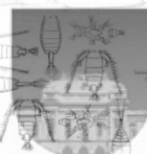




Facultad de Ciencias
Universidad de la República



UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
URUGUAY

Evaluación de la incidencia de copépodos muertos en el Río de la Plata y exploración de procesos responsables

Tesis de Grado

Licenciatura en Ciencias Biológicas–Opción Oceanografía

Setiembre 2011

Autor: Mariano Martínez

Orientador: Danilo Calliari

Tribunal: Alicia Acuña

Mónica Gomez

INDICE

Resumen.....	3
Introducción.....	4
Hipótesis.....	6
Predicciones.....	6
Objetivos.....	6
Métodos.....	7
<i>Diseño de muestreo</i>	7
<i>Trabajo de campo</i>	7
<i>Trabajo de laboratorio</i>	8
<i>Calibración del método</i>	8
<i>Análisis de datos</i>	8
Resultados.....	9
<i>Calibración del método</i>	9
<i>Resultados de campo</i>	11
Discusión.....	15
Bibliografía.....	19

RESUMEN

Generalmente se asume que la mortalidad en copépodos se debe principalmente a depredación. Por el contrario, diversos estudios han demostrado que ésta puede deberse a factores como estrés ambiental, contaminación, parasitismo y floraciones nocivas. Los estuarios son sistemas donde las condiciones ambientales son muy variables en tiempo y espacio (e.g. salinidad). Esta inestabilidad somete a los organismos a una constante situación de estrés, lo cual disminuye su supervivencia. En el presente trabajo se evaluó la incidencia de copépodos muertos en el Río de la Plata (RdIP), mediante una técnica de *tinción vital*, con el fin de relacionar dicha incidencia con procesos ambientales. Para ello se realizaron 4 muestreos en 3 estaciones localizadas en la región oligo-mesohalina del RdIP. En cada estación se midieron las principales variables físico-químicas, la densidad de copépodos y se aplicó la técnica de *tinción vital*. En promedio, se halló que el 16.5% de los copépodos *Acartia tonsa* estaban muertos en este estudio. Este porcentaje fue bajo en comparación a lo hallado por otros autores en un estuario de rango salino similar (i.e. 32%). Además, se halló una mortalidad diferencial entre estadíos, siendo los estadíos copepodito IV, V y adulto los que presentaron un mayor porcentaje de organismos muertos. El porcentaje de copépodos muertos se correlacionó negativamente con la salinidad superficial ($p < 0.05$). La mayor mortalidad en salinidades bajas podría deberse, entre otras cosas, al efecto de los cambios relativos de salinidad en los organismos, los cuales son mayores en sistemas de baja salinidad. Si bien en este estudio se obtuvieron resultados importantes y novedosos para la región, es necesario realizar estudios de largo plazo así como ampliar el gradiente de condiciones físico-químicas para obtener información más precisa acerca de los procesos que generan mortalidad "natural" en copépodos.

INTRODUCCIÓN

El zooplancton abarca una gran variedad de grupos taxonómicos, tamaños y formas de vida. Dentro de este grupo, los copépodos han recibido principal atención por el hecho de ser el grupo de metazoarios más abundante (Humes, 1994), y por cumplir un rol fundamental en la transferencia de materia y energía desde los productores primarios a los niveles tróficos superiores (Calbet *et al.*, 2000; Calliari *et al.*, 2008). Sin embargo, dado el tradicional enfoque de los investigadores hacia aspectos como el crecimiento y la fecundidad de este grupo, se sabe muy poco acerca de algunos aspectos de su dinámica poblacional, especialmente acerca de sus tasas y causas de mortalidad (Hirst & Kiørboe, 2002; Thor *et al.*, 2008).

Generalmente, se asume que la mortalidad en copépodos y en otros grupos zooplanctónicos se debe principalmente a depredación (Tang *et al.*, 2006). Por el contrario, diversos estudios han demostrado que la mortalidad en copépodos puede deberse a diversos factores como estrés ambiental (Cervetto *et al.*, 1999; Tiselius *et al.*, 2008), contaminación (Carpenter *et al.*, 1974), parasitismo (Kimmerer & McKinnon, 1990) y a la presencia de blooms de algas nocivas (Avery *et al.*, 2008), lo cual es apoyado por los elevados porcentajes de organismos muertos (i.e. 32%) que han sido registrados en muestras naturales de zooplancton (Tang *et al.*, 2006). De esta manera, además de ser el sustento principal de los niveles tróficos superiores, los copépodos contribuirían de forma muy importante a la exportación de materia orgánica hacia la fauna de las profundidades (Calbet *et al.*, 2000) y su descomposición y desintegración, por bacterias heterótrofas, proveería una vía alternativa de regeneración de nutrientes.

Este desvío del flujo de materia y energía de su ruta clásica (zooplancton-peces) usualmente no es tomado en cuenta a la hora de estimar producción secundaria en copépodos. Tradicionalmente los investigadores colectan preservan y enumeran las muestras de zooplancton sin discriminar entre organismos vivos y muertos, asumiendo implícitamente que todos los organismos en la muestra estaban vivos al momento de la colecta. Dichas estimaciones de abundancia son luego utilizadas para extrapolar las tasas de producción *per cápita* a tasas poblacionales de producción secundaria (Elliott & Tang, 2009). De esta forma, los investigadores podrían estar sobreestimando el tamaño de las poblaciones de zooplancton, su producción secundaria y la disponibilidad de alimento para los niveles tróficos superiores (Tang *et al.*, 2006).

La incidencia de la mortalidad natural (no-depredatoria) en los ecosistemas es mayormente desconocida a pesar de su importancia ecológica. Ello resulta principalmente de dificultades metodológicas. Previo a la década del setenta, la movilidad era el único criterio disponible para discriminar entre organismos planctónicos vivos y muertos (Fleming & Coughlan, 1978). Este método es muy subjetivo, consume mucho tiempo y requiere que el análisis de las muestras se realice inmediatamente después de la captura. Estas condiciones limitan en gran medida el número de

organismos analizados y compromete por ende la credibilidad de los resultados. En 1972, Dressel *et al.* desarrollaron un método para separar el zooplancton vivo del muerto basado en la incorporación diferencial de una tinta conocida como Rojo Neutro (3-Amino-7-dimethylamino-2-methylphenazine hydrochloride). Esta tinta no tóxica es absorbida únicamente por células vivas (Crippen & Perrier, 1974), por lo cual, los organismos vivos en el momento de la colecta se teñirán de rojo mientras que los muertos no se teñirán o lo harán muy levemente.

Pese a la valiosa información que aporta, esta técnica ha sido poco utilizada. Crippen y Perrier (1974) y Fleming y Coughlan (1978) realizaron algunas modificaciones respecto al protocolo propuesto por Dressel *et al.* (1972), los primeros con la intención de extender su aplicación a otros grupos zooplanctónicos, y los últimos con el propósito de preservar las muestras teñidas por más tiempo para su posterior análisis. Recientemente, Tang *et al.* (2006) propusieron un método con algunas modificaciones respecto a los estudios previos con el objetivo de facilitar su aplicación *in situ*. Los resultados de su aplicación en aguas estuarinas de la Bahía de Chesapeake (Estados Unidos) evidenciaron altos porcentajes de copépodos muertos (*Acartia tonsa*), pero la incidencia de copépodos muertos no se correlacionó con ninguna variable ambiental. Este método fue modificado posteriormente por Elliott y Tang (2009) quienes describieron un protocolo detallado y evaluaron, al igual que Tang *et al.* (2006), los efectos de diferentes variables ambientales en la eficiencia de tinción. Estos autores encontraron que dicha eficiencia es menor a bajas temperaturas y que depende de la carga de seston y de la cantidad de organismos presentes. Sin embargo, no encontraron un efecto significativo de la salinidad en la eficiencia de tinción. Otras dificultades asociadas a esta técnica radican en la conservación de las muestras teñidas y en su posterior análisis. Elliott y Tang (2009) recomiendan congelar las muestras teñidas a bordo para su posterior análisis, mientras que anteriormente se proponía conservar las muestras en formol acidificado, lo cual tenía como inconveniente la pérdida gradual de color con el pasar del tiempo. El análisis de las muestras puede en ocasiones presentar dificultades, por ejemplo, organismos recién muertos en el momento de la colecta pueden presentar células activas que incorporen la tinta, conduciendo de esta manera a resultados erróneos. Por estos motivos, es necesaria una calibración experimental del método para las condiciones ambientales específicas del área de estudio.

