los obtenidos a mayores salinidades por un gran número de autores (Lubzens, 1985; entre otros) pueden atribuirse a la variación genética de las cepas y los requerimientos ecológicos dependiendo la zona geográfica (Vallejo et al., 1993)

Los días 10 y 12 fueron los momentos de mayor productividad de la población para el nivel de conductividad considerado como óptimo dentro de este experimento (5 mS/cm), que los situarían como el mejor momento de cosecha en estas condiciones específicas.

Estos resultados confirman que las poblaciones de las cepas locales pueden alcanzar densidades elevadas en los ambientes lóticos de la cuenca del río Salado como lo observado por Claps et al. (2009) donde tanto el límite inferior como óptimo de conductividad son similares a lo planteado en este experimento. En la mayoría de las lagunas de la cuenca, la presencia de *B. plicatilis* está restringida principalmente a los meses de verano cuando es posible que el nivel hidrométrico descienda significativamente por falta de precipitaciones y por incremento de evaporación, promoviendo el ascenso de la conductividad (Ardohain et al., 2005). Lo mismo fue observado por José de Paggi & Paggi (1998) tanto para el río Salado en Santa Fe como para la laguna Juan de Garay, donde encontraron a *B. plicatilis* como especie dominante cuando se registraron los valores más altos de conductividad (3500  $\mu$ S/cm para la laguna y 6300  $\mu$ S/cm para el río).

La diferencia encontrada en la biomasa de las hembras, podría relacionarse con el “efecto Lansing” (Gribble et al., 2014) que sugiere que en aquellos cultivos con hembras más viejas éstas transmitirán una señal a su



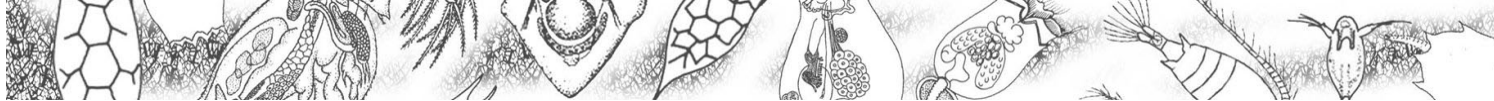


descendencia de manera que las generaciones siguientes comienzan a reproducirse más tempranamente y consecuentemente presentarán una menor talla ya que la energía la desvían hacia la reproducción. Este podría ser el caso ya que el experimento fue diseñado con un inóculo inicial de hembras adultas no grávidas de similar talla. Por lo que las hembras grávidas medidas al finalizar y que representaron la menor talla, pueden haber sido la descendencia de las primeras.

Respecto al biovolumen de las hembras no grávidas, si bien el testeó estadístico no evidenció diferencias entre los tratamientos, la tendencia a la disminución directamente proporcional del tamaño de la lóriga en relación con la disminución de la conductividad pudo haber estado subvalorada por el bajo número de individuos que pudieron medirse hacia el final del experimento.

Se propone entonces para futuras experiencias tomar la precaución de fijar y medir un mayor número de individuos para el cálculo del biovolumen.





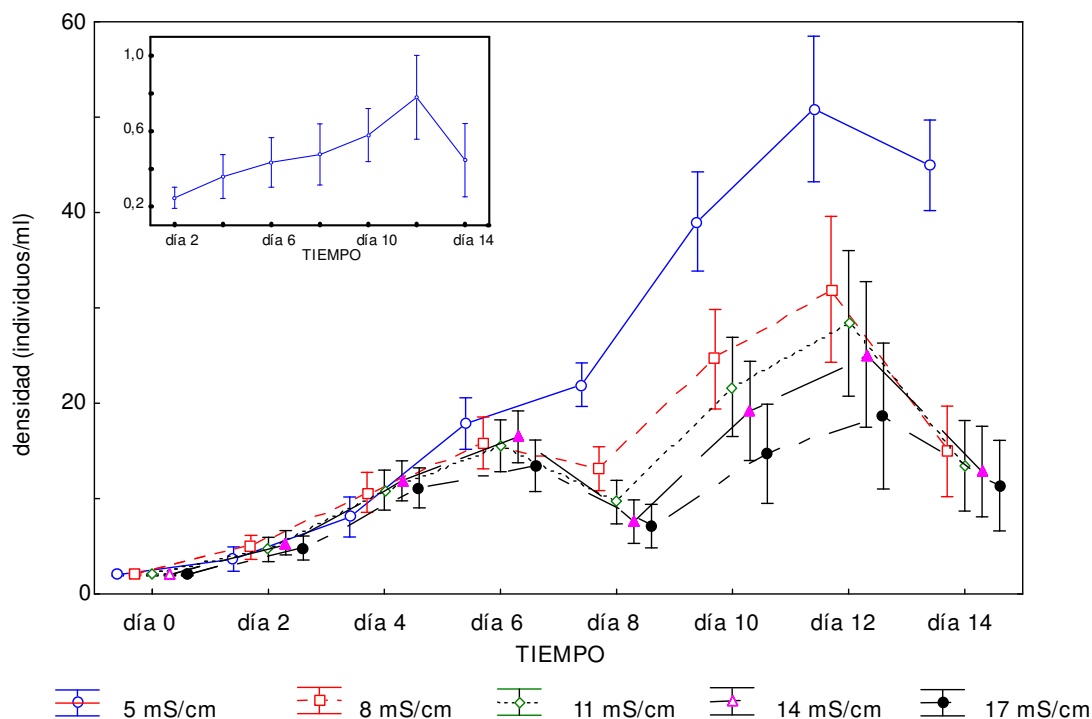
## **EXPERIMENTO 2: EFECTO DEL AUMENTO DE LA CONDUCTIVIDAD EN LA DINÁMICA POBLACIONAL DE *BRACHIONUS PLICATILIS*.**

Este experimento se planteó como continuidad del anterior a fin de evaluar las mismas características poblacionales pero en niveles conductividad creciente respecto al CONTROL de 5 mS/cm. Por lo cual la sección **1.1 de materiales y métodos** se repitió exactamente igual a excepción de los valores de conductividad de cada tratamiento, que se aclaran en la figura 49.

### **2.2 Resultados**

En el mismo orden del experimento 1 se evaluó primero la densidad poblacional de *Brachionus plicatilis* y se observó un comportamiento muy similar en todos los tratamientos en cada día de recuento y el mismo solapamiento entre ellos en la primer semana del experimento. Ya en la segunda semana, a partir del día 8 de recuento se pudo ver el alejamiento del tratamiento de 5 mS/cm de los restantes que siguieron con un solapamiento de los conteos entre sí. La mayor densidad poblacional registrada en este experimento coincidió con el anterior para los 5 mS/cm de conductividad (50,88 individuos/ml promedio) también en el día 12, mientras que en los restantes niveles se mantuvo una relación inversa entre la conductividad y la densidad poblacional siendo que con valores de 8 mS/cm el máximo promedio fue de 31,96 individuos/ml y a 17 mS/cm la densidad alcanzó promedios de 18,67 individuos/ml. Todos los tratamientos disminuyeron su densidad en el día final del experimento (día 14) siendo esta caída más abrupta en los tratamientos de mayor conductividad. El ANOVA de dos vías para medidas repetidas (RM ANOVA) para la densidad confirmó las diferencias observadas para estos tratamientos. De este análisis resultaron significativas las diferencias tanto para la interacción entre los factores TIEMPO y TRATAMIENTO ( $F_{28,105} = 15,43$ ;  $p < 0,000$ ) (Fig. 60), como para cada factor por separado. Las diferencias en cuanto a los tratamientos se dividieron en 2 grupos homogéneos ( $F_{4,15} = 20,09$ ;  $p < 0,000$ ), dejando en claro lo anteriormente expuesto siendo el tratamiento de 5mS/cm significativamente mayor al resto (tabla 10a, Fig. 60). Respecto al tiempo las diferencias obtenidas ( $F_{7,105} = 187,46$ ;  $p < 0,000$ ) evidenciaron una clara separación entre la primera semana del experimento, siendo el octavo día un intermedio por conformar el grupo de mayor densidad de los días 10 y 12, y el día 14 tomando posición intermedia por la disminución poblacional antes mencionada (tabla 10b).





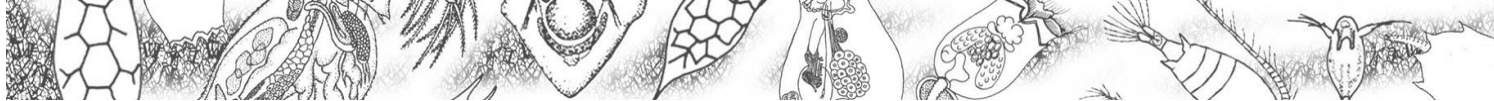
**Figura 60: Interacción (RM ANOVA) entre los factores tiempo y tratamiento para la densidad total de hembras. Recuadro: densidad promedio de hembras grávidas en cada tratamiento en función del tiempo.**

**Tabla 10. Test a posteriori (Tukey) para el factor CONDUCTIVIDAD (a) y TIEMPO (b), mostrando los grupos homogéneos (Gr. H.) y la densidad media total por tratamiento y de las hembras grávidas por día.**

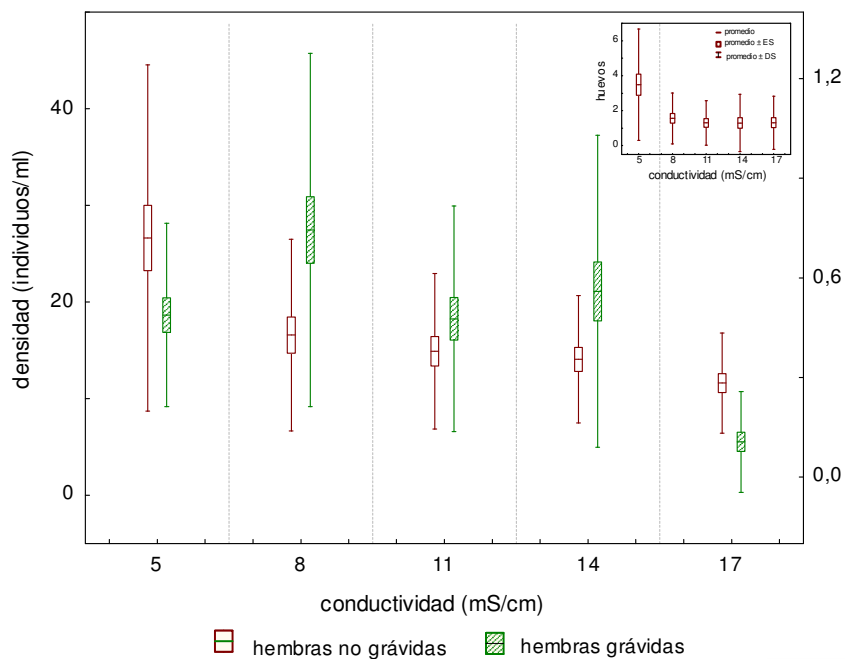
a) Conductividad	Densidad (ind./ml)	Gr. H.
17 mS/cm	10,41	a
14 mS/cm	12,56	a
11 mS/cm	13,29	a
8 mS/cm	14,76	a
5 mS/cm	<b>23,56</b>	<b>b</b>

b) Tiempo	Densidad (ind./ml)	Gr. H.
día 2	0,25	a
día 4	0,36	a b
día 6	0,43	a b
<b>día 14</b>	0,45	a b
día 8	0,48	a b
día 10	<b>0,58</b>	b <b>c</b>
día 12	<b>0,78</b>	<b>c</b>



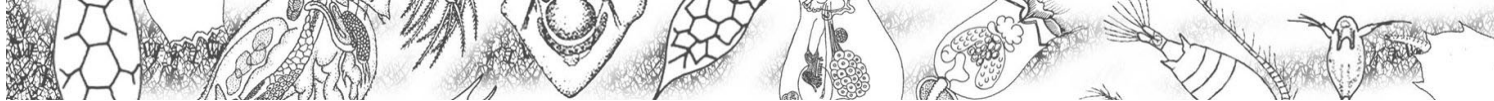


La densidad de hembras grávidas tomó valores promedios que corresponden aproximadamente a un 3% de la densidad total observada. En cada tratamiento y a lo largo del tiempo tuvo un comportamiento similar a la densidad total teniendo sus valores máximos hacia el día 12 y una posterior disminución en el día final (recuadro de Fig. 60 y Fig. 61) obteniéndose diferencias significativas en el RM ANOVA ( $F_{24,90} = 3,45$  ;  $F_{4,15} = 3,98$  ;  $F_{6,90} = 9,66$ ;  $p < 0,05$ ) separando en este caso a los tratamientos en 2 grupos homogéneos con la conductividad de 17 mS/cm y 8 mS/cm como los extremos de cada uno con los menores y mayores valores de densidad promedio respectivamente (tabla 11a), mientras que la conductividad de 5 mS/cm para el caso de las hembras grávidas tomó un valor intermedio (0,49 individuos/ml). Para el factor TIEMPO también se observó un comportamiento similar a la densidad total (recuadro de Fig.60), y donde se evidencia el marcado descenso hacia el final del experimento. El día final (día 14) tomó una posición intermedia por sus bajos valores de densidad, conformando así un total de 3 grupos homogéneos al igual que para la densidad total (tabla 10a). En el caso del número de huevos, también fueron estadísticamente significativas las diferencias para los tratamientos y el tiempo, conformando los mismos grupos homogéneos que se observaron para la densidad total ( $F_{6,105} = 34,18$ ;  $F_{4,105} = 19,56$ ;  $p < 0,000$ ) (tabla 11b; recuadro Fig. 61).



**Figura 61: Box-plot de la densidad total de hembras, densidad de hembras grávidas. Recuadro: promedio del número de huevos por tratamiento.**





**Tabla 11. Test a posteriori (Tukey) para el factor CONDUCTIVIDAD mostrando los grupos homogéneos (Gr. H.) y la densidad de hembras grávidas (a) por tratamiento y el número de huevos total (b).**

a)	Conductividad	Densidad grávidas (individuos/ml)	Gr. H.	
	17 mS/cm	<b>0,11</b>	<b>a</b>	
	11 mS/cm	0,48	a	b
	5 mS/cm	0,49	a	b
	14 mS/cm	0,56	a	b
	8 mS/cm	<b>0,74</b>	<b>b</b>	

b)	Conductividad	Número de huevos (total)	Gr. H.
	14 mS/cm	1,29	a
	11 mS/cm	1,30	a
	17 mS/cm	1,31	a
	8 mS/cm	1,56	a
	5 mS/cm	<b>3,49</b>	<b>b</b>

Al finalizar el experimento se observó que en los dos niveles de mayor conductividad (14 y 17mS/cm) aparecieron hembras portando huevos de resistencia y se observó la presencia de machos que fueron fotografiados (Fig. 62)



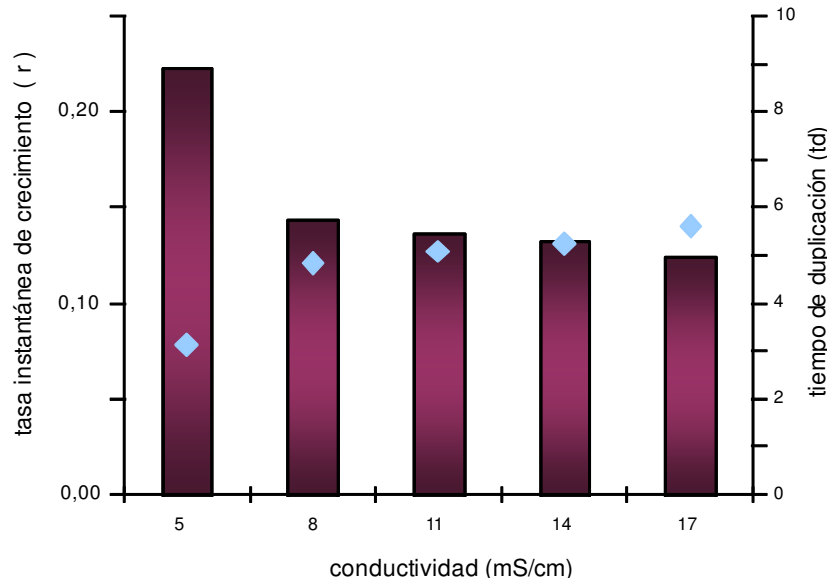
**Figura 62: Imágenes tomadas con microscopio óptico al finalizar el experimento donde se observó la presencia de machos en los 2 niveles de mayor conductividad (14 y 17 mS/cm).**

La tasa instantánea de crecimiento poblacional ( $r$ ) se calculó en el día 12 al igual que el experimento anterior por ser considerado el último día de la fase. Así, la mayor tasa de crecimiento (0,22) y el menor tiempo de duplicación (3,11





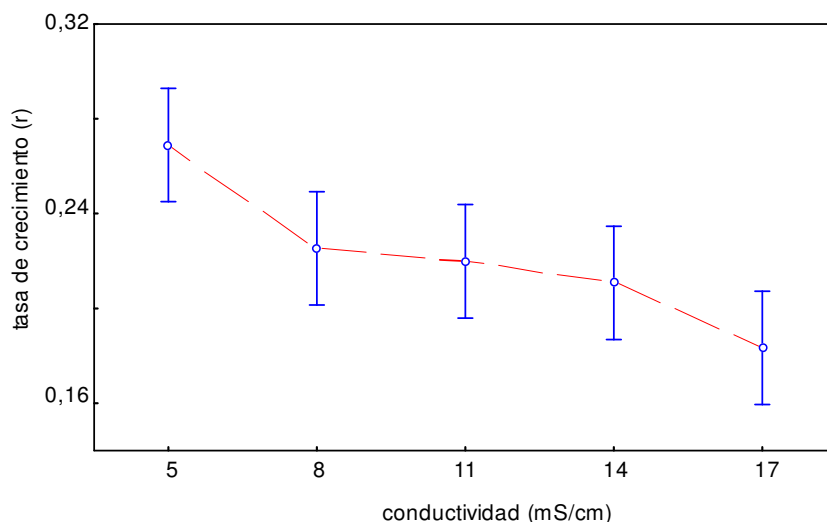
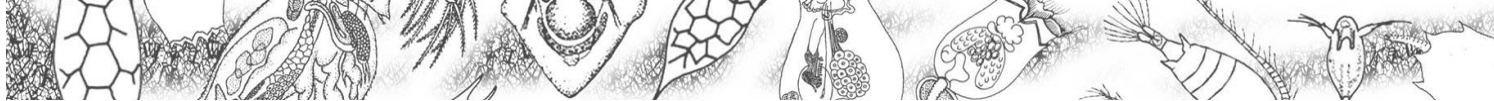
días) correspondió al tratamiento de 5mS/cm, mientras que los restantes mantuvieron esta misma relación pero con valores promedio menores y  $td$  que llegaron a duplicar al tratamiento control ( $r_{promedio}$  entre 0,12-0,14 y  $td$  entre 4,8 y 5,6 días) (Fig. 63).



**Figura 63: Tasa instantánea de crecimiento “r” (barras) y tiempo de duplicación (rombos) de las poblaciones de *Brachionus plicatilis* en los 5 niveles de conductividad.**

El posterior análisis estadístico (ANOVA de una vía) al que se sometió la tasa instantánea de crecimiento evidenció diferencias significativas para este factor entre un nivel de conductividad y otro ( $F_{4,15} = 7,62$ ;  $p < 0,001$ ). Se identificaron dos grupos homogéneos; donde nuevamente la conductividad de 8 mS/cm aparece como valor de transición entre un grupo y otro, siendo parte del primero que incluye los niveles de mayor conductividad (8 a 17 mS/cm) con valores de  $r$  significativamente menores al segundo grupo homogéneo compuesto por los tratamientos de conductividad de 5 mS/cm sumado al de 8 mS/cm (Fig. 64, tabla 12).





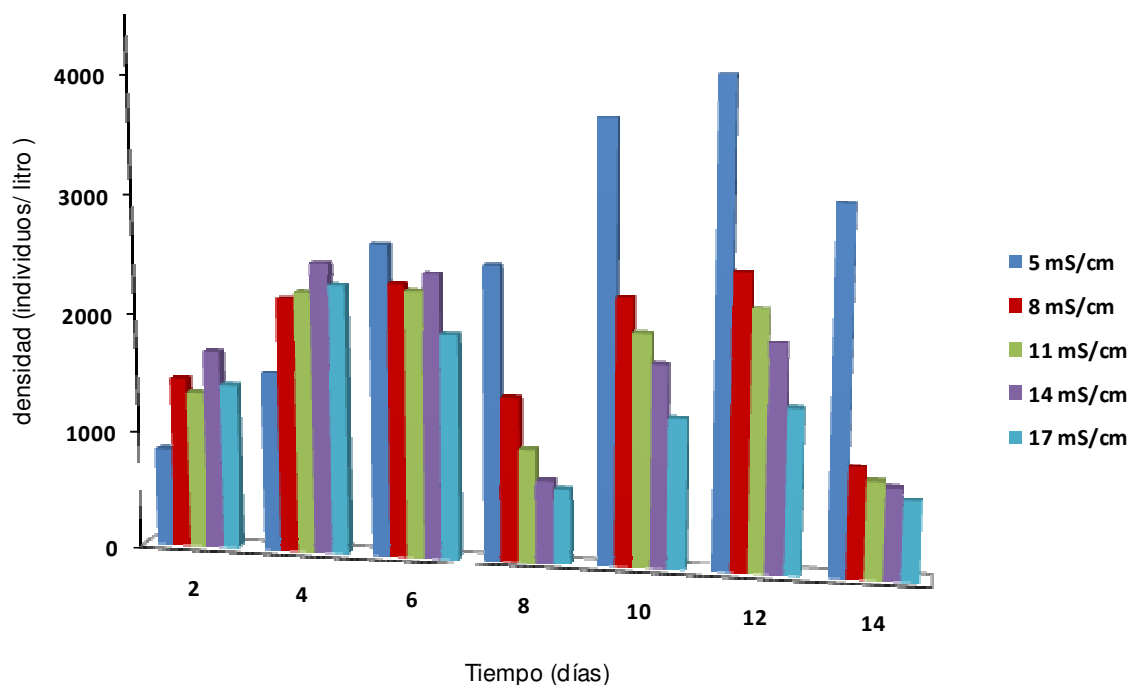
**Figura 64: Tasa instantánea de crecimiento ( $r$ ) promedio por cada tratamiento de conductividad.**

**Tabla 12. Test a posteriori (Tukey) para el factor CONDUCTIVIDAD mostrando los grupos homogéneos (Gr. H.) para la tasa de crecimiento poblacional ( $r$ ).**

Conductividad	$r$	Gr. H.	
17 mS/cm	0,1833	a	
14 mS/cm	0,2108	a	
11 mS/cm	0,2199	a	
8 mS/cm	<b>0,2253</b>	a	<b>b</b>
5 mS/cm	<b>0,2689</b>		<b>b</b>

En cuanto a la productividad ( $R$ ) no se observaron grandes diferencias entre los tratamientos en la primera semana al igual que pasó en el experimento anterior. En la segunda semana de la experiencia el valor máximo se encontró en el tratamiento de 5 mS/cm (4073 ind/1/d), apartándose de los restantes. Los mayores niveles de productividad se observaron en los días 10 y 12. Los tratamientos restantes rondaron un promedio de productividad de 2000 ind/1/d (Fig. 65).

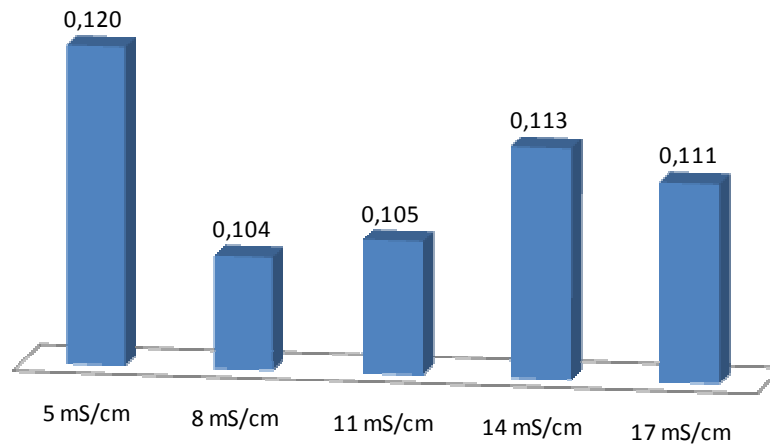




**Figura 65: Productividad de las poblaciones de *Brachionus plicatilis* en los cinco niveles de conductividad.**

En cuanto a la morfometría, los valores promedio del largo de loriga para las hembras no grávidas oscilaron entre los 159,8  $\mu\text{m}$  y 187,4  $\mu\text{m}$ . Las hembras grávidas sólo pudieron medirse en los 3 tratamientos de mayor conductividad, tomando valores promedio de 179  $\mu\text{m}$ . Estos datos fueron transformados y expresados en términos de biomasa ( $\mu\text{g PS}$ ) (Fig. 66). La mayor biomasa se encontró a los 5mS/cm seguida de los niveles de conductividad mayor (14 y 17 mS/cm) y luego los intermedios de 8 y 11 mS/cm, no mostrando una clara tendencia respecto a este factor, esto se confirmó por el ANOVA de una vía realizado donde los grupos homogéneos siguen esta disposición (tabla 13) ( $F_{4,113}=3,87$ ;  $p<0,0055$ ).





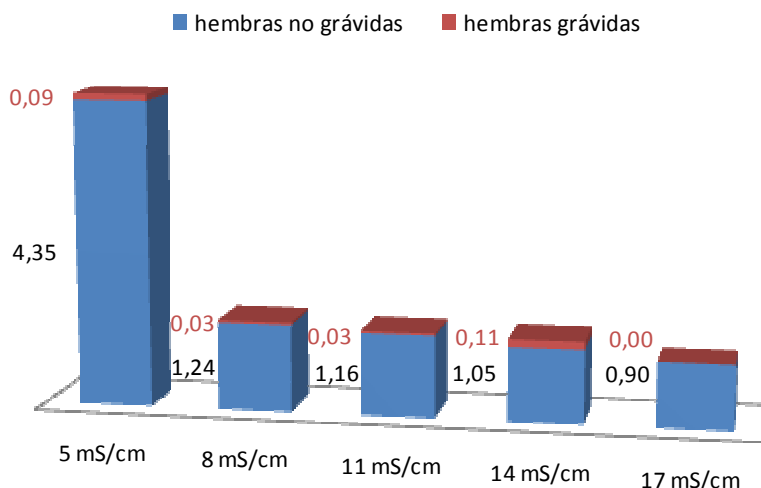
**Figura 66: Biomasa en microgramos de peso seco ( $\mu\text{g PS}$ ) de las hembras no grávidas presentes al finalizar el experimento.**

**Tabla 13. Test a posteriori (Tukey) para el factor CONDUCTIVIDAD mostrando los grupos homogéneos (Gr. H.) para la biomasa en cada tratamiento.**

Conductividad	Biomasa	Gr.H.
8 mS/cm	0,104	a
11 mS/cm	0,105	a
17 mS/cm	<b>0,111</b>	a <b>b</b>
14 mS/cm	<b>0,113</b>	a <b>b</b>
5 mS/cm	<b>0,120</b>	<b>b</b>

Nuevamente, en la biomasa final de los rotíferos en cada tratamiento ( $\mu\text{g PS/ml}$ ) se pudo observar que el mayor valor se obtuvo en el tratamiento de 5 mS/cm con un total de 4,35  $\mu\text{g PS/ml}$  para las hembras no grávidas y un promedio de 1,09  $\mu\text{g PS/ml}$  para los tratamientos restantes. Para las hembras grávidas, como ya se mencionó anteriormente estuvieron presentes en menor proporción, por lo que la biomasa final promedio fue de tan sólo 0,06  $\mu\text{g PS/ml}$  con valores máximos de 0,11  $\mu\text{g PS/ml}$  para la conductividad de 14 mS/cm (Fig. 67).





**Figura 67: Biomasa final expresada en microgramos de peso seco por mililitro ( $\mu\text{g PS/ml}$ ) de las hembras grávidas y no grávidas de *Brachionus plicatilis* al finalizar la experiencia.**

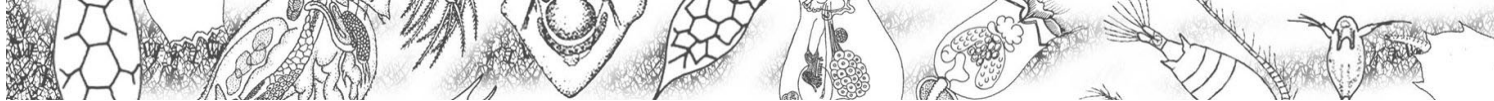
### 2.3 Discusión

Al igual que para el “experimento 1”, aquí también se observó el solapamiento de los tratamientos en la primera semana que puede ser explicada por la fase de latencia mencionada anteriormente por Pascual y Yúfera (1983). Se pudo observar que si bien el tratamiento control fue el que más creció, los restantes tratamientos tuvieron un desarrollo considerable y mucho más elevado a lo observado para los tratamientos del “experimento 1”, incluso duplicando su valor y superando a lo observado por Fielder et al (2000).

Las tasas de reproducción asexual obtenidas fueron equivalentes a las del óptimo del experimento anterior en los niveles de conductividad inferior (5-8 mS/cm), disminuyendo levemente en los niveles más altos, pero aún así tomando valores considerados como favorables en el ámbito experimental coincidiendo con lo observado por Vallejo et al. (1993).

A pesar de la elevada densidad observada en los dos niveles de mayor conductividad (14 y 17 mS/cm), éstas podrían ser consideradas como poco favorables para el crecimiento de estas cepas ya que se registró la presencia de machos y huevos de resistencia indicando un cambio de al menos una parte de





la población a la fase mítica de desarrollo, que como se mencionó anteriormente se produce en condiciones desfavorables de salinidad (Hagiwara & Hino, 1989).

Nuevamente los días 10 y 12 fueron los momentos de mayor productividad de la población en todos los niveles de conductividad, siendo mayor en aquél considerado como óptimo dentro de este experimento (5 mS/cm), coincidiendo con lo observado en el “experimento 1”.

Todo esto refuerza el concepto de que los niveles de conductividad son determinantes para la presencia conspicua de *B. plicatilis* en los ambientes y coincide con los resultados registrados para las poblaciones naturales de esta cepa en los ambientes lóticos de la cuenca del río Salado (Claps et al., 2009) donde pudo alcanzar densidades elevadas incluso a niveles de conductividad tan altos como los evaluados en este experimento (Solari et al., 2002 y Gabellone et al., 2014). Y como se mencionó anteriormente, también se corresponde por lo mencionado para el río Salado de Santa Fe, con la mayor abundancia y dominancia por parte de *B. plicatilis* a conductividades entre los 5 y 8 mS/cm (José de Paggi & Paggi, 1998).

En relación al tamaño (largo) de loriga los valores máximos coinciden con lo observado por Anitha & George (2006) para niveles de conductividad similares a los ensayados.





## B. Temperatura

La temperatura es un factor determinante para el crecimiento de poblaciones de rotíferos aunque es variable según la especie. *Brachionus angularis* tiene su límite de tolerancia a 25 °C mientras que *B. calyciflorus*, considerada una especie euriterma del calor puede cultivarse con temperaturas mayores a 40 °C. Por el contrario, especies del género *Notholca* no prosperan con temperaturas superiores a los 10 °C (Walz et al., 1989).

La reproducción de *B. plicatilis* depende de numerosos factores como la temperatura, salinidad y la calidad y cantidad de alimento (Lubzens et al., 1985, Miracle & Serra 1989, Yúfera, 2007). El máximo crecimiento de la poblaciones puede darse en diferentes temperaturas (Yin & Zhao, 2008), dependiendo de las cepas geográficas, pero fluctúa entre 18 y 25 °C (Fielder et al., 2000).

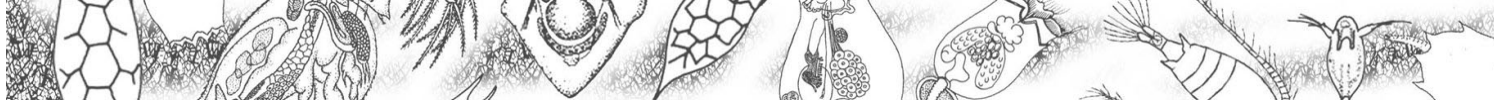
**Hipótesis: La estacionalidad en los cuerpos de agua pampásicos se expresa en fluctuaciones térmicas que influyen en forma directa en la estructura y dinámica de un gran número de zooplanctontes. Por ejemplo se define tanto la presencia (rango) como el predominio (óptimo) de la especie eurihalina *B. plicatilis* en ríos y lagunas pampásicas.**

Objetivos: evaluar el efecto de dos niveles de temperatura que reflejan dos momentos característicos de estacionalidad térmica en los cuales la cepa local de *Brachionus plicatilis* puede desarrollarse.

### **EXPERIMENTO 3: EFECTO DE LA TEMPERATURA EN LA DINÁMICA POBLACIONAL DE *BRACHIONUS PLICATILIS*.**

La temperatura promedio histórica (1933-actualidad) de los sitios de muestreo de la provincia de Buenos Aires en donde se colectaron los clones de *B.plicatilis* fluctúa entre los 15° C en otoño y primavera y 25° C en verano (<http://data.giss.nasa.gov/tmp/gistemp/STATIONS/>). Por lo que se planteó realizar como primera experiencia en laboratorio respecto a la temperatura, una que evaluara el desarrollo poblacional de clones de este organismo en ambas condiciones térmicas (25° C y 15° C).



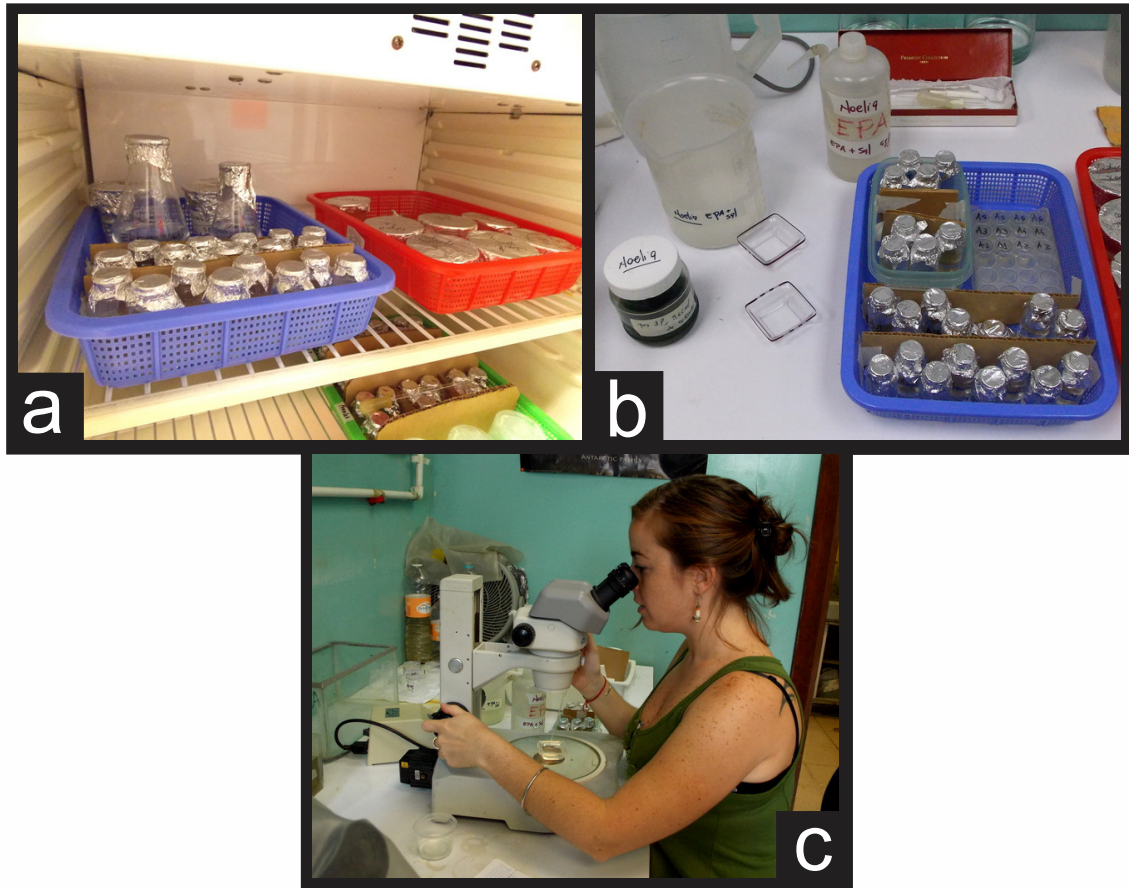


### 3.1 Materiales y métodos.

El experimento se llevó a cabo en dos cámaras de incubación, cada una configurada con las dos temperaturas propuestas para este experimento (25° C y 15° C). Se utilizaron 16 viales de vidrio de 25 ml, los cuales se llenaron con 20 ml de medio de cultivo EPA y se inocularon con  $0,5 \times 10^6$  individuos/ml de *C. vulgaris* (Fig. 68). La densidad inicial del rotífero *B. plicatilis* para todos ellos fue de 0,5 individuos/ml (10 individuos por vial). Todos los tratamientos se realizaron por triplicado. La mitad de ellos se inocularon con hembras adultas (tratamiento A) y la otra mitad con neonatos (tratamiento N) (Fig. 69).

