



Universidad de Jaén

Escuela de Doctorado

**Vulnerabilidad inducida por
concentraciones subletales de
agroquímicos: respuestas de *Daphnia
magna* a la historia de perturbación y
cambio global**

Autor: María Eugenia López Valcárcel

Fecha: 09/04/2024

ISBN:
Licencia CC

RUJJA

Dña. GEMA PARRA ANGUITA, Catedrática de Ecología de la Universidad de Jaén y Dña. ANA ISABEL DEL ARCO OCHOA, Doctora por la Universidad de Jaén. CERTIFICAN: Que los trabajos llevados a cabo en la elaboración de la Tesis Doctoral titulada: “Vulnerabilidad inducida por concentraciones subletales de agroquímicos: respuestas de *Daphnia magna* a la historia de perturbación y cambio global”, presentada por María Eugenia López Valcárcel, han sido realizados bajo su dirección, reuniendo las condiciones académicas necesarias para su presentación y defensa pública para optar al grado de Doctor por la Universidad de Jaén.

En Jaén a 5 de abril de 2024

PARRA
ANGUITA
MARIA
GEMA -
26018515H

Firmado digitalmente por
PARRA ANGUITA
MARIA GEMA -
26018515H
Fecha:
2024.04.05
09:47:13 +02'00'

M^a Gema Parra Anguita

DEL ARCO
OCHOA
ANA
ISABEL -
75116373Y

Firmado digitalmente por
DEL ARCO OCHOA ANA
ISABEL - 75116373Y
Nombre de reconocimiento
(DN): c=ES,
serialNumber=IDCES-75116
373Y, givenName=ANA
ISABEL, sn=DEL ARCO
OCHOA, cn=DEL ARCO
OCHOA ANA ISABEL -
75116373Y
Fecha: 2024.04.05 11:25:38
+02'00'

Ana Isabel del Arco Ochoa



A mi madre Lucía, a mi padre Miguel y a mi hermano Gabriel,
por confiar ciegamente en mí y darme la oportunidad de
seguir el camino que he escogido con orgullo.

Agradecimientos

He estado retrasando este momento hasta el día de antes de depositar la tesis y es que son tantas las vivencias durante estos 5 años que tengo una maraña mental de todo lo que me gustaría decir. Después de una pandemia, infinitas mudanzas, un incendio, entre otras cosas, hemos llegado hasta el final. Espero y deseo no olvidar nada ni a ninguna de las personas que han hecho este camino tan bonito e inolvidable.

En primer lugar, me gustaría comenzar agradeciendo al departamento de Biología Animal, Biología Vegetal y Ecología de la Universidad de Jaén, y dentro de este departamento al Grupo de investigación *Ecología y Biodiversidad de Sistemas Acuáticos*, RNM300, por haberme acogido durante estos años y haberme proporcionado los medios para realizar esta tesis. También transmitir mi agradecimiento por el apoyo técnico y humano del Centro de Instrumentación CientíficoTécnica (CICT) de los Servicios Centrales de Apoyo a la Investigación de la Universidad de Jaén (UJA, MICINN, Junta de Andalucía, FEDER), al Centro de Estudios Avanzados en Ciencias de la Tierra, Energía y Medio Ambiente de la Universidad de Jaén y al proyecto de la convocatoria del Ministerio de Transición Ecológica 2021: *Soluciones basadas en la Naturaleza frente a contaminantes emergentes: Protegiendo las aguas para la Transición Ecológica* (TED2021-129910B-I00).

A mi directora Gema Parra, porque desde el primer seminario suyo al que asistí en tercero de carrera tuve una corazonada y supe que quería iniciar mi carrera en la ciencia con ella. Gracias por trasmitirme tus ganas, gracias por motivarme incluso cuando no eras consciente en mis cientos de visitas a tu despacho y gracias por ser un **referente** en la ciencia y un “todoterreno”. Es y ha sido un placer trabajar contigo, espero poder seguir haciéndolo.

A mi directora Ana del Arco, a pesar de habernos conocido y trabajado a través de una pantalla la mayor parte del tiempo, estoy muy agradecida por todo lo que me has enseñado durante estos 5 años. Gracias por tu plena sinceridad y preocupación desde el minuto 0, gracias por ser realista y ayudarme a poner los pies en la tierra cuando ha sido necesario. Gracias por estar siempre disponible y por tu constancia. ¡Lo hemos conseguido! a pesar de las fechas ;).

A Manuel Miguel Ramos, por su ayuda para adentrarme un poco más en el mundo de la estadística y por enseñarme a sacar adelante un metaanálisis, que se dice pronto, muchísimas gracias.

A Cristiano Araújo, por su colaboración en esta tesis, por su absoluta disponibilidad y amabilidad, muchísimas gracias.

To Robert Fischer, thank you for believing in me and giving me confidence while I was away from home.

A mi familia, por confiar en mí, en ocasiones, más que yo misma. Gracias mamá, por ser mi referente en la vida, por ser ejemplo de mujer luchadora, por estar ahí incondicionalmente. Gracias papá, por ser tan bueno con todo lo que te rodea y por apoyarme tanto. Gracias Gabriel, por estar ahí, y aunque sé que no eres de muchas palabras, sé lo orgulloso que estás, al igual que lo estoy yo de tí. Gracias titas Antonia y Mari por las risas y por el apoyo constante, gracias tito Joaquín por leerte mis artículos de “gambas”, a María por ser un ejemplo de valentía, siempre te echo de menos, a Ayla, Lidia y M^a Jesús por hacer mis alegrías tuyas.

A Sara, por estar a mi lado, por entenderme y escucharme, por haber estado en mis momentos más brillantes y en mis momentos más oscuros, por haber decidido quedarte y hacer de estos dos últimos años los más bonitos.