Los estuarios son sistemas donde las condiciones ambientales son muy variables en el tiempo y en el espacio (e.g. salinidad, turbidez, etc.). Esta inestabilidad somete a los organismos zooplanctónicos a una constante situación de estrés, lo cual tiene como consecuencia una disminución en su supervivencia (Calliari *et al.*, 2008). Por este motivo, la aplicación de esta técnica en sistemas tan peculiares como los estuarios es particularmente interesante.

El Río de la Plata es uno de los estuarios más grandes del mundo. Es considerado una zona de alto interés económico dado que es el sitio de desove de varias especies nectónicas que son

explotadas comercialmente (Acuña *et al.*, 1997). A pesar de la relación directa que existe entre la producción zooplanctónica y la producción de peces (Kiørboe, 1993), se sabe muy poco acerca del zooplancton de esta zona (Berasategui *et al.*, 2005). Algunos estudios puntuales sugieren para esta región una baja riqueza taxonómica y una alta densidad de organismos, siendo el copépodo calanoide *Acartia tonsa* la especie más abundante (Cervetto *et al.*, 2006). Son aún más escasos los conocimientos acerca de sus tasas o procesos, como lo son la producción y herbivoría (Calliari *et al.*, 2004) y prácticamente nulos los conocimientos relacionados a la mortalidad de este grupo. Como muchos estuarios, el Río de la Plata se caracteriza por presentar una alta carga de sólidos en suspensión y una salinidad muy variable en el tiempo y en el espacio, la cual depende, en este caso, de la dirección del viento y en menor medida de la descarga del Río Uruguay y Paraná (Framiñan & Brown, 1993). Estas características implican una fuente de estrés importante para los organismos, especialmente para los juveniles, restringiendo su distribución (Attrill, 2002) y condicionando su supervivencia. Por esta razón, es necesario evaluar la importancia de la mortalidad "natural" y los mecanismos asociados a ella para entender los procesos ecológicos más fundamentales en el Río de la Plata y generar de esta manera información muy valiosa para el uso, gestión y conservación de este ecosistema.

HIPÓTESIS

En zonas de fuertes gradientes salinos (horizontales o verticales) los organismos están sujetos a cambios drásticos en la salinidad, los cuales representan un factor significativo de mortalidad. La región oligo-mesohalina del Río de la Plata está dominada por gradientes horizontales y una columna de agua estratificada por salinidad, lo cual genera una alta mortalidad de copépodos. Los estadios juveniles son más susceptibles al estrés osmótico y presentan una mayor mortalidad que los adultos bajo estas condiciones

PREDICCIONES

En la región oligo-mesohalina del Río de la Plata existirá una alta incidencia de copépodos muertos (>30%), la cual se correlacionará con la intensidad de los gradientes salinos. Esta correlación será más fuerte en el caso de los organismos juveniles que en el caso de los adultos.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la incidencia de copépodos muertos en el Río de la Plata y explorar mecanismos ambientales causantes de mortalidad no-depredatoria.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

(i) Poner a punto un protocolo de *tinción vital* para las especies de copépodos más

abundantes de la región oligo-mesohalina del Río de la Plata

(ii) Evaluar la incidencia de copépodos muertos para los diferentes estadios de desarrollo en un amplio rango de condiciones ambientales

(iii) Determinar la relación entre la incidencia de copépodos muertos y los gradientes de salinidad

MÉTODOS

Diseño de muestreo. Se realizaron 4 muestreos en la región oligo-mesohalina del Río de la Plata y por fuera de la zona litoral, a bordo de la embarcación "Alba" (longitud de eslora: 12m). Cada salida de muestreo se identifica con el código correlativo: CR3, CR4, CR5 y CR6. Los muestreos se realizaron en Setiembre y Noviembre de 2009 (CR3 y CR4 respectivamente) y en Setiembre y Noviembre de 2010 (CR5 y CR6 respectivamente). Se dispuso un transecto de 17 km paralelo al eje principal del estuario a una distancia aproximada de la costa de 4.8 km (Fig. 1). En los dos primeros muestreos (CR3 y CR4) se midieron variables físico-químicas y se tomaron muestras biológicas en tres estaciones. En los últimos dos muestreos (CR5 y CR6) se agregaron dos estaciones en los extremos del transecto donde sólo fueron medidas variables físico-químicas. La distancia aproximada entre estaciones fue de 4.1 km.

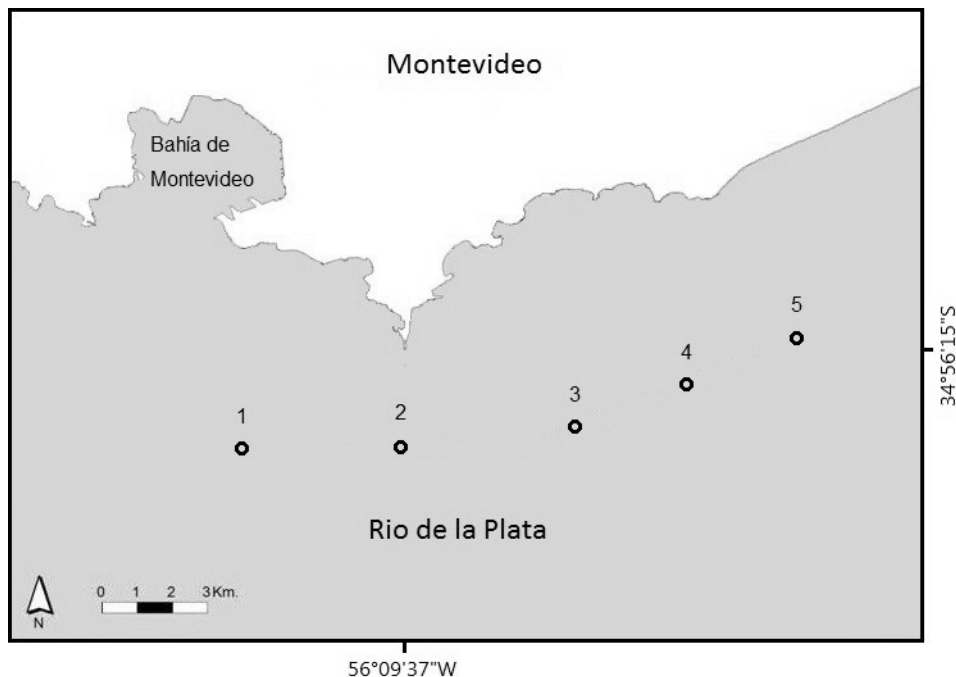


Figura 1. Área de estudio: región oligo-mesohalina del Río de la Plata (costa de Montevideo). Estaciones de muestreo (1, 2, 3, 4, 5)

Trabajo de campo. En cada estación se realizaron perfiles de temperatura, salinidad, fluorescencia y turbidez mediante CTD. Para estimar la densidad de copépodos (ind/m^3) se tomaron

muestras subsuperficiales con red de 90 micras de abertura de poro equipada con flujómetro para estimar el volumen de agua filtrada. Las muestras se fijaron en formol al 4% (concentración final) para posterior análisis. Para la aplicación de la tinción vital se tomaron muestras subsuperficiales de zooplancton con red de 120 micras de abertura de poro y copo no-filtrante. Los organismos colectados fueron transferidos a un vaso de bohemia con agua de mar al que se agregó Rojo neutro (concentración final: 1:67000) y se dejó incubar durante un periodo de 15 minutos. Una vez transcurrido este tiempo, se filtró la muestra por una malla de 100 micras y se conservó en frío (-20°C) (Elliot & Tang, 2009).