Los conteos se realizaron con microscopio estereoscópico y a diario se renovó por completo el medio de cultivo de cada uno de las réplicas y se inocularon con la misma cantidad de alimento. El conteo de los tratamientos inoculados con hembras adultas se efectuó cada 24 horas y los datos obtenidos se utilizaron en los análisis de crecimiento poblacional, mientras que los tratamientos inoculados con neonatos se contabilizaron cada 12 horas para la confección de una tabla de vida. Como ya se mencionó anteriormente, los organismos de esta especie y de los rotíferos en general tienen un corto ciclo de vida y el conteo cada 12 horas, nos permite diferenciar los neonatos recientes de los adultos. Para la confección de la tabla de vida fue necesario contar y separar los nuevos neonatos de los adultos y de esta manera estar seguros que se sigue el crecimiento de la cohorte original. La finalización del experimento se determinó para los tratamientos con neonatos al momento en que todas las hembras de esa cohorte murieron y en los tratamientos con adultos al momento en que la población disminuyó considerablemente luego de la respectiva fase exponencial. Con los datos obtenidos de la tabla de vida también se calcularon la tasa de crecimiento poblacional ( $r$ ), la tasa reproductiva bruta y neta (TRB, TRN), supervivencia ( $lx$ ) y la fecundidad ( $mx$ ) para cada tratamiento. Al finalizar el experimento se tomaron las medidas morfométricas de los individuos para su posterior cálculo de biomasa.

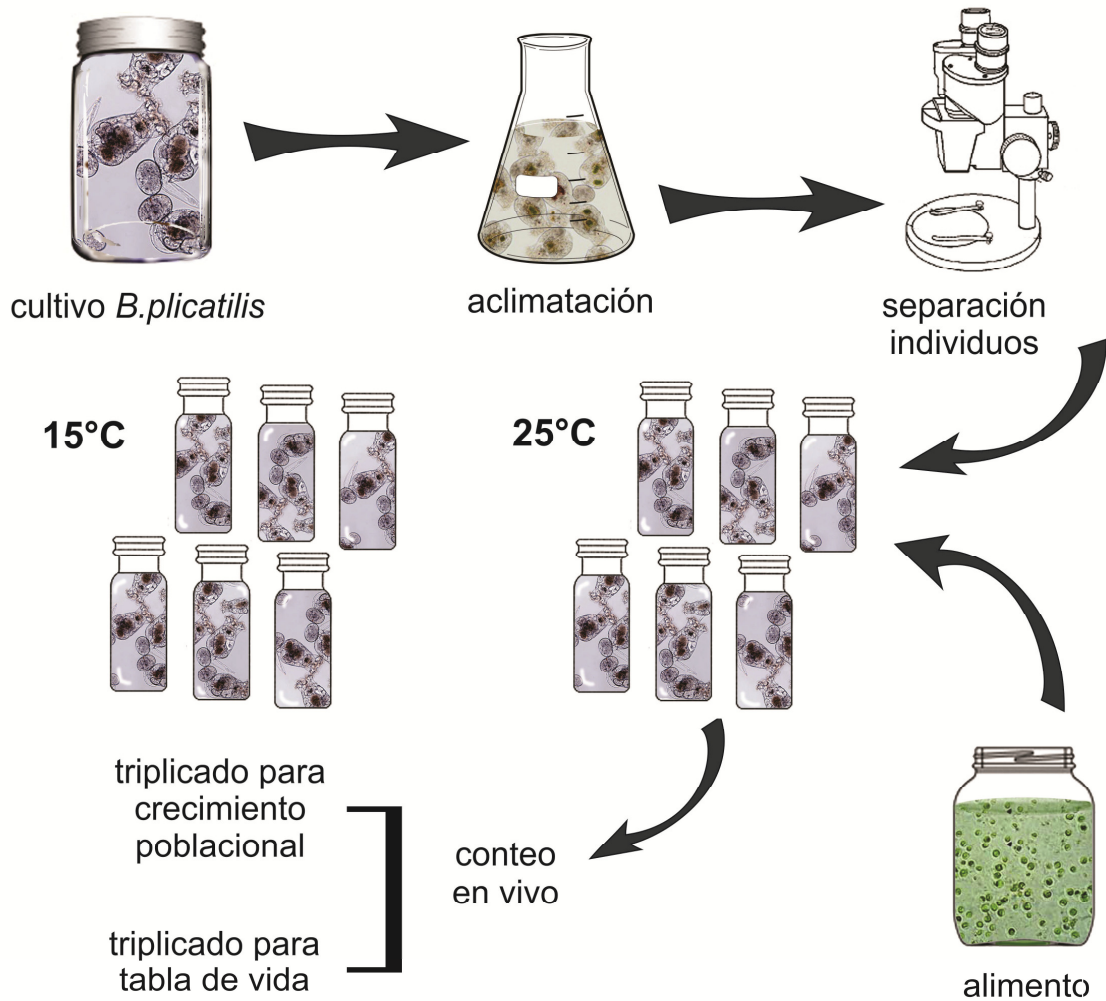




**Figura 68: Desarrollo del experimento de temperatura con *Brachionus plicatilis*. a) Cámara de incubación; b) Viales, medio de cultivo y cámaras de conteo; c) recuento con microscopio estereoscópico.**

Los valores de densidad y aquellos parámetros obtenidos de la tabla de vida fueron sometidos a distintos análisis estadísticos según corresponda en cada caso (RM ANOVA, ANOVA una vía) con el cumplimiento de los supuestos respectivos.





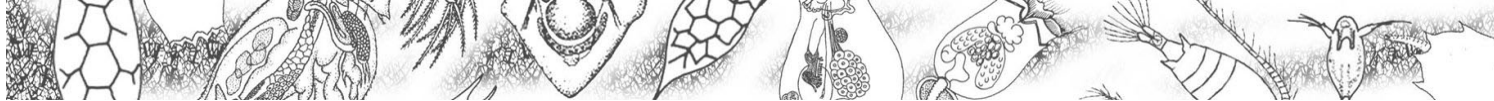
**Figura 69: Esquema del diseño experimental y desarrollo del experimento 2: *Brachionus plicatilis* sometido a temperaturas de 25°C y 15°C.**

### 3.2 Resultados.

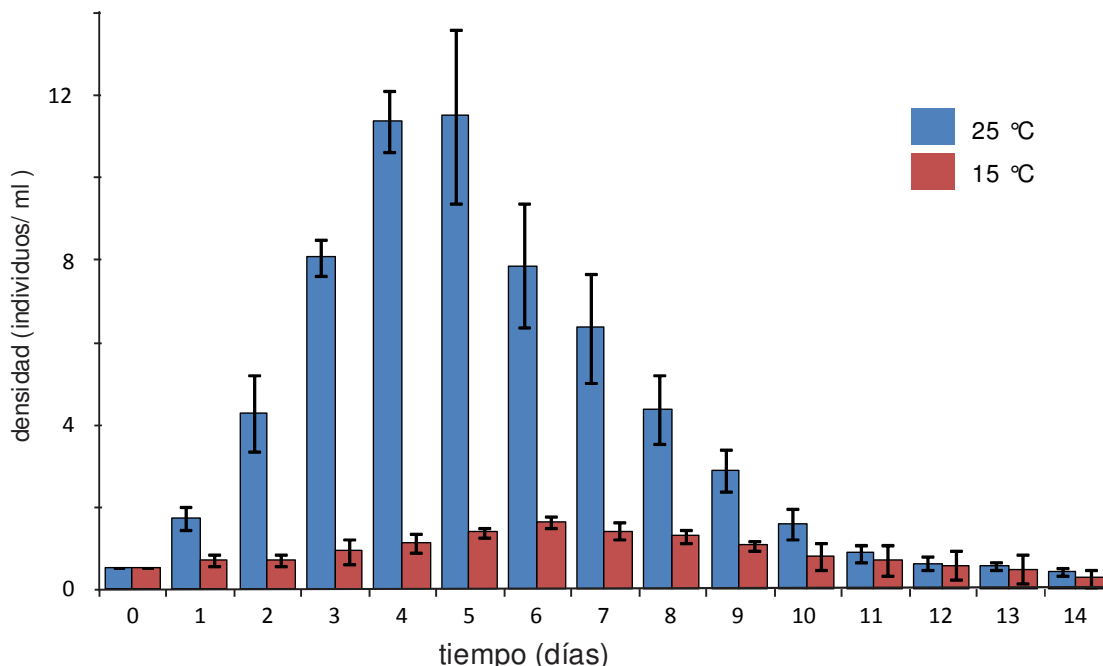
De los tratamientos con hembras adultas (A), la máxima densidad promedio se obtuvo a los 25° C (11,47 individuos/ml) en el día 5 del experimento con picos de 13 individuos/ml, mientras que a los 15° C ocurrió un día después y no superó los 2 individuos/ml, lo que representó apenas una séptima parte de lo observado para el primer tratamiento (Fig. 70).

A partir del día 1 ambos tratamientos ya se separaron notoriamente y con un fuerte incremento poblacional a 25°C, para volver a juntarse hacia el día 11 hasta finalizar el experimento. Se observó que si bien a los 15°C no existió un





considerable incremento poblacional, la misma no desapareció sino que permaneció con baja densidad pero estable a lo largo del tiempo experimental.



**Figura 70: Densidad poblacional de *Brachionus plicatilis* en las dos temperaturas ensayadas: 25° C y 15° C.**

Para la verificación estadística de estas observaciones, los valores de densidad se sometieron a un análisis de la varianza para medidas repetidas (RM ANOVA) en el cual se obtuvieron diferencias significativas ( $p < 0,001$ ) tanto para la interacción ( $F_{14,56} = 50,9$ ) como para los factores TIEMPO y TEMPERATURA ( $F_{14,56} = 69,2$ ;  $F_{1,4} = 439,9$ ).

El test a posteriori Tuckey para el factor TIEMPO mostró tres grupos homogéneos, el primero agrupó los 2 primeros días y los 5 últimos días, con la menor densidad de rotíferos, que coincide con lo señalado anteriormente donde se juntaron los valores de ambos tratamientos. Por otro lado los días 3 a 6 conformaron el grupo con la mayor densidad poblacional y un tercer grupo con valores intermedios, estos 2 últimos grupos coincidieron con la separación antes mencionada entre ambos tratamientos (tabla 14).



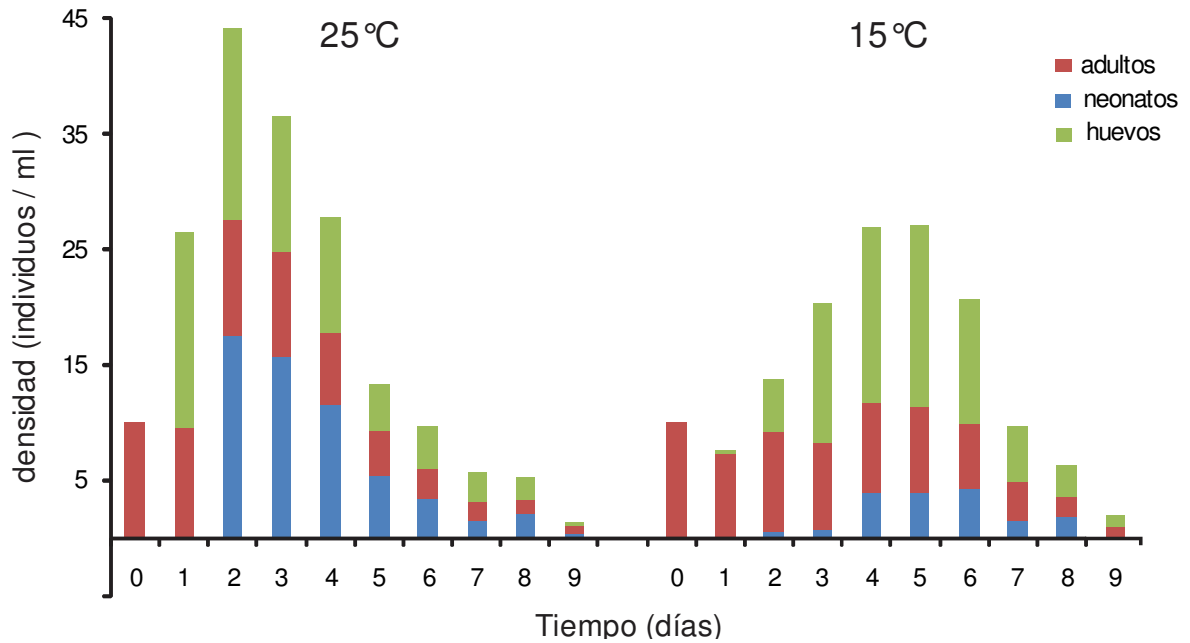


**Tabla 14. Test a posteriori (Tukey) para el factor TIEMPO, mostrando los grupos homogéneos (Gr. H.) y la densidad media.**

	<b>Gr. H</b>	<b>media</b>
día 14	<b>a</b>	6,5
día 0	<b>a</b>	9,83
día 13	<b>a</b>	10,0
día 12	<b>a</b>	11,5
día 11	<b>a</b>	15,33
día 10	<b>a</b>	23,17
día 1	<b>a</b>	23,67
día 9	<b>b</b>	39,0
día 2	<b>b</b>	49,33
día 8	<b>b</b>	56,17
día 7	<b>b</b>	77,17
día 3	<b>c</b>	89,33
día 6	<b>c</b>	94,33
día 4	<b>c</b>	124,33
día 5	<b>c</b>	128,33

A partir de los tratamientos inoculados con neonatos (N) se evidenciaron las diferencias en la estructura de la población en cada tratamiento (Fig. 71). La mayor diferencia se halló en la densidad de neonatos que en el tratamiento de 25°C alcanzó un máximo de 17 neonatos en el día 2, mientras que a los 15°C el máximo fue apenas de 4 neonatos entre los días 4 a 6. La densidad de huevos fue muy similar entre ambos, con máximos de 16-17 huevos por día, pero como puede visualizarse en la figura 71 la producción comenzó en edades muy tempranas en el tratamiento de 25°C (día 1), mientras que a 15°C una producción equivalente se observó a partir del día 3-4. Los adultos por su parte y como ya se mencionó anteriormente tuvieron un comportamiento muy similar entre ambos tratamientos en los días sucesivos comenzando a morir a partir del día 5-6.

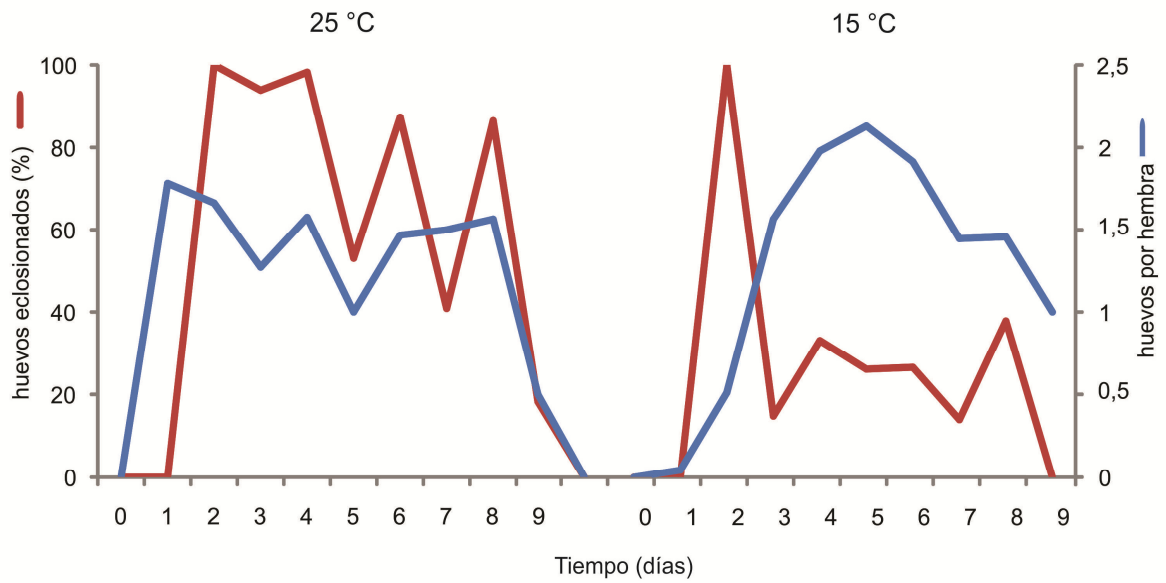




**Figura 71: Densidad de los distintos componentes de la estructura poblacional en las dos temperaturas ensayadas: 25° C y 15° C.**

La relación huevo-hembra y el porcentaje de huevos eclosionados (Fig. 72) mostraron claras diferencias entre ambos tratamientos. A 25°C se halló una relación huevo-hembra de hasta 1,8 mientras que a 15°C se encontraron máximos de 2,2 huevos por hembra. Sin embargo, si se analiza el porcentaje de huevos eclosionados se ve que en el tratamiento de 25°C alcanzaron valores muy altos en los momentos de mayor producción incluso hasta el 100% en día 2 y valores muy cercanos en los días subsiguientes (80-95%). En el tratamiento de 15°C el único pico con el máximo porcentaje de eclosión fue en el día 2 donde la producción de huevos fue muy baja (0,05 huevos/hembra), mientras que esta relación se vio invertida en los días posteriores, donde al aumentar la producción disminuyó notablemente la eclosión de los mismos alcanzando valores entre 13 y 37%, sin llegar ni a la mitad de lo observado a mayor temperatura.

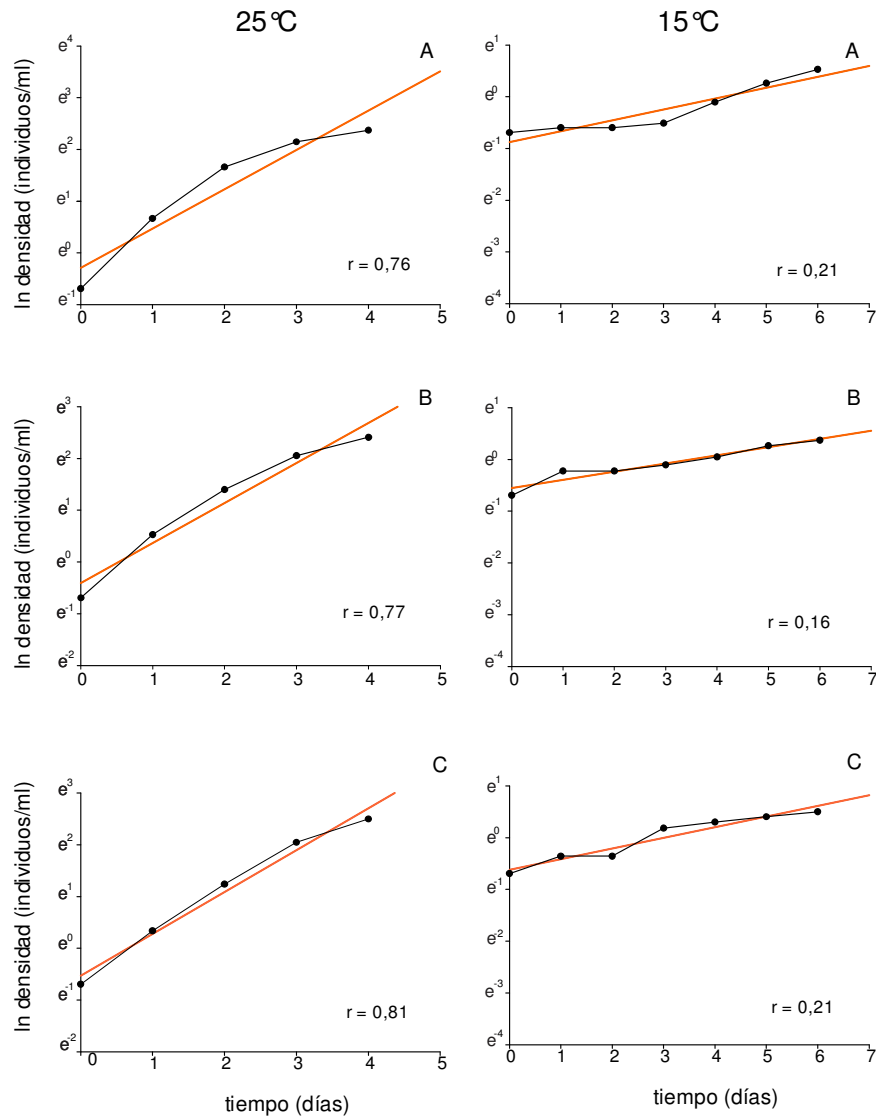




**Figura 72: Relación huevo por hembra grávida y porcentaje de huevos eclosionados por día en las dos temperaturas ensayadas: 25° C y 15° C.**

Los valores de la tasa de crecimiento poblacional ( $r$ ), se obtuvieron de manera gráfica por la técnica de la pendiente antes mencionada en el capítulo III (Fig. 73), y también a partir de la tabla de vida construida junto con la tasa reproductiva bruta (TRB) y la tasa reproductiva neta (TRN) para cada réplica de cada tratamiento se testearon mediante un ANOVA de una vía teniendo como factor la TEMPERATURA. En la tabla 15 se resumen los resultados de este análisis siendo significativas ( $p < 0,000$ ) las diferencias entre ambas temperaturas para los tres parámetros testeados. El test a posteriori Tukey evidenció los mismos grupos homogéneos para los tres casos, siendo siempre significativamente menores los valores en la temperatura de 15°C. La tabla 16 y la figura 74 resumen en conjunto los valores medios de ambos tratamientos para cada uno de ellos.





**Figura 73: Curvas de crecimiento durante la fase exponencial de cada réplica en cada temperatura y superpuesta la recta de regresión cuya pendiente representa la tasa de crecimiento poblacional ( $r$ )**

**Tabla 15. Resultados del ANOVA de una vía para la tasa de crecimiento ( $r$ ), para la tasa reproductiva bruta (TRB) y para la tasa reproductiva neta (TRN) (g.l.: grados de libertad, F: coeficiente de Fischer, p: probabilidad).**

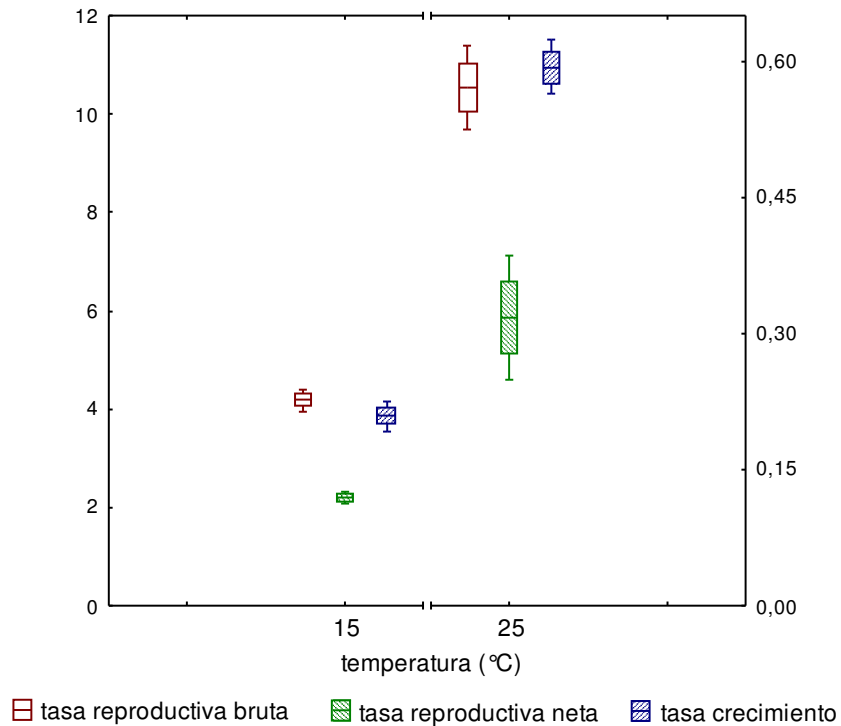
	<b>r</b>			<b>TRB</b>		<b>TRN</b>	
	g. l.	F	p	F	p	F	p
Intersección	1	1658,65	0,000002	851,93	0,000008	120,75	0,00039
Temperatura	1	379,27	0,000041	159,49	0,00023	24,82	0,0076
Error	4						





**Tabla 16. Test a posteriori (Tukey) para el factor TEMPERATURA, mostrando los grupos homogéneos (Gr. H.) para la tasa de crecimiento (r), para la tasa reproductiva bruta (TRB) y para la tasa reproductiva neta (TRN).**

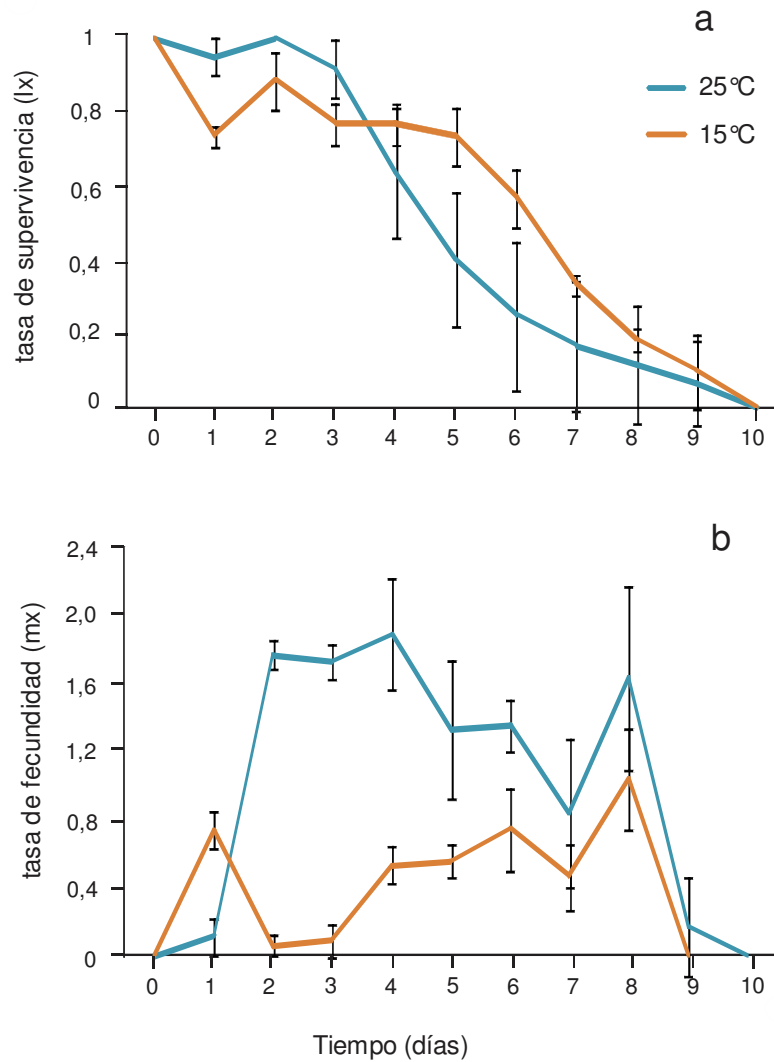
	Gr. H.	r	TRB	TRN
15 °C	<b>a</b>	0,21	4,17	2,20
25 °C	<b>b</b>	0,68	10,54	5,85



**Figura 74: Box-plot mostrando para ambas temperaturas los valores promedio y desvíos para la tasa de crecimiento (r) tasa reproductiva bruta (TRB) y tasa reproductiva neta (TRN).**

Los valores de supervivencia ( $lx$ ) se mantuvieron muy próximos entre ambos tratamientos siendo incluso levemente menores en el tratamiento de 25°C a partir del cuarto día, pero con mayores desvíos entre las réplicas (Fig. 75) Esto pudo corroborarse con el RM ANOVA donde los tratamientos no resultaron estadísticamente significativos ( $F_{1,4}=0,83$ ;  $p=0,41$ ), mientras que si lo hicieron para el factor tiempo ( $F_{10,40}=111,81$ ,  $p<0,000$ ) demostrando que sí cambiaron a lo largo de los días pero de manera similar en ambas temperaturas.

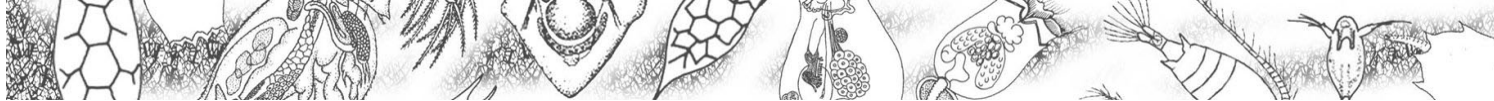




**Figura 75: Curvas para la supervivencia (a) y fecundidad (b) respecto a cada día del experimento y para cada temperatura ensayada.**

Para la fecundidad (mx) en cambio, las diferencias sí fueron significativas ( $p < 0,000$ ) tanto para la interacción ( $F_{10,40} = 15,22$ ) como para ambos factores, TIEMPO y TEMPERATURA ( $F_{10,40} = 26,75$ ;  $F_{1,4} = 179,88$ ). En la figura 75 se observa que a excepción del día 1 (además del día inicial y final) la temperatura de 25°C siempre tuvo los mayores valores siendo la separación máxima entre ambos tratamientos en los días 2 a 6 duplicando los valores del tratamiento de menor temperatura. La mayor fecundidad se halló en los días 2-4 para los 25°C con un pico un poco menor hacia el final (día 8), mientras que en este día fue donde a los 15°C se encontró el mayor valor promedio de fecundidad (1), junto con un valor cercano de 0,7 en el día 1. Estas diferencias en los valores según los días y la temperatura se resume en la tabla 17 de los grupos homogéneos resultantes





del análisis a posteriori (Tukey) realizado para al RM ANOVA antes mencionado, donde los menores valores agrupan en general al tratamiento de 15°C y los días 1 y 9 del tratamiento de 25°C que como ya se mencionó antes, responden al único día donde los valores de 15°C superaron a los de 25°C, y al final de la experiencia donde se unen ambas curvas. El día 7 tuvo una ubicación intermedia debido a que como se observó en la figura y también puede leerse de la columna de “media” de la tabla el día 8 vuelve a aumentar su valor promedio en ambos tratamientos quedando entonces por sobre el día 7. En la parte inferior de la tabla con los mayores valores se encuentra sólo el tratamiento de 25°C.

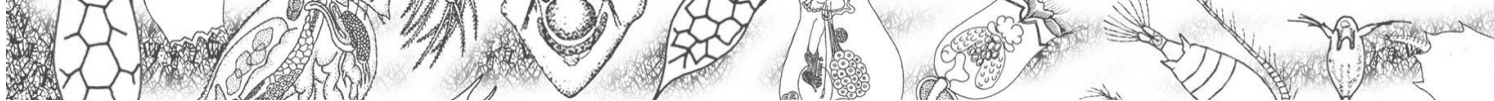
**Tabla 17. Test a posteriori (Tukey) para la interacción entre TIEMPO y TEMPERATURA, mostrando los grupos homogéneos (Gr. H.).**

	día	media	Gr. H.				
15 °C	9	0,000000	a				
15 °C	10	0,000000	a				
15 °C	0	0,000000	a				
25 °C	0	0,000000	a				
25 °C	10	0,000000	a				
15 °C	2	0,059211	a	b			
15 °C	3	0,086310	a	b			
25 °C	1	0,109162	a	b			
25 °C	9	0,166667	a	b			
15 °C	7	0,460317	a	b	c		
15 °C	4	0,526786	a	b	c		
15 °C	5	0,550962	a	b	c		
15 °C	1	0,730159		b	c	d	
15 °C	6	0,733566		b	c	d	
25 °C	7	0,825397			c	d	
15 °C	8	1,027778			c	d	
25 °C	5	1,319048			c	d	e
25 °C	6	1,344444				d	e
25 °C	8	1,611111				d	e
25 °C	3	1,714161				d	e
25 °C	2	1,750000					e
25 °C	4	1,870370					e

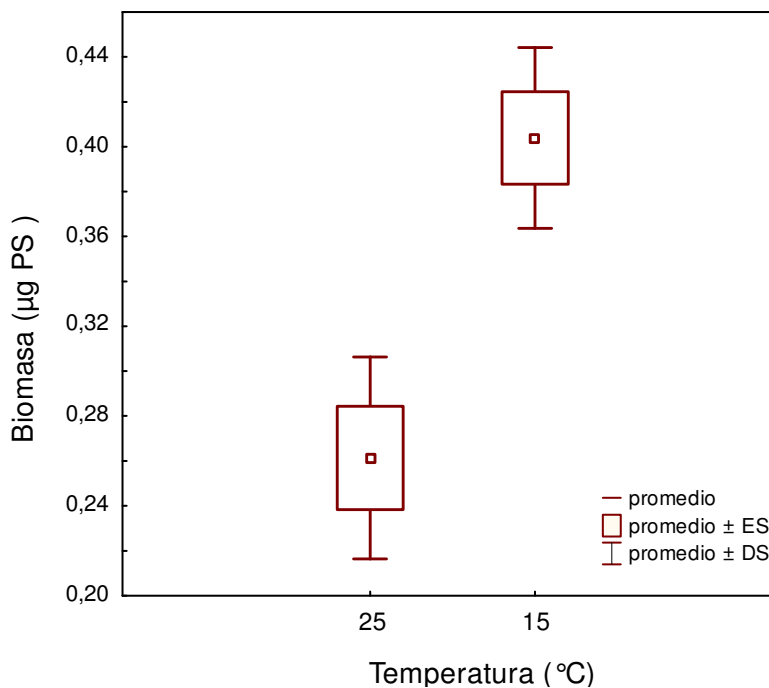
En cuanto a las medidas morfométricas los individuos más grandes se encontraron a la temperatura de 15°C con una longitud promedio de 235,4 µm y un máximo de 247,2 µm; mientras que a 25°C fueron un 16% menor con una longitud promedio de 195,8 µm y máximos de 226,1 µm.

Los valores de biomasa (µg PS) fueron sometidos a un análisis de diferencia de medias para dos grupos que evidenció que ambas temperaturas





difierieron significativamente para la biomasa ( $t = -4,59$ ;  $p < 0,000$ ) con biomasa promedio de  $0,40 \mu\text{g PS}$  (máximo  $= 0,46 \mu\text{g PS}$ ) para los  $15^\circ\text{C}$  y  $0,26 \mu\text{g PS}$  promedio (máximo  $= 0,39 \mu\text{g PS}$ ) para los  $25^\circ\text{C}$  (Fig. 76).



**Figura 76: Box-plot resultante del análisis de comparación de medias (test t) para la biomasa en las dos temperaturas ensayadas.**

### 3.3 Discusión

La cepa local de *Brachionus plicatilis* con la cual se realizó este experimento a un nivel de conductividad que se determinó previamente como óptimo tuvo un comportamiento en cuanto a la temperatura que coincide con lo observado por Claps et al. (2009) a pesar de que este trabajo fue realizado por estaciones climáticas y por lo tanto podría considerarse que el rango correspondiente fue menos exacto.

A nivel experimental el notorio crecimiento poblacional a la mayor temperatura ensayada de  $25^\circ\text{C}$  y la manera en la cual la estructura poblacional fue incrementando su proporción de juveniles y producción de huevos, está en concordancia con lo planteado por estos autores que proponen un rango de





temperatura en las poblaciones naturales de  $20^{\circ}\text{C} (\pm 5,6^{\circ}\text{C})$  y con Fielder et al. (2000) quienes proponen un cultivo comercial con cepas marinas entre los  $23$  y  $24^{\circ}\text{C}$  con posibilidades de realizarlos a  $25^{\circ}\text{C}$  a salinidades óptimas, demostrando así, una característica preferencia por las temperaturas cálidas.

La alta tasa de crecimiento obtenida a la mayor temperatura, coincidió con la establecida para esta cepa en condiciones de laboratorio en capítulos anteriores, y fue muy cercana a la que otros autores han planteado a esta misma temperatura (Miracle & Serra, 1989; Pascual & Yúfera, 1983). Lo que denotaría el porqué esta especie es dominante en los meses de verano en los cuerpos de agua pampásicos cuando éstos presentan niveles propicios de salinidad.

El retraso al inicio de la reproducción en la menor temperatura (Sarma et al., 2005) y el pico en la proporción de huevos eclosionados en los primeros y últimos días pero con menor proporción de juveniles viables, sumado al aumento en la producción de huevos por hembra denotan una condición poco favorable que podría estar induciendo a las hembras a invertir sus recursos energéticos en dejar descendencia a pesar de que ésta no demuestra tener éxito. A mayor temperatura se han establecido tiempos de eclosión menores a las 12 horas con lo que la población aumentará rápidamente a pesar de tener momentos de una menor relación huevo/hembra (Sarma & Rao, 1991).

Esto mismo ocurre con la tasa de fecundidad que a la menor temperatura los picos al inicio y final del experimento indican el esfuerzo de las hembras por producir descendencia ante una condición distinta y menos favorable, mientras que a la temperatura considerada como óptima este pico se ve levemente retrasado pero con un éxito reproductivo hasta 12 veces mayor, generando entonces una notable producción de huevos que eclosionan con éxito convirtiéndose en juveniles y transformándose en adultas como se pudo notar en el recambio poblacional antes mencionado.