A Frida, mi hija de otra especie, y aunque parezca increíble quien más me conoce, gracias por la compañía, el amor y el consuelo.

A la familia que he elegido y me ha elegido a mí.

A Miriam, Rocío, Amalia, Juanjo, Emi, Azahara y Natacha, porque a pesar de los años seguimos juntas, porque un rato con vosotras es resetear mi mente y volver a la infancia, os quiero siempre en mi equipo.

A Amanda, tengo tantas cosas por las que darte las gracias que necesitaría otra tesis para poder hacerlo. Para mí eres mi hermana. Gracias por tanto.

A Elvira, por alegrarme la vida durante estos años y repartir felicidad por donde pasa.

A Jose Alfonso, por ser papá conmigo (de un gatito) y por tantos y tantos momentos de risas, lágrimas y sustos jeje

A Agus e Iván, gracias mis niños por todo, por haber vivido conmigo y por haberme regalado los mejores años de mi estancia en Jaén.

A Alberto, por su comprensión y por estar ahí a pesar de los años y los cambios. Ánimo con la vida ;).

A Laura, Almudena, M^a Ángeles y Fran, gracias por haberme acompañado durante estos años de ciencia, que alegría haberos visto evolucionar desde que terminamos la carrera y que alegría saber que siempre nos reencontraremos.

A mis niñas, a mi maravilloso descubrimiento, Ali, Sonia, Pilar, María Villena, Elena y Gema, gracias por enseñarme el poder que puede tener un grupo de mujeres tan diferentes y gracias por los viernes de gatos.

A Aurora, por haber aparecido en el último momento como un soplo de aire fresco, gracias por aguantarme y apoyarme en esta última etapa y gracias por ser tan feliz ;)

Podría estar eternamente escribiendo, pero creo que ya está siendo demasiado extenso... Así que, por último, quería hacer un agradecimiento muy especial a mi equipo

de rugby, gracias por enseñarme que, hasta la más pequeña, si se lo propone, puede conseguir cosas enormes. Gracias, gracias y gracias.

ÍNDICE

RESUMEN	12
GLOSARIO	14
INTRODUCCIÓN	18
Ecosistemas acuáticos y contaminación por agroquímicos	18
Ecotoxicología y complejidad de la contaminación por agroquímicos en Sistemas Acuáticos.....	20
La repercusión de las concentraciones subletales de agroquímicos	22
Historia de perturbación y poblaciones vulnerables	24
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	28
ESTRUCTURA DE LA TESIS	30
CAPÍTULOS	37
Capítulo I: Effect of Sublethal Concentrations of Agrochemicals on Zooplankton Populations: A Meta-analysis study.....	39
Capítulo II: Environmental disturbance history undermines population responses to cope with anthropogenic and environmental stressors	81
Capítulo III: Sublethal exposure to agrochemicals impairs zooplankton ability to face future global change challenges.....	84
Capítulo IV: Zooplankton vulnerability to glyphosate exacerbated by global change... 87	
Capítulo V: Reduced avoidance behaviour in <i>Daphnia magna</i> due to the agrochemical-induced vulnerability.....	90
RESUMEN DE LOS RESULTADOS	121
Capítulo I.	121
Capítulo II.....	122
Capítulo III.....	123
Capítulo IV.....	125
Capítulo V.....	126
DISCUSIÓN	129
Efecto de concentraciones subletales sobre poblaciones zooplanctónicas	¡Error! Marcador no definido.
Vulnerabilidad y factores de cambio global.	¡Error! Marcador no definido.
Vulnerabilidad y fragmentación química de hábitats.	141

Aspectos de la tesis relacionados con la Evaluación de Riesgo Ecológico.	143
Aplicabilidad de la tesis en escenarios de cambio global. Contaminantes emergentes.	144
CONCLUSIONES.....	147
REFERENCIAS	150

Resumen

Las prácticas agrícolas actuales, principalmente la utilización de productos agroquímicos, provocan que las masas de agua continentales estén contaminadas a través de procesos de escorrentía, deriva y lixiviación, afectando a la biota acuática y, consecuentemente, a los ecosistemas. Las evaluaciones ecotoxicológicas de los efectos de los agroquímicos en la biota de sistemas acuáticos se basan en gran medida en ensayos de laboratorio realizados en entornos simplificados y controlados que no abarcan la complejidad de dicha contaminación. La dificultad para integrar, además, la complejidad de los ecosistemas acuáticos en ensayos de laboratorio supone un obstáculo en la incorporación de dinámicas temporales en las evaluaciones de riesgo toxicológico, limitando nuestra capacidad para evaluar los efectos transgeneracionales de los agroquímicos en las comunidades acuáticas y su capacidad de recuperación frente a las perturbaciones. Los organismos zooplanctónicos pueden sufrir efectos nocivos con la exposición a concentraciones no letales y supuestamente seguras, pero pueden persistir en entornos perturbados gracias a los mecanismos de desintoxicación. Sin embargo, la inversión biológica (e.g.: gasto energético, síntesis de proteínas...) que estos procesos acarrearán podría afectar negativamente a la eficacia biológica o fitness. Por lo tanto, se consideró importante estudiar los posibles efectos de concentraciones subletales de agroquímicos en organismos zooplanctónicos. La hipótesis de partida en esta tesis fue que la exposición a concentraciones de agroquímicos subletales y aceptadas como seguras en ecosistemas acuáticos, tienen efectos negativos sobre las especies zooplanctónicas. Para probar esta hipótesis se siguieron distintas etapas de investigación y experimentación: En primera instancia, se recopiló, evaluó y analizó la información disponible sobre el efecto de concentraciones subletales de agroquímicos en especies