Trabajo de laboratorio. Para estimar densidad de copépodos (D), se realizaron conteos bajo lupa binocular en cámaras tipo Bogorov. En general, se cuantificaron alícuotas que representaban fracciones entre 1/1000 y 1/100 de la muestra total. Para evaluar la incidencia de copépodos muertos, las muestras congeladas fueron descongeladas utilizando agua *in situ* filtrada por una malla de 10 micras y se acidificaron con HCL 1M (1 ml por 10 ml de muestra). La acidificación ayuda a resaltar el color de la tinta. Una de las propiedades del Rojo neutro es que a valores de pH menores a 6.8 se visualiza como rojo, mientras que a valores de PH mayores de 8.0 se visualiza como amarillo. Una vez descongeladas y acidificadas, las muestras se analizaron bajo lupa con campo oscuro, determinándose el estado de los organismos (vivo o muerto) y sus respectivos estadios de desarrollo.

Calibración del método. Se realizaron experimentos para evaluar la influencia de la salinidad y temperatura del agua en la eficiencia de tinción (conc. final 1:67000). Para evaluar la influencia de la salinidad, 3 replicas de 10 organismos vivos y 10 organismos muertos fueron sometidos a salinidades de 2.5, 5, 10 y 15, y a una temperatura de 20°C, e incubados con Rojo neutro durante 15 minutos. Para la temperatura, la misma cantidad de replicas y organismos fueron incubados con Rojo neutro durante 15 minutos a temperaturas de 10°C, 15°C y 20°C, y salinidad de 2.5. Las condiciones de salinidad y temperatura utilizadas son representativas del rango encontrado *in situ*.

Análisis de datos. Se estimó la temperatura y salinidad superficial como sus valores promedio en la capa de mezcla superficial (región por encima de la haloclina). Se calculó el coeficiente de estratificación salina (CES), el cual resultó de la diferencia entre el promedio de la salinidad de fondo (debajo de la haloclina) y el promedio de la salinidad de superficie dividido por el espesor de la haloclina. Además se calculó el gradiente horizontal salino (GHS), como la diferencia entre la salinidad superficial de dos estaciones contiguas sobre la distancia existente entre las mismas.

Se calculó el "índice M", el cual cuantifica la proporción real de organismos muertos por estadio, corrigiendo el error inherente a la representación diferencial de cada estadio en la población. Este resulta del cociente entre el porcentaje de copépodos muertos de un estadio (x) y el porcentaje de organismos del estadio (x) encontrado en la población. Para el análisis de mortalidad por estadios, se agruparon los estadios de la siguiente forma: copepodito I, copepodito II y copepodito III (Grupo

C123); copepodito IV, copepodito V y Adulto (Grupo C45A). Para evaluar diferencias entre incidencia de organismos muertos de ambos grupos, se aplicó el test *t* de Student para variables dependientes entre el índice M de cada grupo. Se realizaron análisis de correlación lineal (Pearson) entre la incidencia de copépodos muertos y salinidad superficial, temperatura superficial, coeficiente de estratificación salina, gradiente horizontal salino y densidad de copépodos. Además, se realizaron correlaciones de Pearson entre dichas variables y el índice M de C123 y C45A. La normalidad y homocedasticidad de los datos se verificó aplicando test de Shapiro-Wilk y test de Levene's respectivamente. Las distribuciones de datos que no fueron normales se transformaron utilizando las siguientes formulas: $\log_{10}(x+1)$; \sqrt{x} ; $\sqrt{(\log_{10}(x+0,1))}$. Los outliers fueron eliminados según el criterio propuesto por Moore & McCabe (1999), quienes los definen como puntos que caen más de 1,5 veces el rango intercuartil por encima del tercer cuartil (Q3) o debajo del primer cuartil (Q1).

RESULTADOS

1. Calibración del método

Los experimentos de calibración se realizaron con el copépodo calanoide *Acartia tonsa*, el cual representó entre el 67 y 99% de la abundancia total de copépodos.

La intensidad de tinción de los organismos pudo ser discriminada en 5 niveles, con las siguientes características: 1: Cuerpo blancuzco, sin zonas teñidas; 2: Cuerpo blancuzco, con zonas teñidas rosado pálido; 3: Cuerpo rosado pálido, con zonas teñidas rosado intenso; 4: Cuerpo completamente teñido rosado intenso; 5: Cuerpo completamente teñido rojo intenso. (Fig. 2). Del total de los organismos vivos sometidos a la tinción, el 74.3% fue asignado al nivel de intensidad de tinción 5, el 24.3% al nivel 4 y el 1.4% al nivel 3. Del total de los organismos muertos sometidos a la técnica, el 58.4% presentó un nivel de intensidad de tinción 2, el 33.9% un nivel de intensidad 1, y el 7.7% un nivel de intensidad 3. Estos resultados indican que la técnica permite separar con un margen de error mínimo los organismos vivos de los muertos en una muestra con organismos vivos y muertos mezclados.

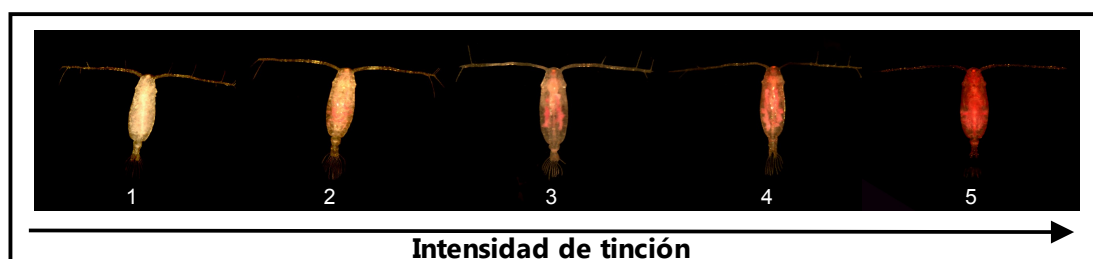


Figura 2. Niveles de intensidad de tinción (1, 2, 3, 4, 5) en hembras adultas de *Acartia tonsa*

A su vez, los experimentos de calibración evidenciaron que no existe efecto de la salinidad en la

eficiencia de tinción (Fig. 3), y que sí existe un efecto de la temperatura. Dicha eficiencia fue menor a bajas temperaturas, hallándose a 10°C un solapamiento de organismos vivos y muertos (19.5%) en el nivel de intensidad de tinción 3 (Fig 4).