Las curvas de supervivencia se mantienen similares entre ambas temperaturas, incluso siendo levemente menores a  $25^{\circ}\text{C}$  luego de los primeros días, lo que podría sugerir que las hembras también están invirtiendo su energía en reproducirse ante una condición óptima, pero esta vez con éxito, en lugar de invertir esfuerzo en su propia supervivencia, acortando la etapa postembrionaria. Justamente al mayor pico reproductivo a esta temperatura le sigue un declive en la supervivencia, mientras sucede lo contrario a la menor temperatura, donde





luego de un breve pico reproductivo le sigue una meseta y una mayor tasa de supervivencia, sugiriendo que las hembras a 15°C luego de los primeros días intentan mantener la población más que dejar descendencia, hasta que alcanzan la edad máxima donde repiten el pico reproductivo antes mencionado.

Según Miracle & Serra (1989) tanto el crecimiento somático de los juveniles, como el desarrollo postembrionario es altamente dependiente de la temperatura y sostienen que en condiciones favorables materia y energía son invertidas en la reproducción una vez que alcanzan esta etapa. En este experimento, la mayor biomasa se observó en las hembras a los 15 °C, lo que podría estar confirmando que éstas se encontraban invirtiendo su energía en crecer y sostenerse en el tiempo alcanzando mayores tallas que las hembras a 25 °C, quienes a menor edad y talla ya estaban entrando en la etapa reproductiva.

En contraposición a lo observado por Pascual y Yúfera (1983) cuya población a los 15°C no prosperó en absoluto, en este trabajo la población sometida a esta temperatura se mantuvo viva con densidades mínimas pero constantes hacia el final del experimento por lo cual no se puede aseverar que sea ésta la temperatura límite inferior para esta cepa. Lo cual coincide también con los rangos ya mencionados por Claps et al. (2009) y lo registrado por Gabellone et al. (2014) en el río Salado en diferentes ocasiones de muestreo, cuyos picos de *B. plicatilis* mencionados a temperaturas inferiores podrían estar siendo producidos por una condición favorable de salinidad registrada en ese momento que supera el aspecto negativo de la temperatura desfavorable.





### C. Pastoreo

Históricamente los cladóceros han tenido más atención en las investigaciones que respectan al pastoreo, por un lado porque son los organismos dentro de los grupos dominantes que representan la mayor biomasa de los cuerpos dulceacuícolas y por otra parte porque son de manipulación más sencilla en laboratorio (Wallace & Snell, 2001). Sin embargo, la alta tasa de crecimiento que presentan los rotíferos en los ambientes pampeanos, sumado a las elevadas densidades que alcanzan en estos ambientes los hace muy importantes en la dinámica trófica de los mismos.

La competencia por los recursos es uno de los factores más influyentes sobre la dinámica del zooplancton. Para que exista la competencia, estos recursos deben ser limitantes, de modo que es importante determinar qué componentes del zooplancton se encuentran limitados por esta disponibilidad de alimento y a partir de la intensidad de esta limitación se puede analizar sus patrones temporales y cómo difiere entre especies y entre ambientes acuáticos. Por lo tanto, las variaciones temporales en la cantidad y calidad del fitoplancton tienen importancia en la estructura de la comunidad y las interacciones entre especies. En algunos casos puede ocurrir una coexistencia de zooplanctones, e incluso un aumento en la diversidad ya que las fluctuaciones ambientales pueden permitir que numerosas especies puedan coexistir cuando el disturbio tiene una frecuencia intermedia (Kirk, 2002).

**Hipótesis: El alimento (tamaño, forma, calidad nutricional y abundancia de las algas fitoplanctónicas) es un factor limitante que puede provocar una condición de hambre en los pastoreadores y puede conllevar a una fuerte reducción en sus poblaciones. La ventaja en la competencia interespecífica del zooplancton herbívoro está ligada al grado de eficiencia en la captura y manipuleo del alimento que poseen las especies.**

Objetivos:

Evaluar el consumo de un representante de los rotíferos: *Brachionus plicatilis* a fin de observar su efecto como organismo pastoreador y evaluar el punto al cual el recurso se convierte en limitante (experimento 4).





Evaluar la respuesta de ejemplares adultos de *Notodiaptomus incompositus*, a dos densidades algales contrastantes (experimento 5).

Evaluar las posibles relaciones de competencia por alimento entre algunos cladóceros integrantes del zooplancton de las lagunas pampeanas y el río Salado (*Moina micrura*, *Simocephalus vetulus* y *Diaphanosma birgei*) (experimento 6).

**EXPERIMENTO 4: EFECTO DE PASTOREO DEL ROTIFERO BRACHIONUS PLICATILIS SOBRE EL ALGA UNICELULAR CHLORELLA VULGARIS.**

Los estudios de pastoreo se han ocupado históricamente de los cladóceros, principalmente especies de *Daphnia*, por ser pastoreadores efectivos capaces de ralea las poblaciones algales con la consiguiente disminución de la turbidez del agua (Sommer et al., 1986). En este sentido los rotíferos, reconocidos como pastoreadores menos eficientes, no han sido analizados con la misma intensidad. Tomando en consideración que en la cuenca del río Salado se han registrado picos de densidad muy elevados de *B. plicatilis* en condiciones favorables (Neschuk et al., 2002; Claps et al., 2009) se intentará dilucidar su capacidad de clareo y si a elevadas densidades del rotífero es comparable a la que ejercen los cladóceros.

Para este estudio se eligió al alga unicelular *Chlorella vulgaris* por ser un alga palatable (Martínez, 1999; Shertzer et al., 2002; Xuwang et al., 2011), por estar presente en los cuerpos de agua de la región (Ruiz et al., 2014; Solari & Mac Donagh, 2014), por ser muy utilizada en ensayos de laboratorio (Navarro & Yúfera, 1998; Flores Burgos et al., 2003) y por ser tolerante a un amplio rango de salinidad (Vallejo et al., 1993) en el cual esta especie de braquiónimo predomina.

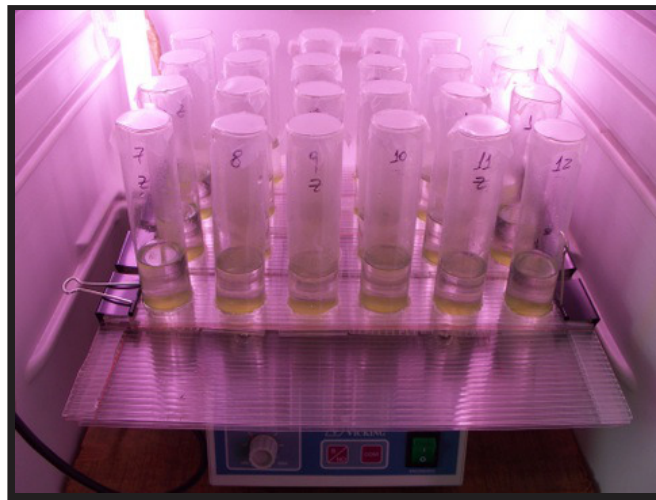
Los objetivos de este experimento fueron observar la evolución de la densidad del alga unicelular *C. vulgaris* en presencia y ausencia de un rotífero pastoreador así como también la evolución de la población del rotífero *B. plicatilis* a lo largo del tiempo del experimento y en función de lo anterior inferir el efecto del pastoreo del rotífero sobre el alga.





#### 4.1 Materiales y métodos.

Todos los organismos utilizados en este ensayo fueron cultivados en laboratorio, y aclimatados durante los 15 días previos al inicio de la experiencia. Las algas se controlaron a diario midiendo la turbidez, permitiendo por este medio inferir su densidad. Los rotíferos también se controlaron diariamente por observación con microscopio estereoscópico y se determinó la densidad de hembras no grávidas para ser utilizadas en el experimento. El experimento se llevo a cabo en una cámara de incubación donde se dispusieron un total de 30 unidades experimentales sobre un agitador orbital. Las condiciones definidas para este experimento fueron de 23 °C ( $\pm 1^\circ\text{C}$ ) y un fotoperíodo de 14 horas luz; que se mantuvieron constantes durante los 5 días que duró la experiencia (Fig. 77).



**Figura 77: Cámara de incubación con dispositivo de ensayo armado y unidades experimentales ya inoculadas con el alga y los rotíferos en el caso de los tratamientos.**

El ensayo consistió en un tratamiento de pastoreo (algas + rotíferos) y un control (sólo con algas). Ambos se realizaron por triplicado y se dispusieron espacialmente en forma alternada, sumando un total de cinco series. En primer lugar se preparó el medio para todas las unidades experimentales por igual, con una densidad inicial de *C. vulgaris* de 2 millones de individuos/ml ( $2 \times 10^6$  individuos/ml) y a los tratamientos se le agregaron 2 hembras no grávidas/ml de *B. plicatilis*; completando el volumen de cada unidad experimental de 30 ml (60 rotíferos por unidad experimental x 15 tratamientos representan un total de 900

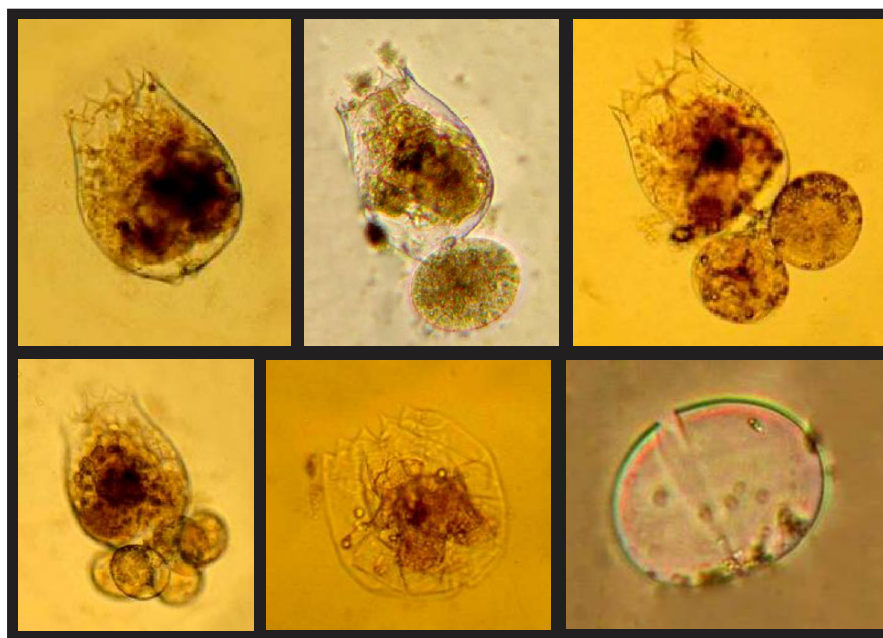




individuos iniciales). En los cinco días sucesivos se realizaron extracciones diarias de los triplicados para los recuentos tanto de algas como de rotíferos.

Diariamente se fijaron alícuotas duplicadas de cada tratamiento con lugol 1% para el posterior recuento de las mismas (12 alícuotas diarias x 5 días = 60 alícuotas en total). El recuento se realizó de forma digitalizada con microscopio invertido y por procesamiento de imágenes (Image J), permitiéndonos ser más precisos a la hora de calcular la densidad algal de cada unidad del experimento (ver capítulo I).

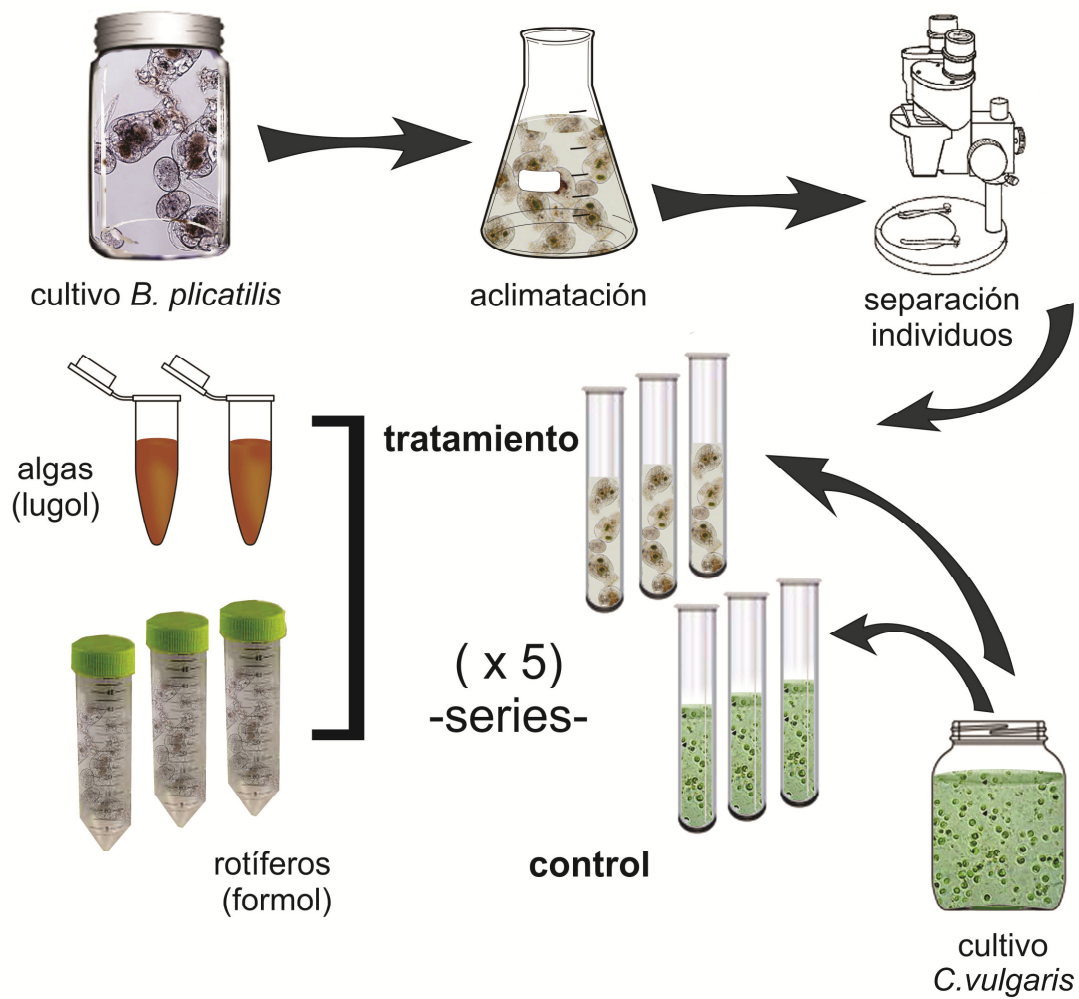
Los rotíferos se fijaron con formol 4% y fueron contabilizados a partir de toda la muestra, con microscopio óptico y se discriminaron los distintos componentes de la estructura poblacional; incluyendo huevos, huevos eclosionados, juveniles (discriminados por tamaño) y hembras adultas no grávidas y grávidas y diferenciando para estas últimas la cantidad de huevos que portaban (Fig. 78).



**Figura 78: Fotos del recuento de *Brachionus plicatilis*. Algunos ejemplares representando distintas estructuras de la población (hembras adultas no grávidas, grávidas muertas y huevo eclosionado).**

El resultado de los conteos se sometió a análisis estadístico, incluyendo Análisis de varianza (ANOVA) factorial y de una vía que se especificarán en cada caso. Para ambos se contempló el cumplimiento de la homogeneidad de varianzas por el test de Levene.



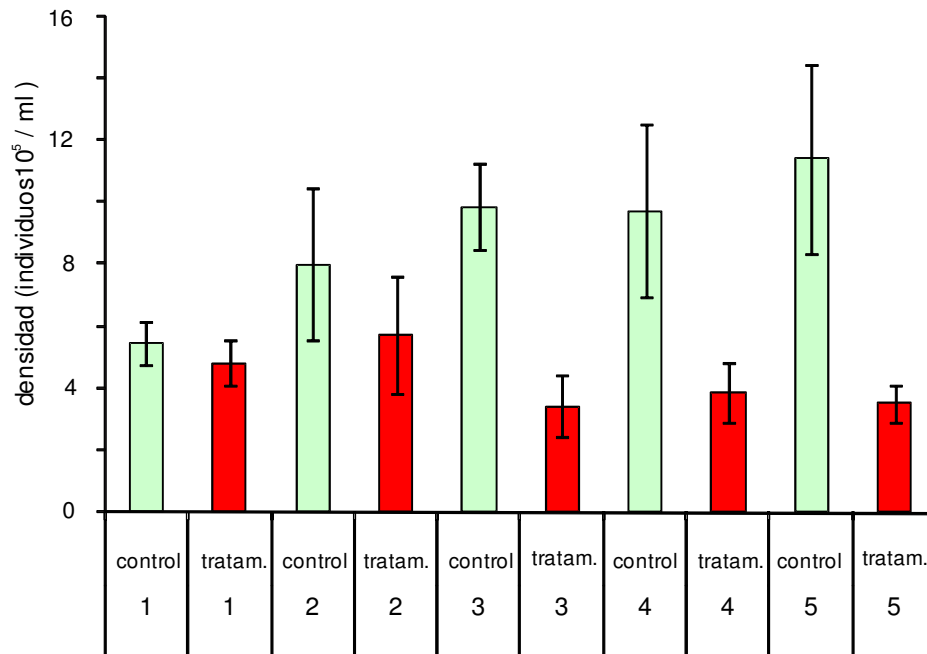


**Figura 79: Esquema de diseño experimental y desarrollo del experimento de pastoreo de *Brachionus plicatilis* sobre *Chlorella vulgaris*.**

#### 4.2 Resultados.

La densidad del alga *Chlorella vulgaris* a lo largo del tiempo en el que se prolongó el experimento diferenció notablemente los controles de los tratamientos ya a partir del día 2 y aumentando hacia el final, alcanzando así en este día una densidad máxima de  $14 \times 10^5$  individuos/ml para el control, mientras que para los tratamientos la densidad máxima alcanzada ese día fue de un 30% ( $4,22 \times 10^5$  individuos/ml) (Fig. 80).

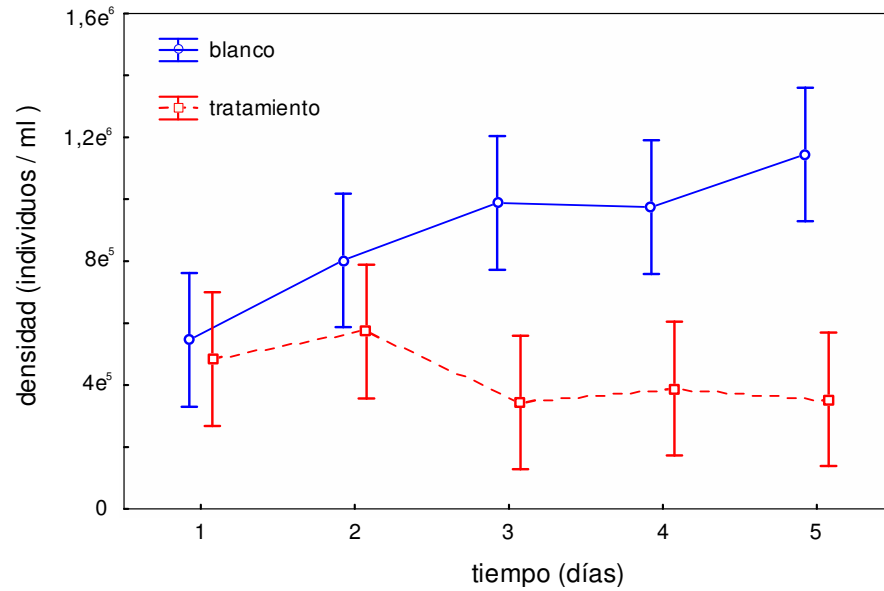




**Figura 80: Densidad de *Chlorella vulgaris* en los recuentos diarios de controles y tratamientos.**

La mayor diferencia entre los tratamientos y los controles ocurrió a partir del tercer día, y para testear este efecto se evaluó estadísticamente el EFECTO DE PASTOREO por medio de un ANOVA factorial. Así, se observaron diferencias significativas tanto para la interacción ( $F_{4,20} = 4,32$ ;  $p = 0,011$ ) como para el TRATAMIENTO a lo largo del tiempo ( $F_{1,20} = 49,94$ ;  $p < 0,000$ ) (Fig. 81). Pudieron determinarse entonces tres grupos homogéneos (tabla 18). El primero reúne los dos primeros días tanto para el control como para el tratamiento donde pareciera no haber efecto por parte del pastoreador. A partir del tercer día se verificó una clara separación entre ambos, el grupo CONTROL se alejó de los TRATAMIENTOS debido al aumento en la densidad algal a través del tiempo en los controles, mientras que en los tratamientos con el rotífero pastoreador se observó una clara disminución en dicha densidad (Fig. 81).





**Figura 81: Gráfico de ANOVA para la densidad de *Chlorella vulgaris* por día de experimento evidenciando el efecto de pastoreo del rotífero.**

**Tabla 18. Test a posteriori (Tukey) para la interacción entre TIEMPO y FACTOR, mostrando los grupos homogéneos (Gr. H.) para la densidad promedio de algas.**

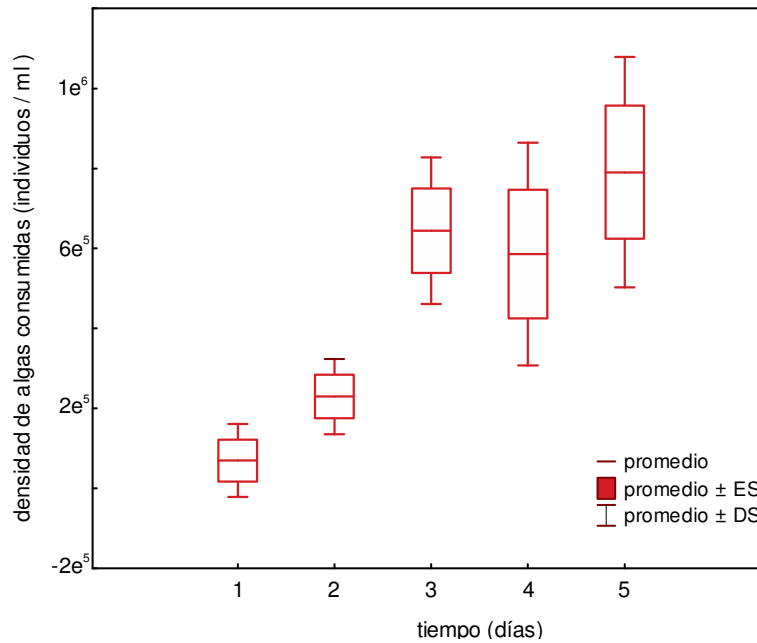
Tiempo (días)	Factor	Densidad (ind/ml)	Gr.H.		
3	tratamiento	344.073	a		
5	tratamiento	354.240	a		
4	tratamiento	389.187	a		
1	tratamiento	484.181	a	b	
1	control	546.133	a	b	
2	tratamiento	573.138	a	b	
2	control	802.838	a	b	c
4	control	975.033	b	c	
3	control	988.377	b	c	
5	control	1.144.687		c	

En cuanto a la proporción de algas consumidas por día se pudo observar que entre el día 1 y 2 no superan el 30% del consumo (11% y 28% respectivamente, mientras que al día 3 alcanzaron un consumo promedio del 65%, y si bien el último día alcanzaron el consumo máximo promedio del 69% no fue una diferencia notoria respecto al anterior (Fig. 82). Para ello se efectuó otro análisis estadístico (ANOVA de una vía) que verificó estas diferencias ( $F_{4,10} = 6,47$ ;  $p < 0,007$ ) en 2 grupos homogéneos siendo el día 4 un punto de transición entre





grupos ya que en este día se produjo una pequeña disminución del consumo pero con mayores desvíos que lo unieron así a ambos grupos (tabla 19). El grupo de menor consumo agrupó entonces a los días 1, 2 y 4, mientras que el mayor consumo lo obtuvieron los días 4, 3 y 5 en este orden, confirmando así que a partir del día 3 no hay diferencias significativas respecto al consumo e los días posteriores.



**Figura 82: Box-plot para la densidad de algas consumidas por día.**

**Tabla 19. Test a posteriori (Tukey) para el TIEMPO, mostrando los grupos homogéneos (Gr. H.) para la densidad promedio de algas consumidas.**

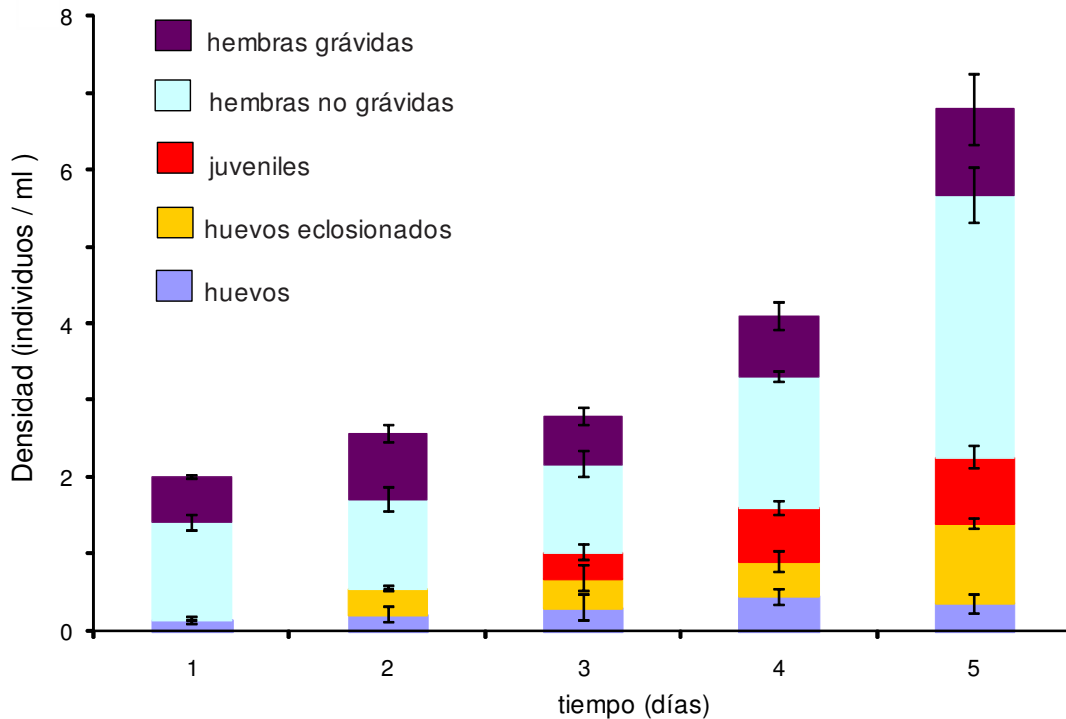
Tiempo (días)	Densidad (ind/ml)	Gr. H.	
1	69577,2	a	
2	229699,9	a	
<b>4</b>	<b>585846,0</b>	<b>a</b>	<b>b</b>
3	644303,5		b
5	790447,3		b

La evolución de la población del rotífero a través del tiempo mostró un incremento de hembras adultas que se acentuó hacia el final de experimento alcanzando una densidad máxima de poco más de 5 individuos/ml casi triplicando su densidad inicial. Las hembras grávidas alcanzaron su máxima





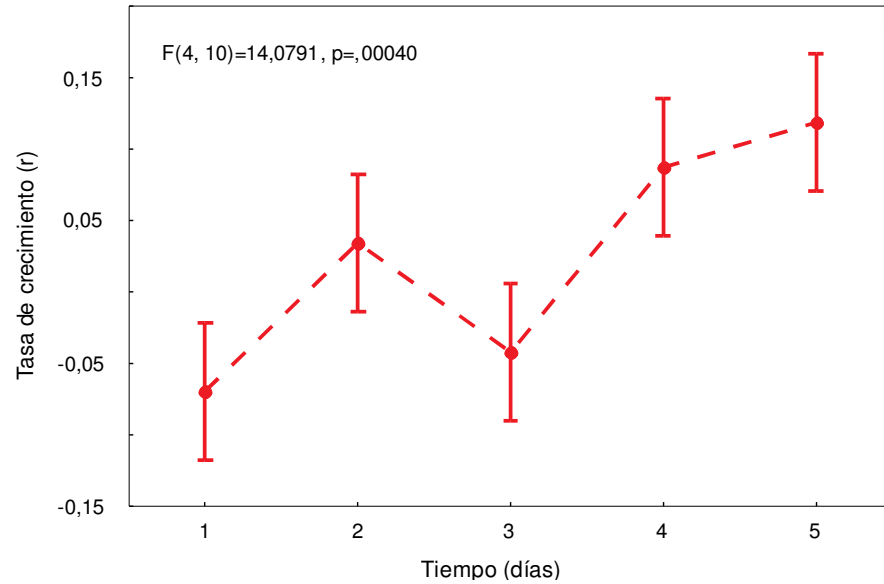
densidad en el día 2 con un 75% respecto a la densidad total y a partir de allí disminuyeron su proporción hasta el 33% en el día 5 con valores netos entre los 0,6 y 1,12 individuos/ml. La incorporación e incremento de juveniles fue a partir del tercer día llegando el último día a densidades promedio de 0,86 individuos/ml. (Fig. 83).



**Figura 83: Representación a través de la densidad de los distintos componentes de la estructura poblacional de *Brachionus plicatilis* a lo largo del experimento.**

Posteriormente se calculó la tasa de crecimiento poblacional ( $r$ ), la cual fue sometida a un ANOVA de una vía que mostró diferencias significativas respecto al tiempo ( $F_{4,10} = 14,07$ ;  $p < 0,0004$ ) y un llamativo cambio en la tendencia en el día 3, donde se notó una fuerte caída para luego volver a incrementarse en los días posteriores (Fig.84).



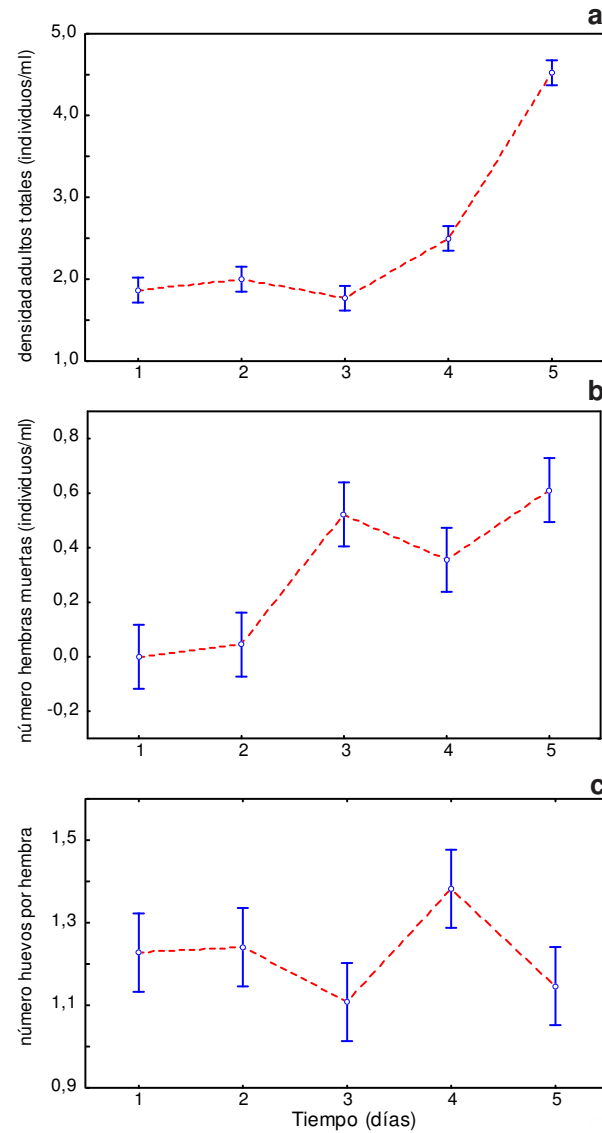


**Figura 84: Gráfico de ANOVA para la tasa de crecimiento por día de *Brachionus plicatilis*.**

Lo mismo sucedió en los respectivos ANOVA de una vía realizados para la densidad de hembras adultas, la densidad de hembras muertas y la relación huevo por hembra grávida ya que en todos los casos resultaron significativas las diferencias respecto al factor TIEMPO (Fig 85). En la tabla 20 se exponen los grupos homogéneos conformados para estos tres parámetros testados respecto al tiempo y los valores del coeficiente de Fisher para cada uno de ellos.

Si se vuelve a observar el **día 3** tomando en consideración la población de hembras adultas, también se notó una disminución en la densidad (Fig. 85a), mientras que sucedió lo contrario al evaluar los individuos muertos donde se observó un pico de incremento (Fig. 85b). Al mismo tiempo en este día también se notó una baja en la relación de huevos por hembra grávida (Fig. 85c). Considerándose este día entonces como un punto de inflexión en el desarrollo poblacional.





**Figura 85: Gráficos resultantes del ANOVA de una vía para la densidad de hembras adultas (a); adultas muertas (b) y relación huevos por hembra grávida (c).**

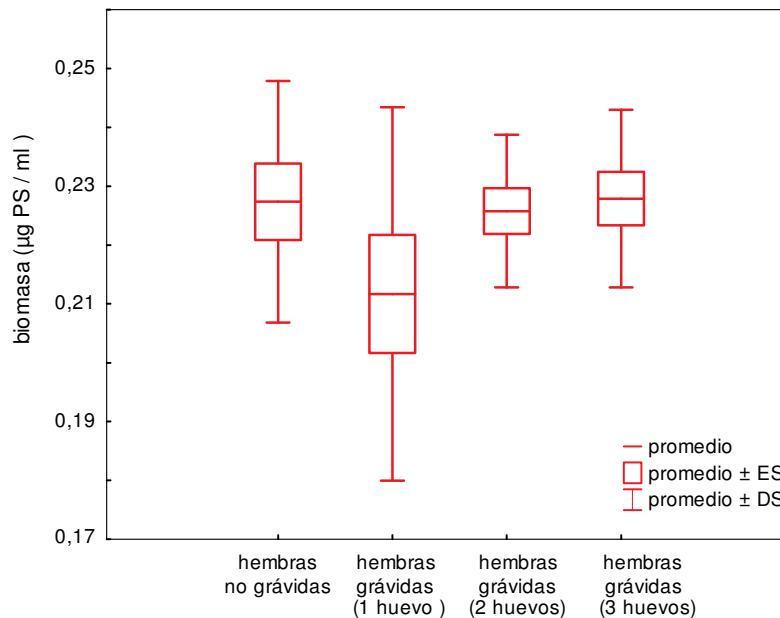
**Tabla 20. Test a posteriori (Tukey) para el factor TIEMPO, mostrando los grupos homogéneos (Gr. H.) para la densidad total de *Brachionus plicatilis*, la densidad de hembras muertas y la relación huevos por hembra grávida; y los coeficientes de Fisher y valor de probabilidad para cada uno de ellos.**

Día	Densidad total	Gr. H.	Día	Densidad ♀ Muertas	Gr. H.	Día	Huevos/hembra	Gr. H.
3	1,767	a	1	0,000	a	3	1,1079	a
1	1,867	a	2	0,044	a	5	1,1468	a
2	2,00	a	4	0,355	b	1	1,2276	a b
4	2,50	b	3	0,522	b c	2	1,2409	a b
5	4,522	c	5	0,611	c	4	1,3821	b
<b>F<sub>4,10</sub> = 285,56; p&lt;0,000</b>			<b>F<sub>4,10</sub> = 27,51; p&lt;0,000</b>			<b>F<sub>4,10</sub> = 6,19; p&lt;0,009</b>		





En cuanto a la biomasa se discriminaron las hembras no grávidas de las grávidas y para éstas últimas también en cuanto a la cantidad de huevos que portaban. Los valores de biomasa oscilaron entre los 0,21 y 0,23  $\mu\text{g}$ , con valores máximos de 0,25  $\mu\text{g}$  en todos los casos. El análisis estadístico de todos los valores de biomasa obtenidos no arrojó diferencias significativas ( $F_{3,38}=1,37$ ;  $p=0,26$ ) (Fig. 86).



**Figura 86: Box-plot para la biomasa de hembras no grávidas, y grávidas discriminadas según la cantidad de huevos.**

### 4.3 Discusión

Al analizar la evolución temporal de la población de *B. plicatilis* se observa que si bien la población total, incluyendo juveniles, puestas y huevos eclosionados se han incrementado hacia el final de la experiencia, el tercer día parece ser un día clave en el recambio poblacional cuando las hembras de la generación anterior comienzan a morir, y las hembras grávidas más viejas podrían tener menos energía para producir más de un huevo por puesta, revelando un claro descenso en la tasa de crecimiento. En el género *Brachionus* es común que se registre una elevada supervivencia inicial y luego una mortalidad relativamente rápida sin importar que los individuos sean o no manipulados en forma diaria (Serra et al, 1994).





El valor de “r” obtenido no se corresponde con lo citado en la bibliografía para la especie y lo registrado en las propias experiencias de crecimiento realizadas en el capítulo II, siendo considerablemente menor. Debe destacarse, sin embargo, que se ha señalado que este valor depende de la concentración del alimento y podría verse afectado por las condiciones de cultivo (Özdemir & Çiltaş, 2010).

La disminución del alimento registrada por efecto del pastoreo no parece haber sido lo suficientemente negativa como para generar la inanición de los individuos ya que la concentración de algas excede en dos órdenes de magnitud los valores considerados umbrales para la especie (Snell & Boyer, 1988) y la población al final del experimento quintuplicó el número de individuos (Hansen et al., 1997).