zooplanctónicas a través de la realización de una revisión sistemática y un metanálisis, donde se confirmó estadísticamente la evidencia científica del efecto negativo de la exposición a concentraciones subletales de agroquímicos sobre la abundancia de poblaciones zooplanctónicas. Posteriormente en ensayos de laboratorio se indujo un estado de “vulnerabilidad” en poblaciones de *D. magna* mediante una exposición continuada a concentraciones subletales de agroquímicos, lo que se ha considerado historia de perturbación. Se verificó esta vulnerabilidad mediante el estudio de las respuestas a la exposición posterior a factores estresantes y probables en escenarios de cambio global, como son la falta de alimento, el incremento de la temperatura, la salinización y la exposición a otros contaminantes. En estos estudios las respuestas de las poblaciones vulnerables de *D. magna* ante exposiciones a factores estresantes de cambio global difieren de las poblaciones control sin historia previa de perturbación, mostrando una mayor vulnerabilidad. Por último, se evaluó la capacidad de escape en poblaciones con vulnerabilidad inducida de *D. magna*. La simulación y el análisis de esta respuesta de comportamiento son relevantes en el contexto de escenarios de hábitats fragmentados químicamente. Los resultados obtenidos demostraron que las poblaciones vulnerables muestran una menor capacidad de escape que poblaciones sin historia previa de perturbación. Consideramos que la información recopilada durante esta tesis es relevante para la mejora de la Evaluación de Riesgo Ambiental. Además, la evidencia científica de este estudio podría contribuir a la suma de evidencias científicas que abogan por la revisión de las diferentes legislaciones sobre las concentraciones de agroquímicos permitidas, y entendidas como seguras para los medios acuáticos.

Glosario

Cambio global / Global change: El cambio global se refiere a los cambios a gran escala y de larga duración en los sistemas terrestres y acuáticos de la Tierra, causados principalmente por actividades humanas, como la emisión de gases de efecto invernadero, la deforestación, la urbanización y la contaminación. Estos cambios tienen impactos significativos en los ecosistemas, el clima, la biodiversidad y los servicios ecosistémicos, y pueden conducir a consecuencias adversas para el medio ambiente y la sociedad, como pueden ser: el aumento de la temperatura global, la pérdida de hábitats, la alteración de los patrones climáticos y la extinción de especies.

Concentraciones subletales / Sublethal concentrations: En ecotoxicología, las concentraciones subletales se refieren a niveles de exposición a una sustancia tóxica que no causan una mortalidad inmediata o una respuesta aguda en los organismos expuestos, pero pueden provocar efectos adversos a largo plazo en su salud y comportamiento.

Concentración Sin Efecto Observado / No Observed Effect Concentration (NOEC): La NOEC es la concentración máxima a la cual no se detecta ningún efecto negativo en un organismo en particular bajo condiciones experimentales específicas. Se utiliza comúnmente en estudios de toxicidad para determinar los niveles seguros de exposición a sustancias químicas y establecer límites de calidad ambiental y estándares de seguridad.

Estresores de cambio global / Global change stressors: Los estresores de cambio global son aquellas influencias ambientales que causan perturbaciones significativas en los ecosistemas como resultado del cambio global. Estos factores, en ecosistemas acuáticos, pueden incluir el aumento de la temperatura del agua,

salinización, la contaminación por nutrientes y productos químicos, la alteración de los patrones de precipitación y escorrentía, la pérdida de hábitats acuáticos debido a la urbanización y la degradación del suelo, entre otros.

Fragmentación química / Chemical fragmentation: La fragmentación química de un hábitat se refiere al proceso mediante el cual la presencia y concentración de diversos compuestos químicos en el agua se distribuyen de manera heterogénea y fragmentada en el entorno, en este caso, de los sistemas acuáticos.