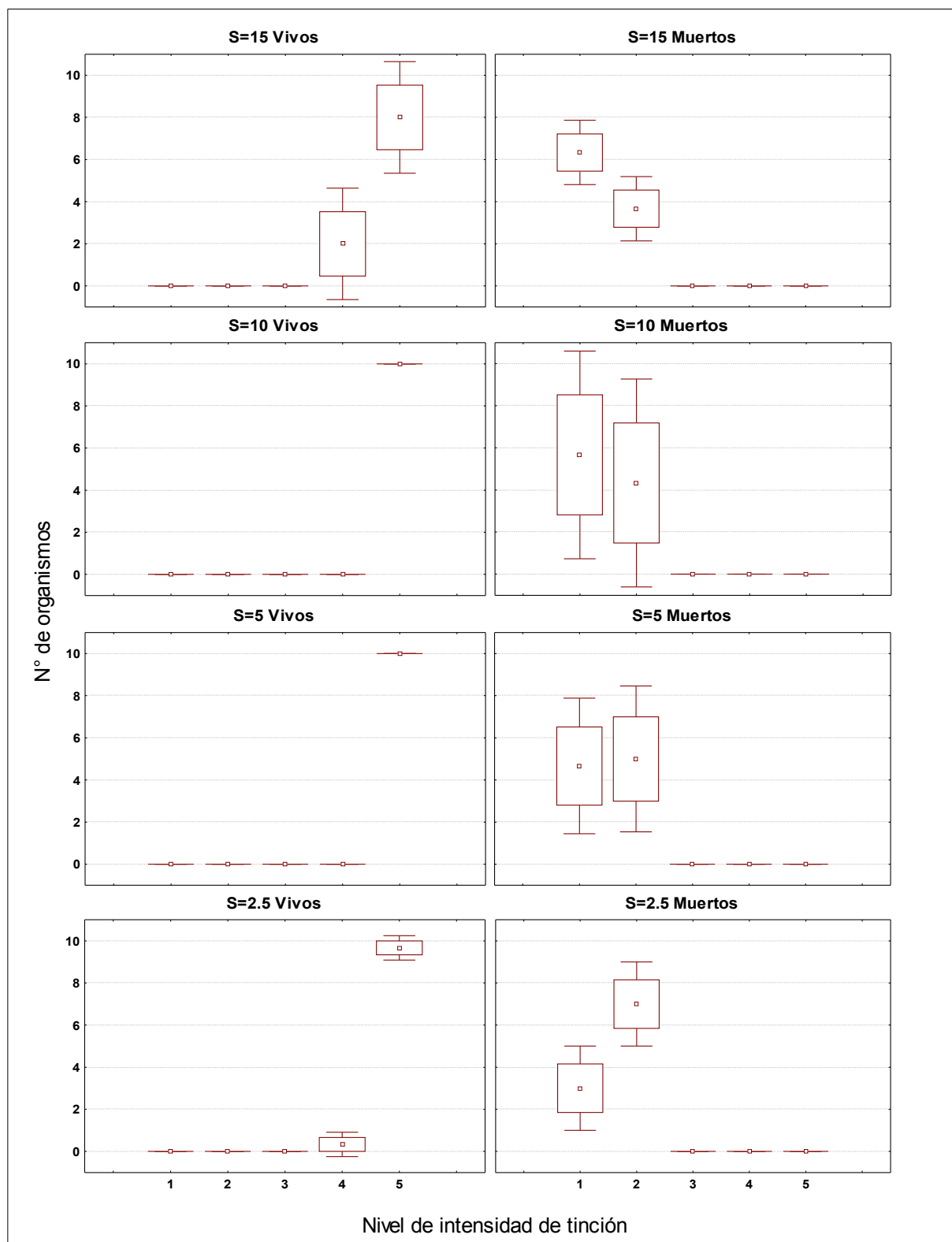


Figura 3. Influencia de la salinidad en la eficiencia de tinción. Hembras adultas de *Acartia tonsa* vivas y muertas sometidas a la técnica de tinción vital a salinidades de: 2.5, 5, 10 y 15. \square Media \square Media \pm SE I Media \pm SD

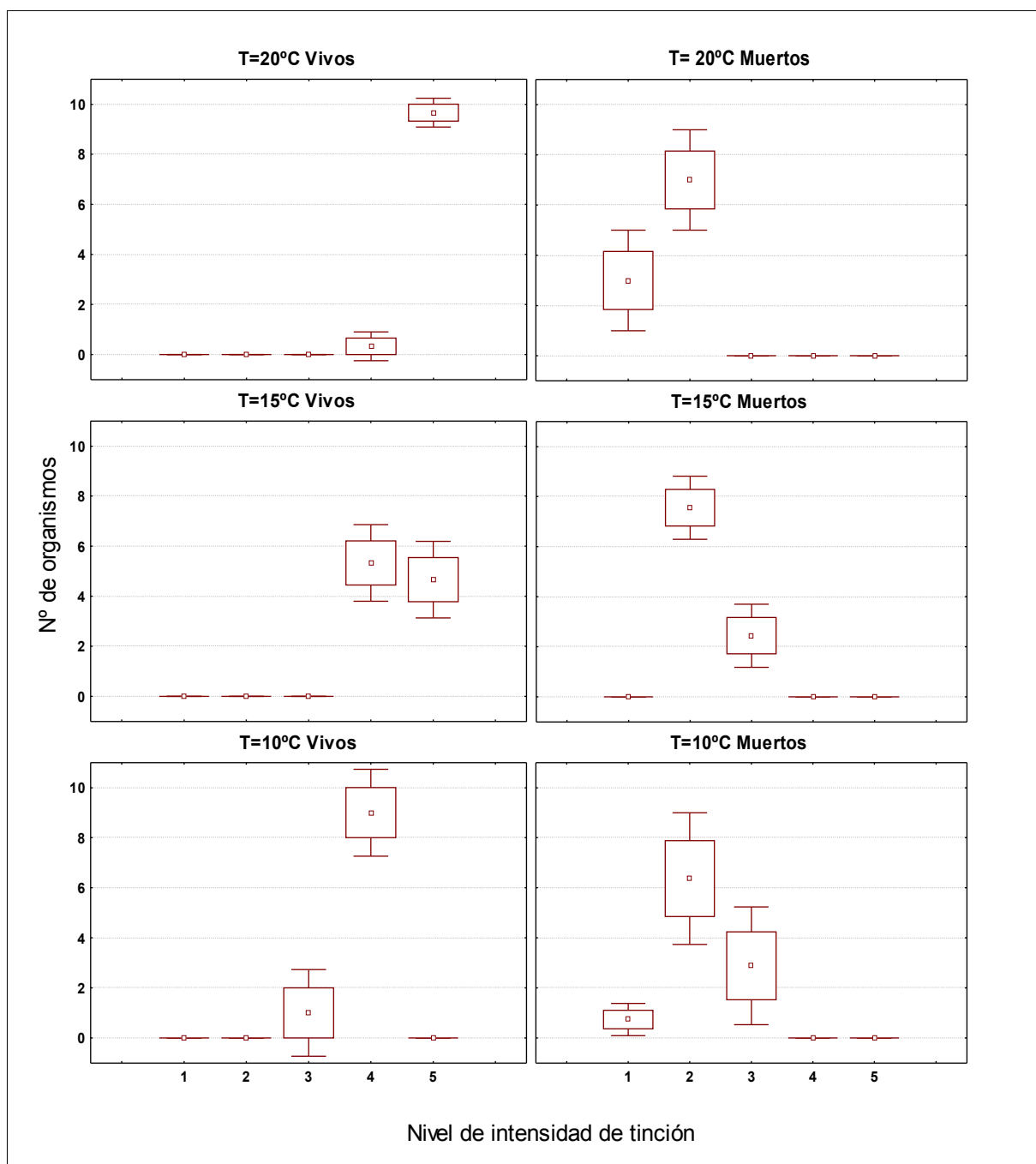


Figura 4. Influencia de la temperatura en la eficiencia de tinción. Hembras adultas de *Acartia tonsa* vivas y muertas sometidas a la técnica de tinción vital a temperaturas de: 10°C, 15°C y 20°C.