Al mismo tiempo, la biomasa de las hembras amícticas no difiere significativamente entre aquellas grávidas y no grávidas, lo que estaría indicando que se ha acortado su etapa prereproductiva comenzando a reproducirse más jóvenes, lo que vuelve a señalar que las condiciones del medio no fueron adversas como también lo sugiere Miracle & Serra (1989) en un ensayo con la misma especie.

Este fenómeno que se produce en las hembras jóvenes se denomina “efecto Lansing” que significa que las hembras que derivan de hembras más viejas se reproducen antes y con tasas más altas en las siguientes generaciones. Esto tiene como consecuencia que si los cultivos continuamente derivan de hembras de mayor edad colapsan después de varias generaciones mientras que los otros pueden mantenerse en forma indefinida (Gribble et al., 2014).

Puede considerarse que la cepa pampeana de *B. plicatilis* tiene una destacada capacidad de pastoreo y de crecimiento que con posterioridad deberían ser analizados en simultáneo con otras especies conspicuas que integran al microzooplancton en ambientes pampeanos y así determinar su papel en el control de las poblaciones algales autóctonas.





### **EXPERIMENTO 5: EFECTO DE PASTOREO DEL COPÉPODO CALANOIDEO NOTODIAPTOMUS INCOMPOSITUS SOBRE EL ALGA UNICELULAR CHLORELLA VULGARIS.**

*Notodiaptomus incompositus* (Brian, 1926) es considerada una especie oportunista que habita ambientes lénticos y lóticos (Previattelli et al., 2013). Es una de las especies más abundantes (larvas nauplii) y con mayor biomasa (adultos) en el zooplancton de ambientes lóticos y lénticos de la cuenca del río Salado (Ardohain, 2008; Benítez, 2008; Claps et al., 2004; entre otros).

Las clorofitas y criptomonadales constituyen su alimento preferido aunque ha podido desarrollarse con una dieta exclusiva de cianobacterias (Weigand, 2011).

Los copépodos, en especial los calanoideos, han sido objeto de escaso número de estudios experimentales acerca de competencia o limitación por alimento (DeMott, 1989). Esto está vinculado a su ciclo de vida complejo y a que el desarrollo completo requiere que los experimentos se prolonguen en el tiempo (Hart, 1996), sumado a una más complicada manipulación de los organismos en el laboratorio en comparación a otras especies.

Con el desarrollo de este experimento se pretende analizar la evolución de la densidad del alga unicelular *C. vulgaris* en presencia y ausencia de un copépodo pastoreador así como también la evolución de la población del copépodo *N. incompositus* a lo largo del tiempo y en función de lo anterior inferir el efecto del pastoreo del copépodo sobre el alga.

En un primer momento se planteó esta experiencia de pastoreo con **exceso** de alimento (*C. vulgaris*) utilizando el mismo número de algas ( $2 \times 10^6$  individuos/ml) que en el experimento de pastoreo de *B. plicatilis* con el objetivo de poder comparar posteriormente los resultados de ambos.

La metodología fue la misma que se describirá más adelante (ver materiales y métodos siguientes). Durante el primer conteo (día 2) se observó una mortalidad del 50% en los tubos de mayor densidad poblacional (8 individuos/ml) y un notable aumento de la turbidez del medio en todas las unidades experimentales. Se prosiguió hasta el día 4 (segunda extracción) donde al observar la mortalidad en casi la totalidad de las réplicas de cada tratamiento el experimento no pudo continuarse.

Así se rescataron los individuos que quedaron vivos y se sumaron a los cultivos. Una vez alcanzado el número necesario de individuos para repetir el





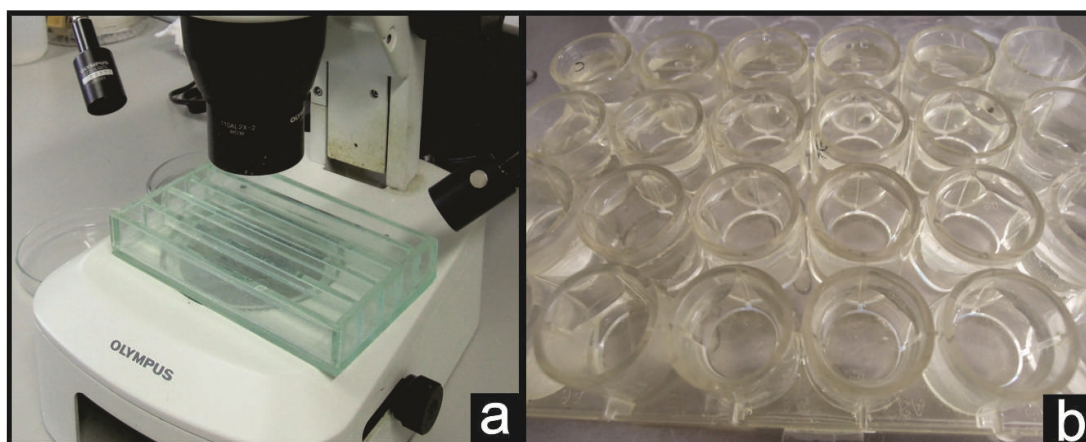
experimento, se decidió realizarlo utilizando los valores equivalentes a lo registrado en campo y así poder evaluar la capacidad de pastoreo de *N. incompositus* con dicha densidad algal.

### 5.1 Materiales y métodos.

Los organismos utilizados en este experimento fueron obtenidos a partir de los cultivos realizados en el laboratorio ya previamente descritos.

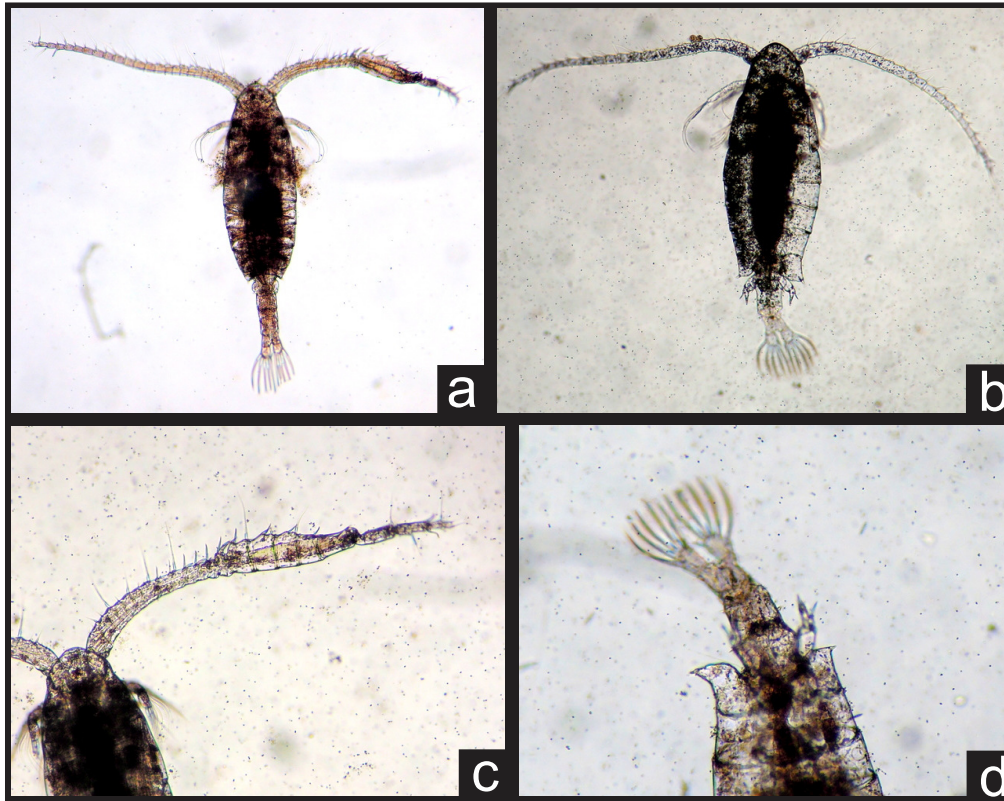
El proceso de cultivo, monitoreo y obtención del alga *C. vulgaris* fue el mismo que se utilizó en la experiencia de pastoreo con *B. plicatilis*.

Los copépodos se controlaron diariamente por observación directa con microscopio estereoscópico. Previo al inicio del experimento los organismos se individualizaron utilizando una cámara Bogorov modificada (Fig. 87 a) y se separaron por sexo (Paggi, 1995) colocándolos en placas de cultivo multicelda (Fig. 87 b) de manera de contabilizar fácilmente la densidad de los adultos representantes de cada sexo (Fig. 88). Posteriormente se destinaron al azar (por numeración de celdas y sorteo) los individuos a cada tratamiento.



**Figura 87: a) Microscopio estereoscópico con cámara Bogorov modificada y b) cámara multicelda con individuos machos y hembras.**

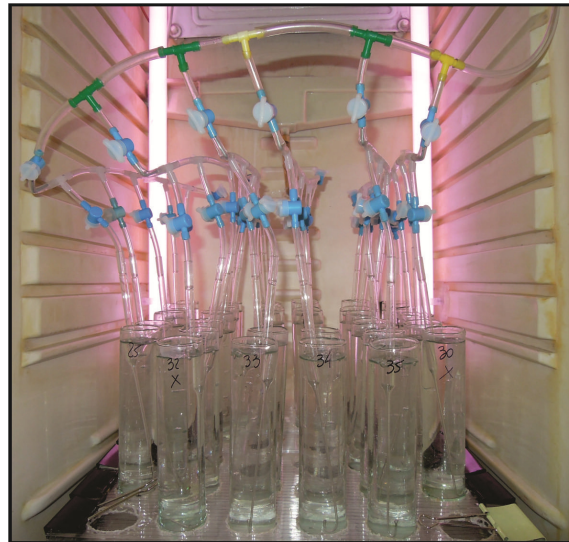




**Figura 88: macho (a) y hembra (b) de *Notodiaptomus incompositus*; c) detalle de la antena geniculada del macho y d) detalle del extremo posterior de la hembra con el quinto segmento del prosoma expandido.**

El experimento constó de un control (tubos de Nessler sólo con algas) y 5 tratamientos con distinta densidad de copépodos adultos según sexo y emparejamiento (T1: 4 machos; T2: 4 hembras; T3: 8 hembras; T4: 2 parejas y T5: 4 parejas), todos por triplicado. Cabe destacar que no se pudo llevar a cabo el T6 programado de “8 machos” por falta de densidad de los mismos. Se conformaron así, un total de 18 unidades experimentales que se dispusieron al azar en el espacio muestral y se colocaron en una cámara de incubación donde la temperatura ( $23\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ) y el fotoperíodo (14:10) se mantuvieron constantes durante los 14 días que duró el experimento. A cada unidad experimental se le proporcionó aireación continua por medio de un sistema de tubos y pipetas Pasteur que alimentaron cada una por separado (Fig. 89).





**Figura 89: Incubadora armada con el dispositivo de experimentación y sistema de aireación individual.**

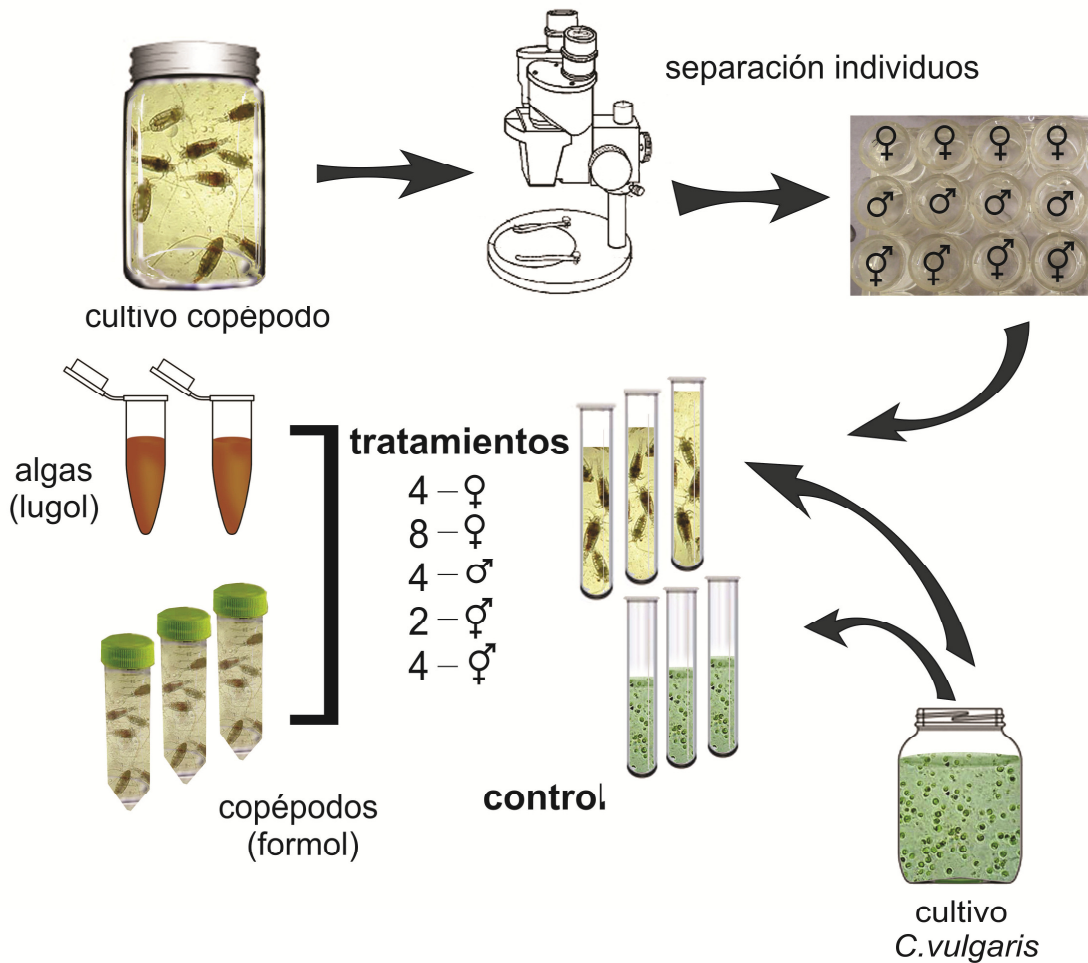
El volumen final de cada unidad experimental fue de 120 ml. La densidad inicial de *C. vulgaris* para el control y los tratamientos fue de 360.000 individuos (3.000 individuos/ml) y a los tratamientos se le agregó la densidad de copépodos seleccionada para cada uno de ellos. En las dos semanas sucesivas día por medio se realizaron las extracciones de alícuotas de 1,5 ml (por duplicado) que fueron fijadas con lugol acético 1% para el recuento de la densidad algal (36 alícuotas por extracción x 7 extracciones = 252 alícuotas en total). El recuento se realizó de forma digitalizada con microscopio invertido y por procesamiento de imágenes (Image J), con el mismo procedimiento que se mencionó en el experimento de pastoreo de *B. plicatilis* y que como ya se mencionó en el capítulo I permite agilizar el recuento celular de un número tan grande de muestras. Los copépodos se fijaron con formol 4% al finalizar el experimento (Fig. 90) y fueron contabilizados a partir de toda la muestra, con microscopio óptico diferenciando individuos vivos y muertos por sexo, y la presencia de sacos ovígeros y/o espermatóforos en los tratamientos con parejas. Se midió el largo total de cada individuo para el posterior cálculo de la biomasa mediante la fórmula de Dumont et al (1975).

El resultado de los conteos se sometió a los análisis estadísticos correspondientes, incluyendo Test de t y Análisis de la Varianza (ANOVA) de medidas repetidas para la densidad total de las algas y para observar el efecto de





pastoreo en el cual se tuvo en cuenta el cumplimiento del supuesto de esfericidad de Mauchley y la homogeneidad de varianzas para cada factor.



**Figura 90: Esquema de diseño experimental y desarrollo del experimento de pastoreo de *Notodiaptomus incompositus* sobre *Chlorella vulgaris*.**

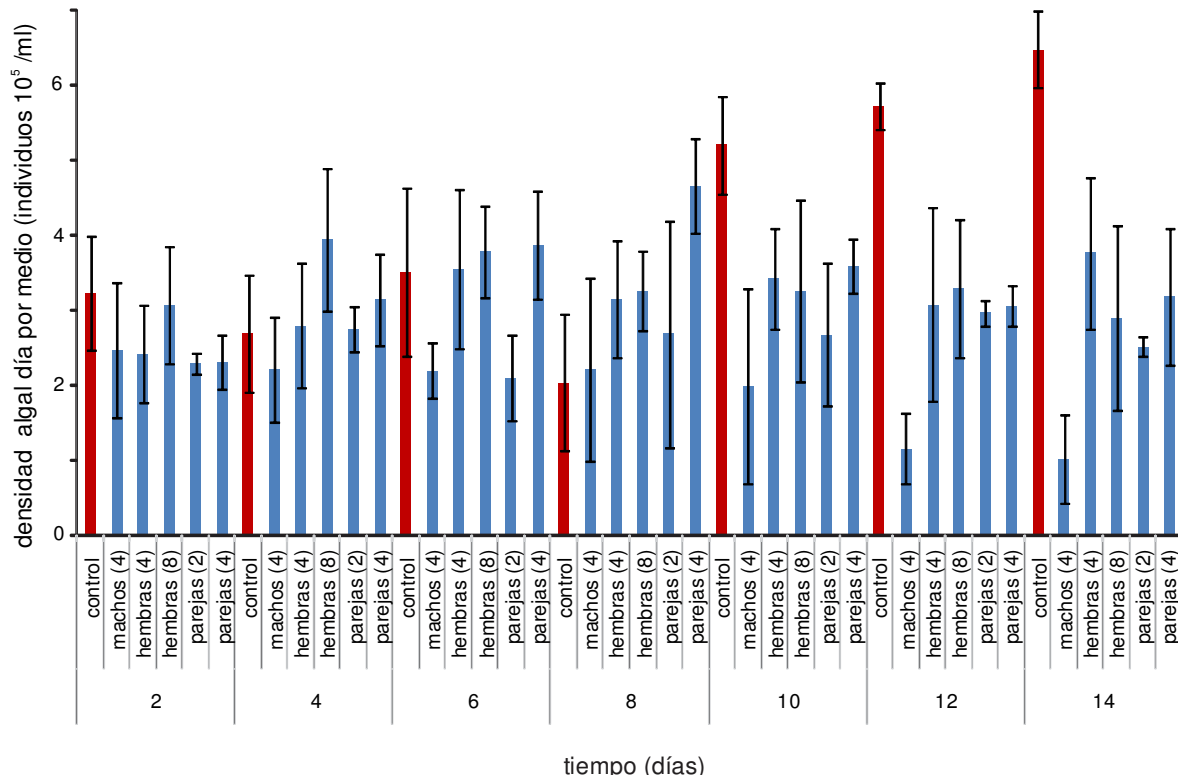
## 5.2 Resultados.

La densidad del alga *C. vulgaris* en función del tiempo en el que se prolongó el experimento (Fig.91) diferenció claramente 2 etapas; la primera abarcó los primeros 8 días del experimento donde no se observó una notoria diferencia entre la densidad registrada en el control y en los tratamientos. En la segunda semana, la densidad del CONTROL se incrementó notoriamente, alejándose de los distintos tratamientos mostrando una clara tendencia al





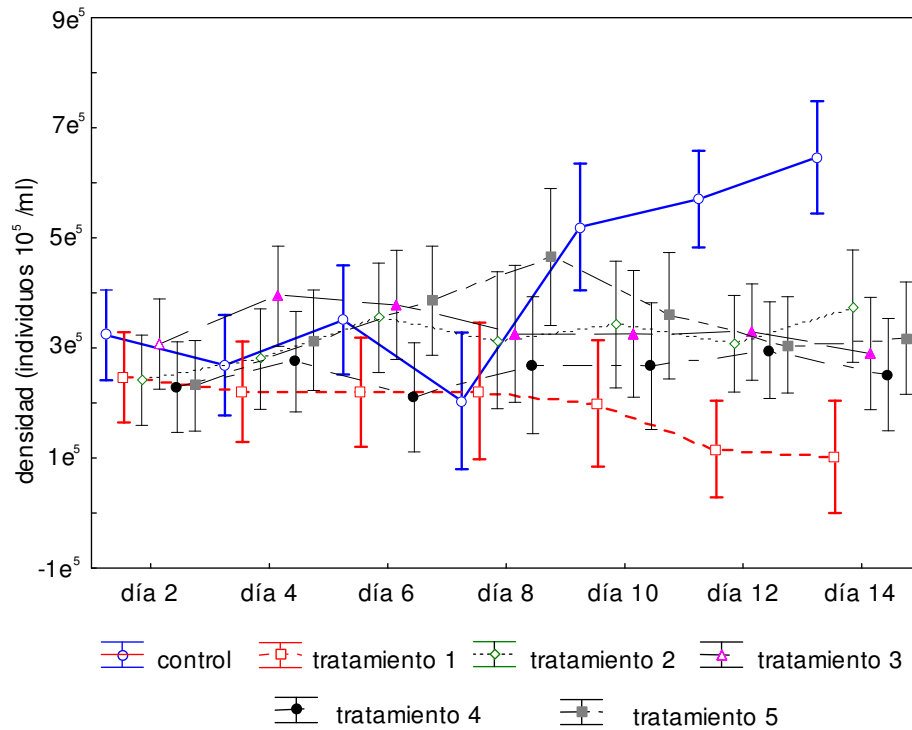
crecimiento poblacional de las algas en el CONTROL y una leve disminución en los tratamientos, un poco más acentuada en el TRATAMIENTO 1 (4 machos).



**Figura 91: Densidad de *Chlorella vulgaris* por día en cada tratamiento (en rojo el control y en azul los distintos tratamientos).**

Estas diferencias en la densidad de las algas a lo largo del tiempo experimental fueron sometidas al análisis estadístico (ANOVA de medidas repetidas) que reveló diferencias significativas tanto para la interacción entre los factores TIEMPO y TRATAMIENTO ( $F_{30,72} = 5,09$ ;  $p < 0,0000$ ) como para ambos factores por separado ( $F_{6,72} = 2,64$ ;  $p < 0,02$ ;  $F_{5,12} = 6,41$ ;  $p < 0,0000$ ) pudiendo observar un claro solapamiento de los tratamientos a lo largo del experimento, diferenciándose hacia el final el TRATAMIENTO 1 (4 machos) del resto disminuyendo su densidad, al mismo tiempo que el CONTROL se apartó pero en dirección opuesta aumentando su densidad (Fig. 92 Tabla 21).





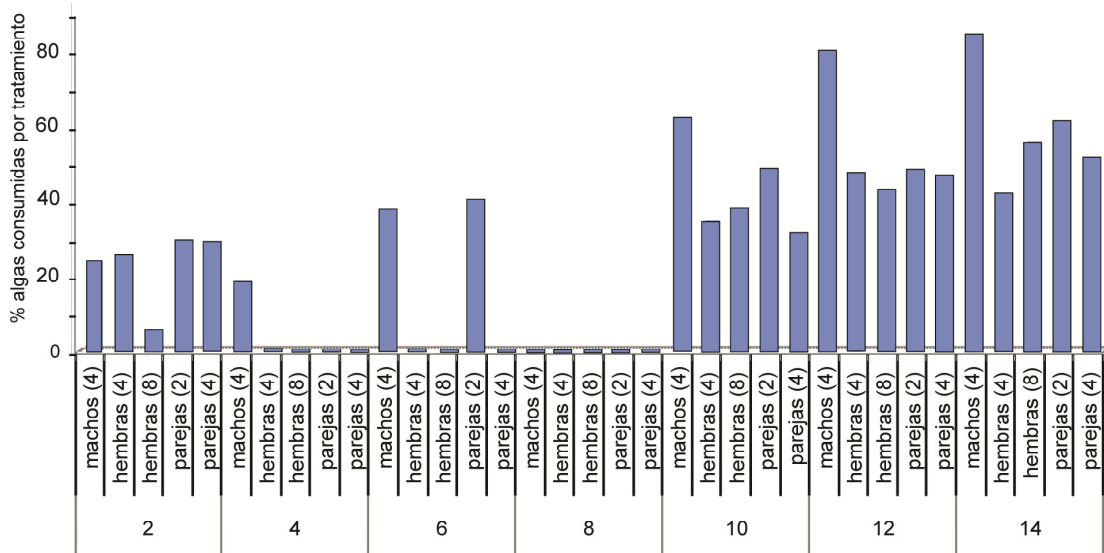
**Figura 92. Gráfico del RM ANOVA para los factores tiempo y tratamiento (T1: 4 machos; T2: 4 hembras; T3: 8 hembras; T4: 2 parejas y T5: 4 parejas).**

**Tabla 21. Test a posteriori (Tukey) para el factor TRATAMIENTO, mostrando los grupos homogéneos (Gr. H.) para la densidad promedio del alga *Chlorella vulgaris*.**

Tratamiento	Densidad (ind/ml)	Gr.H.		
<b>4 machos</b>	<b>189663,3</b>			<b>c</b>
4 hembras	257017,3	a		c
8 hembras	316775,7	a	b	c
2 parejas	335876,1	a	b	
4 parejas	340008,9	a	b	
<b>control</b>	<b>412165,9</b>			<b>b</b>

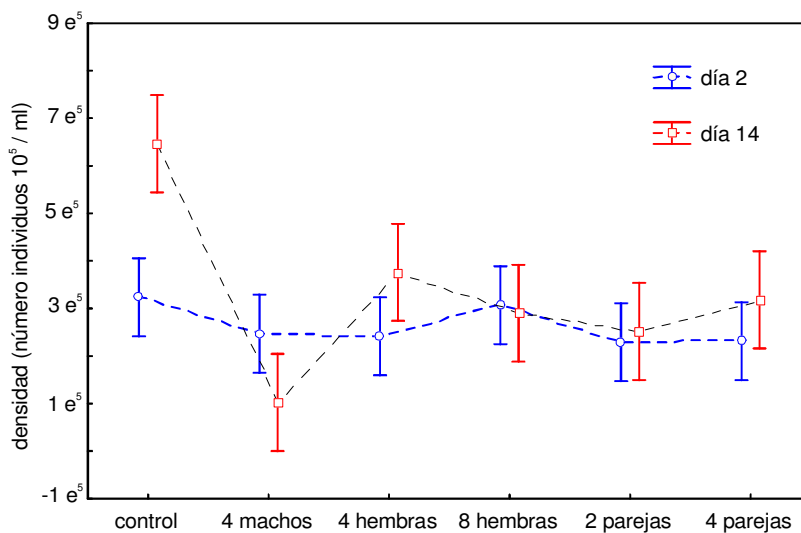
La observación de las algas consumidas (diferencia entre el número algas del control y número algas de cada tratamiento) durante los 14 días consecutivos mostró un resultado que concuerda con lo observado para la densidad total, evidenciando un bajo a nulo consumo durante la primera semana mientras que, en la segunda semana, se incrementó dicho consumo con valores porcentuales promedio que oscilaron entre 30 y 80% dependiendo del tratamiento, siempre siendo mayor el valor para el TRATAMIENTO 1 (Fig. 93).





**Figura 93. Cantidad de algas consumidas por día en cada tratamiento expresado en porcentaje.**

Considerando sólo la densidad de algas al comienzo y final del experimento, se pudo observar que el CONTROL prácticamente duplicó su densidad inicial (3.000 individuos/ml) alcanzando un promedio total de 650.000 individuos (5.500 individuos/ml) (Fig. 94). Entre los tratamientos no hubo una misma tendencia pudiendose observar para el TRATAMIENTO 1 un descenso de la densidad final respecto de la inicial, mientras que los TRATAMIENTOS 2 y 5 se comportaron de manera opuesta y los restantes no tuvieron un cambio notorio entre ambas fechas.

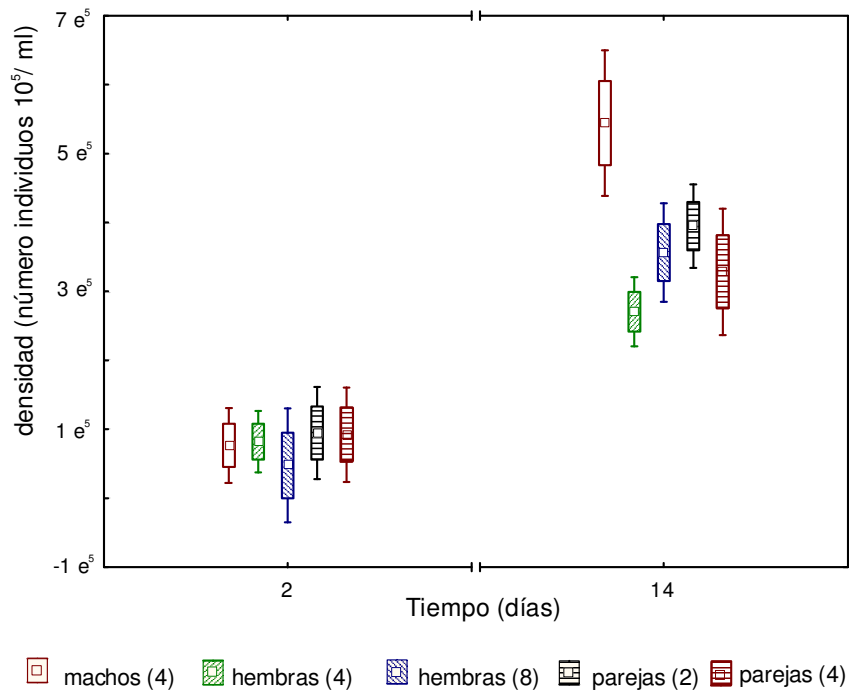


**Figura 94. Densidad inicial y final de *Chlorella vulgaris* para el control y los tratamientos.**



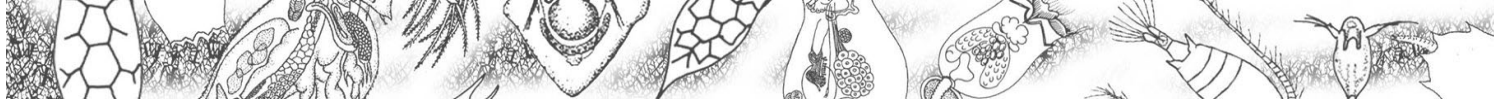


Para estos dos días (día 2 y día 14), se evaluó entonces el efecto de pastoreo considerando la diferencia de la densidad de algas entre TRATAMIENTOS y CONTROL correspondientes a cada día para verificar si los tratamientos diferían entre sí respecto al consumo. El análisis de la varianza arrojó diferencias significativas tanto para el factor TIEMPO ( $F_{1,10}=116$ ;  $p<0,000$ ) como para el TRATAMIENTO ( $F_{4,10}=3,56$ ;  $p<0,000$ ), no así para la interacción entre ambos. En la figura 95 se observa claramente este resultado, evidenciando que el TRATAMIENTO 1 (4 machos) se diferencia del resto en el día 14, evidenciando así un mayor consumo de estos individuos respecto al resto. Mientras que el TRATAMIENTO 2 (4 hembras) fue el que presentó menor densidad de pastoreo. De esta manera ambos conforman los extremos de dichos grupos homogéneos (tabla 22), mientras que el resto comparte valores con ambos, no pudiendo diferenciar una clara tendencia cuando tenemos una mayor densidad de individuos o parejas conformadas que evidencie un comportamiento de pastoreo diferente entre ellos.



**Figura 95. Box-plot de la densidad de algas consumidas por tratamiento para el día 2 y final (14).**



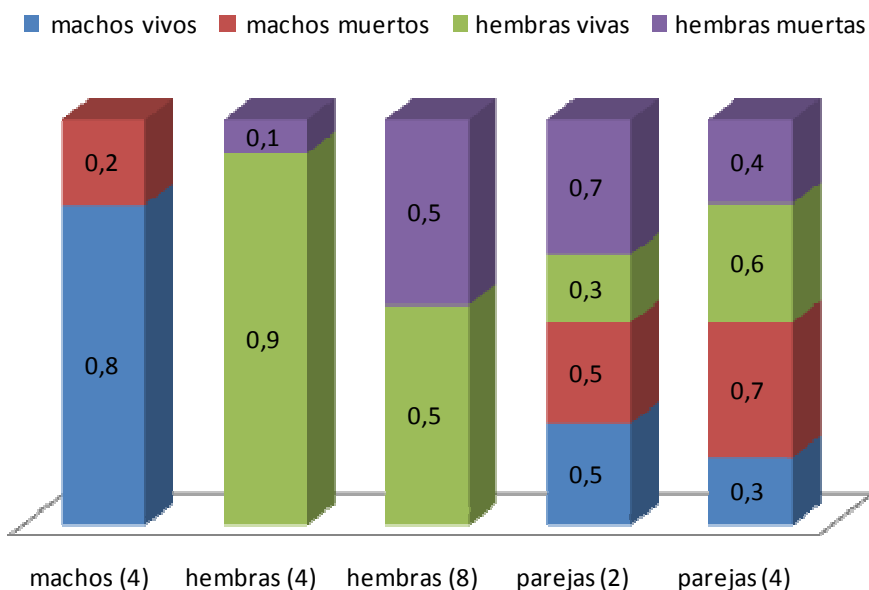


**Tabla 22. Test a posteriori (Tukey) para el factor TRATAMIENTO, mostrando los grupos homogéneos (Gr. H.) para la densidad promedio de ALGAS CONSUMIDAS.**

Tratamiento	Densidad (ind./ml)	Gr. H.	
<b>4 hembras</b>	<b>176315,4</b>	<b>a</b>	
8 hembras	202117,7	a	b
4 parejas	210327,5	a	b
2 parejas	244730,5	a	b
<b>4 machos</b>	<b>310409,0</b>	<b>b</b>	

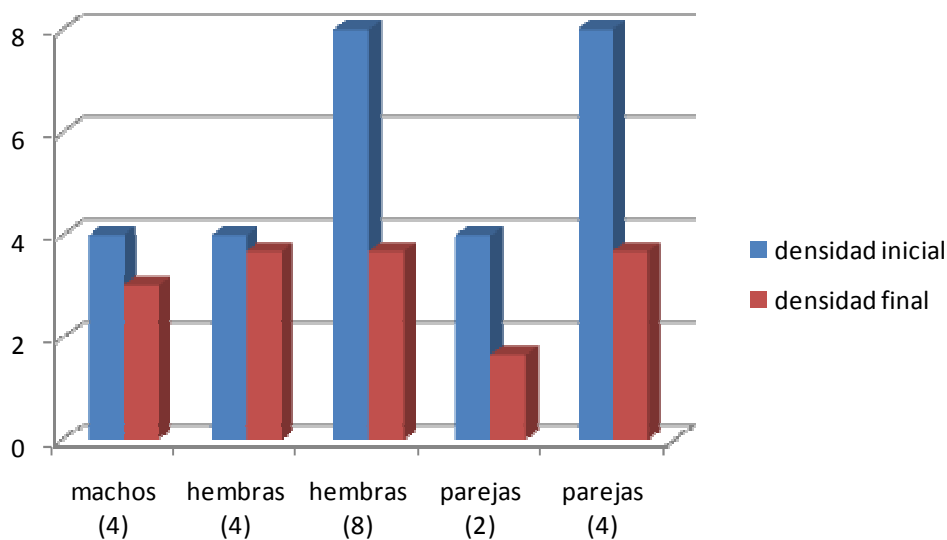
El conteo de los copépodos de cada tratamiento realizado el al finalizar el experimento, arrojó valores de mortalidad que no superaron el 50% (Fig. 96), a excepción del TRATAMIENTO 4 (2 parejas) donde las hembras alcanzaron una mortalidad del 70%, mientras que la mitad de los machos permanecieron vivos y en el TRATAMIENTO 5 donde se invirtió esta relación siendo los machos lo que presentaron este alto valor de mortalidad. La figura 97 compara la densidad inicial y final promedio de cada tratamiento.

No se registró la presencia de huevos, ni espermatozoides en ninguna de las réplicas de los tratamientos 4 y 5 con distinta densidad de parejas.



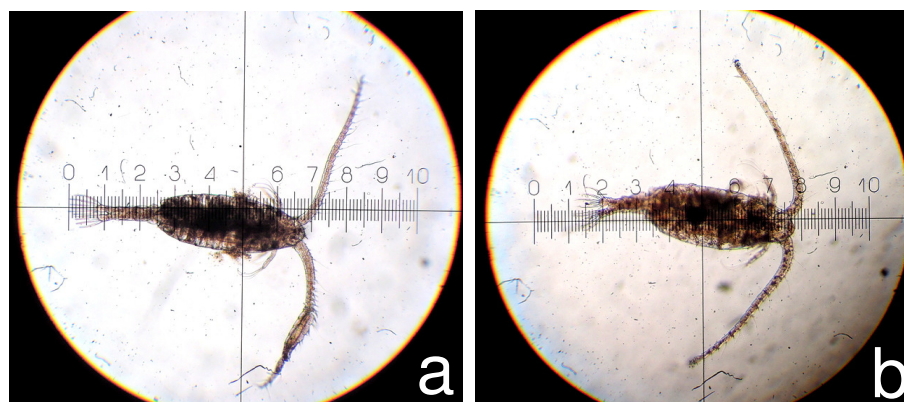
**Figura 96. Proporción de individuos vivos y muertos en cada tratamiento al finalizar el experimento.**





**Figura 97. Comparación de la densidad inicial y final de individuos vivos en cada tratamiento al finalizar el experimento.**

La longitud de los individuos promedió en tallas de 1528  $\mu\text{m}$  para los machos con un máximo de 1651  $\mu\text{m}$ , mientras que las hembras fueron en promedio un 8% mayores (1645  $\mu\text{m}$ ) con máximos de 1943  $\mu\text{m}$  (Fig. 98).