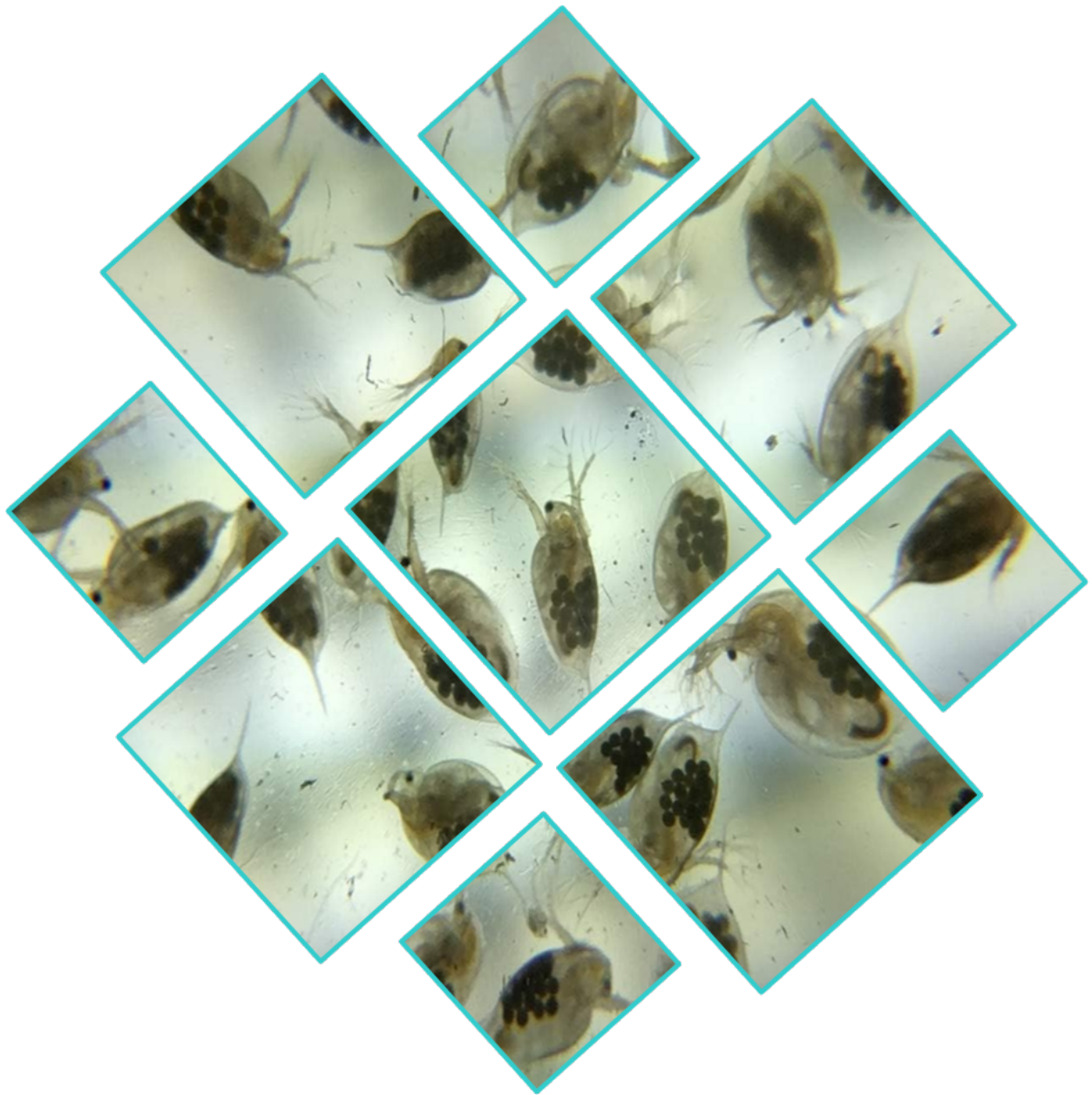
Historia de perturbación / Disturbance history: En el contexto de la ecotoxicología acuática, una historia de perturbación se refiere a eventos pasados que han perturbado los ecosistemas acuáticos, con un enfoque particular en la contaminación química y sus efectos en la biota acuática. Además, implica investigar cómo estas perturbaciones han afectado la calidad del agua, la biodiversidad acuática, la estructura de las comunidades biológicas y los procesos ecológicos en los ecosistemas acuáticos a lo largo del tiempo.

Metaanálisis / Meta-Analysis: Un metaanálisis es un método estadístico que combina los resultados de múltiples estudios independientes sobre un tema específico para proporcionar una estimación cuantitativa más precisa del efecto de interés. Esto implica la recopilación de datos de varios estudios primarios, su síntesis y análisis estadístico para identificar patrones, tendencias o efectos generales. El objetivo principal del metaanálisis es obtener conclusiones robustas y generalizables al considerar un conjunto amplio de evidencia empírica.

VARIABLES MODERADORAS / Moderator variables: Las variables moderadoras en el contexto de un metaanálisis son aquellas que se incorporan al análisis con el fin de explorar cómo influyen o moderan la relación entre las variables de interés. Estas variables pueden incluir características de los estudios analizados, así como variables relacionadas con los participantes u organismos estudiados y la metodología realizada. Su inclusión tiene como objetivo controlar posibles fuentes de variabilidad entre los estudios y examinar la heterogeneidad de los resultados.

Vulnerabilidad / Vulnerability: La vulnerabilidad está referida a la capacidad reducida de una población para resistir los impactos actuales debido a exposiciones previas.

INTRODUCCIÓN



Introducción

Ecosistemas acuáticos y contaminación por agroquímicos

Las actividades antropogénicas provocan cada vez más impactos en los ecosistemas acuáticos (Amiard-Triquet y Amiard, 2015; Verhougstraete et al., 2015). Las prácticas agrícolas intensivas sobre las cuencas de drenaje hacen que las masas de agua continentales se vean afectadas por contaminación y llegada de sedimentos, a través de procesos de escorrentía, deriva y lixiviación. Estos procesos hacen que los agroquímicos aplicados en los sistemas de cultivo intensivos lleguen a los cuerpos acuáticos dañando la biota y sus procesos (Parra et al., 2005; del Arco et al., 2019; Kumar et al., 2021). El incremento en el uso de productos agroquímicos ha hecho que esta práctica sea considerada como uno de los impulsores antropogénicos de cambio global más importantes (Schäfer et al., 2016; Bernhardt et al., 2017). Además, la mayoría de los agroquímicos utilizados para la agricultura intensiva permanecen en el agua periodos de tiempo considerables, ya que no se degradan con facilidad, lo que lleva a que la comunidad acuática esté en contacto con estos tóxicos durante periodos de tiempo más prolongados (Ramasamy et al., 2007; Schäfer et al., 2011). Según información recopilada por la European Environment Agency, EEA, (2023), las ventas de pesticidas en la Unión Europea (UE) se mantuvieron constantes alrededor de 350.000 toneladas/año desde 2011 hasta 2020. España, acompañada de Italia, Alemania y Francia han comercializado y usado 100 veces más en la mayoría de los grupos de sustancias activas, que el resto de países de la UE, siendo los cuatro principales productores agrícolas dentro de la UE (Eurostat, 2022). Además, un resumen reciente de la EEA destacó que en 2020 uno o más pesticidas fueron detectados por encima de los umbrales de seguridad en el 22% de todos los lugares donde se habían realizado