□ Media □ Media ± SE I Media ± SD

2. Resultados de Campo

2.1. Variables físico-químicas

La salinidad superficial presentó valores entre 2.0 y 16.4, mientras que la temperatura superficial varió entre 13.5 y 18.1°C. El Coeficiente de estratificación salina presentó valores muy

elevados en CR3 y CR5, a diferencia del Gradiente horizontal salino, que alcanzó su valor máximo en CR4 (Tabla 1). En la figura 5 se muestran perfiles de salinidad y temperatura de las estaciones en que se tomaron muestras biológicas.

Tabla 1. Variables físico-químicas. Rangos de: Salinidad superficial promedio (S sup.); Temperatura superficial promedio (T sup.); Coeficiente de estratificación salina (CES); Gradiente horizontal salino (GHS).

Crucero (CR)	S sup.	T sup. (°C)	CES (m ⁻¹)	GHS (km ⁻¹)
3	4.0-5.7	13.5-14.1	8.0-14.1	0.02-0.30
4	7.5-16.4	14.6-15.3	0.0-3.3	0.04-1.75
5	2.0-4.8	16.1-17.0	8.1-11.1	0.06-0.53
6	4.5-6.9	17.7-18.1	1.1-7.1	0.07-0.28

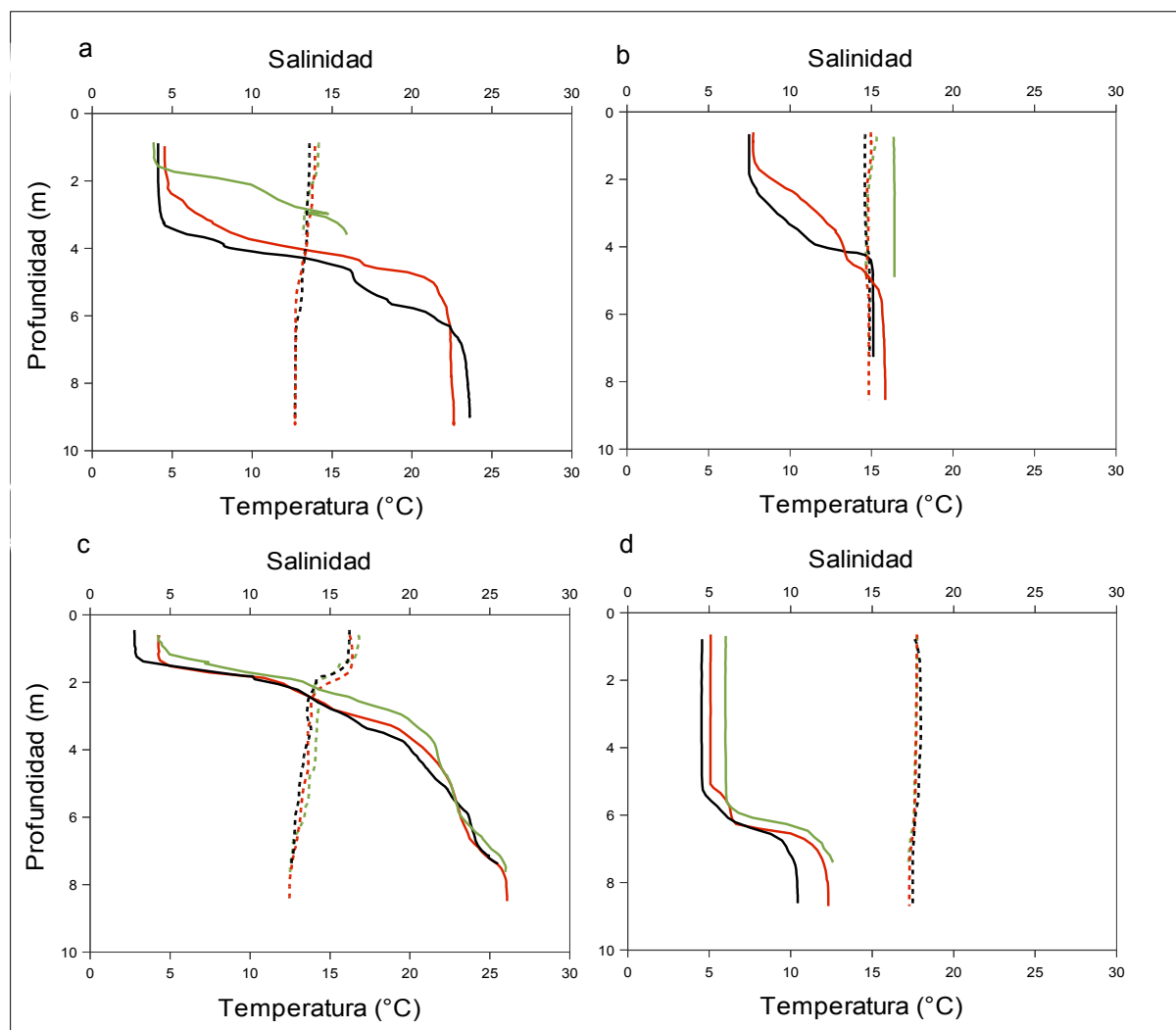


Figura 5. Perfiles de salinidad (línea continua) y temperatura (línea punteada) de la estación 1 (negro), 2 (rojo), y 3 (verde) en CR3 (a) y CR4 (b), y de la estación 2 (negro), 3 (rojo) y 4 (verde) en CR5 (c) y CR6 (d).

2.2. Densidad de copépodos

En los cuatro muestreos la especie de copépodo dominante fue *Acartia tonsa*. En CR3 la densidad de *Acartia tonsa* varió entre 1633 y 6901 ind/m³, en CR4 varió entre 1470 y 3908 ind/m³, en CR5 lo hizo entre 709 y 2579 ind/m³ y en CR6 se tomó una única muestra que alcanzó una densidad de 1657 ind/m³.

2.3. Incidencia de copépodos muertos

El porcentaje de copépodos (*A. tonsa*) muertos fue bajo en CR3 y CR4 pero elevado en CR5 y CR6, llegándose a hallar un 44.8% de organismos muertos en una estación de CR5. En promedio, se halló que el 16.5% de los copépodos *A. tonsa* estaban muertos en este estudio. En los cuatro muestreos los organismos muertos pertenecieron mayormente a los estadios copepodito IV, copepodito V y Adulto (C45A) (Tabla 2). Esta mortalidad diferencial entre estadios fue apoyada por las diferencias significativas ($t=-3.306$, $n=11$, $p=0.008$) halladas entre el Índice M de C123 y el Índice M de C45A (Figura 6).