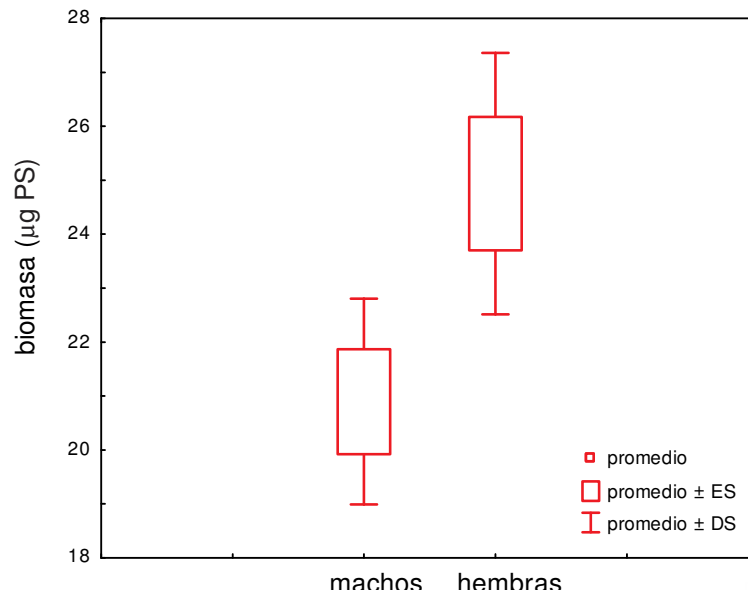
**Figura 98: Medición del largo de los ejemplares machos (a) y hembras (b) fijados final del experimento.**

En cuanto a la biomasa ( $\mu\text{g}$  PS) los valores promedio oscilaron entre los 13,3 y 24,8  $\mu\text{g}$  PS para los machos y entre 17,8 y 36,3  $\mu\text{g}$  PS para las hembras. El análisis estadístico de todos los valores de biomasa obtenidos arrojó diferencias significativas ( $t = -2,32$ ;  $p < 0,02$ ) en cuanto al dimorfismo sexual de





esta especie siendo aproximadamente 20% mayores las representantes hembras con una biomasa promedio de 24,9  $\mu\text{g}$  PS, mientras que los machos alcanzaron un promedio menor (20,9  $\mu\text{g}$ ) (Fig.99)



**Figura 99: Box-plot resultante del test de diferencia de medias (t) para la biomasa promedio de machos y hembras.**

### 5.3 Discusión

Las dificultades registradas en los experimentos efectuados con este calanoideo pudieron estar vinculadas a condiciones de estrés y que a veces conllevan a la muerte súbita del cultivo (Kaminski et al., 2009).

Los copépodos en los ambientes acuáticos experimentan regularmente el hambre debido a los cambios sucesionales del fitoplancton y a la necesidad de realizar desplazamiento verticales y horizontales en busca del alimento que se dispone en parches por lo cual los niveles de hambre tienen un papel importante en el comportamiento de alimentación. Los individuos con hambre son más activos que los saciados (Dhanker et al., 2013). En este caso, mostraron una fase de latencia de una semana en la cual no fue evidente el pastoreo que puede vincularse al estrés o a que no tuvieron un período previo de ayuno por lo cual el consumo algal se hizo evidente a partir de la segunda semana.

La disminución algal registrada en los controles a la mitad del experimento pudo deberse a la falta de incorporación de nutrientes. Sin embargo, posteriormente la población algal se recuperó, posiblemente debido a la merma





en su densidad, al reciclado de los nutrientes y al aportado por las excretas de los calanoideos (Carrillo et al., 1996; Mc Carthy et al., 2006), lo que también podría estar enmascarando un poco más la diferencia entre ambos. De todas maneras, la tendencia de crecimiento poblacional del alga continuó según lo previsto y lo observado en los cultivos en los días posteriores a ese punto de inflexión no afectando al ensayo como sucedió en el caso de la inoculación con exceso de alimento.

El TRATAMIENTO 1, compuesto sólo con machos y donde hubo mayor registro de pastoreo coincide con la menor mortalidad, teniendo un densidad final de individuos vivos casi igual a la inicial (3 individuos vivos final promedio) mientras que el tratamiento de menor pastoreo (TRATAMIENTO 2) coincide justamente con la mayor supervivencia de la hembras. Esto podría sugerir entonces que los machos se alimentan más que las hembras. Por otro lado, y apoyando la misma interpretación, los siguientes tratamientos con menor pastoreo fueron el 3 y el 5, donde el TRATAMIENTO 3 es también sólo de hembras teniendo un valor final de 3 individuos vivos final y el TRATAMIENTO 5 es de parejas, pero es en el cual se observó la mortalidad de casi todos los machos y la supervivencia de las hembras. Finalmente, el tratamiento con valores intermedios de pastoreo (TRATAMIENTO 4) donde inicialmente había 2 individuos de cada sexo, y donde al finalizar la supervivencia fue mayor de los macho que de las hembras. Sin embargo, no se han encontrado citas bibliográficas en la literatura que puedan confirmar esta diferenciación sexual en cuanto al volumen de pastoreo que pueda apoyar lo observado en este experimento. Se podría decir que los machos evidenciaron una mayor habilidad competitiva para obtener el alimento en un espacio reducido ya que normalmente nadan en un camino recto mientras que las hembras no ovígeras exhiben deslizamientos lentos y constantes interrumpidos ocasionalmente por saltos (Dur et al., 2010).

A pesar de que hubo supervivencia en varios tratamientos y que los especímenes tenían un gran tamaño no se logró que se reprodujeran por lo cual se puede suponer que por una parte la dieta pudo no ser apropiada ya que es común que procuren obtener sus requerimientos basándose en una dieta mixta (Williamson & Butler, 1986). Asimismo, puede considerarse que los recipientes utilizados en el experimento pudieron ser inadecuados para el normal comportamiento de ambos sexos.





La biomasa alcanzada a nivel experimental fue considerablemente mayor a la registrada en las poblaciones naturales de lagunas pampeanas donde se han registrado valores de biomasa promedio de  $10 \mu\text{g PS}$  (Claps, comunicación personal) siendo este valor un 50% menor al mínimo promedio de este experimento. Los especímenes analizados del río Salado fueron un poco más grandes que los de las lagunas, con valores promedio de casi  $14 \mu\text{g PS}$  para los machos y  $15 \mu\text{g PS}$  para las hembras (Claps, comunicación personal), los cuales de todas maneras siguen siendo más pequeños que los obtenidos a nivel experimental. Esto puede atribuirse a que en condiciones controladas de laboratorio pueden alcanzarse niveles óptimos de temperatura y de alimento (Hart, 1996) que también ante la ausencia de depredadores promueve que puedan crecer mucho más que en los ambientes naturales.





**EXPERIMENTO 6: EFECTO DE PASTOREO DE ESPECIES DE CLADÓCEROS PLANCTÓNICOS Y PERIFÍTICOS SOBRE EL ALGA UNICELULAR *CHLORELLA VULGARIS* CON Y SIN LA PRESENCIA DE PLANTAS SUMERGIDAS.**

*Diaphanosoma birgei* Kořínek es una especie común en el plancton de lagos someros tanto en zonas templadas como en los trópicos (Han et al., 2011) y se alimenta de nanoplancton (Sipaúba-Tavares et al., 2014).

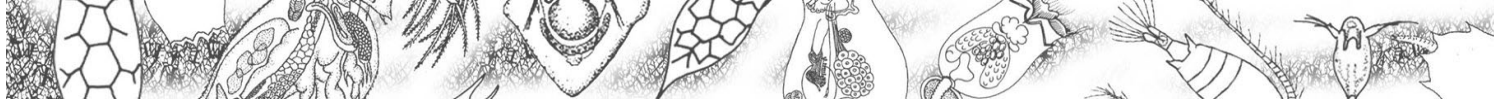
*Moina micrura* Kurz es un cladóceros cosmopolita que se registra en ambientes acuáticos de regiones tropicales y subtropicales, aunque algunos autores consideran que es un complejo de especies. La presencia de este complejo y la posible existencia de híbridos explicarían su elevada variabilidad morfológica y ecológica (Petrusek et al., 2004). Es una especie planctónica que muestra preferencia alimentaria por especies de *Chlorella* (Martínez & Montecino, 2000).

*Simocephalus vetulus* (Müller) es un cladóceros de tamaño intermedio a grande, que se encuentra en forma frecuente en sedimentos y macrófitos litorales de ambientes lénticos eutróficos. De acuerdo a Lynch (1980) los cladóceros litorales grandes primero crecen y luego se reproducen mientras que los planctónicos más pequeños crecen y se reproducen al mismo tiempo, en respuesta a la presión de depredación. Es común que los jóvenes destinen la energía en crecer hasta el tamaño óptimo y luego invertir el esfuerzo en reproducirse. Según Perrin et al. (1987), *S. vetulus* no se ajusta a este patrón y la limitante para el crecimiento poblacional es el tamaño de la cámara incubatriz que promueve que el esfuerzo no sea derivado exclusivamente a la reproducción.

Es conocido en los crustáceos que la duración del desarrollo embrionario está en función a la temperatura mientras que la duración del desarrollo post-embrionario está influenciada por el alimento. Por esta razón, los cultivos de cladóceros mantenidos con alta concentración de alimento presentan un acortamiento en el desarrollo post-embrionario (Hardy & Duncan, 1994).

Cuando las condiciones ambientales son favorables (densidad poblacional, temperatura, fotoperíodo, calidad y cantidad de alimento), la descendencia de los cladóceros estará formada por hembras partenogenéticas que son clones de la hembra progenitora (Pagano et al., 2000).





Estas tres especies utilizadas en el experimento se registran en el plancton de ambientes lénticos y lóticos de la cuenca del río Salado durante todo el ciclo anual, en general en bajo número (Ardohain, 2008; Benítez, 2008; Claps et al., 2004; entre otros).

Debido a los distintos hábitos de estos organismos (planctónicos y perífíticos) se propuso como objetivo del experimento evaluar el efecto de pastoreo de cada una de ellas sobre el alga palatable *Chlorella vulgaris* y si existen diferencias entre ellas respecto a la presencia/ausencia de vegetación sumergida que podría constituir un factor físico negativo para el mecanismo de filtración de los cladóceros planctónicos (Fig. 99).

### 6.1 Materiales y métodos.

Se cultivaron en laboratorio las tres especies de cladóceros utilizadas en este experimento (*Simocephalus vetulus*, *Diaphanosoma birgei* y *Moina micrura*).

El experimento se llevó a cabo en una cámara de incubación donde se mantuvieron constantes la temperatura ( $23\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ) y el fotoperíodo (14 horas luz). En este caso el diseño contó con 24 unidades experimentales (6 tratamientos x 3 réplicas + 2 controles x 3 réplicas). Los controles **sin vegetación** (S/V) consistieron en 100 ml de medio con una densidad inicial de  $2 \times 10^6$  individuos/ml de *C. vulgaris*, mientras que a los controles **con vegetación** (C/V) se les adicionó además una macrófita artificial simulando un tallo de *Myriophyllum sp* (Fig. 100)

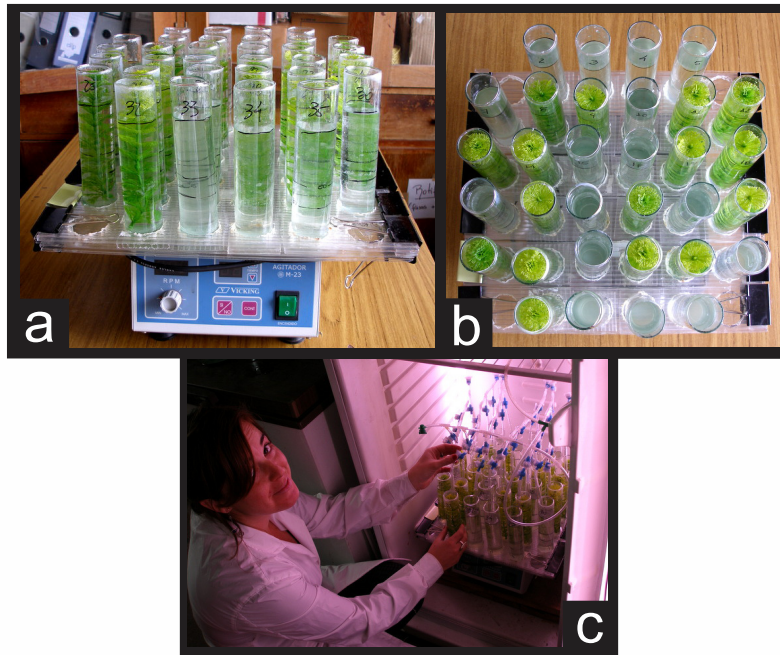
Según Martínez (2000) una concentración menor a 36.000 células/ml de *Chlorella sp.* puede ser considerada limitante para el crecimiento de *M. micrura*, mientras que Deng et al. (2006) la establecen en menos de  $1 \times 10^4\text{ ml}^{-1}$  cuando el alimento es *Scenedesmus obliquus*. Por lo enunciado anteriormente es evidente que la densidad algal utilizada en el experimento no constituirá un factor de estrés para la especie.

El mismo diseño se realizó para los TRATAMIENTO a los que se agregaron las 3 especies de cladóceros por separado con una densidad inicial de 0,05 individuos/ml de cada especie (5 individuos por tubo x 18 réplicas = 90 individuos en total).





Las unidades experimentales, al igual que se mencionó anteriormente, se distribuyeron al azar por sorteo en el espacio sobre el agitador orbital que se colocó posteriormente en la cámara de incubación. A todas se les adicionó el sistema de aireación por igual para evitar la sedimentación de las algas.

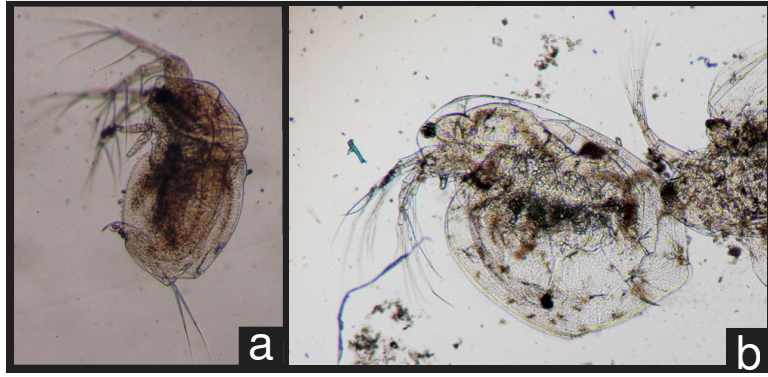


**Figura 100: a) unidades experimentales sobre agitador orbital; b) disposición al azar de tratamientos; c) cámara de incubación con dispositivo armado y regulación del sistema de aireación.**

El experimento se prolongó por 10 días y se extrajeron día por medio dos alícuotas de 1,5ml que fueron fijadas con lugol (1%) para el posterior recuento de algas que se realizó por procesamiento de imágenes como se mencionó anteriormente y que permitió el cálculo de la densidad algal (36 alícuotas por extracción x 5 extracciones = 180 alícuotas en total). En el caso de los cladóceros se fijaron con formol (4%) al finalizar el experimento (Fig. 102) lo que permitió tomar las medidas morfométricas y su posterior transformación a biomasa, utilizando las fórmulas propuestas de Dumont (1975). Se tuvo en cuenta en todos los tratamientos la posible aparición de efipios y/o machos.

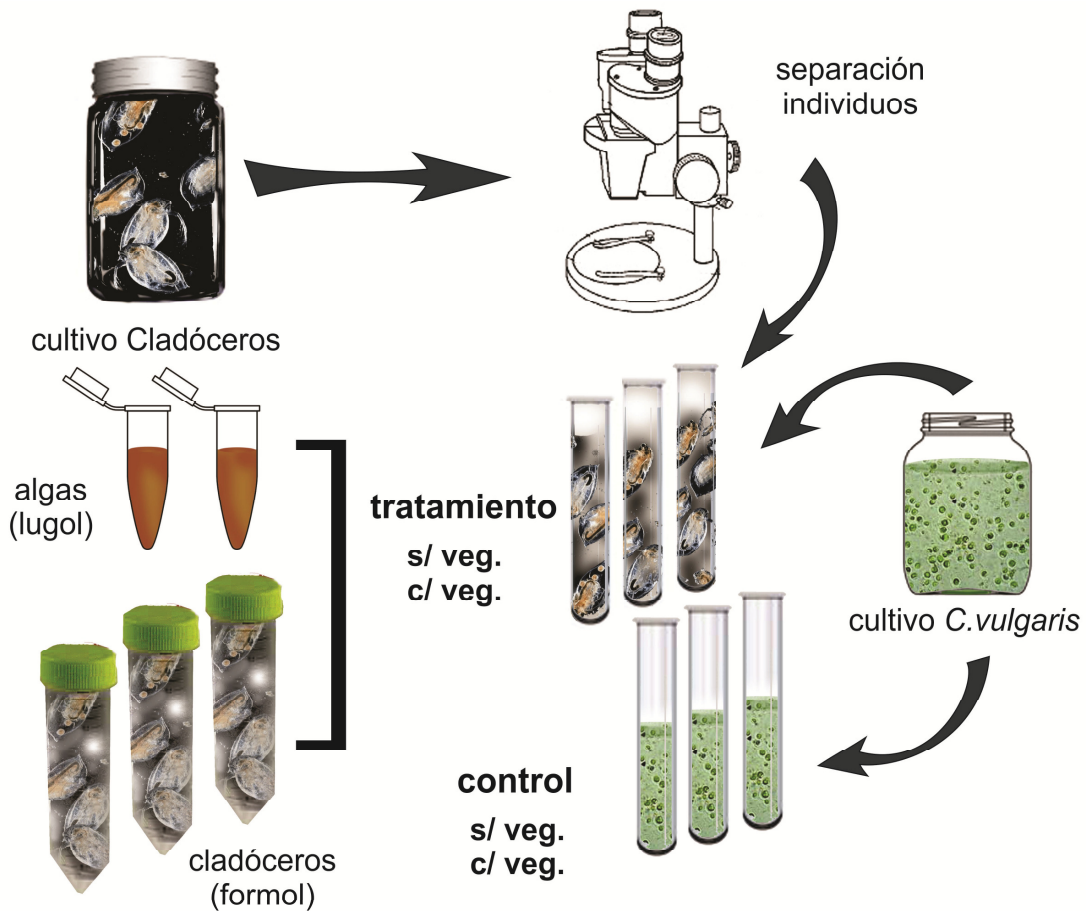
Posiblemente debido a la sensibilidad de *D. birgei* en el primer recuento se observó una considerable mortalidad de la población, y debido a la baja densidad inicial esto influyó en la continuidad del experimento, y al cuarto día se decidió eliminar este tratamiento, por lo cual se expondrán a continuación los resultados de las dos especies restantes (Fig. 101).





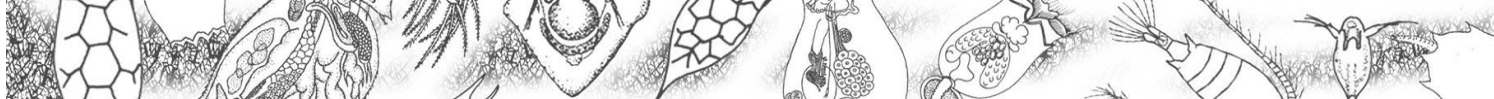
**Figura 101: Ejemplares de *Moina micrura* (a) y *Simocephalus vetulus* (b).**

Los datos obtenidos de los recuentos de algas y cladóceros y las medidas de estos últimos fueron sometidos a análisis estadísticos de acuerdo a los objetivos a testear (ANOVA RM y de una vía, test de t) con el cumplimiento de los respectivos supuestos (esfericidad, homogeneidad).



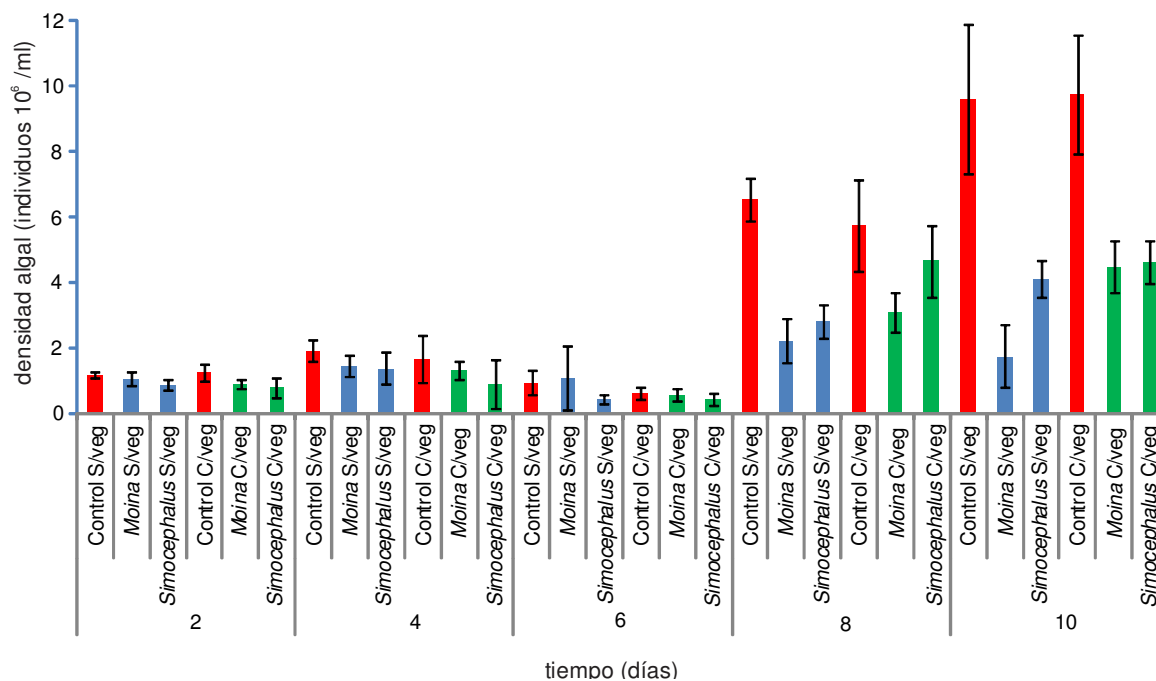
**Figura 102: Esquema del diseño experimental y desarrollo del experimento de pastoreo de las dos especies de cladóceros sobre *Chlorella vulgaris*.**





## 6.2 Resultados

En cuanto a la densidad de *C. vulgaris* se pudo observar una estabilidad en la población del alga durante los primeros 6 días tanto en los controles como los tratamientos con un leve descenso poblacional en el día 6, muy similar a lo ocurrido en el experimento anterior. A partir del día 8 se observó un notorio incremento de los CONTROLES que triplicaron su densidad inicial ( $\approx 6 \times 10^6$  individuos/ml) y la quintuplicaron en el día 10 al finalizar la experiencia ( $\approx 10-11 \times 10^6$  individuos/ml); mientras que los TRATAMIENTOS evidenciaron diferencias respecto a los controles presentando densidades notoriamente menores (Fig. 103).



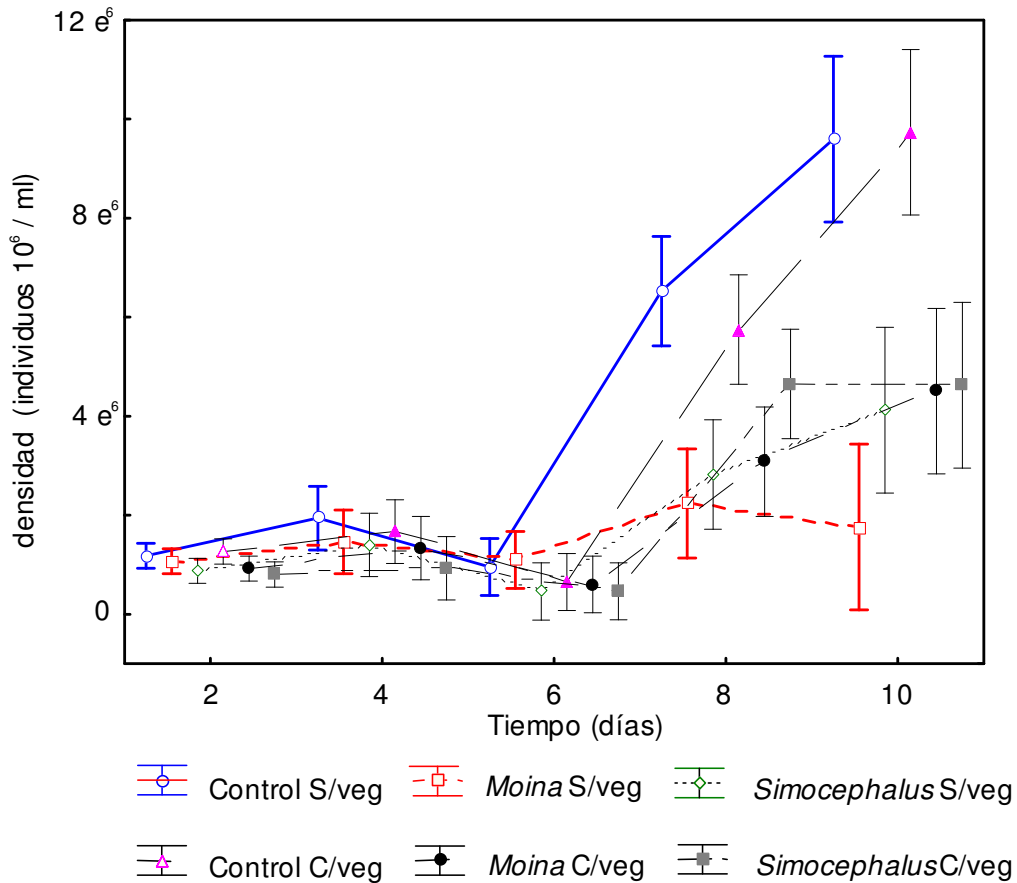
**Figura 103: Densidad de *Chlorella vulgaris* por día y por tratamiento (en rojo los controles, en azul los tratamientos en ausencia de vegetación y en verde los tratamientos con vegetación).**

El análisis de la varianza (RM ANOVA) para la densidad algal resultó significativo tanto para la interacción ( $F_{20,48}=10,41$ ;  $p<0,0000$ ) como para ambos factores (TIEMPO, TRATAMIENTO) por separado ( $F_{4,48}=150,87$ ,  $F_{5,12}=23,42$ ;  $p<0,0000$ ). Donde se puede observar el claro solapamiento de los





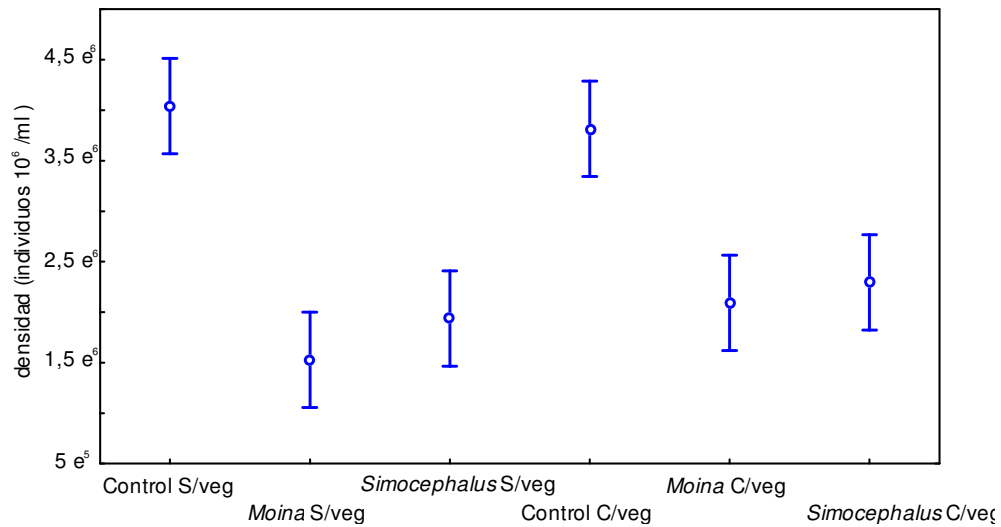
TRATAMIENTOS y los CONTROLES en los 6 primeros días, y una separación entre ambos en los días subsiguientes (Fig.104).



**Figura 104: Gráfico del RM ANOVA para los factores tiempo y tratamiento en función de la densidad de *Chlorella vulgaris*.**

En la gráfica del test a posteriori realizado para el factor TRATAMIENTO (figura 105) y la tabla 23 que representa los grupos homogéneos, se pueden evidenciar las diferencias entre los CONTROLES y los TRATAMIENTOS, siendo significativamente menores estos últimos, lo que podría sugerir un efecto de pastoreo positivo para ambos tratamientos, con y sin vegetación sumergida de ambas especies.





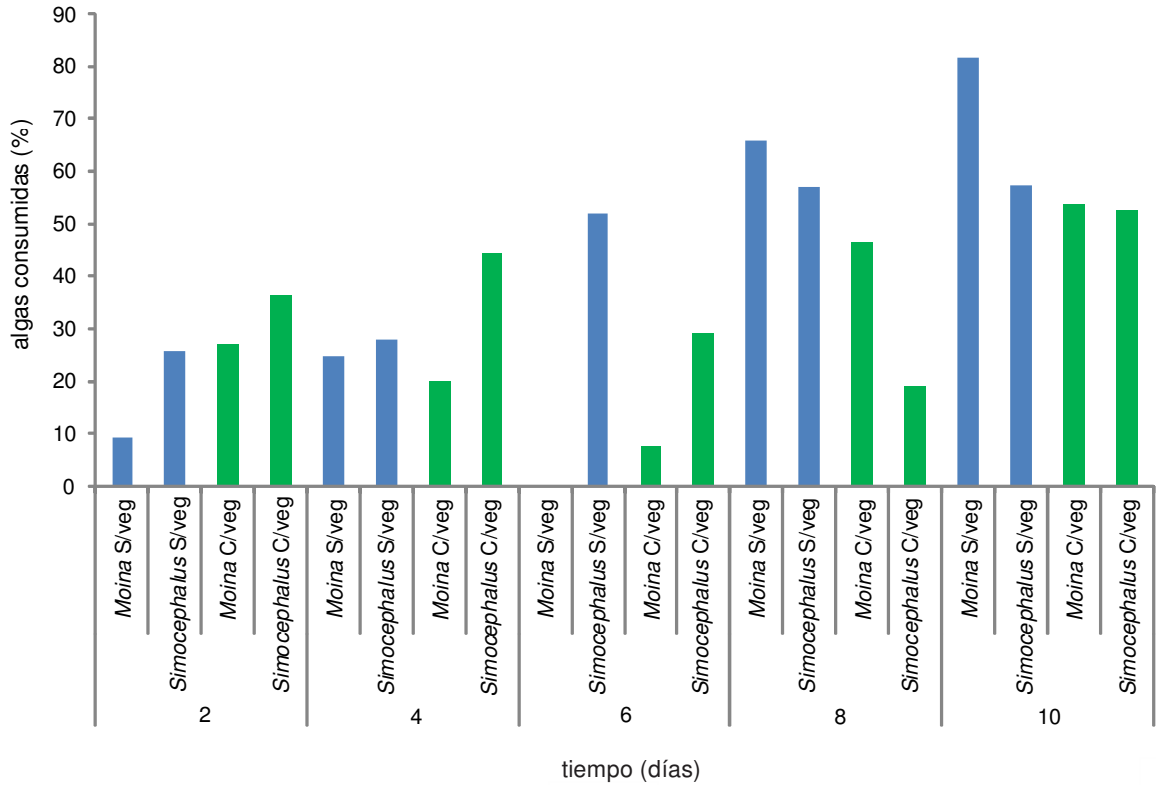
**Figura 105: Representación gráfica de los grupos homogéneos resultantes del test a posteriori (Tukey) para el factor tratamiento.**

**Tabla 23. Test a posteriori (Tukey) para el factor TRATAMIENTO mostrando los grupos homogéneos (Gr. H.) para la densidad del alga *Chlorella vulgaris*.**

Tratamiento	Densidad (ind/ml)	Gr. H.
<i>M. micrura</i> s/veg	1.527.337	a
<i>S. vetulus</i> s/veg	1.936.655	a
<i>M. micrura</i> c/veg	2.091.468	a
<i>S. vetulus</i> c/veg	2.295.072	a
<b>Control c/veg</b>	<b>3.815.215</b>	<b>b</b>
<b>Control s/veg</b>	<b>4.041.102</b>	<b>b</b>

Por su parte, el porcentaje de algas consumidas muestra que en los primeros días el mayor consumo se obtuvo para *Simocephalus vetulus* en el tratamiento **con vegetación** con un promedio del 40-45% de algas consumidas mientras que los tratamientos restantes no superaron el 25%. Hacia el final del experimento se observó un incremento en el consumo de todos los tratamientos (a excepción de *S. vetulus* C/V en el día 8) alcanzando *Moina micrura* en los tratamientos **sin vegetación** un consumo promedio de entre 60 y 80% en los 4 últimos días, mientras que las restantes se mantuvieron muy cercanas entre sí con promedios de 50% de algas consumidas (Fig. 106).

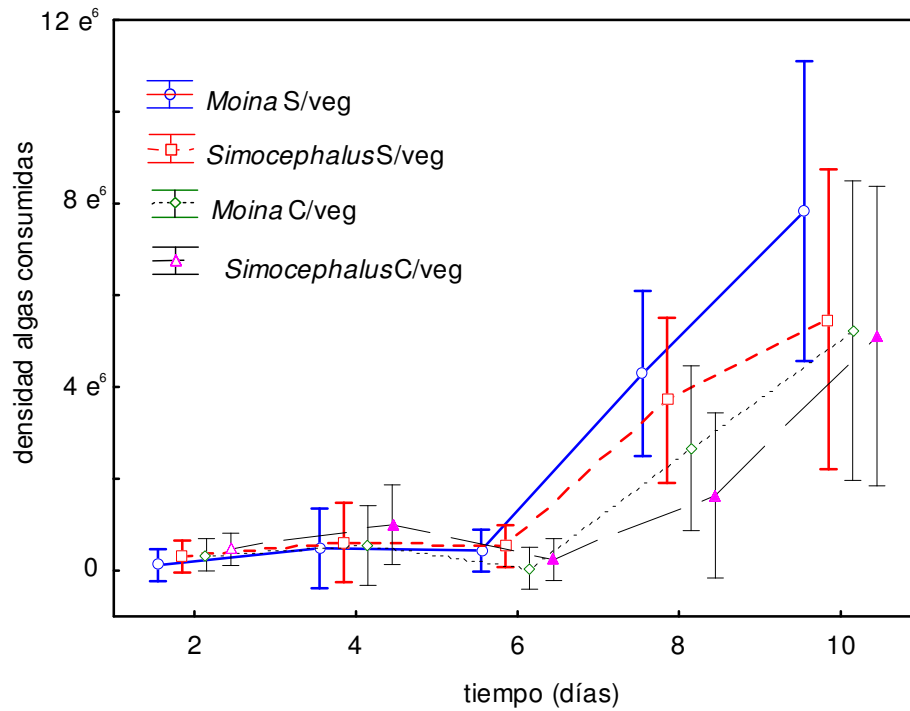




**Figura 106: Porcentaje de algas consumidas en función del tiempo para cada tratamiento (en azul los tratamientos en ausencia de vegetación y en verde los tratamientos con vegetación).**

El RM ANOVA realizado para la densidad de algas consumidas, no mostró sin embargo, diferencias significativas entre los 4 tratamientos, pero sí lo hizo para el factor TIEMPO ( $F_{4,32}=43,27$ ;  $p<0,0000$ ) mostrando el solapamiento en los 6 primeros días que ya se había observado en la densidad total y los días 8-10 con los mayores valores de densidad de algas consumidas (Fig. 107; tabla 24).





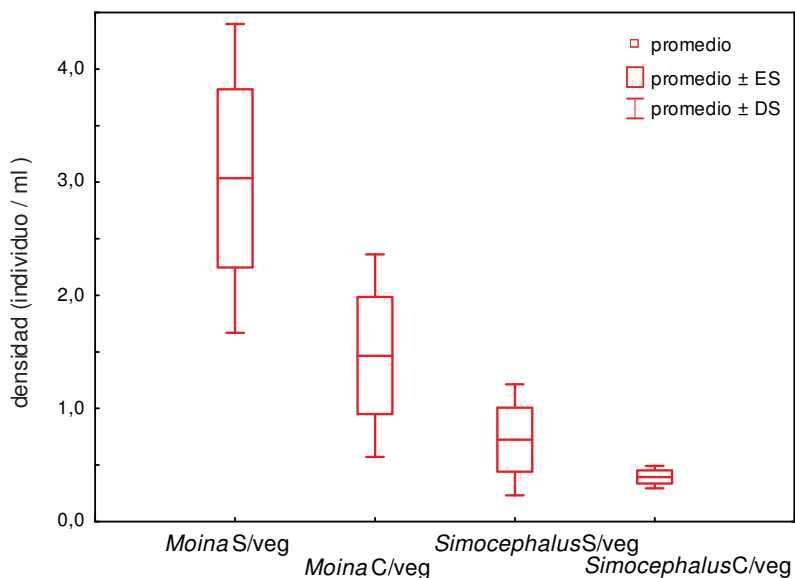
**Figura 107: Gráfico del RM ANOVA para los factores tratamientos y tiempo de la densidad de algas consumidas.**

**Tabla 24. Test a posteriori (Tukey) para el factor TIEMPO mostrando los grupos homogéneos (Gr. H.) para la densidad de ALGAS CONSUMIDAS en los 4 tratamientos.**

Tiempo	Densidad (ind/ml)	Gr. H.
día 2	306.109	a
día 6	311.680	a
día 4	657.664	a
día 8	3.075.746	b
día 10	5.910.085	c

Respecto a la densidad final de los cladóceros, la especie que alcanzó el mayor valor promedio fue *M. micrura* en el tratamiento **sin vegetación** con 3 individuos/ml, incrementando 60 veces su densidad inicial y 29 veces en el tratamiento **con vegetación** (1,5 ind/ml); mientras que *S. vetulus* incrementó entre 14 y 8 veces su densidad para cada tratamiento respectivo, con 0,7 y 0,4 individuos/ml en cada uno de ellos (Fig. 108).