monitoreos en superficies acuáticas (EEA, 2023). En países europeos como Irlanda, el 4,5% de los suministros de agua potable muestreados superaron el umbral estándar establecido para pesticidas (EPA, 2021). A pesar de los esfuerzos para desarrollar una regulación preventiva y una Evaluación de Riesgos Ambientales (ERA), el estudio de Brühl y Zaller (2019) argumenta que esta evaluación no es suficiente para prevenir los efectos perjudiciales de los pesticidas registrados y comúnmente utilizados. En dicho estudio, se marca la necesidad de considerar los efectos del tiempo de exposición y de la acumulación de impactos sobre la biodiversidad. Evaluaciones recientes muestran que la exposición a pesticidas está relacionada con una amplia gama de efectos directos (tanto letales como no letales) e indirectos sobre la biodiversidad (EEA, 2023). Se requieren investigaciones que evalúen el riesgo ambiental en escenarios realistas, teniendo en cuenta comunidades naturales no objetivo de dichas aplicaciones, por ejemplo, en el estudio de del Arco et al., (2019), se evaluó la respuesta de comunidades planctónicas a tratamientos individuales y mixtos de sulfato de cobre y nitrato de amonio (pesticidas que pueden coexistir dentro de un mismo sistema acuático), donde ambas concentraciones de agroquímicos estuvieron por debajo de los límites legales, pero, aun así, afectaron negativamente a la comunidad planctónica. Por lo tanto, es necesario tener en cuenta en las evaluaciones de riesgo ambiental que lo habitual es la realización de múltiples aplicaciones de varios pesticidas durante la temporada de cultivo y que estas aplicaciones afectaran a comunidades naturales no objetivo. Esto incluiría estudios que consideren el tiempo de exposición y la acumulación de impactos de múltiples pesticidas en las poblaciones naturales (del Arco et al., 2019; Brühl y Zaller, 2019; EEA, 2023).

Ecotoxicología y complejidad de la contaminación por agroquímicos en Sistemas Acuáticos

“La Ecotoxicología es una subdisciplina de la Ecología que se centra en el efecto de sustancias tóxicas en los ecosistemas y en sus componentes vivos” (Jorgensen et al., 2010). Esta disciplina, nos proporciona información a través de la evaluación del efecto de sustancias tóxicas (ya sean de procedencia antropogénica o natural), sobre la riqueza, abundancia y distribución de especies (Bard, 2008). El desarrollo de la ecotoxicología ha permitido la implementación de evaluaciones de riesgo tanto retrospectivas como prospectivas, con la finalidad de tener una capacidad de gestión del riesgo mejor en escenarios futuros derivados de la presencia de sustancias en los ecosistemas (Amiard-Triquet y Amiard, 2015). La evaluación predictiva de riesgos busca evaluar los riesgos futuros derivados del impacto de sustancias químicas en el medio ambiente. El 1 de julio de 2007 entró en vigor en la Unión Europea (UE) una nueva política química llamada REACH (Registro, Evaluación y Autorización de Sustancias Químicas). Se trata de una regulación establecida por la UE diseñada para mejorar la protección de la salud humana y el medio ambiente frente a los riesgos que pueden generar los productos químicos, al tiempo que promueve la competitividad de la industria química de la UE. También fomenta métodos alternativos para la evaluación de los peligros de sustancias con el fin de reducir el número de pruebas en animales (Lulei, 2008). Desde la implementación de esta regulación química ha habido una mejora significativa con respecto al vertido de sustancias tóxicas en los ecosistemas (Commission of the European Communities, 2003).

Las evaluaciones ecotoxicológicas de los efectos de los agroquímicos en la biota de sistemas acuáticos se enfrentan a la complejidad de dicha contaminación. Por un

lado, podemos señalar una problemática asociada a la metodología. Estas evaluaciones suelen depender en gran medida de ensayos de laboratorio realizados en entornos simplificados y controlados, lo que facilita la identificación de los modos de acción y las concentraciones umbral que causan alteración en el sistema (Hébert et al., 2021). Sin embargo, esta aproximación presenta limitaciones, ya que tiende a centrarse en ensayos con una única especie y un único agroquímico, pasando por alto la posible influencia de numerosos factores indirectos e interactivos (Relyea y Hoverman, 2008). La dificultad de integrar la complejidad de los ecosistemas acuáticos en ensayos de laboratorio conlleva el riesgo de limitar la comprensión de los impactos reales de los agroquímicos en la biodiversidad y el funcionamiento de los ecosistemas (Coors y De Meester, 2008; Relyea, 2009).

A la hora de crear escenarios realistas para la comprensión del funcionamiento ecosistémico es necesario tener en cuenta factores de cambio global (Parra et al., 2021). El funcionamiento de sistemas acuáticos continentales, específicamente los humedales temporales, se encuentra influenciado por diversos factores relacionados con el cambio global, como puede ser la presión sobre los recursos hídricos generada por el crecimiento poblacional y los cambios en el uso del suelo (Sim et al., 2013), los cambios en los regímenes de precipitación y evaporación que pueden llevar a periodos de sequía más prolongados (Sim et al., 2013), los cambios en la cobertura vegetal y la calidad del suelo debido a las prácticas agrícolas intensivas y la urbanización de zonas naturales (Bagella y Caria, 2013; Wassens et al., 2013), el impacto en la biodiversidad (Blanco et al., 2020), los eventos climáticos extremos como olas de calor prolongadas (Bagella y Caria 2013; Wassens et al., 2013), los efectos en las cascadas tróficas (Pinero-Rodríguez et al., 2021), y el aumento de la salinidad que puede conducir a una

simplificación de las redes tróficas (Brucet et al., 2009; Jeppesen et al., 2015). Por lo tanto, estudiar los factores de cambio global es esencial para comprender, prever y mitigar los impactos ambientales, promover la conservación de la biodiversidad, gestionar de manera sostenible los recursos naturales y tomar decisiones informadas para un futuro más resiliente (Parra et al., 2021).