Tabla 2. Rangos de: Porcentaje de organismos (*A. tonsa*) muertos en la población; Porcentaje de los organismos (*A. tonsa*) muertos que pertenecían a los estadios copepodito I, II, y III (C123); Porcentaje de los organismos (*A. tonsa*) muertos que pertenecían a los estadios copepodito IV, V y Adultos (C45A)

Crucero	% Org. muertos	% muertos C123	% muertos C45A
3	12.5-13.0	7.5-15.6	84.4-92.5
4	6.2-13.2	10.0-12.0	88.0-90.0
5	16.5-44.8	7.8-14.8	85.2-92.2
6	11.8-22.8	21.1-36.8	63.2-78.9

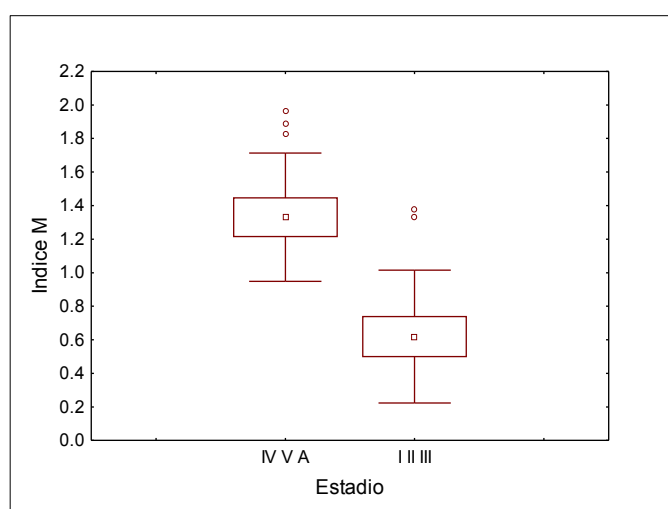


Figura 6. Índice M de los estadios copepodito I, II y III (C123);

Índice M de los estadios copepodito IV, V y Adulto (C45A).

□ Media □ Media±SE I Media±SD

2.4. Análisis de correlación

El análisis de *outliers* indicó que una de las observaciones en el conjunto de datos de Incidencia de copépodos muertos (44,8%, en CR5) escapaba significativamente al patrón general (Moore & McCabe 1999). Sin considerar dicha observación, la incidencia de copépodos muertos se correlacionó negativamente con la salinidad superficial ($p < 0.05$) (Fig. 7a). Dicha correlación indica que a medida que disminuye la salinidad superficial aumenta la incidencia de copépodos muertos. El porcentaje de copépodos (*A. tonsa*) muertos no se correlacionó con ninguna de las demás variables analizadas (T sup., CES, GHS, D) ($p > 0.05$) (Fig. 7b, c y d). Al explorar la correlación entre el índice M de C123 y C45A, y las variables analizadas, no se halló significancia en ninguno de los casos (Fig. 8).

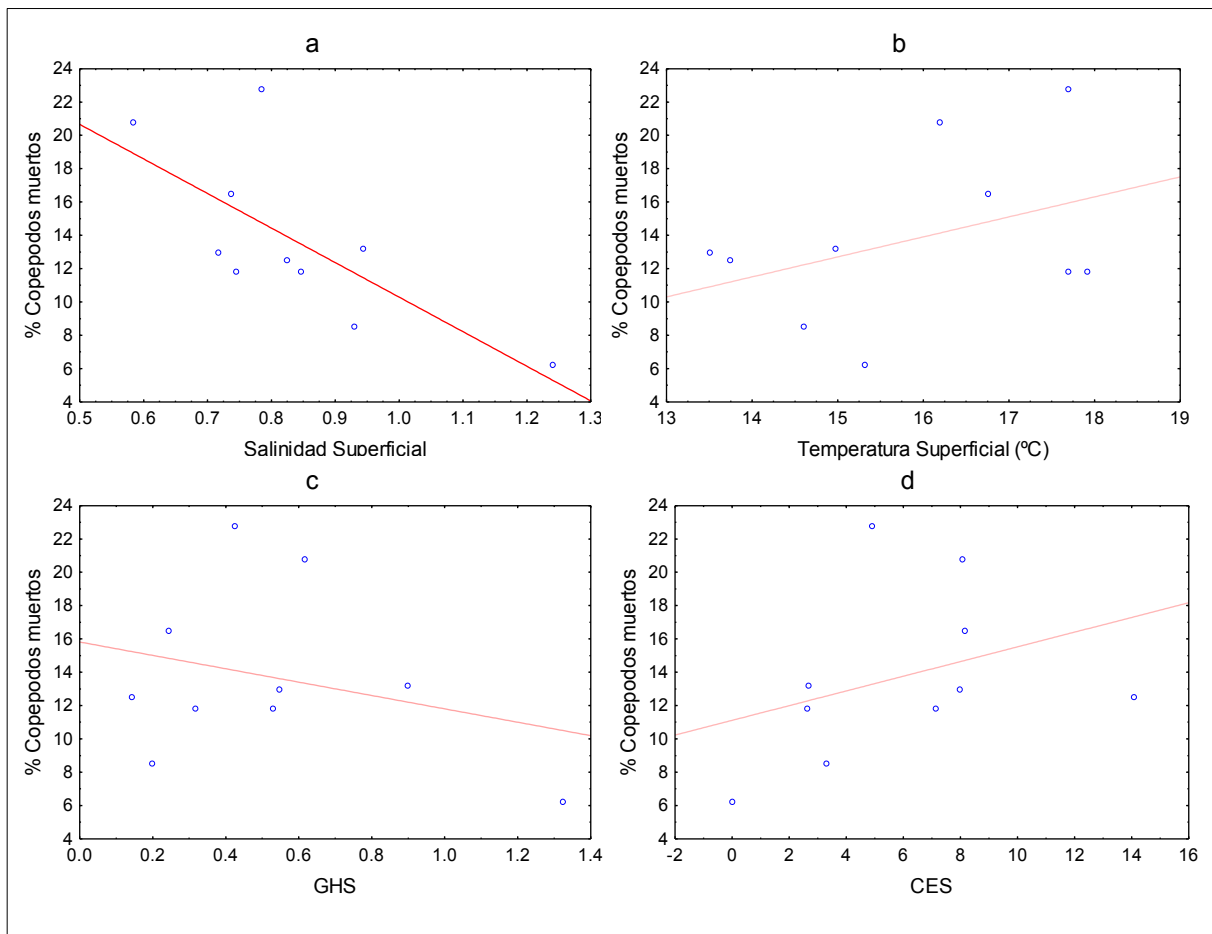


Figura 7. Gráficos de correlación entre porcentaje de copépodos (*A. tonsa*) muertos y: a) Salinidad superficial ($r = -0.7217$, $p = 0.0184$); b) Temperatura Superficial ($r = 0.3884$, $p = 0.2673$); c) Gradiente Horizontal Salino (GHS) ($r = -0.2841$, $p = 0.4264$); d) Coeficiente de estratificación Salina (CES) ($r = 0.3492$, $p = 0.3226$)

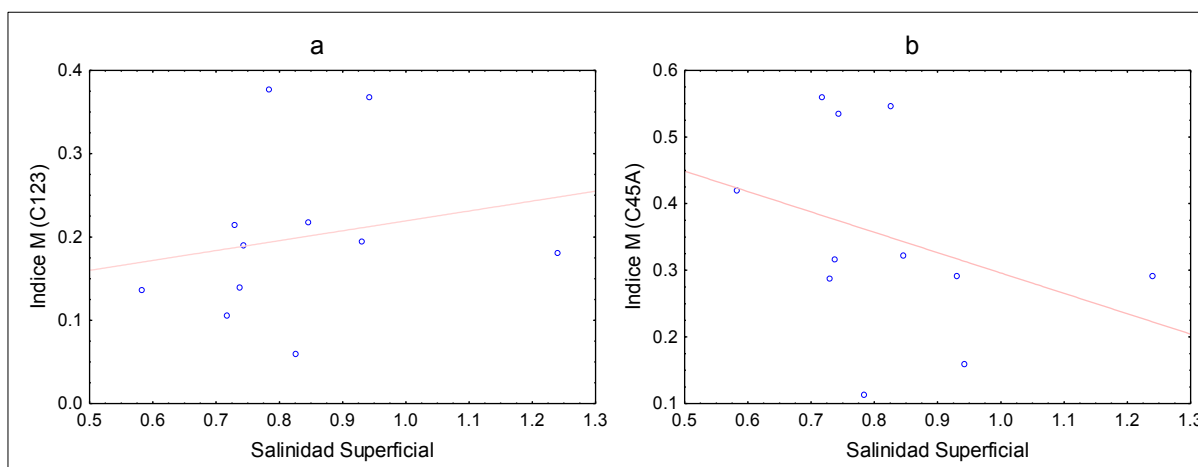


Figura 8. Gráficos de correlación entre: a) Índice M de C123 y Salinidad Superficial ($r=0.2067$, $p=0.5420$); b) Índice M de C45A y Salinidad Superficial ($r=-0.3472$, $p=0.2955$)