**Figura 108: Box-plot para la densidad final de cladóceros en cada tratamiento.**

La evaluación estadística de la densidad final de cada tratamiento se realizó en este caso sobre los datos transformados a logaritmo natural para cumplir con el supuesto de homogeneidad de varianzas. El ANOVA de una vía resultó entonces significativo ( $F_{3,8}=5,76$ ;  $p<0,021$ ) separando ambos tratamientos de *S. vetulus* (con los menores valores de densidad) de *M. micrura* S/V con la mayor densidad poblacional, mientras que *M. micrura* C/V tomó valores y agrupamiento intermedios (tabla 23).

**Tabla 23. Test a posteriori (Tukey) para el factor TRATAMIENTO mostrando los grupos homogéneos (Gr. H.) para la densidad final de los cladóceros en cada tratamiento.**

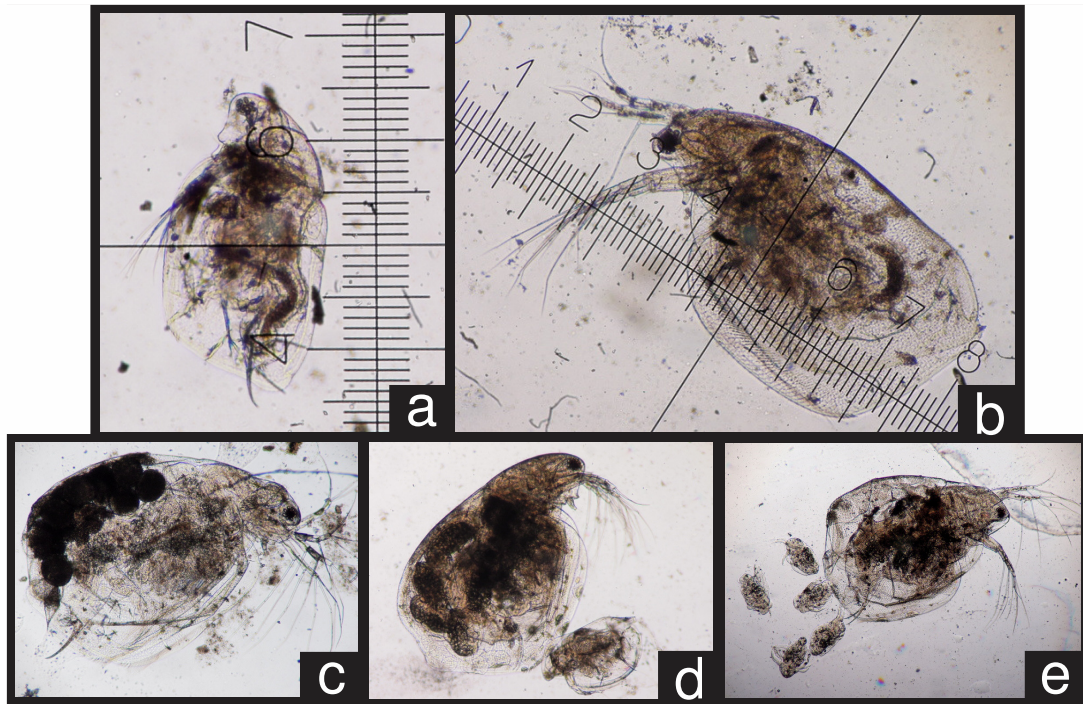
Tratamiento	Densidad (ind/ml)	Gr. H.
<i>S. vetulus</i> c/plantas	<b>0,3933</b>	<b>a</b>
<i>S. vetulus</i> s/plantas	0,7233	a
<i>M. micrura</i> c/plantas	1,4667	a b
<i>M. micrura</i> s/plantas	<b>3,0333</b>	<b>b</b>

La longitud promedio de los individuos de *S. vetulus* fue 914  $\mu\text{m}$  para el tratamiento **sin vegetación** con un máximo de 1821  $\mu\text{m}$ , y valores similares para el tratamiento **con vegetación** (longitud promedio: 947  $\mu\text{m}$ , máximo: 1797  $\mu\text{m}$ )





(Fig. 109). El análisis de comparación de medias (test de Student) no arrojó diferencias significativas ( $t=-1,44$ ;  $p=0,15$ ) entre ambos tratamientos.



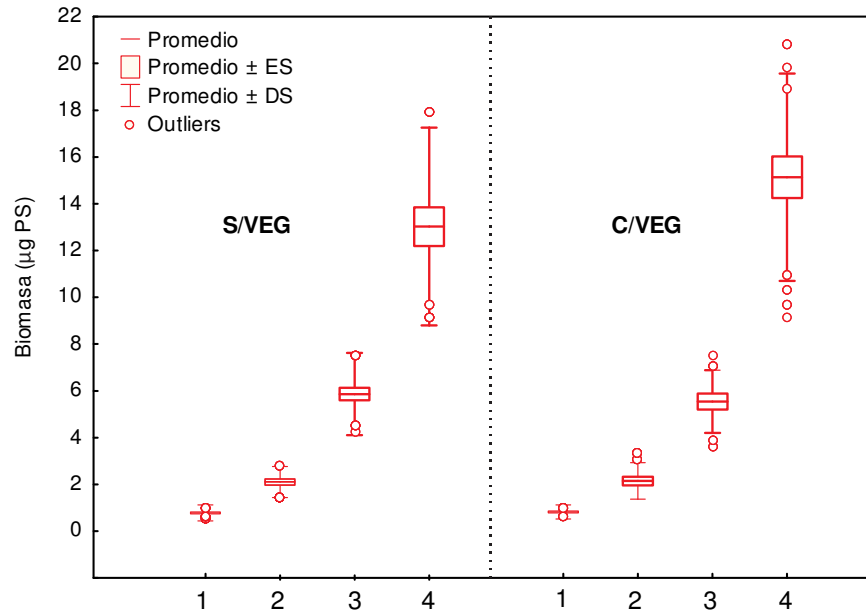
**Figura 109: Medición del largo de los ejemplares de *Simocephalus vetulus* fijados con formol al final del experimento (a y b). Hembras grávidas de mayor tamaño y embriones (c-d).**

Para el análisis de la biomasa los valores obtenidos de la longitud del caparazón (mm) se organizaron en 4 clases (modificadas de Perrin, 1988):

- Clase 1: hasta 0,762 mm
- Clase 2: 0,763- 1,016 mm
- Clase 3: 1,017- 1,327 mm
- Clase 4: mayor a 1,328 mm

Posteriormente se transformaron a biomasa utilizando la fórmula propuesta por Dumont (1975) y se mantuvo el mismo orden de clases. Así, los valores promedios y máximos de cada clase para cada tratamiento fueron muy próximos entre sí, con valores mínimos de 1,27  $\mu\text{g}$  PS para las clases más pequeñas y máximos de 15 a 20  $\mu\text{g}$  PS para las clases mayores en ambos tratamientos (Fig. 110).





**Figura 110: Box-plot para la biomasa de *Simocephalus vetulus* en cada tratamiento (sin vegetación y con vegetación) y para cada clase de tamaño (1: < 1,3 µg PS; 2: 1,31-3,4 µg PS; 3: 3,41-9 µg PS y 4: >9 µg PS) al finalizar el experimento.**

Se realizó lo mismo para *M. micrura* registrando valores de longitud promedio entre 689 y 710 µm para ambos tratamientos con máximos 827 µm y mínimos de 546 µm. El análisis de comparación de medias (test de Student) no arrojó diferencias significativas ( $t= 1,29$ ;  $p=0,22$ ) entre ambos tratamientos.

Para el análisis de la biomasa se las categorizó en tres clases:

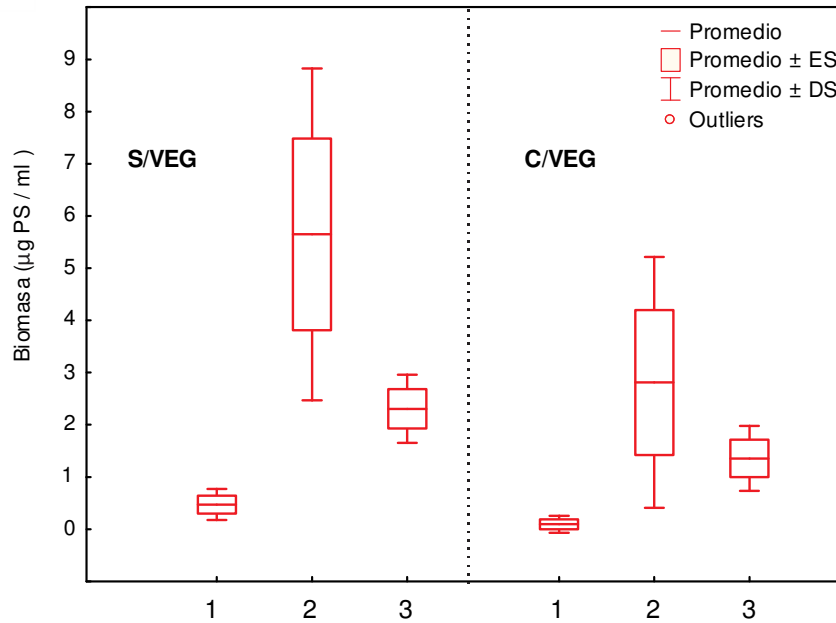
Clase 1: hasta 0,60 mm

Clase 2: 0,61- 0,80 mm

Clase 3: mayores a 0,81 mm

Al igual que para la especie anterior, estos datos se transformaron a biomasa con la fórmula para la especie propuesta por Dumont (1975) y se mantuvo el mismo orden de clases. En la figura 111 se observa la biomasa por unidad de volumen de las distintas clases en ambos tratamientos mostrando en ambos casos una mayor cantidad de individuos de talla media que queda representado en la mayor biomasa y similares valores de individuos pequeños y grandes en ambos tratamientos.





**Figura 111: Box-plot para la biomasa por unidad de volumen de *Moina micrura* en cada tratamiento (sin vegetación y con vegetación) y para cada clase de tamaño (1: < 0,6 µg PS; 2: 0,61- 0,80 µg PS; 3: > 0,81 µg PS) al finalizar el experimento.**

### 6.3 Discusión

La ausencia de desarrollo de la población de *D. birgei* podría estar vinculada a la dieta ofrecida ya que se ha observado que el alimento óptimo para esta especie es una mezcla de clorofitas (Sipaúba-Tavares et al., 2014). Según estos autores si la población es alimentada con un monocultivo aumenta su fase de latencia (nueve días). La disminución repentina del crecimiento puede también estar vinculada a la liberación de metabolitos por parte de los individuos que incrementan los efectos en la limitación de alimento (Sipaúba-Tavares et al., 2014). Asimismo, la temperatura del experimento podría no ser óptima ya que en ensayos con otra especie se ha logrado el máximo desarrollo a 29 °C. Esto está vinculado al carácter tropical del género (Hang et al., 2011).

Los valores de densidad alcanzados por *M. micrura* en el tratamiento sin macrófitas fueron similares a los obtenidos por Sipaúba-Tavares & Bachion





(2002). También hubo coincidencia en el momento del pico de crecimiento a los 10 días.

El éxito reproductivo de *M. micrura* estaría vinculado a su rápido crecimiento si tiene a disposición un elevado requerimiento de recursos alimentarios que la tipifica como una especie ruderal (Ferrão-Filho et al., 2005). Asimismo, debe destacarse que se le brindó su alimento preferido (Martínez, 2000; Martínez & Montecino, 2000). Debe destacarse que a pesar de que el volumen de los recipientes era reducido no hubo producción de machos como lo señalado por Martínez Jerónimo et al. (2007), quienes postulan que la falta de espacio promueve dicha producción al impedir los desplazamientos o la obtención del alimento y no la vinculan al hacinamiento.

En ensayos de laboratorio se ha comprobado que las poblaciones de *Simocephalus vetulus* alimentadas con *Cryptomonas ovata* respecto a otros alimentos (ciliados, materia orgánica y otra criptofita flagelada) alcanza la máxima reproducción y crecimiento (Bec et al., 2003) mientras que en otros obtuvieron idénticos resultados junto a un acortamiento en el desarrollo post-embrionario con dietas de clorofitas nanoplanctónicas a elevada concentración (Czeczuga et al., 2003).

Al final de este experimento (10 días) se cuenta con una población de *S. vetulus* que incluye varias clases de tamaño con evidencia de reproducción demostrando que hubo acortamiento en el desarrollo post-embrionario como lo registrado por Czeczuga et al. (2003) al alimentar a la población de *S. vetulus* con *Chlorella pyrenoidosa* incluso a concentraciones menores ( $800 \times 10^3/\text{ml}$ ) a las utilizadas por nosotros. Asimismo, el tamaño máximo alcanzado por las hembras al finalizar el experimento es similar.

Por otra parte, Deng et al. (2006) obtuvieron resultados semejantes en la duración del desarrollo y el tamaño corporal con *Scenedesmus obliquus* como alimento, concluyendo que la temperatura y la concentración algal son los factores determinantes en el crecimiento de la población, siendo los óptimos  $25^\circ\text{C}$  y una concentración algal de  $2 \times 10^5/\text{ml}$ .

La comparación del consumo algal durante gran parte del experimento muestra que fue mayor en *M. micrura* y esto estaría vinculado a que a pesar de que *S. vetulus* es un cladócero grande al ser un organismo litoral y sésil su tasa de filtración no es tan eficiente como la de un cladócero planctónico (Loureiro et





al., 2013). Sin embargo, para *S. vetulus* se ha demostrado que en concentraciones similares a las utilizadas en este experimento alcanza su máxima tasa de ingestión con una disminución de la tasa de filtración. Se considera que cuando existe mayor disponibilidad de alimento se cubren los requerimientos nutricionales en menor tiempo, esfuerzo y gasto energético. Concentraciones mayores a  $3 \times 10^6$  individuos/ml de *C. vulgaris* promueven que el aparato filtrador no sea tan efectivo y la tasa de ingestión no se incrementa proporcionalmente al incremento del alimento incluso se ha señalado que el aparato de filtración puede resultar dañado (Brito et al., 2006). De esto se desprende que las poblaciones de *S. vetulus* han efectuado un uso adecuado del recurso y por lo tanto han logrado incrementar el tamaño corporal de las hembras además de reproducirse.

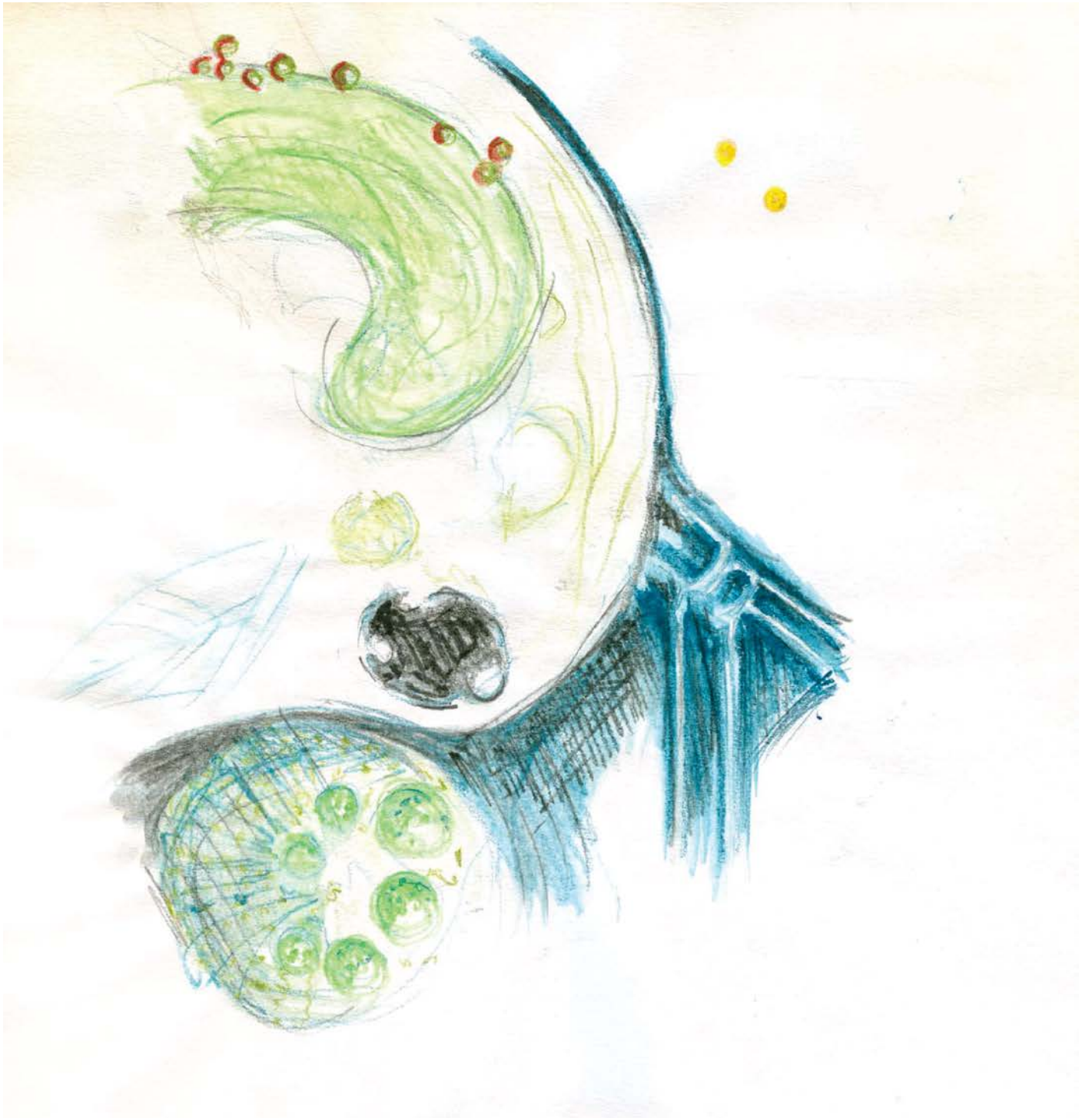
La presencia de la macrófita sumergida influyó de manera evidente en el pastoreo efectuado por *M. micrura* mientras que el de *S. vetulus* fue mayormente similar en ambas condiciones.

Para ambas especies, el incremento mayor de la población ocurre en ausencia de vegetación. Debe tomarse en cuenta que la vegetación artificial utilizada en el experimento ocupaba una gran proporción del volumen de la unidad experimental entorpeciendo la movilidad de los organismos, en especial hacia el final de la experiencia donde ya se encontraban densidades más elevadas.

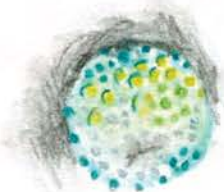
La biomasa alcanzada por la especie planctónica en el tratamiento sin vegetación fue mayor y está vinculada a su preferencia por el agua libre. La cobertura que alcanza la vegetación debe constituirse en una perturbación para los especímenes de *M. micrura* aunque pudieran alimentarse y reproducirse.

La especie con hábitos litorales presentó valores similares de biomasa en ambos tratamientos, evidenciando que la falta de sustrato no afectó el crecimiento de la población de *S. vetulus*. Este resultado podría estar vinculado a la disponibilidad de alimento muy palatable en exceso y una temperatura acorde a sus requerimientos.





**CONSIDERACIONES FINALES**





Los resultados obtenidos en este trabajo se complementan con algunos de los registrados anteriormente en las poblaciones naturales por otros autores en ambientes lóticos y lénticos de la cuenca del río Salado abriendo una puerta a la utilización de la experimentación como herramienta complementaria para intentar alcanzar un mayor conocimiento de la estructura y dinámica del zooplancton en los ambientes acuáticos pampeanos.

- ✚ Se establecieron las tasas de crecimiento de *C. vulgaris* y *S. acutus* como línea de base para su utilización futura en cultivos de laboratorio y como alimento de los organismos del zooplancton utilizados en los ensayos ya que además de ser dos de las clorofíceas más utilizadas a nivel mundial para la experimentación son conspicuas integrantes del fitoplancton en los ambientes pampeanos.
- ✚ *Chlorella vulgaris* presentó la mayor tasa de crecimiento y se eligió como mejor alimento para los organismos tanto en los cultivos como en los experimentos.
- ✚ Se ajustó y optimizó la técnica de recuento digitalizado de células de las algas de manera de hacer más eficiente el procesamiento de datos en la fase de experimentación y se relacionó la densidad alcanzada por las algas con la turbidez mediante un modelo lineal para permitir un monitoreo eficaz e rápido de los cultivos.
- ✚ Las tasas de crecimiento de algunos de los organismos que integran al zooplancton de los ambientes acuáticos pampeanos reflejan cómo algunas especies resultan ser dominantes, otras tienen picos de abundancia en forma esporádica y algunas se presentan en bajo número. El cálculo de estas tasas en condiciones óptimas de laboratorio, permite conocer más acerca del comportamiento de cada especie y entender lo observado en la dinámica de las poblaciones naturales.
- ✚ La cepa de *Brachionus plicatilis* obtenida en el río Salado muestra una importante plasticidad frente a diversos niveles de conductividad que junto a su elevada tasa de crecimiento poblacional le posibilitan ser protagonista notorio en el zooplancton alcanzando densidades muy elevadas en gran parte de la cuenca.





- ✚ El óptimo de **conductividad** a nivel experimental para *B. plicatilis* (5 mS/cm) coincidió con lo señalado para las poblaciones naturales locales (Claps et al., 2009).
- ✚ El rango de conductividad a nivel experimental en relación con la tasa de crecimiento poblacional de *B. plicatilis* fue entre 2 y 8 mS/cm coincidiendo con lo mencionado para las poblaciones naturales locales (Claps et al., 2009).
- ✚ El límite inferior para el crecimiento de *B. plicatilis* se encontró entre los niveles de 1 y 2 mS/cm, mientras que el superior no pudo confirmarse, coincidiendo también con lo observado en las poblaciones locales y señalado para otras cepas mundiales (Pascual & Yúfera, 1983).
- ✚ A pesar de un menor crecimiento poblacional y la presencia de estructuras de resistencia, el crecimiento de las poblaciones experimentales de *B. plicatilis* se prolongó en los niveles altos de conductividad, sin poderse establecer un claro límite superior de tolerancia. Sin embargo los valores coinciden con lo observado a campo por Solari et al. (2002) y Gabellone et al. (2014).
- ✚ La mayor productividad de *B. plicatilis* en ambos experimentos de conductividad se obtuvo para los días 10 y 12, considerándose éste como el mejor momento para la cosecha.
- ✚ El nivel considerado como óptimo de **temperatura** (25 °C) coincide con lo observado en las poblaciones naturales de esta cepa de *Brachionus plicatilis* (Claps et al., 2009).
- ✚ La alta tasa de crecimiento de *B. plicatilis* obtenida a 25 °C confirma porque esta especie es dominante en primavera-verano en condiciones de alta salinidad en la cuenca del río Salado, tanto en ambientes lóticos como lénticos.
- ✚ La supervivencia de la población de *B. plicatilis* hacia el final del experimento a los 15 °C sugiere que su límite inferior de tolerancia estaría aún por debajo de esta temperatura.
- ✚ Se establecieron las curvas de crecimiento y de supervivencia para *B. plicatilis* que coinciden con el recambio en la estructura poblacional,

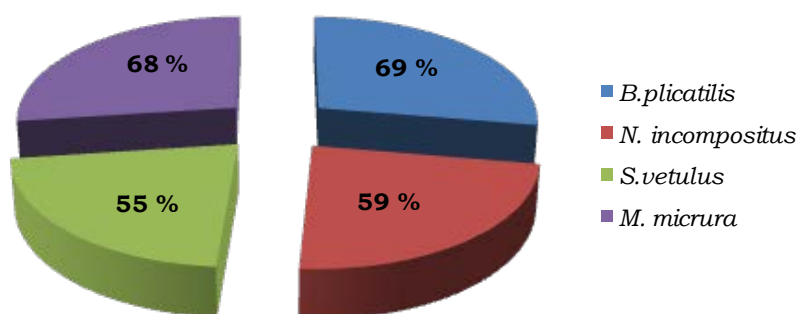




sugiriendo que las hembras a menor temperatura invierten su mayor energía en la reproducción al principio y al final del experimento.

✚ Tomando en cuenta la respuesta de los representantes de los tres grupos zooplanctónicos utilizados en los tres experimentos de **pastoreo** pudo observarse que:

- El cladócero bentónico *S. vetulus* alcanza la mayor biomasa final promedio por mililitro (6,30  $\mu\text{g PS /ml}$ ), seguido por el planctónico *M. micrura* (2,11  $\mu\text{g PS /ml}$ ), el rotífero *B. plicatilis* (1,21  $\mu\text{g PS /ml}$ ) y por último el copépodo calanoideo *N. incompositus* (0,44  $\mu\text{g PS /ml}$ )
- El análisis del porcentaje de algas consumidas por cada especie por separado en relación con el número de algas disponibles en ese día, indica que es similar en los cuatro organismos (Fig. 112) siempre considerando que cada especie estuvo aislada y con exceso de alimento.



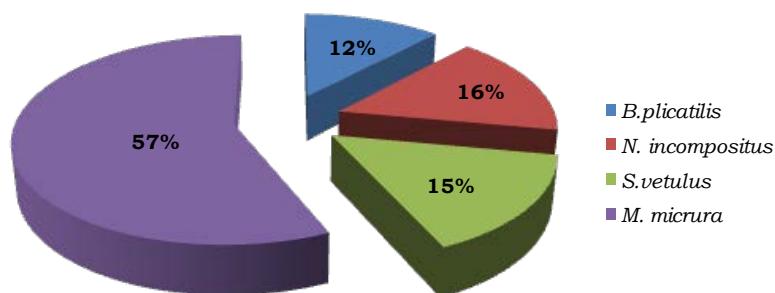
**Figura 112: Consumo porcentual relativo respecto a la cantidad de algas disponibles al finalizar cada experimento.**

✚ Para comparar la eficiencia de consumo del alimento para cada especie se realizó el cálculo para que tuvieran una biomasa equivalente considerando a *S. vetulus* como la especie de mayor tamaño promedio. Se aplicó un coeficiente de multiplicación para el resto de las especies (biomasa de *S. vetulus*/ biomasa de especie X) y se lo multiplicó con la densidad de algas consumidas real para cada especie, resultando cada valor como la densidad de algas consumidas si todos los organismos tuvieran igual biomasa. El mayor consumo porcentual fue realizado por parte del





cladóceros planctónicos *M. micrura* (57%). Las restantes especies presentaron valores similares (*N. incompositus*: 16%, *S. vetulus*: 15%, *B. plicatilis*: 12%) (Fig. 113).



**Figura 113: Consumo porcentual de algas a equivalente biomasa por mililitro de las cuatro especies analizadas.**

- Este resultado está en relación con los hábitos alimentarios de cada una de las especies, demostrando que *M. micrura* es un filtrador más eficiente respecto a *S. vetulus* y *B. plicatilis*. El copépodo *N. incompositus* a pesar de ser un raptor que debe capturar las partículas presenta valores similares a los de menor eficiencia filtradora, demostrando que su método de alimentación no constituye una desventaja.
- El rotífero *B. plicatilis*, a pesar de ser catalogado como filtrador poco eficiente, ha demostrado que con biomasa equivalente tiene una capacidad de consumo similar a organismos de mayor porte como *S. vetulus* y *N. incompositus*, evidenciando de esta manera que es una especie a tener en cuenta a la hora de evaluar su efecto pastoreador como posible controlador de la biomasa fitoplanctónica en los ecosistemas naturales ya que como se ha mencionado anteriormente es una especie que alcanza elevadas densidades en condiciones favorables.

En las últimas décadas se ha intentado comprender a nivel mundial como se comportan las distintas especies que componen el zooplancton ante los cambios bióticos y abióticos que se producen de manera natural y que en





ocasiones se ven acentuados a causa del manejo humano de los cuerpos de agua o de sus tierras circundantes y que repercuten en ellos. El trabajo experimental tanto *in situ* como en el laboratorio ha tomado importancia como herramienta para evaluar, observar y entender estos cambios. Sin embargo en nuestro país, es escasa la información en este aspecto y más aún, en el sitio de estudio planteado en esta tesis, donde los trabajos se han remitido históricamente a datos de campo.

De esta manera por medio de este trabajo se pretendió ajustar las técnicas de laboratorio y comenzar una línea de investigación que permita introducirnos y entender por medio de experimentos lo que muchas veces resulta difícil analizar al estudiar la compleja red trófica pelágica en el campo. El laboratorio y las condiciones restringidas que pueden establecerse en él nos permiten desglosar los interrogantes y estudiarlos por separado, para luego poder reunirlos y evaluarlos en conjunto, generando así una nueva línea en el conocimiento limnológico de los ambientes pampeanos.

De esta manera se provee de resultados cuantitativos respecto a las respuestas fisiológicas de las especies ante un disturbio proporcionado y se disgregan las variables que pueden ser potencialmente importantes en sistemas naturales más complejos, generando tanto la dirección como el diseño hacia un nuevo estudio de las poblaciones naturales.

Como se ha mencionado a lo largo de esta tesis, numerosos y reconocidos investigadores hacen hincapié en que se deben efectuar experimentos con las poblaciones locales de interés ya que debido a la diversidad genética de estas especies se producen distintas respuestas a los factores de control en las distintas regiones geográficas. Así, al generar nuestros propios rangos y óptimos para cada especie local, podremos explicar más eficientemente lo que ocurre a nivel natural.

#### ✚ Aportes originales de esta tesis:

Si bien el procesamiento de imágenes digitales no es una técnica nueva, su utilización en esta tesis para el recuento automatizado de células de *C. vulgaris* y la relación establecida respecto a la turbidez, permitieron optimizar dos situaciones: por un lado el monitoreo inmediato





de los **cultivos** algales por medio de un turbidímetro y por el otro la garantía de realizar el **recuento** de las células algales con un mínimo error ya que en este tipo de experimentos son generadas un gran volumen de muestras, siendo más rápido y exacto el recuento digital por sobre el manual. Al mismo tiempo esta técnica tiene la posibilidad de ser aplicada a otras algas unicelulares (como especies de *Scenedesmus*, *Chlamydomonas* o cryptomonadales) teniendo entonces una importancia mayor al poder extrapolarse a otro tipo de estudios.

Por otra parte se abordaron varios aspectos poblacionales del rotífero *Brachionus plicatilis* y sus respuestas ante algunos de los cambios naturales que pueden afectar a las poblaciones locales. Esta especie es una de las más conspicuas y emblemáticas tanto en los ambientes naturales de la región como en su uso estrictamente en laboratorio y es considerada una especie críptica a nivel mundial generando continuamente nuevos interrogantes en cuanto a su comportamiento según su distribución geográfica. Se considera este trabajo como el primero de este tipo realizado para la región y que aporta significativamente al conocimiento de la cepa local de esta especie en cuanto a los más trascendentes factores de control (conductividad, temperatura y alimento).

#### ✚ Perspectivas futuras:

Se propone continuar y ampliar los estudios en microcosmos con la cepa local de *Brachionus plicatilis* estudiada, de manera de generar un conocimiento amplio acerca de su fisiología y comportamiento local. También se plantea estudiar las poblaciones de esta especie en otros sitios de la cuenca y/o sitios cercanos con el fin de comprobar si la especie se comporta de la misma manera o presenta diferencias respecto a los sitios ya evaluados.

También se pretende ampliar los estudios a otras especies de rotíferos importantes de la cuenca como *B. calyciflorus*, *B. angularis*, *B. rotundiformis*, *Keratella tropica*, *Asplanchna brightwellii*, realizando ensayos similares a los aquí expuestos, sumando otros de competencia y depredación completando de esta manera el conocimiento de las interacciones entre las especies más importantes del zooplancton local.





## BIBLIOGRAFIA

- Adamkiewicz-Chojnacka, B. 1988. The genus *Euchlanis* (Rotatoria) in brackish waters of the Vistula Lagoon (southern Baltic). *Oceanologia* 26: 97-104.
- Aguirre Ramírez, N. J., J. A. Palacio Baena, I. C. Correa Ocho & E. Hernández Atiliano. 2007. Ensayos de bioestimulación algal con diferentes relaciones Nitrógeno: Fósforo, bajo condiciones de laboratorio. *Rev. Ingenierías Univ. Medellín* 6:11-21.
- Ahlgren, G., L. Lundstedt, M. Brett & C. Forsberg. 1990. Lipid composition and food quality of some freshwater microalgae. *J. Plankton Res.* 12: 809-818.
- Ahlstrom, E. H. 1940. A revision of the Rotatorian genera *Brachionus* and *Platytias* with description of one new species and two new varieties. *Bull. Am. Mus. Nat. Hist.* 77: 143-181.
- Allan, J. D. 1976. Life history patterns in zooplankton. *Am. Nat.* 110: 165-180.
- Allende, L., G. Tell, H. Zagarese, A. Torremorell, G. Pérez, J. Bustingorry, R. Escaray & I. Izaguirre. 2009. Phytoplankton and primary production in clear-vegetated, inorganic-turbid, and algal-turbid shallow lakes from the pampa plain (Argentina). *Hydrobiologia* 624:45-60
- Altenburger, R., J. M. Schmitt & J. Riedl. 2008. Bioassay with unicelular algae: deviations from exponential growth and its implications for toxicity test results. *J. Environ. Quality* 37: 16-21.
- Anitha, P. S. & R. M. George. 2006. The taxonomy of *Brachionus plicatilis* species complex (Rotifera: Monogononta) from the Southern Kerala (India) with a note on their reproductive preferences. *J. Mar. Biol. Ass. India*, 48: 6 - 13.
- Aoyagui, A. S. M. & C. C. Bonecker. 2004. The art status of rotifer studies in natural environments of South America: floodplains. *Acta Sci. Biol. Sc.* 26: 385-406.
- APHA. 1995. Standard methods for analysis of water and wastewater. 19 edition. American Public Health Association, Washington D.C.
- Arдохайн, D. M. 2008. Respuesta del zooplancton en su estructura y dinámica a factores clave en una laguna arreica (pcia. de Buenos Aires). Tesis Doctoral 961. Facultad de Ciencias Naturales y Museo, UNLP.
- Arдохайн, D., H. Benítez, M. Claps & N. Gabellone. 2005. Estructura y dinámica de rotíferos planctónicos en dos lagunas pampásicas: similitudes y diferencias. *Biología Acuática* 22: 7-18.



- Arndt, H. 1993. Rotifers as predators on components of microbial web (bacteria, heterotrophic flagellates, ciliates) – a review. *Hydrobiologia* 255/256: 231–246.
- Baranyi, C., T. Hein, C. Holarek, S. Keckeis & F. Schiemer. 2002. Zooplankton biomass and community structure in a Danube River floodplain system: effects of hydrology. *Freshw. Biol.* 47: 473-482.
- Basu, B. K. & F. R. Pick. 1997. Phytoplankton and zooplankton development in a lowland, temperate river. *J. Plankton Res.* 19: 237-253.
- Bazzuri, M. E., N. A. Gabellone & L. C. Solari. 2010. Seasonal variation in the phytoplankton of a saline lowland river (Buenos Aires, Argentina) throughout an intensive sampling period. *River Res. Appl.* 26: 766–778.
- Bec, A., C. Desvillettes, A. Véra, D. Fontvieille & G. Bourdier. 2003. Nutritional value of different food sources for the benthic Daphnidae *Simocephalus vetulus*: role of fatty acids. *Arch. Hydrobiol.* 156: 145–163.
- Benider, A., A. Tifnouti & R. Pourriot. 2002. Growth of *Moina macrocopa* (Straus 1820) (Crustacea, Cladocera): Influence of trophic conditions, population density and temperature. *Hydrobiologia* 468: 1–11.
- Benítez, H. H. 2008. Estructura y dinámica del zooplancton de una laguna pampásica moderadamente eutrófica (San Miguel del Monte): factores de control. Tesis Doctoral 990. Facultad de Ciencias Naturales y Museo, UNLP.
- Benítez, H. H. & M. C. Claps. 2000. Zooplancton de una laguna pampásica (Monte) y su afluente (El Totoral). Caracterización estructural en un ciclo anual. *Diversidad y Ambiente* 1: 87-96.
- Benítez, H. H. & M. C. Claps. 2009. Distribución horizontal y vertical del zooplancton en un ciclo diario en el litoral de una laguna pampásica. *Biología Acuática* 26: 19-29.
- Benítez, H. H. & M. C. Claps. 2012. Estudio de migraciones del zooplancton en un lago somero: desarrollo de una nueva metodología a campo. *Biología Acuática* 27: 29-41
- Benndorf, J. 1990. Conditions for effective biomanipulation; conclusions derived from whole-lake experiments in Europe. *Hydrobiologia*, 200/201: 187–203.
- Benzie, J. A. H. 2005. Cladocera: the genus *Daphnia* (including *Daphniopsis*). Leiden, The Netherlands, Backhuys Publishers.