La dificultad para integrar la complejidad de los ecosistemas acuáticos en ensayos de laboratorio se asocia al obstáculo que representa la incorporación de dinámicas temporales en las evaluaciones de riesgo toxicológico, limitando, nuestra capacidad para evaluar los efectos de los agroquímicos a largo plazo en las comunidades acuáticas y su capacidad de recuperación frente a perturbaciones (Jansen et al., 2011; Halstead et al., 2014). Así mismo, el modelo actual de evaluación de riesgos no logra captar la exposición acumulada y combinada a los pesticidas, ni los impactos resultantes en los ecosistemas (Bopp et al., 2019). Es importante tener en cuenta que los compuestos bajo investigación pueden no ser necesariamente la única causa de efectos biológicos y el estrés causado por productos químicos puede estar potenciado por otros factores de estrés no químicos (Johnson y Sumpter, 2016; Burton Jr, 2017).

La repercusión de las concentraciones subletales de agroquímicos

Existe una gran cantidad de información toxicológica sobre el efecto de los agroquímicos basada en diferentes pruebas de toxicidad aguda en distintos organismos. La finalidad de estos estudios es evaluar y determinar las concentraciones letales de los agroquímicos en dichas especies (Bickham, 2011; Hébert, 2021). Por convenio, en organismos acuáticos, se han utilizado los valores de LC₅₀ (la concentración que es letal para el 50 % de la población expuesta) como herramienta en la generación de escenarios

de exposición seguros, asumiendo factores que pueden representar una centésima parte de la LC_{50} calculada. Estas concentraciones, 100 o 1000 veces inferiores a la letal, son entendidas como concentraciones subletales y, desde el punto de vista del procedimiento establecido de riesgo ambiental y de la normativa, se aceptan como seguras.

Si bien los ensayos estandarizados son cruciales para establecer conocimientos fundamentales sobre los efectos agudos de los agroquímicos, existe un vacío de conocimiento sobre cómo la exposición a concentraciones subletales de estos agroquímicos podría afectar a los organismos (Liao et al., 2015; del Arco et al., 2016). Este enfoque no capta la realidad ambiental donde existe una gran cantidad de contaminantes en los sistemas acuáticos con valores de concentración que son generalmente bajos, incluso alcanzando rangos de concentración de $ng\ L^{-1}$ (Robles-Molina et al., 2014). Algunos autores han demostrado que los organismos zooplanctónicos también pueden sufrir efectos nocivos con exposición a concentraciones supuestamente seguras (Bendis y Relyea, 2014). Las poblaciones zooplanctónicas pueden persistir en entornos perturbados gracias a los mecanismos de desintoxicación que, a su vez, podrían afectar negativamente a la eficacia biológica o fitness (principalmente afectando al crecimiento y a la reproducción) (Hua et al., 2014; Liao et al., 2015). Por lo tanto, es importante considerar los posibles efectos de concentraciones subletales de agroquímicos en organismos zooplanctónicos a la hora de realizar una evaluación de riesgo toxicológico en sistemas acuáticos (Pease y Bull, 1988; Hoffmann y Parsons, 1991; Saro et al., 2012; Robles-Molina et al., 2014).

Historia de perturbación y poblaciones vulnerables

A pesar de los esfuerzos legislativos para limitar la contaminación (91/271/CEE, 2020), los ecosistemas acuáticos sufren la exposición a múltiples entradas de sustancias químicas, tanto continuas como discontinuas, y en concentraciones variables, que generan una historia de perturbaciones ambientales única para cada comunidad o población (Micheli et al., 2013; De Laender y Janssen, 2013). La no inclusión del estudio de esta historia de perturbaciones puede disminuir la capacidad de una predicción más realista sobre los cambios en las poblaciones y comunidades acuáticas, dado que las respuestas a los factores estresantes individuales y/o combinados están moldeadas por exposiciones pasadas a otros factores estresantes (Jansen et al., 2011).