DISCUSIÓN

Los resultados de los experimentos de calibración demostraron que la técnica de *tinción vital* puede ser utilizada eficientemente para separar copépodos (*A. tonsa*) vivos de muertos en muestras naturales de zooplancton. En concordancia con Elliot & Tang (2009), no se halló efecto de la salinidad en la eficiencia de tinción, mientras que sí se halló efecto de la temperatura en dicha eficiencia. Esta fue menor a bajas temperaturas, hallándose la menor eficiencia a 10°C, la cual es una temperatura poco habitual en el Río de la Plata (periodo frío: junio-setiembre) (Guerrero *et al.*, 1997). La baja eficiencia hallada en estas condiciones podría deberse a la disminución de las tasas metabólicas de los organismos provocada por las bajas temperaturas, lo cual se traduce en una menor incorporación de la tinta.

La salinidad y temperatura superficial presentaron valores habituales para la zona estudiada. No se hallaron grandes variaciones entre cruceros ni estaciones, a excepción del crucero 4 (CR4), en el cual una de las estaciones presentó una salinidad de 16.4. El valor más bajo de temperatura superficial registrado en los cuatro muestreos fue 13.5°C. Por lo tanto, en base a los experimentos de calibración, se asume que los porcentajes de copépodos muertos hallados no tendrían error asociado a la temperatura. La marcada diferencia entre la salinidad superficial y la salinidad de fondo explica los elevados valores de CES encontrados en CR3 y CR5. Por el contrario, los valores encontrados de GHS fueron bajos. Esto último no significa que no haya cambios drásticos de salinidad horizontales (frentes de salinidad) que puedan afectar la supervivencia de los organismos, sino que si existieran discontinuidades fuertes en escalas espaciales muy pequeñas (decenas/ centenas de metros), éstas podrían no haberse detectado debido a la distancia entre estaciones de muestreo consecutivas.

El copépodo calanoide *A. tonsa* fue la especie dominante en los cuatro muestreos. Esta especie

se caracteriza por ser eurihalina, por ser tolerante a un amplio rango de temperatura y por su capacidad de adaptarse a ambientes muy variables. Estudios previos (Calliari *et al.*, 2006, 2008) sugieren que su dominancia se ve favorecida en ambientes con alta disponibilidad de alimento y baja salinidad. Estas condiciones son típicas de regiones oligo-mesohalinas de muchos estuarios (salinidad entre 2 y 15), donde la competencia con los copépodos marinos se ve reducida. Esto explica la dominancia de *A. tonsa* en el Río de la Plata, y su contribución mayoritaria a la producción secundaria. Sin embargo, no todos los individuos de *A. tonsa* contados en este estudio contribuirían a dicha producción. Los resultados de la tinción vital *in situ* evidenciaron que existe, en promedio, un 16,5% de organismos que estarían muertos y no aportarían a los niveles tróficos superiores. Si bien dicho porcentaje no es despreciable, fue bajo en comparación a lo encontrado por Tang *et al.* (2006) (32%) en un estuario de rango similar de salinidad y a lo esperado *a priori* en este estudio.

Al examinar la incidencia de copépodos muertos separadamente por estaciones, encontramos un valor muy elevado en la estación 3 de CR5 (44.8%). Esta mortalidad masiva podría deberse a la exposición de los organismos a cambios drásticos de salinidad, en zonas de frentes salinos o a causa de eventos de mezcla vertical. En aguas oceánicas las carcasas de los copépodos muertos tienden a acumularse en profundidad (Terazaki & Wada, 1988), mientras que en estuarios, la turbulencia podría provocar la resuspensión de las carcasas, lo cual explicaría su aparición en muestras subsuperficiales. Tang *et al.* (2006) aplicaron la técnica de *tinción vital* en una zona de frente salino, hallando un 75% de copépodos muertos.

Inicialmente, se esperaba encontrar en este estudio, una mayor mortalidad de los estadios juveniles asociada a gradientes salinos. Esta hipótesis se basa en lo hallado por Cervetto *et al.* (1999) en experimentos, en los cuales los juveniles de *A. tonsa* resultaron más sensibles a cambios fuertes de salinidad que los adultos. Sin embargo, los organismos muertos en el presente trabajo correspondieron mayormente a los estadios avanzados de copepodito y adulto (C45A). Esto hace suponer que el estrés ambiental no sería la única causa de mortalidad "natural" en copépodos, y que la fisiología e historia de vida de los organismos tendrían relevancia. Recientemente, Rodríguez *et al.* (2010) evaluaron el efecto del envejecimiento en diferentes parámetros poblacionales de *A. tonsa*. Estos autores hallaron, entre otras cosas, que la alimentación y las tasas de producción de *A. tonsa* disminuyen con la edad, lo cual está asociado al incremento en la acumulación de proteína de daño oxidativo, y que las tasas de mortalidad aumentan con la edad de los organismos.

En los análisis de correlación solo se halló significancia entre la incidencia de copépodos muertos y la salinidad superficial. La mayor mortalidad de *A. tonsa* en salinidades bajas, podría deberse al efecto de los cambios relativos de salinidad en los organismos, los cuales son mayores en sistemas de menor salinidad. Por otra parte, si bien *A. tonsa* tolera las salinidades bajas (2-5), bajo estas condiciones está sometida a un estrés fisiológico fuerte (Calliari *et al.*, 2006), el cual sumado al

universo de factores no analizados (edad, calidad del alimento, presencia de tóxicos, etc.) podría contribuir de forma importante a la aparición de organismos muertos en ambientes de baja salinidad. Otra posible explicación se sustenta en lo hallado por Cervetto *et al.* (1999), quienes encontraron que *A. tonsa* es más sensible al incremento de salinidad que al descenso. De esta forma, es esperable que la mortalidad sea mayor a bajas salinidades donde las probabilidades de incrementos salinos son mayores. Si bien la correlación entre la incidencia de copépodos muertos y el resto de las variables ambientales medidas no fue significativa, se visualizan tendencias en algunos casos (e.g. %copépodos muertos vs. CES). La falta de significancia pudo deberse al bajo número de eventos analizados (n). Alternativamente, este resultado podría estar indicando que la mortalidad debida a gradientes sea de naturaleza episódica (i.e., eventos puntuales de alta mortalidad cuando ocurre un evento de mezcla) vs. mortalidad continua debido a la mezcla. Un proceso de este tipo implicaría que difícilmente se encuentre una correlación entre gradientes y mortalidad, ya que la mayoría de las observaciones no coincidirían con episodios de alta mortalidad asociados a fuertes gradientes. Esto debe ser comprobado realizando estudios de largo plazo que abarquen un mayor gradiente de condiciones físico-químicas (ampliar la longitud del transecto), así como aplicando la técnica luego de eventos puntuales (i.e. tormentas, eventos de contaminación) que puedan ocasionar episodios de altas mortalidades. Esta técnica puede ser de gran ayuda para evaluar el impacto inmediato de algún tipo de contaminación en la comunidad zooplanctónica. Recientemente, se aplicó la técnica de *tinción vital* en un arroyo afectado por un derrame de petróleo, hallándose un elevado porcentaje de copépodos *A. tonsa* muertos (51,7%) (Datos no publicados).