- Bertani, I., I. Ferrari & G. Rossetti. 2012. Role of intra-community biotic interactions in structuring riverine zooplankton under low-flow, summer conditions. *J. Plankton Res.* 34: 308-320.
- Bertolo, A. 1998. Etudes experimentales sur le role des poissons dans le fonctionnement des systemes pelagiques lacustres. Thèse de doctorat en Sciences biologiques et fondamentales appliqués, Université de Paris.
- Bertolo, A., G. Lacroix & F. Lescher-Moutoué. 1999. Scaling food chains in aquatic mesocosms: do the effects of depth override the effects of planktivory? *Oecologia* 121: 55-65.
- Beyerinck, M. W. 1890. Culturversuche mit Zoochlorellen, Lichenengonidien und anderen niederen Algen. *Botanische Zeitung.* 45: 726-788.
- Beyers, R. J. & H. Odum. 1993. *Ecological microcosms.* Springer Verlag.
- Bogdan, K. G. & J. J. Gilbert. 1987. Quantitative comparison of food niches in some freshwater zooplankton. *Oecologia* 72: 331-340.
- Boltovskoy A., A. Dippolito, M. Foggetta, N. Gómez & G. Álvarez. 1990. La laguna Lobos y su afluente: limnología descriptiva, con especial referencia al plancton. *Biología Acuática* 14: 3-38.
- Boveri, M. B. 2009. Interacciones tróficas en el ecosistema de las lagunas pampeanas: estudios experimentales en mesocosmos. Tesis Doctoral. Facultad de Agronomía, UBA.
- Boxshall, G. A. & D. Defaye. 2008. Global diversity of copepods (Crustacea: Copepoda) in freshwater. *Hydrobiologia* 595: 195-207.
- Brandl, Z. 1998. Feeding strategies of planktonic cyclopoids in lacustrine Ecosystems. *J. Marine Systems* 15: 87-95.
- Brandl, Z. 2005. Freshwater copepods and rotifers: predators and their prey. *Hydrobiologia* 546: 475-489.
- Brennan, L. & P. Owende. 2010. Biofuels from microalgae — A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renew. Sustainable Energy Rev.* 14: 557-577.
- Brett, M. T. & C. R. Goldman. 1997. Consumer versus resource control in freshwater pelagic food-webs. *Science* 275: 384-386.
- Brito, D., N. Milani & G. Pereira. 2006. Tasa de filtración e ingestión de *Simocephalus vetulus* (Müller, 1776) (Crustacea: Cladocera) alimentado con *Selenastrum capricornutum* Printz, 1914 y *Chlorella vulgaris* Beijerinck, 1890. *Interciencia* 31: 753-757.
- Brooks, J. L. & S. I. Dodson. 1965. Predation, body size, and composition of plankton. *Science* 150: 28-35.





- Burks, R. L., D. M. Lodge, E. Jeppesen & T. L. Lauridsen. 2002. Diel horizontal migration of zooplankton: costs and benefits of inhabiting the littoral. *Freshw. Biol.* 47: 343-365.
- Cabrera, M. I. 2008. Tasa de crecimiento poblacional del rotífero *Brachionus rotundiformis* (Rotifera: Brachionidae) en un quimiostato de dos cámaras. *Rev. Biol. Trop.* 56: 1149-1157.
- Campillo, S., E. M. García-Roger, D. Martínez-Torres & M. Serra. 2005. Morphological stasis of two species belonging to the L-morphotype in the *Brachionus plicatilis* species complex. *Hydrobiologia* 546:181-187.
- Cano, M., M. Casco, L. Solari, M. Mac Donagh, N. Gabellone & M. Claps. 2008. Implications of rapid changes in chlorophyll-a of plankton, epipelon, and epiphyton in a Pampean shallow lake: an interpretation in terms of a conceptual model. *Hydrobiologia* 614: 33-45.
- Caramujo M. J. & M. J. Boavida. 1999. Characteristics of the reproductive cycles and development times of *Copidodiaptomus numidicus* (Copepoda: Calanoida) and *Acanthocyclops robustus* (Copepoda: Cyclopoida). *J. Plankton Res.* 21: 1765-1778.
- Carmona, M. J., N. Dimas-Flores, J. Montero-Pau & M. Serra. 2011. Effect of experimental methodology on estimation of density at sex initiation in cyclically parthenogenetic rotifers. *Hydrobiologia* 662:131-139.
- Carpenter, S. R. 1996. Microcosm experiments have limited relevance for community and ecosystem ecology. *Ecology* 77: 677-680.
- Carpenter, S. R., J. J. Cole, J. R. Hodgson, J. F. Kitchell, M. L. Pace, D. Bade, K. L. Cottingham, T. E. Essington, J. N. Houser & D. E. Schindler. 2001. Trophic cascades, nutrients, and lake productivity: whole-lake experiments. *Ecol. Monogr.* 71: 163-186.
- Carrillo, P., I. Reche & L. Cruz-Pizarro. 1996. Intraspecific stoichiometric variability and the ratio of nitrogen to phosphorus resupplied by zooplankton. *Freshw. Biol.* 36:363-374.
- Casco, M. A., N. A. Gabellone, M. C. Claps & L. C. Solari. 2010. Las lagunas pampásicas de la cuenca del río Salado: orígenes, características físicas y ecológicas. Las posibilidades y riesgos de su uso. En: Gaviño Novillo, M. & R. Sarandón (Eds.). *La ecohidrología como desafío: experiencias y estudios de caso*. UNESCO. Documentos Técnicos del PHI-LAC, N°23: 7-18.
- Casper, A. F. & J. H. Thorp. 2007. Diel and lateral patterns of zooplankton distribution in the St. Lawrence River. *River Res. Applic.* 23: 73-85.





- Castañe, P. M., C. R. Loez, H. F. Olguín, A. Puig, M. G. Rovedatti, M. L. Topalián & A. Salibián. 1998. Caracterización y variación espacial de parámetros físico-químicos y del plancton en un río urbano contaminado (río Reconquista, Argentina). *Rev. Int. Contam. Ambient.* 14: 69-77.
- Chang K.-H. & T. Hanazato. 2003. Vulnerability of cladoceran species to predation by the copepod *Mesocyclops leuckarti*: laboratory observations on the behavioural interactions between predator and prey. *Freshw. Biol.* 48: 476-484.
- Chang, K. H., Doi, H., Y. Nishibe & S. I. Nakano. 2010. Feeding habits of omnivorous *Asplanchna*: comparison of diet composition among *Asplanchna herricki*, *A. priodonta* and *A. girodi* in pond ecosystems. *J. Limnol.* 69: 209-216
- Chaparro, G. N. 2013. Influencia del nivel hídrico y de la macrofitia en los patrones espaciales y temporales del zooplancton de una laguna de inundación. Tesis 5305, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA.
- Chinnasamy, S., A. Bhatnagar, R. Hunt & K. C. Das. 2010. Microalgae cultivation in a wastewater dominated by carpet mill effluents for biofuel applications. *Bioresource Technol.* 101: 3097-3105.
- Chisti, Y. 2007. Biodiesel from microalgae. *Biotechnol. Adv.* 25:294-306.
- Ciros-Pérez, J., A. Gómez & M. Serra. 2001. On the taxonomy of three sympatric sibling species of the *Brachionus plicatilis* (Rotifera) complex from Spain, with the description of *B. ibericus* n. sp. *J. Plankton Res.* 23: 1311-1328.
- Cisneros, R. 2011. Growth performance of the native rotifer *Brachionus* sp. "Cayman" using different enrichment supplements. *Ecología Aplicada* 10: 99-105.
- Claps M., H. Benítez & N. Gabellone. 2002. Vertical distribution of zooplankton in a pampasic shallow lake (Argentina). *Verh. Inter. Ver. Limnol.* 28: 1032-1036.
- Claps M. C., N. A. Gabellone & H. H. Benítez. 2004. Zooplankton biomass in an eutrophic shallow lake (Buenos Aires, Argentina): spatiotemporal variations. *Ann. Limnol. Int. J. Lim.* 40: 201-210.
- Claps, M., N. Gabellone & N. Neschuk. 2009. Influence of regional factors on zooplankton structure in a saline lowland river: the Salado River (Buenos Aires province, Argentina). *River. Res. Applic.* 25: 453-471.
- Claps M. C., N. A. Gabellone & H. H. Benítez. 2011. Seasonal changes in the vertical distribution of rotifers in a eutrophic shallow lake with contrasting states of clear and turbid water. *Zool. Studies* 50: 454-465.





- Converti, A., A. A. Casazza, E. Y. Ortiz, P. Perego & M. Del Borghi. 2009. Chemical engineering and processing: process intensification. *Chem. Engin. Process.* 48: 1146-1151.
- Cordova, S. E., J. Giffin & K. Kirk. 2001. Food limitation of planktonic rotifers: field experiments in two mountain ponds. *Freshw. Biol.* 46: 1519-1527.
- Crease, T. J., A. R. Omilian, K. S. Costanzo, D. J. Taylor. 2012. Transcontinental phylogeography of the *Daphnia pulex* species complex. *PLoS ONE* 7: e46620.
- Cryer, M. & C. R. Townsend. 1989. Generation time of *Acanthocyclops robustus* in relation to food availability and temperature in a shallow eutrophic lake. *Hydrobiologia* 182: 93-91.
- Czeczuga, B., M. Kozłowska & B. Kiziewicz. 2003. Effect of various types of phytoplankton on fertility, egg size and duration of postembryonic growth of a few plankton representatives of Cladocera (Crustacea). *Polish J. Environm. Studies* 12: 545-555.
- Davidson Jr., N. L., W. E. Kelso & D. Allen Rutherford. 2000. Characteristics of cladoceran and copepod communities in floodplain habitats of the Atchafalaya River Basin. *Hydrobiologia* 435: 99-107, 2000.
- De Bie, T., S. Declerck, K. Martens, L. De Meester & L. Brendonck. 2008. A comparative analysis of cladoceran communities from different water body types: patterns in community composition and diversity. *Hydrobiologia* 597:19-27
- De Pauw, N., J. Morales & G. Persoone. 1984. Mass culture of microalgae in aquaculture systems: Progress and constrains. *Hydrobiologia* 116-117: 121-134.
- DeMott, W. R. 1988. Discrimination between algae and artificial particles by freshwater and marine copepods. *Limnol Oceanogr.* 33: 397-408.
- DeMott, W. R. 1989. The role of competition in zooplankton succession. En: Sommer, U. (Ed.). *Plankton Ecology: Succession in plankton communities.* Springer Verlag.
- Deng, D.-G., Ying, J., Ming, L. & L-X. Yuan. 2006. Effect of temperature and food concentration on the growth and reproduction of *Simocephalus vetulus*. *Acta Hydrobiol. Sinica* 30: 298-303.
- Dhanker, R., R. Kumar, L-C. Tseng & J.-S. Hwang. 2013. Ciliate (*Euplotes* sp.) predation by *Pseudodiaptomus annandalei* (Copepoda: Calanoida) and the effects of mono-algal and pluri-algal diets. *Zool. Studies* 52:34-.





- Dickerson, K. D., K. A. Medley & J. E. Havel. 2010. Spatial variation in zooplankton community structure is related to hydrologic flow units in the Missouri River, USA. *River Res. Applic.* 26: 605–618.
- Diéguez, M. & J. J. Gilbert. 2002. Suppression of the rotifer *Polyarthra remata* by the omnivorous copepod *Tropocyclops extensus*: predation or competition. *J. Plankton Res.* 24: 359–369.
- Diovisalvi, N., G. Berasain, F. Unrein, D. Colautti, P. Fermani, M.E. Llamas, A. M. Torremorell, L. Lagomarsino, G. Pérez, R. Escaray, J. Bustingorry, M. Ferraro & H. Zagarese. 2010. Chascomús: estructura y funcionamiento de una laguna pampeana turbia. *Ecología Austral* 20: 115-127.
- Dippolito, A., D. M. Ardohain, M. C. Claps & N. A. Gabellone. 2010. Muestreo intensivo del zooplancton en el sector inferior del río Salado (Bs. As.) durante la ejecución de una obra hidráulica. *Biología Acuática* 26: 229-239.
- Dodson, S. I. 1974. Zooplankton competition and predation: an experimental test of the size-efficiency hypothesis. *Ecology* 55: 605–613.
- Dodson, S. I. 1992. Predicting crustacean zooplankton species richness. *Limnol. Oceanogr.* 37: 848–856
- Dodson, S. I. & D. G. Frey. 2001. Cladocera and other Branchiopoda. Capítulo 21: 849 – 913. En: Thorpe, J. & A. Covich (Eds.). *Ecology and Classification of North American Freshwater Invertebrates*. 2nd edition.
- Dokulil, M. & K. Teubner. 2003: Eutrophication and restoration of shallow lakes – the concept of stable equilibria revisited. *Hydrobiologia* 506-509: 29-35.
- Dole-Olivier M. J., D. M. Galassi, P. Marmonier & M. Creuzé des Châtelliers. 2000. The biology and ecology of lotic microcrustaceans. *Freshw. Biol.* 44: 63-91.
- Drake, J. A., G. R. Huxel & C. L. Hewitt. 1996. Microcosms as models for generating and testing community theory. *Ecology* 73: 670-677.
- Duggan, I. C. 2001. The ecology of periphytic rotifers. *Hydrobiologia* 446/447: 139–148
- Duggan, I. C., K. V. Robinson, C. W. Burns, J. C. Banks & I. D. Hogg. 2012. Identifying invertebrate invasions using morphological and molecular analyses: North American *Daphnia 'pulex'* in New Zealand fresh waters. *Aquatic Invasions* 7: 585–590.
- Dumont, H.J. & S. S. S. Sarma. 1995. Demography and population growth of *Asplanchna girodi* (Rotifera) as a function of prey (*Anuraeopsis fissa*) density. *Hydrobiologia* 306: 97-107.





- Dumont, H. J., I. van de Velde & S. Dumont. 1975. The dry weight estimate of biomass in a selection of Cladocera, Copepoda and Rotifera from the plankton, periphyton and benthos of continental waters. *Oecologia*, 19: 75-97.
- Dur, G., S. Souissi, F. Schmitt, S-H Cheng & J. S Hwang. 2010. The different aspects in motion of the three reproductive stages of *Pseudodiaptomus annandalei* (Copepoda, Calanoida). *J. Plankton Res.* 32: 423-440.
- Echaniz, S. A. & A. M. Vignatti. 2002. Variación anual de la taxocenosis de cladóceros planctónicos (Crustacea: Branchiopoda) de una laguna de elevada salinidad (La Pampa, Argentina). *Neotrópica* 48: 11-17.
- Echaniz, S. A., A. M. Vignatti & P. C. Bunino. 2008. El zooplancton de un lago somero hipereutrófico de la región central de Argentina: cambios después de una década. *Biota Neotrop.* 8: 63-71.
- Echaniz, S., A. Vignatti, J. C. Paggi & S. José de Paggi. 2005. Riqueza y composición del zooplancton de lagunas saladas de Argentina. *Rev. FABICIB* 9: 25-39.
- Echaniz, S. A., G. C. Cabrera, P. L. Aliaga & A. M. Vignatti. 2013. Variation in zooplankton and limnological parameters in a saline lake of La Pampa, Central Argentina, during an annual cycle. *International J. Ecosystem* 3: 72-81.
- Echaniz, S., A. Vignatti, S. José de Paggi, J. Paggi, & A. Pilati. 2006. Zooplankton seasonal abundance of south american saline shallow lakes. *Internat. Rev. Hydrobiol.* 91: 86-100.
- Elmoor-Loureiro, L. M. A., L. Mendonça-Galvão & C. Padovesi-Fonseca. 2004. New cladoceran records from Lake Paranoá, Central Brazil. *Braz. J. Biol.*, 64: 415-422.
- Elmoor-Loureiro, L. M. A., J. M. Santangelo, P. M. Lopes & R. L. Bozelli. 2010. A new report of *Moina macrocopa* (Straus, 1820) (Cladocera, Anomopoda) in South America. *Braz. J. Biol.* 70: 225-226.
- Elser, J. J. & J. Urabe. 1999. The stoichiometry of consumer-driven nutrient recycling: theory, observations, and consequences. *Ecology* 82:898-903
- Elser, J. J., K. Hayakawa & J. Urabe 2001. Nutrient limitation reduces food quality for zooplankton: *Daphnia* response to seston phosphorus enrichment. *Ecology*, 82: 898-903
- Embleton, K. E., C. E. Gibson & S. I. Heaney. 2003. Automated counting of phytoplankton by pattern recognition: a comparison with a manual counting method. *J. Plankton Res.* 25: 669-681.





- Environmental Protection Agency. 1985. Methods for measuring the acute toxicity of effluents to freshwater and marine organisms. En: Peltier, W. H. & C. I. Weber (Eds.). EPA-600/485-013. Washington, D.C., USA.
- Esparcia, A., M. R. Miracle & M. Serra. 1989. *Brachionus plicatilis* tolerance to low oxygen concentrations. *Hydrobiologia* 186/187: 331-337.
- Fernández-Araiza, M. A., S. S. S. Sarma & S. Nandini. 2005. Combined effects of food concentration and temperature on competition among four species of *Brachionus* (Rotifera). *Hydrobiologia* 546: 519-534.
- Ferrando, N. S. H. H. Benítez, N. A. Gabellone, M. C. Claps & P. R. Altamirano. A quick and effective estimation of *Chlorella vulgaris* density by turbidity measurement. *Limnetica* (en prensa)
- Ferrão-Filho, A. S., W. R. Demott & A. J. Tessier. 2005. Responses of tropical cladocerans to a gradient of resource quality. *Freshw. Biol.* 50: 954-964.
- Feuchtmayr, H. 2004. Mesozooplankton impacts on lower trophic levels from freshwater, marine and brackish systems in spring – a comparative study. Thesis Universität Kiel.
- Fielder, D.S., J. Purser & S. C. Battaglione. 2000. Effect of rapid changes in temperature and salinity on availability of the rotifers *Brachionus rotundiformis* and *Brachionus plicatilis*. *Aquaculture* 189: 85-99.
- Flores-Burgos, J., S. S. S. Sarma & S. Nandini. 2003 Population growth of zooplankton (rotifers and cladocerans) fed *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus acutus* in different proportions. *Acta Hydrochim. Hydrobiol.* 31: 240-248.
- Fontanarrosa, M. S., G. Chaparro, P. de Tezanos Pinto, P. Rodríguez & I. O' Farrell. 2010. Zooplankton response to shading effects of free-floating plants in shallow warm temperate lakes: a field mesocosm experiment. *Hydrobiologia* 646: 231-242
- Forró, L., N. Korovchinsky, A. Kotov, & A. Petrusek. 2008. Global diversity of cladocerans (Cladocera; Crustacea) in freshwater. *Hydrobiologia* 595: 177-184.
- Frisch, D. 2002. Dormancy, dispersal and the survival of cyclopoid copepods (Cyclopoida, Copepoda) in a lowland floodplain. *Freshw. Biol.* 47: 1269-1281.
- Frutos, S. M. 1998. Densidad y diversidad del zooplancton en los ríos Salado y Negro – planicie del río Paraná – Argentina. *Rev. Brasil. Biol.* 58: 431-444.





- Frutos, S. M. & R. Carnevali. 2008. Zoo-heloplankton structure in three artificial ponds of North-eastern Argentina. *Rev. Biol. Trop.* 56: 1135-1147.
- Frutos, S. M.; A. S. G. Poi de Neiff & J. J. Neiff. 2006. Zooplankton of the Paraguay River a comparison between sections and hydrological phases. *Ann. Limnol.* 42: 277-288.
- Frutos, S. M., A. S. G. Poi de Neiff & J. J. Neiff. 2009. Zooplankton abundance and species diversity in two lakes with different trophic states (Corrientes, Argentina). *Acta Limnol. Bras.* 21: 367-375.
- Fryer, G. 1957. The food of some freshwater cyclopoid copepods and its ecological significance. *J. Animal Ecol.* 26: 263-286.
- Fussmann, G. 1996. The importance of crustacean zooplankton in structuring rotifer and phytoplankton communities; an enclosure study. *J. Plankton Res.* 18: 1897-1915.
- Gabellone N. A., L. Solari C. & M. C. Claps. 2001. Planktonic and physical-chemical dynamics of a markedly fluctuating backwater pond associated with a lowland river (Salado River, Buenos Aires, Argentina). *Lakes & Reservoirs* 6: 133-142.
- Gabellone, N., R. Sarandon & C. Claps. 2003. Caracterización y zonificación ecológica de la Cuenca del Río Salado: 87-122. En: Maiola, O., N. Gabellone & M. Hernández (Eds.). *Inundaciones en la región pampeana*. Ediciones Universidad Nacional de La Plata.
- Gabellone, N. A., L. Solari, M. Claps & N. Neschuk. 2008. Chemical classification of the water in a lowland river basin (Salado River, Buenos Aires, Argentina) affected by hydraulic modifications. *Environ. Geol.* 53: 1353-1363.
- Gabellone, N. A., M. C. Claps, L. C. Solari & N. C. Neschuk. 2005. Nutrients, conductivity and plankton in a landscape approach to a Pampean saline lowland river (Salado River, Argentina). *Biogeochemistry* 75: 455-477.
- Gabellone, N., M. Claps, L. Solari & N. Neschuk. 2010. Dinámica espacial y temporal de fracciones de fósforo en la cuenca del río Salado (Buenos Aires, Argentina). *Actas del I Congreso Internacional de Hidrología de Llanuras, Hacia la gestión integral de los recursos hídricos en zonas de llanura*: 641-646.
- Gabellone, N. A., M. C. Claps, D. M. Ardohain, A. Dippolito, M. E. Bazzuri & L. C. Solari. 2014. Relationship between the zoo- and phytoplankton biomasses





- in a saline lowland river (Argentina): a short-time-scale analysis. *Fundam. Appl. Limnol.* 184: 307-327.
- García-Chicote, J., C. Rojo & M. A. Rodrigo. 2007. Alimentación de *Acanthocyclops robustus*: Un caso de canibalismo. *Limnetica* 26: 265-276.
- García-Roger, E.M., A. Martínez & Manuel Serra. 2006. Starvation tolerance of rotifers produced from parthenogenetic eggs and from diapausing eggs: a life table approach. *J. Plankton Res.* 28: 257-265.
- Gilbert, J. J. 1980. Feeding in the rotifer *Asplanchna*: behavior, cannibalism, selectivity, prey defenses, and impact on rotifer communities: 158-172. En: Kerfoot, W. C. (Ed.). *Evolution and Ecology of zooplankton communities*. The University Press of New England.
- Gilbert, J. J. 1985. Competition between rotifers and *Daphnia*. *Ecology* 66: 1943-1950.
- Gilbert, J. J. 1988. Suppression of rotifer populations by *Daphnia*: a review of the evidence, the mechanisms, and the effects on zooplankton community structure. *Limnol. Oceanogr.* 33: 1286-1303.
- Gilbert, J. J. 1990. Differential effects of *Anabaena affinis* on cladocerans and rotifers: mechanisms and implications. *Ecology* 71: 1727-1740
- Gilbert, J. J. 1996. Effect of food availability on the response of planktonic rotifers to a toxic strain of the cyanobacterium *Anabaena flos-aquae*. *Limnol. Oceanogr.* 41: 1565-1572.
- Gilbert, J. J. 2002. Endogenous regulation of environmentally-induced sexuality in a rotifer: a multi-generational parental effect induced by fertilization. *Freshwat. Biol.* 47: 1633-1641
- Gilbert, J. J. 2003. Specificity of crowding response that induces sexuality in the rotifer *Brachionus*. *Limnol. Oceanogr.* 48: 1297-1303.
- Gilbert, J. J. 2013. The cost of predator-induced morphological defense in rotifers: experimental studies and synthesis. *J. Plankton Res.* 35: 461-472.
- Gilbert, J. J. & T. Schröder. 2004. Rotifers from diapausing, fertilized eggs: Unique features and emergence. *Limnol. Oceanogr.* 49: 1341-1354.
- Gliwicz, Z. M. 2002. On the different nature of top-down and bottom-up effects in pelagic food webs. *Freshw. Biol.* 47: 2296-2312.
- Gliwicz, Z. M. & C. Guisande. 1992. Family planning in *Daphnia*: resistance to starvation in offspring born to mothers grown at different food levels. *Oecologia* 91: 463-467.





- Goldsborough, L. G. & G. G. C. Robinson. 1996. Pattern in wetlands: 77–117.  
En: Stevenson, R. J., M. L. Bothwell & R. L. Lowe (Eds.). *Algal Ecology: Freshwater Benthic Ecosystems*. Academic Press, California.
- Gómez, A. & M. Serra. 1995. Behavioral reproductive isolation among sympatric strains of *Brachionus plicatilis* Müller 1786: insights into the status of this taxonomic species. *Hydrobiologia* 313/314: 111-119.
- Gómez, A. & T. W. Snell. 1996. Sibling species and cryptic speciation in the *Brachionus plicatilis* species complex (Rotifera). *J. Evol. Biol.* 9: 953–964.
- González Sagrario M. A. & E. Balseiro. 2002. Phytoplankton biomass control by zooplankton in a shallow lake of Argentine Pampa. *Verh. Internat. Verein. Limnol.* 28 1588–1592.
- González Sagrario M. A. & E. Balseiro. 2003. Indirect enhancement of large zooplankton by consumption of predacious macroinvertebrates by littoral fish. *Arch. Hydrobiol.* 158: 551-574.
- González Sagrario M. A., E. Balseiro, R. Ituarte & E. Spivak. 2009. Macrophytes as refuge or risky area for zooplankton: A balance set by littoral predacious macroinvertebrates. *Freshw. Biol.* 54: 1042-1053.
- Gosselain, V., L. Viroux & J.-P. Descy. 1998. Can a community of small-bodied grazers control phytoplankton in rivers? *Freshw. Biol.* 39: 9-24.
- Gribble, K. E., G. Jarvis, M. Bock & D. B. M. Welch. 2014. Maternal caloric restriction partially rescues the deleterious effects of advanced maternal age on offspring. *Aging Cell* 13: 623–630.
- Gross, E. M. 2003. Allelopathy of Aquatic Autotrophs. *Critical Reviews in Plant Sciences* 22:313-339
- Grover, J. P. & R. D. Holt. 1998. Disentangling resource and apparent competition: realistic models for plant-herbivore communities. *J. Th. Biol.* 191: 353-376.
- Guillard, R. R. L. 1978. Counting slides. En: Sournia, A. (Ed.). *Phytoplankton manual*, UNESCO, Paris.
- Gyllström, M. & L.-A. Hansson. 2004. Dormancy in freshwater zooplankton: Induction, termination and the importance of benthic-pelagic coupling. *Aquat. Sci.* 66: 274–295.
- Hagiwara, A. & A. Hino. 1989. Effect of incubation and preservation on resting egg hatching and mixis in the derived clones of the rotifer *Brachionus plicatilis*. *Hydrobiologia* 186/187: 415-421.
- Hairston, N. G. Jr, C. M. Kearns & D. R. Engstrom. 1995. Age and survivorship of diapausing eggs in a sediment egg bank. *Ecology* 76: 1706-1717.





- Hampton, S. E. & J. J. Gilbert. 2001. Observations of insect predation on rotifers. *Hydrobiologia* 446/447: 115–121.
- Hampton, S. E. & P. L. Starkweather. 1998. Differences in predation among morphotypes of the rotifer *Asplanchna silvestrii*. *Freshw. Biol.* 40: 595–605
- Han, B P., J. Yin, X. Lin & H. J. Dumont. 2011. Why is *Diaphanosoma* (Crustacea: Ctenopoda) so common in the tropics? Influence of temperature and food on the population parameters of *Diaphanosoma dubium*, and a hypothesis on the nature of tropical cladocerans. *Hydrobiologia* 668: 109–115.
- Hansen, B., T. Wernberg-Møller & L. Wittrup. 1997. Particle grazing efficiency and specific growth efficiency of the rotifer *Brachionus plicatilis* (Muller). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 215: 217–233.
- Hardy, E. R. & A. Duncan. 1994. Food concentration and temperature effects and life cycle characteristics of tropical Cladocera (*Daphnia gessneri* Herbst, *Diaphanosoma sarsi* Richard, *Moina reticulata* (Daday)): I Development time. *Acta Amazonica* 24: 119–134.
- Hart, R. C. 1996. Naupliar and copepodite growth and survival of two freshwater calanoids at various food levels: Demographic contrasts, similarities, and food needs. *Limnol. Oceanogr.* 41: 648–658.
- Havens, K. E. & J. R. Beaver. 2011. Composition, size, and biomass of zooplankton in large productive Florida lakes. *Hydrobiologia* 668: 49–60.
- HELCOM. 2001. Manual for Marine Monitoring in the COMBINE Programme of HELCOM.
- Held, P. 2011. Monitoring of Algal Growth Using their Intrinsic Properties. *Biofuel Res. Rev. Vermont*.
- Hillbricht-Ilkowska, A. 1977. Trophic relations and energy flow in pelagic plankton. *Pol. Ecol. Stud.* 3: 3–98.
- Hirayama K. & S. Ogawa, 1972. Fundamental studies on physiology of rotifer for its mass culture I. Filter feeding of rotifer. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.* 38: 1207–1214.
- Hobaek, A., M. Manca & T. Andersen. 2002. Factors influencing species richness in lacustrine zooplankton. *Acta Oecol.* 23: 155–163.
- Holst, H., H. Zimmermann-Timm & H. Kausch. 2002. Longitudinal and transverse distribution of plankton rotifers in the potamal of the River Elbe (Germany) during late summer. *Internat. Rev. Hydrobiol.* 87: 267–280.





- Horppila, J. & I. Nurminen. 2001. The effect of an emergent macrophyte (*Typha angustifolia*) on sediment resuspension in a shallow north temperate lake. *Freshw. Biol.* 46: 1447–1455.
- Hotos, G. N. 2003. Growth, filtration and ingestion rate of the rotifer *Brachionus plicatilis* fed with large (*Asteromonas gracilis*) and small (*Chlorella* sp.) celled algal species. *Aquaculture Res.* 34: 793-802.
- Huston, M. A. 1999. Microcosm experiments have limited relevance for community and ecosystem ecology: synthesis of comments. *Ecology* 80: 1083-1089.
- Hutchinson, G. E. 1961. The paradox of the plankton. *Amer. Natur.* 95: 137–145.
- Hwang, J-S. & J. R. Strickler. 2001. Can copepods differentiate prey from predator hydromechanically? *Zool. Studies* 40: 1-6.
- Javanmardian, M. & B.O. Paissou. 1992. Continuous photoautotrophic cultures of the eukaryotic alga *Chlorella vulgaris* can exhibit stable oscillatory dynamics. *Biotechnol. Bioengineering* 39:487-497.
- Jeppesen, E., P. Kristensen, J. P. Jensen, M. Sondergaard, E. Mortensen & T. Lauridsen. 1991. Recovery resilience following a reduction in external phosphorus loading of shallow, eutrophic, Danish lakes: duration, regulating factors and methods for overcoming resilience. *Mem. Ist. Ital. Idrobiol.* 48: 127-148.
- Jeppesen, E., J. P. Jensen, M. Sondergaard, T. Lauridsen, L. J. Pedersen & L. Jensen. 1997. Top-down control in freshwater lakes: the role of nutrient state, submerged macrophytes and water depth. *Hydrobiologia* 342/343: 151–164.
- Jeppesen, E., M. Søndergaard, J. P. Jensen, K. E. Havens, O. Anneville, L. Carvalho, M. F. Coveney, R. Deneke, M. T. Dokulil, B. Foy, D. Gerdeaux, S. E. Hampton, S. Hilt, K. Kangur, J. Köhler, E. H. H. R. Lammens, T. L. Lauridsen, M. Manca, M. R. Miracle, B. Moss, P. Nöges, G. Persson, G. Phillips, R. Portielje, C. L. Schelske, D. Straile, I. Tatrai, E. Willén & M. Winder. 2005. Lake responses to reduced nutrient loading: an analysis of contemporary long-term data from 35 case studies. *Freshw. Biol.* 50: 1747–1771.
- Joaquim-Justo, C., C. Detry, F. Cauffman & J. P. Thomé. 2004. Feeding of planktonic rotifers on ciliates: a method using natural ciliate assemblages labelled with fluorescent microparticles. *J. Plankton Res.* 26:1289-1299
- José de Paggi, S. 1990. Ecological and biogeographical remarks on the rotifer fauna of Argentina. *Rev. Biol. Trop.* 23: 297-311.





- José de Paggi, S. 1993. Composition and seasonality of planktonic rotifers in limnetic and littoral regions of a floodplain lake (Paraná River System). *Rev. Hydrobiol. trop.* 26: 53-63.
- José de Paggi, S. 1996. Rotifera (Monogononta) diversity in subtropical waters of Argentina. *Annls. Limnol.* 32: 209-220.
- José de Paggi, S. & J. C. Paggi. 1998. Zooplankton de ambientes acuáticos con diferentes estados tróficos y salinidad. *Neotropica* 44: 95-106.
- Juárez, J. & A. Villagra de Gamundi. 2007. Bioensayos preliminares para evaluar la toxicidad del lindano sobre *Simocephalus vetulus* (O.F. Müller, 1776) (Crustacea: Cladocera). *Rev. Perú Biol.* 14: 65-67.
- Jung, M.-m. 2011. Characterization of a unique new strain named the NFRDI N° 1 rotifer strain, a brackish *Brachionus* rotifer collected from a South Korea coastal lagoon. *Fish. Aquat. Sci.* 14: 333-337.
- Kak, A. & T. R. Rao, 1998. Does the evasive behavior of *Hexarthra* influence its competition with cladocerans? *Hydrobiologia* 387/388: 409-419.
- Kaminski, S. M., J. G. F. Bersano & W. J. A. Amaral. 2009. Efeitos da salinidade e dieta alimentar sobre os copépodes *Pseudodiaptomus richardi* e *Notodiaptomus incompositus* em estudos de laboratório. *Braz. J. Aquat. Sci. Technol.* 13: 25-36.
- Kappes, H., C. Mechenich & U. Sinsch. 2000. Long-term dynamics of *Asplanchna priodonta* in Lake Windsborn with comments on the diet. *Hydrobiologia*, 432: 91-100.
- Kim, H-J. & A. Hagiwara. 2011. Effect of female aging on the morphology and hatchability of resting eggs in the rotifer *Brachionus plicatilis* Müller. *Hydrobiologia* 662:107-111.
- King, C. E. 1967. Food, Age, and the Dynamics of a Laboratory Population of Rotifers. *Ecology* 48: 111-128.
- Kirk, K. L. 2002. Competition in variable environments: experiment with planktonic rotifers. *Freshw. Ecol.* 47: 1089-1096.
- Kirk, K. L. & J. J. Gilbert. 1990. Suspended clay and the population dynamics of planktonic rotifers and cladocerans. *Ecology* 71:1741-1755
- Kirk, K. L., J. Ellis & J. Taylor. 1999. Physiological responses to variable environments: storage and respiration in starving rotifers. *Freshw. Biol.* 42: 637-644.
- Koste, W. 1978. Rotatoria. Die Rädertiere Mitteleuropas. Bestimmungswerk begründet von Max Voigt. Borntraeger: Berlin, Stuttgart.





- Kotani, T. & A. Hagiwara. 2003. Fertilization between rotifer *Brachionus plicatilis* strains at different temperatures. *Fisheries Science* 69: 1078–1080.
- Kotani, T., A. Hagiwara, T. W. Snell & M. Serra. 2005. Euryhaline *Brachionus* strains (Rotifera) from tropical habitats: morphology and allozyme patterns. *Hydrobiologia* 546: 161–167.
- Kuczyńska-Kippen, N. & B. Nagengast. 2003. The impact of the architecture of macrophytes on the spatial structure of zooplankton of the Wielkowiejskie Lake. *Roczniki AR w Poznaniu CCCLIV, Bot.* 6: 121–129.
- Kumar, R. 2003. Effect of *Mesocyclops thermocyclopoides* (Copepoda, Cyclopoida) predation on population dynamics of different prey: a laboratory study. *J. Freshw. Ecol.* 18: 383–393.
- Kumar, R. & T. R. Rao, 2001. Effect of the cyclopoid copepod *Mesocyclops thermocyclopoides* on the interactions between the predatory rotifer *Asplanchna intermedia* and its prey *Brachionus calyciflorus* and *B. angularis*. *Hydrobiologia* 453/454: 261–268.
- Kumar, R. & J. S. Hwang. 2008. Ontogenetic Shifts in the Ability of the Cladoceran, *Moina macrocopa* Straus and *Ceriodaphnia cornuta* Sars to Utilize Ciliated Protists as Food Source. *Internat. Rev. Hydrobiol.* 93: 284–296.
- Lair, N. 2006. A review of regulation mechanisms of metazoan plankton in riverine ecosystems: aquatic habitat versus biota. *River Res. Applic.* 22: 567–593.
- Lampert, W. & U. Sommer. 1997. *Limnoecology: The Ecology of Lakes and Streams*. Oxford University Press, New York.
- Lapesa, S., T. W. Snell, D. M. Fields & M. Serra. 2002. Predatory interactions between a cyclopoid copepod and three sibling rotifer species. *Freshw. Biol.* 47: 1685–1695
- Lauridsen, T. L., E. Jeppesen, S. F. Mitchell, D. M. Lodge & R. L. Burks. 1999. Diel variation in horizontal distribution of *Daphnia* and *Ceriodaphnia* in oligotrophic and mesotrophic lakes with contrasting fish densities. *Hydrobiologia* 408/409: 241–250.
- Lee, C. & B. Palsson. 1994. High-density algal photobioreactors using light emitting diodes. *Biotechnol. Bioengin.* 44:1161-1167.
- Lemke, A. M. & A. C. Benke. 2003. Growth and reproduction of three cladoceran species from a small wetland in the south-eastern U.S.A. *Freshw. Biol.* 48: 589–603.