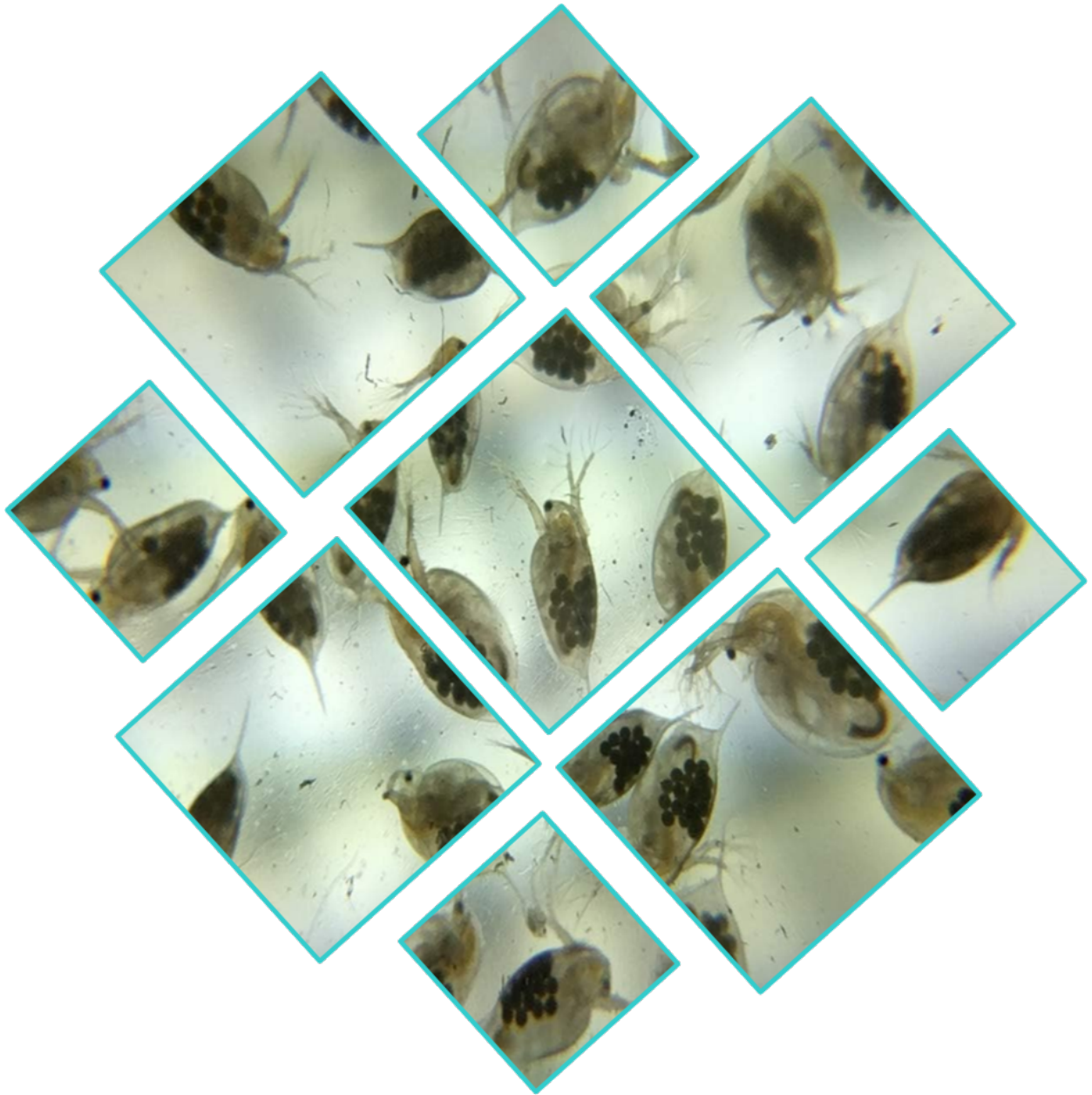
Investigaciones anteriores han mostrado la capacidad de las poblaciones para adaptarse a perturbaciones ambientales como la exposición a pesticidas (Agra et al., 2011), metales pesados (Barata et al., 2002) o sales (Bell y González, 2011), entre otros factores estresantes. La adaptación podría resultar en tolerancia cruzada, es decir, que la tolerancia a un factor estresante de una población hace que se genere tolerancia hacia otro u otros factores estresantes, o susceptibilidad cruzada, concepto contrario al anterior, donde se muestra que la susceptibilidad de una población a un factor estresante hace que se genere susceptibilidad ante otro u otros factores estresantes. Este es otro aspecto crucial para comprender cómo un factor estresante podría modular la respuesta de los organismos a un segundo factor estresante y las implicaciones de ello para la estabilidad de la comunidad en un entorno cambiante (Brausch y Smith, 2009; Todgham y Stillman, 2013; Hua et al., 2014; Liao et al., 2015; Bendis y Relyea, 2016). También se han examinado previamente las respuestas de las poblaciones a exposiciones químicas durante varias generaciones y subletales en condiciones ambientales

favorables en laboratorio, donde se muestran efectos negativos a nivel poblacional (Lewis, 1991; Liao et al., 2015; del Arco et al., 2016). A pesar de esta información, aun se desconoce cómo una historia de perturbación previa, generada en una población por la exposición continua durante varias generaciones a un pesticida en concentraciones subletales, podría afectar a su respuesta frente a factores estresantes subsecuentes. La exposición continua a concentraciones subletales durante varias generaciones podría imponer un coste (coste de adaptación o aclimatación) que podría generar una vulnerabilidad que socave la respuesta ante la exposición a factores estresantes posteriores (Barbosa et al., 2015). El concepto de vulnerabilidad inducida ha sido previamente utilizado en aves y anfibios para explicar cómo diferentes factores estresantes conducen a respuestas deficientes de los organismos ante, por ejemplo, infecciones posteriores o escape de depredadores (Buerger et al., 1991; Rumschlag y Boone, 2015). Por lo tanto, consideramos una población vulnerable como una población que ha sido expuesta a una historia de perturbación generada por la exposición a concentraciones subletales de un tóxico y que, posteriormente, se ha comprobado un efecto mayor de un factor estresante en dicha población, comparada con una población sin esa historia de perturbación.

Una vez introducida y contextualizada la problemática, esta tesis doctoral se ha realizado con la finalidad de responder a las siguientes preguntas de investigación: ¿La exposición de una población durante varias generaciones a una concentración subletal, asumida como segura por la normativa, puede derivar en respuestas adversas frente a factores estresantes posteriores? ¿Hasta qué punto las condiciones ambientales que predicen los escenarios de cambio global pueden repercutir en la capacidad de respuesta de especies que están ya siendo sometidas a perturbaciones de origen tóxico? ¿Qué

consecuencias ecológicas pueden tener los efectos generados por dichas exposiciones subletales?

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS



Hipótesis y objetivos

La hipótesis de trabajo es que la exposición a concentraciones subletales de agroquímicos, aceptadas como seguras en ecosistemas acuáticos, tienen efectos negativos sobre la capacidad de las especies zooplanctónicas para hacer frente a otros estresores.

Los principales objetivos son:

Objetivo 1

Recopilación, análisis y evaluación de la información disponible sobre el efecto de concentraciones subletales de agroquímicos en especies zooplanctónicas.

Objetivo 2

Inducción de vulnerabilidad en poblaciones de *D. magna* mediante una exposición a concentraciones subletales de agroquímicos.