La técnica de *tinción vital* demostró ser una herramienta de fácil aplicación en campo, lo cual permite a los investigadores incorporarla a las estimaciones rutinarias de producción secundaria. De esta manera, los investigadores estarían corrigiendo el error que introducen los organismos muertos a dichas estimaciones.

La *tinción vital* resultó efectiva para discriminar copépodos *A. tonsa* vivos de muertos en las condiciones ambientales específicas del Río de la Plata. Si bien *A. tonsa* es la especie dominante en el Río de la Plata, es necesario extender su aplicación a otras especies de copépodos, así como a otros grupos zooplanctónicos y de esta manera ampliar el alcance de la misma. La importancia de su perfeccionamiento radica en que su aplicación proporciona información que nos permite inferir aspectos de la ecología de los organismos, de su biología y de sus parámetros poblacionales. A su vez, nos brinda información muy valiosa que podría ayudar a comprender de forma más global y precisa los flujos de materia y energía en los sistemas acuáticos.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a toda mi familia, especialmente a mis padres y a mi hermano, su apoyo fue fundamental para alcanzar esta meta. A Miri, quien siempre estuvo para alentarme y para ayudarme en todo lo que necesité. Al equipo de trabajo, a Danilo por siempre estar dispuesto a responder preguntas y a brindar consejos para mejorar la calidad del trabajo, y a Noé por ser una gran compañera de trabajo. Por último, agradezco a mis amigos, a todos, por hacer más larga y disfrutable la carrera.

Dedico especialmente todo mi trabajo a mi queridísima prima Maite.

BIBLIOGRAFÍA

- Acuña A., Arena G., Berois N., Mantero G., Masello A., Nion H., Retta S., Rodríguez M., (1997). The croacker (*Micropogonias furnieri*): biological cycle and fisheries in the Río de la Plata and its oceanic front. pp. 191-228 en (P. G. Well & G. R. Daborneds) *The Río de la Plata, An environmental overview*. CIID/UNESCO, ISBN 0-7703-2852-0
- Attrill M. J., (2002). A testable linear model for diversity trends in estuaries. *J. Animal. Ecol.*, 71:262–269
- Avery D. E., Altland K. K., Dam H. G., (2008). Sex-related differential mortality of a marine copepod exposed to a toxic dinoflagellate. *Limnol. Oceanogr.*, 53(6):2627–2635
- Berasategui A. D., Marque S. M., Gómez-Erache M., Ramírez F. C., Mianzan H. W., Acha E. M., (2005). Copepod assemblages in a highly complex hydrographic region. *Estuar. Coast. Shelf Sci.*, 66:483-492
- Calbet A., Landry M. R., Scheinberg R. D., (2000). Copepod grazing in a subtropical bay: species-specific responses to a midsummer increase in nanoplankton standing stock. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 193:15-84
- Calliari D., Andersen Borg M. C., Thor P., Gorokhova E., Tiselius P., (2008). Instantaneous salinity reductions affect the survival and feeding rates of the co-occurring copepods *Acartia tonsa* Dana and *A. clausi* Giesbrecht differently. *J. of Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 362:18–25
- Calliari D., Andersen C., Thor P., Gorokhova E., Tiselius P., (2006). Salinity modulates the energy balance and reproductive success of co-occurring copepods *Acartia tonsa* and *A. clausi* in different ways. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 312:177-188
- Calliari D., Cervetto G., Castiglioni R., (2004). Summertime herbivory and egg production by *Acartia tonsa* at the Montevideo coast-Río de la Plata. *OPHELIA*, 58
- Carpenter E. J., Peck B. B., Anderson S. J., (1974). Survival of copepods passing through a nuclear power station on northeastern Long Island Sound, USA. *Marine Biology*, 24:49-55
- Cervetto G., Calliari D., Rodríguez-Graña L., Lanceot G., Castiglioni R., (2006). Zooplankton de ambientes costeros de Uruguay: añadiendo piezas al rompecabezas. En: Menafrá, R., Rodríguez-Gallego

L., Scarabino F., Conde D. (Eds.), Bases para la conservación y el manejo de la costa uruguaya. Vida Silvestre Uruguay, pp. 105–111

Cervetto G., Gaudy R., Pagano M., (1999). Influence of salinity on the distribution of *Acartia tonsa* (Copepoda, Calanoida). J. Exp. Mar. Biol. Ecol., 239:33–45

Crippen R. W., Perrier J. L., (1974). The use of Neutral Red and Evans Blue for live-dead determinations of marine plankton. Stain Technology, 49:97-104

Dressel D. M., Heinle D. R., Grote M. C., (1972). Vital staining to sort dead and live copepods. Chesapeake Science, 13:156-159

Elliott D. T., Tang K. W., (2009). Simple staining method for differentiating live and dead marine zooplankton in field samples. Limnol. Oceanogr.: Methods, 7:585–594

Fleming J. M., Coughlan J., (1978). Preservation of vitally stained zooplankton for live/dead sorting. Estuaries, 1:135-137

Framiñan M., Brown O., (1996). Study of the Río de la Plata turbidity front. Part I: Spatial and temporal distribution. Continental Shelf Research, 16:1259-1283

Guerrero R., Acha E., Framiñan M., Lasta C., (1997). Physical oceanography of the Rio de la Plata Estuary, Argentina. Continental Shelf Research, 7:727-742

Hirst A. G., Kiørboe T., (2002). Mortality of marine planktonic copepods: global rates and patterns. Mar. Ecol. Prog. Ser., 230:195–209

Humes A. G., (1994). How many copepods? Hydrobiologia, 292/293: 1-7

Kimmerer W. J., McKinnon A. D., (1990). High mortality in a copepod population caused by a parasitic dinoflagellate. Marine Biology, 107:449-452

Kiørboe T., (1993). Turbulence, Phytoplankton Cell Size, and the Structure of Pelagic Food Webs. Advances in Marine Biology, 29:1-72

Moore D. S., McCabe G. P., (1999) Introduction to the Practice of Statistics, 3rd ed. New York: W. H. Freeman

Rodriguez-Graña L, Calliari D, Tiselius P, Hansen B. W., Skold H. N., (2010). Gender-specific ageing and non-Mendelian inheritance of oxidative damage in marine copepods. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 401:1–13

Tang K. W., Freund C. S., Schweitzer C. L., (2006). Occurrence of copepod carcasses in the lower Chesapeake Bay and their decomposition by ambient microbes. *Estuar. Coast. Shelf Sci.*, 68:499-508

Terazaki M., Wada M., (1988). Occurrence of large numbers of carcasses of the large, grazing copepod *Calanus cristatus* from the Japan Sea. *Marine Biology.*, 97:177-183

Tiselius P, Andersen Borg C. M., Hansen B. W., Hansen P. J., Nielsen T. G., Vismann B., (2008). High reproduction, but low biomass: mortality estimates of the copepod *Acartia tonsa* in a hyper-eutrophic estuary. *Aquat Biol.*, 2: 93–103

Thor P, Nielsen T. G., Tiselius P., (2008). Mortality rates of epipelagic copepods in the post-spring bloom period in Disko Bay, western Greenland. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 359: 151–160