- Liu, H., P. Xie, F. Chen, H. Tang & L. Xie. 2002. Enhancement of planktonic rotifers by *Microcystis aeruginosa* blooms: an enclosure experiment in a shallow eutrophic lake. *J. Freshwat. Ecol.* 17: 239-248.
- Llames, M. E., L. Lagomarsino, N. Diovisalvi, P. Fermani, A. M. Torremorell, G. Pérez, F. Unrein, J. Bustingorry, R. Escaray, M. Ferraro & H. E. Zagarese. 2009. The effects of light availability in shallow, turbid waters: a mesocosm study. *J. Plankton Res.* 31: 1517-1529.
- Lonsdale, D. J., M. A. Frey & T. W. Snell. 1998. The role of chemical signals in copepod reproduction. *J. Marine Systems* 15: 1-12.
- Loureiro, C., J. L. Pereira, M. A. Pedrosa, F. Gonçalves & B. B. Castro. 2013. Competitive outcome of *Daphnia-Simocephalus* experimental microcosms: salinity versus priority effects. *PLoS ONE* 8(8): e70572.
- Lubzens, E., G. Minkoff & S. Marom. 1985. Salinity dependence of sexual and asexual reproduction in the rotifer *Brachionus plicatilis*. *Marine Biol.* 85: 123-126.
- Lubzens, E., O. Zmora & Y. Barr. 2001. Biotechnology and aquaculture of rotifers. *Hydrobiologia* 446/447:337-353.
- Lund, J. W. G., C. Kipling & E. D. Le Cren. 1958. The inverted microscope method of estimating algal numbers and the statistical basis of estimations by counting. *Hydrobiologia* 11: 143-170.
- Lynch, M. 1980. The evolution of cladoceran life histories. *Quat. Rev. Biol.* 55: 23-42.
- Lynch, M. 1989. The life history consequences of resource depression in *Daphnia pulex*. *Ecology* 70: 246-256.
- Manisha, S.C.A. 2007. Growth, survival and reproduction in *Chlorella vulgaris* and *C. variegata* with respect to culture age. *Folia Microbiologica* 52: 399-406.
- Marinone M. C. & H. E. Zagarese. 1991. A field and laboratory study on factors affecting polymorphism in the rotifer *Keratella tropica*. *Oecologia* 86: 372-377.
- Martínez Jerónimo, F., J. Rodríguez Estrada & R. Villaseñor Córdova. 2007. Effect of culture density and volume on *Moina micrura* (Kurz, 1874) reproduction, and sex ratio in the progeny *Hydrobiologia* 594: 69-73.
- Martínez, G. 1999. Estrategias de alimentación de tres especies del zooplancton límnic (Cladocera). *Rev. Chilena Hist. Nat.* 72: 671-676,





- Martínez, G., 2000. Conducta alimentaria de *Daphnia ambigua* Scourfield 1947, *Moina micrura* Kurz 1874 y *Ceriodaphnia dubia* Richard 1895 (Cladocera:) frente a un gradiente de alimento. Rev. Chil. Hist. Nat. 73: 47-54.
- Martínez, G. & Montecino, V. 2000. Competencia en Cladocera: implicancias de la sobreposición en el uso de los recursos tróficos. Rev. Chil. Hist. Nat. 73: 787-795.
- Mata, T. M., A. A. Martins & N. S. Caetano. 2010. Microalgae for biodiesel production and other applications. Renew. Sust. Energy Rev. 14: 217-232.
- Matveev V.F., C.C. Martínez & S.M. Frutos. 1989. Predator-prey relationships in subtropical zooplankton: water mite against cladocerans in an Argentine lake. Oecologia 79: 489-495.
- Mayeli, S. M., S. Nandini & S. S. S Sarma. 2004. The efficacy of morphology as defense mechanism against grazing by selected species of rotifers and cladocerans. Aquat. Ecol. 38: 515-524.
- Mazziotti, C. & M. R. Vadrucci. 2007. Methodological aspects of phytoplankton analysis in transitional waters. Transit. Waters Bull. 3: 9-12.
- McCarthy, V., I. Donohue & K. Irvine. 2006. Field evidence for stoichiometric relationships between zooplankton and N and P availability in a shallow calcareous lake. Freshw. Biology 51:1589-1604.
- McCauley, E. 1984. The estimation of the abundance and biomass of zooplankton in samples: 228-265. En: Downing J. & F. Rigler (Eds.). A manual on methods for the assessment of secondary productivity in fresh waters. Blackwell Scientific Publications.
- McCauley, E. & J. Kalff. 1981. Empirical relationships between phytoplankton and zooplankton biomass in lakes. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 38: 458-463
- Meijer, M. L. & H. Houser, 1997. Effects of biomanipulation in the large and shallow Lake Wolderwijd, The Netherlands. Hydrobiologia 342-343: 335-349
- Meijer. M. L., I de Boois, M. Scheffer, R. Portielje & H. Houser. 1999. Biomanipulation in shallow lakes in The Netherlands: an evaluation of 18 case studies. Hydrobiologia 408-409: 13-30
- Merriman, J. & K. L. Kirk. 2000. Temporal patterns of resource limitation in natural populations of rotifers. Ecology 81: 141-149.
- Miracle, M. R. & M. Serra. 1989. Salinity and temperature influence in rotifer life history characteristics. Hydrobiologia 186/187: 81-102





- Miretzky, P., V. Conzonno & A. Fernández Cirelli. 2000. Hydrochemistry of pampasic ponds in the lower stream bed of Salado River drainage basin, Argentina. *Environ. Geol.* 39: 951-956.
- Mitra, A. & K. J. Flynn. 2005. Predator-prey interactions: is “ecological stoichiometry” sufficient when good food goes bad? *J. Plankton Res.* 27: 393-399
- Modenutti, B. E. 1987a. Caracterización y variación espacial del zooplancton del arroyo Rodríguez (prov. de Buenos Aires). *An. Inst. Cienc. del Mar y Limnol.* 14: 21-28.
- Modenutti, B. E. 1987b. Variaciones en la diversidad del zooplancton del Arroyo Rodríguez (Prov. de Buenos Aires). *Rev. Asoc. Cs. Nat. Litoral* 18: 61-70.
- Modenutti, B. E. 1991. Zooplancton de ambientes lóticos de la subcuenca Delta del río Paraná, Buenos Aires, Argentina. *Iheringia Serie Zoologia* 71: 67-80.
- Modenutti, B. E. 1998. Planktonic rotifers of Samborombón river basin (Argentina). *Hydrobiologia* 387/388: 259-265.
- Modenutti, B. E. & M. C. Claps. 1988. Monogononta rotifers from plankton and periphyton of Pampasic lotic environments. *Limnologica* 19: 167-175.
- Morales-Ventura, J., S. Nandini, S. S. S. Sarma & M. Castellanos-Paez. 2012. Demography of zooplankton (*Anuraeopsis fissa*, *Brachionus rubens* and *Moina macrocopa*) fed *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus acutus* cultured on different media. *Rev. Biol. Trop.* 60: 955-965.
- Nandini, S. & S. S. S. Sarma. 2000. Lifetable demography of four cladoceran species in relation to algal food (*Chlorella vulgaris*) density. *Hydrobiologia* 435: 117-126.
- Nandini, S. & S. S. S. Sarma. 2002a. Competition between the Rotifers *Brachionus patulus* and *Euchlanis dilatata*: Effect of Algal Food Level and Relative Initial Densities of Competing Species. *Russian J. Ecol.* 33: 291-295.
- Nandini, S. & S. S. S. Sarma. 2002b. Competition between *Moina macrocopa* and *Ceriodaphnia dubia*: a life table demography study. *Internat. Rev. Hydrobiol.* 87: 85-95.
- Nandini, S. & S. S. S. Sarma. 2003. Population growth of some genera of cladocerans (Cladocera) in relation to algal food (*Chlorella vulgaris*) levels. *Hydrobiologia* 491: 211-219.
- Nandini, S., S. S. S. Sarma & T. R. Rao. 1998. Effect of co-existence on the population growth of rotifers and cladocerans. *Russian J. Ecol.* 7: 1-10.





- Nandini, S., S. S. S. Sarma & M. D. Hurtado-Bocanegra. 2002. Effect of four species of cladocerans (Crustacea) on the population growth of *Brachionus patulus* (Rotifera). *Acta Hydrochim. Hydrobiol.* 30: 101–107.
- Nandini, S., R. Pérez-Chávez & S. S. S. Sarma. 2003. The effect of prey morphology on the feeding and population growth of the predatory *Asplanchna sieboldii*: a case study using of *Brachionus* (Rotifera). *Freshw. Biol.* 48: 2131–2140.
- Nandini, S., C. Enríquez-García & S. S. S. Sarma. 2007. A laboratory study on the demography and competition of three species of littoral cladocerans from Lake Huetzalin, Xochimilco, Mexico. *Aquat. Ecol.* 41: 547-556.
- Navarro, N. & M. Yúfera. 1998. Influence of the food ration and individual density on production efficiency of semicontinuous cultures of *Brachionus*-fed microalgae dry powder. *Hydrobiologia* 387/388: 483–487.
- Neschuk, N. 2001. *Limnología del Río Salado (Buenos Aires) y el uso de la tierra en su cuenca*. Tesis Doctoral 767. Facultad de Ciencias Naturales y Museo, UNLP.
- Neschuk, N., M. Claps & N. Gabellone. 2002a. Planktonic rotifers of a saline lowland river (Salado River, Argentina). *Ann. Limnologie, Int. J. Limnol.* 38: 191–198.
- Neschuk, N., N. Gabellone & L. Solari. 2002b. Plankton characterization of a lowland river (Salado River, Argentina). *Verh. Internat. Verein. Limnol.* 28: 1336-1339.
- Nichols, H. W. 1973. Growth media - freshwater. En: J. R. Stein (Ed.). *Handbook of Phycological methods and growth measurements*. Cambridge University Press
- Nogrady, T. & H. Segers. 2002. Rotifera. Volume 6: Asplanchnidae, Gastropodidae, Lindiidae, Microcodidae, Synchaetidae, Trochosphaeridae and Filinia. En: Dumont, H. (Coord. Ed.). *Guides to the identification of the Microinvertebrates of the Continental Waters of the World* 18. Backhuys Publishers.
- Nogrady, T., R. L. Wallace, & T. Snell. 1993. Rotifera. Volume 1: Biology, Ecology and Systematics. En: Dumont, H. (Coord. Ed.). *Guides to the identification of the Microinvertebrates of the Continental Waters of the World* 4. SPB Academic Publishing.
- O'Donnell, D. R. S., B. Fey & K. L. Cottingham. 2013. Nutrient availability influences kairomone-induced defenses in *Scenedesmus acutus* (Chlorophyceae). *J. Plankton Res.* 35: 191-200.





- Ohmori, F., G. Kaneko, T. Saito & S. Watabe. 2011. A novel growth-promoting protein in the conditioned media from the rotifer *Brachionus plicatilis* at an early exponential growth phase. *Hydrobiologia* 667:101–117.
- Olguín, H. F., A. Puig, C. R. Loez, A. Salibian, M. L. Topalián, P. M. Castané & M. G. Rovedatti. 2004. An integration of water physicochemistry, algal, bioassays, phytoplankton and zooplankton for ecotoxicological assessment in a highly polluted lowland river. *Water Air Soil Poll.* 155: 355–381.
- Olivier, S. 1961. Estudios limnológicos en la laguna Vitel (Pdo. Chascomús-Buenos Aires-Arg.). *Agro* 6: 1-128.
- Ooms Wilms, A., G. Postema & R. Gulati. 1999. Population dynamics of planktonic rotifers in Lake Loosdrecht, the Netherlands, in relation to their potential food and predators. *Freshwat. Biol.* 42: 77-97.
- Orlova-Bienkowskaja, M. J. 1998. A revision of the cladoceran genus *Simocephalus* (Crustacea, Daphniidae). *Bul. Nat. Hist. Mus. Zool.* 64: 1-62.
- Ortiz Moreno, M. L., C. E. Cortés Castillo, J. Sánchez Villarraga, J. Padilla & A. M. Otero Paternina. 2012. Evaluación del crecimiento de la microalga *Chlorella sorokiniana* en diferentes medios de cultivo en condiciones autotróficas y mixotróficas. *Orinoquia* 16: 11-20.
- Özdemir, N. & A. Çiltaş. 2010. The effect of caloric restriction on the population density of freshwater rotifers (*Brachionus calyciflorus*). *Turk. J. Zool.* 34: 377-383.
- Pagano, M., L. Saint-Jean, R. Arfi, M. Bouvy & H. Shep. 2000. Population growth capacities and factors in monospecific cultures of the cladocerans *Moina micrura* and *Diaphanosoma excisum* and the copepod *Thermocyclops decipiens* from Côte d'Ivoire (West Africa). *Aquatic Living Resources* 13: 163–172.
- Paggi, J. C. 1978. Revisión de las especies argentinas del género *Diaphanosoma* Fischer (Crustaceae, Cladocera). *Acta Zoologica Lilloana* 33: 43–65.
- Paggi, J. C. 1995. Biodiversidad del zooplancton en los sistemas acuáticos continentales de la región Neotropical: Revisión de las especies del género *Notodiaptomus* Kiefer (Copepoda: Calanoida). Tesis de Magister, Universidad Nacional del Litoral.
- Paggi, J. C. 1997. *Moina macrocopa* (Straus, 1820) (Branchiopoda, Anomopoda) in South America: another case of species introduction? *Crustaceana* 70: 886-893.





- Paggi, J. C. 2004. Importancia de la fauna de "Cladóceros" (Crustácea, Branchiopoda) del Litoral Fluvial Argentino. Temas de la Biodiversidad del Litoral fluvial argentino INSUGEO, Miscelánea, 12: 239 – 246.
- Pascual, E. & M. Yúfera. 1983. Crecimiento en cultivo de una cepa de *Brachionus plicatilis* O. F. Müller en función de la temperatura y la salinidad. Investigaciones Pesqueras 47:151-159
- Peña-Aguado, F., S. Nandini & S. S. S. Sarma. 2005. Differences in population growth of rotifers and cladocerans raised on algal diets supplemented with yeast. Limnologica 35: 298–303.
- Perrin, N. 1988. Why are offspring born larger when it is colder? Phenotypic plasticity for offspring size in the cladoceran *Simocephalus vetulus* (Müller). Functional Ecol. 2: 283-288.
- Perrin, N., M. Ruedi & H. Saiah. 1987. Why is the cladoceran *Simocephalus vetulus* (Müller) not a "bang-bang strategist"? A critique of the optimal-body-Size model. Functional Ecol. 1: 223-228.
- Petrusek, A., M. Černý & E. Audenaert. 2004. Large intercontinental differentiation of *Moina micrura* (Crustacea: Anomopoda): one less cosmopolitan cladoceran? Hydrobiologia 526: 73–81.
- Pittman, J. K., A. O. Dean & O. Osundeko. 2011. The potential of sustainable algal biofuel production using wastewater resources. Bioresource Technol. 102:17–25.
- Pociecha A. & E. Wilk-Wozniak. 2008. Comments on the diet of *Asplanchna priodonta* (Gosse, 1850) in the Dobczy dam reservoir on the basis of field sample observations. Oceanol. Hydrobiol. St. 37: 63-69
- Pomeroy, L. R. 1974. The ocean foodweb, a changing paradigm. BioScience 24: 499–504.
- Pourriot, R. & T. W. Snell. 1983. Resting eggs in rotifers. Hydrobiologia 104: 213-224.
- Previattelli, D., G. Perbiche-Neves & E. N. dos Santos-Silva. 2013. New Diaptomidae records (Crustacea: Copepoda: Calanoida: Diaptomidae) in the Neotropical region. Check List 9: 700–713.
- Prieto M. & V. Atencio. 2008. Zooplankton en la larvicultura de peces neotropicales. Rev. MVZ Córdoba 13: 1415-1425
- Quirós, R., A. M. Renella, M. B. Boveri, J. J. Rosso & A. Sosnovsky, 2002. Factores que afectan la estructura y el funcionamiento de las lagunas pampeanas. Ecología Austral 12: 175–185.





- Rennella, A. & R. Quirós. 2002. Relations between planktivorous fish and zooplankton in two very shallow lakes of the Pampa Plain. *Verh. Int. Verein. Limnol.* 28: 887-891.
- Rennella, A. M. & R. Quirós. 2006. The effects of hydrobiology on plankton biomass in shallow lakes of the Pampa Plain. *Hydrobiologia* 556: 181-191.
- Rettig, J. E., L. S. Schuman & J. K. McCloskey. 2006. Seasonal patterns of abundance: do zooplankton in small ponds do the same thing every spring–summer? *Hydrobiologia* 556: 193–207.
- Ricci, C. 2001. Dormancy patterns in rotifers. *Hydrobiologia* 446/447: 1–11.
- Ringuelet R. A., I. Moreno & E. Feldman. 1972. El zooplancton de las lagunas de la Pampa Deprimida y otras aguas superficiales de la llanura bonaerense (Argentina). *Physis* 74: 187-200.
- Rodas Gaitán, H. A., H. Rodríguez Fuentes, G. Flores Mendiola, J. A. Vidales Contreras, J Aranda Ruiz & A. I. Luna Maldonado. 2012. Efecto de la densidad celular de inoculación en el crecimiento de *Chlorella vulgaris* CLV2 cultivada bajo condiciones mixotróficas. *Rev. Fitotecnol. Mex.* 35: 83-86.
- Rooney, N. & J. Kalff. 2003. Interaction among epilimnetic phosphorus, phytoplankton biomass and bacterioplankton metabolism in lakes of varying submerged macrophyte cover. *Hydrobiologia* 501: 75-81.
- Rossetti, G., P. Viaroli & I. Ferrari. 2009. Role of abiotic and biotic factors in structuring the metazoan plankton community in a lowland river. *River Res. Appl.* 25: 814-835.
- Rothhaupt, K. O. 1990a. Differences in particle size-dependent feeding efficiencies of closely related rotifer species. *Limnol. Oceanogr.* 35: 16-23.
- Rothhaupt, K. O. 1990b. Changes of the functional responses of the rotifers *Brachionus rubens* and *Brachionus calyciflorus* with particle sizes. *Limnol. Oceanogr.* 35: 24–32.
- Rothhaupt, K. O. 1995. Algal nutrient limitation affects rotifer growth rate but not ingestion rate. *Limnol. Oceanogr.* 40: 1201–1208.
- Ruiz, G., D. Ardohain, L. Solari & N. Gabellone. 2008. Análisis de las interacciones tróficas en microcosmos: estudio preliminar. *Biología Acuática* 24: 73-77.
- Ruiz, G., M. E. Donagh, K. Quaini & L. Solari. 2014. Life strategists and morpho-functional groups applied to the phytoplankton of a pampean shallow lake. *New Zealand J. Mar. Freshw. Res.* DOI: 10.1080/00288330.2014.920890.





- Rusak, J. A., N. D. Yan, K. M. Somers & D. J. McQueen. 1999. The temporal coherence of zooplankton population abundances in neighboring north-temperate lakes. *Amer. Natur.* 153: 46-58.
- Salt, G. W. 1989. Comparisons of the diets and reproductive performances of two sympatric rotifers, *Asplanchna girodi* and *Asplanchna priodonta*. *Freshw. Biol.* 22: 417-430.
- Santer, B. 1998. Life cycle strategies of free-living copepods in fresh waters. *J. Marine Systems* 15: 327-336.
- Sarma, S. S. S. 1985 Effect of food density on the growth of the rotifer *Brachionus patulus* Müller. *Bull. Bot. Soc., Sagar* 32: 54-59.
- Sarma, S. S. S. & T. R. Rao. 1991. The combined effects of food and temperature on the life history parameters of *Brachionus patulus* Müller (Rotifera). *Int. Rev. ges. Hydrobiol.* 76: 225-239.
- Sarma, S. S. S., B. Elguea-Sánchez & S. Nandini. 2002. Effect of salinity on competition between the rotifers *Brachionus rotundiformis* Tschugunoff and *Hexarthra jenkiniae* (De Beauchamp)(Rotifera). *Hydrobiologia* 474: 183-188.
- Sarma, S. S. S., S. Nandini & R. D. Gulati. 2005. Life history strategies of cladocerans: comparisons of tropical and temperate taxa. *Hydrobiologia* 542: 315-333.
- Sarma, S. S. S., S. Nandini, J. Morales-Ventura, I. Delgado-Martínez & L. González-Valverde. 2006. Effects of NaCl salinity on the population dynamics of freshwater zooplankton (rotifers and cladocerans). *Aquat. Ecol.* 40: 349-360.
- Scheffer, M., 1998. *Ecology of shallow lakes*. Chapman and Hall.
- Scheffer, M. & S. Carpenter. 2003. Catastrophic regime shifts in ecosystems: linking theory to observation. *T. Ecol. Evol.* 18: 648-656.
- Scheffer, M., S. Rinaldi, J. Huisman & F. J. Weissing. 2003. Why plankton communities have no equilibrium: solutions to the paradox. *Hydrobiologia* 491: 9-18.
- Scheffer, M., S. H. Hosper, M. L. Meijer, B. Moss & E. Jeppesen. 1993. Alternative equilibria in shallow lakes. *T. Ecol. Evol.* 8: 275-279.
- Schröder, T. 2005. Diapause in monogonont rotifers. *Hydrobiologia* 546: 291-306
- Segers, H. 2007. A global checklist of the rotifers (Phylum Rotifera). *Zootaxa* 1564: 1-104.
- Segers, H. 2008. Global diversity of rotifers (Rotifera) in freshwater. *Hydrobiologia* 595: 49-59.





- Segers, H., G. Murugan & H. J. Dumont. 1993. On the taxonomy of the Brachionidae: description of *Plationus* n. gen. (Rotifera, Monogononta). *Hydrobiologia* 268: 1-8.
- Serra, M. & C. E. King. 1999. Optimal rates of bisexual reproduction in cyclical parthenogens with density-dependent growth. *J. Evol. Biol.* 12: 263-271
- Serra, M., M. J. Carmona & M. R. Miracle. 1994. Survival analysis of three clones of *Brachionus plicatilis* (Rotifera). *Hydrobiologia* 277: 97-105.
- Serra, M., A. Gómez & M. J. Carmona. 1998. Ecological genetics of *Brachionus* sympatric sibling species. *Hydrobiologia* 387/388: 373-384.
- Serra, M., T. W. Snell & C. E. King. 2004. The timing of sex in cyclically parthenogenetic rotifers. Chapter 12: 135-146. En: Moya, A. & E. Font (Eds.). *Evolution: From Molecules to Ecosystems*. Oxford University Press.
- Shah, M. M. R., M. J. Alam & M. Y. Mia. 2003. *Chlorella* sp.: Isolation, pure culture and small scale culture in brackish water. *Bangladesh J. Scient. Industrial Res.* 38:164-174.
- Shapiro, J. & D. I. Wright. 1984. Lake restoration by biomanipulation: Round Lake, Minnesota, the first two years. *Freshw. Biol.* 14: 371-383.
- Shertzer, K.W., S.P. Ellner, G.F. Fussmann & N.G. Hairston Jr. 2002. Predator-prey cycles in an aquatic microcosm: testing hypotheses of mechanism. *J. Animal Ecol.* 71: 802-815
- Shurin, J. B. 2000. Dispersal limitation, invasion resistance, and the structure of pond zooplankton communities. *Ecology* 81: 3074-3086
- Shurin, J. B. 2001. Interactive effects of predation and dispersal on zooplankton communities *Ecology* 82: 3404-3416
- Shurin, J. B., M. Winder, R. Adrian, W. Keller, B. Matthews, A. M. Paterson, M. J. Paterson, B. Pinel-Alloul, J. A. Rusak & N. D. Yan. 2010. Environmental stability and lake zooplankton diversity – contrasting effects of chemical and thermal variability. *Ecology Letters* 13: 453-463
- Silva, W. M. 2008. Diversity and distribution of the free-living freshwater Cyclopoida (Copepoda: Crustacea) in the Neotropics. *Braz. J. Biol.* 68: 1099-1106.
- Silvoso, J., I. Izaguirre & L. Allende. 2011. Picoplankton structure in clear and turbid eutrophic shallow lakes: A seasonal study. *Limnologica* 41: 181-190.
- Sinev, A.Y. 2001a. Separation of *Alona cambouei* Guerne and Richard, 1893 from *Alona pulchella* King, 1853 (Branchiopoda, Anomopoda, Chydoridae). *Arthropoda Sel.* 10: 5-18.





- Sinev, A. Y. 2001b. Redescription of *Alona glabra* Sars, 1901, a South American species of the *pulchella*-group (Branchiopoda: Anomopoda: Chydoridae). *Arthropoda Sel.* 10: 273–280.
- Singh, A., P. Singh Nigam & J. D. Murphy. 2011. Renewable fuels from algae: An answer to debatable land based fuels. *Bioresource Technol.* 102:10–16.
- Sinistro, R., M.L. Sánchez, M.C. Marinone & I. Izaguirre. 2007. Experimental study of the zooplankton impact on the trophic structure of phytoplankton and the microbial assemblages in a temperate wetland (Argentina). *Limnologica* 37: 88–99.
- Sipaúba-Tavares, L. H. & Bachion, M. A. 2002. Population growth and development of two species of cladocera, *Moina micrura* and *Diaphanosoma birgei*, in laboratory. *Braz. J. Biol.* 62: 701-711.
- Sipaúba-Tavares, L. H., B. S. Truzzi & F. A. Berchielli-Morais. 2014. Growth and development time of subtropical Cladocera *Diaphanosoma birgei* Korinek, 1981 fed with different microalgal diets. *Braz. J. Biol.* 74: 464-471.
- Skipnes, O., I. Eide & A. Jensen. 1980. Cage Culture Turbidostat: a Device for Rapid Determination of Algal Growth Rate. *Appl. Environ. Microbiol.* 40: 318-325.
- Snell, T. W. & E. M. Boyer. 1988. Thresholds for mictic female production in the rotifer *Brachionus plicatilis* (Müller). *J. Mar. Biol. Ecol.* 124: 73–85.
- Snell, T. W., M. J. Childres, E. M. Boyer & F. H. Hoff. 1987. Assessing the status of rotifer mass cultures. *J. World Aquaculture Soc.* 18: 270-277.
- Snell, T. W., J. Kim, E. Zelaya & R. Resop. 2007. Mate choice and sexual conflict in *Brachionus plicatilis* (Rotifera). *Hydrobiologia* 593:151-157.
- Solari, L. & M. E. Mac Donagh. 2014. Lotic and lentic environments of the pampean plain. En: Tell, G., I. Izaguirre & I. O'Farrell (Eds.). *Freshwater phytoplankton from Argentina. Advances in Limnology* 65: 143-165.
- Solari, L., M. Claps & N. Gabellone. 2002. River - backwater pond interactions in the lower basin of the Salado River (Buenos Aires, Argentina). *Arch. Hydrobiol. Suppl.* 141: 1-21.
- Solari, L., N. Gabellone, M. Mac Donagh & G. Ruiz. 2003. Estructura y dinámica del fitoplancton en la cuenca de una laguna pampeana (San Miguel del Monte, Buenos Aires, Argentina). *Bol. Soc. Arg. Bot.* 38: 65-73.
- Solari, L. C., N. A. Gabellone, M. Claps, M. A. Casco, K. P. Quaini & N. C. Neschuk. 2014. Phytoplankton chlorophyte structure as related to ENSO events in a saline lowland river (Salado River, Buenos Aires, Argentina). *Ecol. Evol.* 4: 918-932.





- Sommer, U. & F. Sommer. 2006. Cladocerans versus copepods: the cause of contrasting top-down controls on freshwater and marine phytoplankton. *Oecologia* 147: 183-194
- Sommer, U., Z. M. Gliwicz, W. Lampert & A. Duncan. 1986. The PEG-model of seasonal succession of planktonic events in lakes. *Arch. Hydrobiol.* 106: 433-471.
- Sommer, U., F. Sommer, B. Santer, C. Jamieson, M. Boersma, C. Becker & T. Hansen 2001. Complementary impact of copepods and cladocerans on phytoplankton. *Ecology Letters* 4: 545-550.
- Sosnovsky, A. & R. Quirós. 2006. El estado trófico de pequeñas lagunas pampeanas, su relación con la hidrología y el uso de la tierra. *Ecología Austral* 16:115-124
- Sosnovsky, A., J. J. Rosso & R. Quirós. 2010. Trophic interactions in shallow lakes of the Pampa plain (Argentina) and their effects on water transparency during two cold seasons of contrasting fish abundance. *Limnetica* 29: 233-246.
- Starkweather, P. 1980. Behavioral determinants of diet quantity and diet quality in *Brachionus calyciflorus*: 151-157. En: Kerfoot, W. C. (Ed.). *Evolution and ecology of zooplankton communities*. Univ. Press New England.
- Starkweather, P. 1981. Trophic relationships between the rotifers *Brachionus calyciflorus* and the blue-green alga *Anabaena flos-aquae*. *Verh. Internat. Verein. Limnol.* 21: 1507-1514.
- Stelzer, C. P. & T. W. Snell. 2003. Induction of sexual reproduction in *Brachionus plicatilis* (Monogononta, Rotifera) by a density-dependent chemical cue. *Limnol. Oceanogr.* 48: 939-943.
- Stemberger, R. S. 1990. Food limitation, spination, and reproduction in *Brachionus calyciflorus*. *Limnol. Oceanogr.* 35: 33-44.
- Sterner, R. W. 1989. The role of grazers in phytoplankton succession. En: Sommer; U. (Ed.). *Plankton Ecology Succession in plankton communities*. Springer Verlag.
- Suárez-Morales, E., J. W. Reid & M. Elías-Gutiérrez. 2005. Diversity and distributional patterns of Neotropical freshwater copepods (Calanoida: Diaptomidae). *Internat. Rev. Hydrobiol.* 90: 71-83.
- Sulehria, A. Q. K. 2010. Planktonic rotifers and their role in fish growth and farm fisheries. Ph.D. Thesis. G C. University, Lahore. Pakistan.





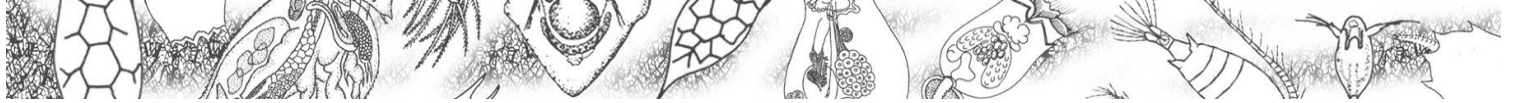
- Ter Braak, C. J. F. 1985. Correspondence analysis of incidence and abundance data: properties in terms of a unimodal response model. *Biometrics* 41: 859–873.
- Ter Braak, C. J. F. 1995. Calibration. En: Jongman, R. H. G., C. J. F. ter Braak, O. F. R. Van Tongeren (Eds.). *Data Analysis in Community and Landscape Ecology*. Cambridge University Press.
- Tessier, A. J. & C. E. Goulden. 1987. Cladoceran juvenile growth. *Limnol. Oceanogr.* 32: 680-686.
- Tessier, A. J. & N. L. Consolatti. 1991. Resource quantity and offspring quality in *Daphnia*. *Ecology* 72: 468–478.
- Travieso, L., F.; Benítez, E. Sánchez, R. Borja, A. Martín & M. F. Colmenarejo. 2006. Batch mixed culture of *Chlorella vulgaris* using settled and diluted piggery waste. *Ecol. Eng.* 28:158–165.
- Urabe, J., M. Nakanishi & K. Kawabata. 1995. Contribution of metazoan plankton to the cycling of nitrogen and phosphorus in Lake Biwa. *Limnol. Oceanogr.* 40: 232–241
- Vallejo, I. A., F. Newmark & M. M. Criales. 1993. Efecto de la salinidad sobre el crecimiento poblacional y el rendimiento del rotífero *Brachionus plicatilis* (cepa Ciénaga Grande de Santa Marta). *An. Inst. Invest. Mar Punta Betín* 22: 112-121.
- Vignatti, A., S. Echaniz & M. C. Martín. 2007. El zooplancton de tres lagos someros de diferente salinidad y estado trófico en la región semiárida pampeana (Argentina). *Gayana* 71: 34-48.
- Vignatti, A. M.; G. C. Cabrera & S. A. Echaniz. 2013. Distribution and biological aspects of the introduced species *Moina macrocopa* (Straus, 1820) (Crustacea, Cladocera) in the semi-arid central region of Argentina. *Biota Neotrop.* 13: 86-92.
- Wagner, C. & R. Adrian. 2011. Consequences of changes in thermal regime for plankton diversity and trait composition in a polymictic lake: a matter of temporal scale. *Freshw. Biol.* 56, 1949–1961.
- Wallace, R. L. 2002. Rotifers: Exquisite Metazoans. *Integ. and Comp. Biol.* 42: 660–667.
- Wallace, R. L. & T. W. Snell. 2001. Phylum Rotifera. Chapter 8: 195-254. En: Thorpe, J. & A. Covich (Eds.). *Ecology and Classification of North American Freshwater Invertebrates*. 2nd Edition. Academic Press
- Walter, K. F. 1981. A synopsis of ecological information on the saline lake rotifer *Brachionus plicatilis* Müller 1786. *Hydrobiologia* 81: 159-167.





- Walton, W.E. 1985. Factors regulating the reproductive phenology of *Onychodiaptomus birgei* (Copepoda: Calanoida) *Limnol. Oceanogr.* 30: 167-179.
- Walz, N. 1995. Rotifer populations in plankton communities: Energetics and life history strategies. *Experientia* 51: 437-453.
- Walz, N., T. Gschloessl & U. Hartmann. 1989. Temperature aspects of ecological bioenergetics in *Brachionus angularis* (Rotatoria). *Hydrobiologia* 186/187: 363-369.
- Wang, C., C. Fu & Y. Liu. 2007. Effects of using light emitting diodes on the cultivation of *Spirulina platensis*. *Bioch. Engineering J.* 37:21-25.
- Weigand, P. 2011. Dinámica estacional del zooplancton en la Laguna de los Padres y el efecto de diferentes concentraciones de alimento sobre el desarrollo de *Notodiaptomus incompositus* (Copepoda Diaptomidae). Tesis Doctoral 257. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UNMdP.
- Weigand, P. & A. Escalante. 2008. Diel vertical distribution of freshwater calanoid copepods in a shallow lake: its variability in males with and without an oil sac. *Mar. Fresh. Behaviour and Physiology* 41: 257-266.
- West, J. A. 2005. Long-Term Macroalgal Culture Maintenance: 157-165. En: Andersen, R. A. (Ed.). *Algal Culturing Techniques*. Elsevier
- Wetzel, R. G. & G. E. Likens. 1991. *Limnological analyses*. 2nd edition. Springer-Verlag, New York.
- Williamson, C. E. & N. M. Butler. 1986. Predation on rotifers by the suspension-feeding Calanoid copepod *Diaptomus pallidus*. *Limnol. Oceanogr.* 31: 393-402.
- Williamson, C. E. & J. W. Reid. 2001. Copepoda. Chapter 22: 915-954. En: Thorpe, J. & A. Covich (Eds.). *Ecology and Classification of North American Freshwater Invertebrates*. 2nd edition
- Xu, H., X. Miao & Q. Wu. 2006. High quality biodiesel production from microalga *Chlorella protothecoides* by heterotrophic growth in fermenters. *J. Biotechnol.* 126: 499-507.
- Xuwang, Y., Z. Shasha, H. Jian & L. Pengfei. 2011. Effects of food quality and starvation on the optimal foraging behavior of *Daphnia magna* (Cladocera). *Acta Ecologica Sinica* 31: 328-333.
- Yarwood-Buchanan, S. 2005. Cladoceran assemblages of small freshwater bodies in lowland England and Wales. Ph D Thesis Oxford Brookes University.
- Yin, X. W. & C. J. Niu. 2008. Polymorphism in stem females and successive parthenogenetic generations in *Brachionus calyciflorus* Pallas. *Aquat. Ecol.* 42: 415-420.





- Yin, X. W. & W. Zhao. 2008. Studies on life history characteristics of *Brachionus plicatilis* O. F. Müller (Rotifera) in relation to temperature, salinity and food algae. *Aquat. Ecol.* 42: 165–176.
- Yúfera, M. 2007. Swimming behaviour of *Brachionus plicatilis* in its relation to food and feeding rates. *Hydrobiologia*, 593: 13-18.
- Zagarese, H. E. & M. C. Marinone. 1992. Induction and inhibition of spine development in the rotifer *Keratella tropica*: evidence from field observations and laboratory experiments. *Freshw. Biol.* 28: 289-300.