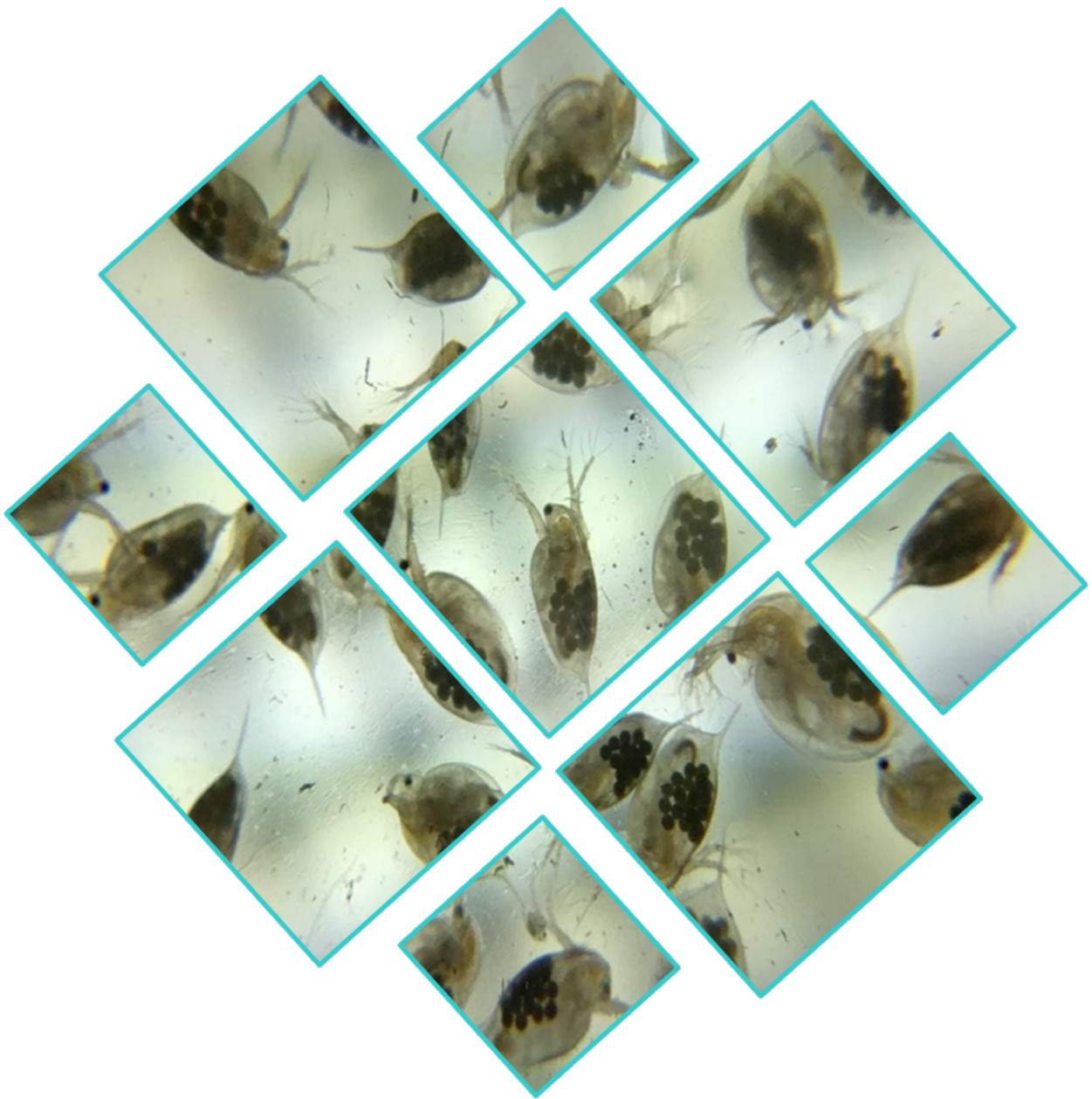
Objetivo 3

Evaluación de poblaciones con vulnerabilidad inducida de *D. magna*. al efecto de la exposición a factores estresantes subsecuentes y probables en escenarios de cambio global, como son la falta de alimento, el incremento de la temperatura, la salinización, la exposición a otros contaminantes.

Objetivo 4

Evaluación de la capacidad de escape en poblaciones con vulnerabilidad inducida de *D. magna* en escenarios de simulación de hábitats fragmentados químicamente.

ESTRUCTURA DE LA TESIS



Estructura de la tesis

Esta tesis doctoral se ha desarrollado con el objetivo de ampliar el conocimiento sobre el efecto de la exposición a concentraciones subletales de agroquímicos sobre poblaciones de *Daphnia magna*, utilizada como especie zooplanctónica modelo. Así mismo, se ha estudiado cómo dicha exposición a concentraciones subletales, entendida como historia de perturbación previa, podría generar vulnerabilidad en las poblaciones de estos dáfidos, confirmando dicha vulnerabilidad tras la exposición a factores estresantes subsecuentes a través de diferentes tipos de ensayos. La tesis está compuesta por 5 capítulos que han ayudado a alcanzar los objetivos mencionados anteriormente.

En todos los capítulos *D. magna* ha sido la especie sujeto de estudio y es un sistema modelo ecotoxicológico muy conocido y utilizado para evaluar el riesgo ambiental de los pesticidas mediante pruebas estandarizadas de toxicidad aguda y crónica (Brock y Van Wijngaarden, 2012). Se utiliza frecuentemente en estudios ecotoxicológicos por su cultivo sencillo, alta fertilidad y variedad de respuestas. El uso de *D. magna* para evaluar la calidad de los sistemas acuáticos comenzó a mediados del siglo XX (Poirier et al., 1988). En la investigación moderna, el uso de *D. magna* ayuda a evaluar una amplia variedad de respuestas, como los cambios en la frecuencia cardíaca, anomalías morfológicas, actividad de movimiento y alimentación, así como el crecimiento y la reproducción (Olkova et al., 2018). Los bioensayos más comunes con *D. magna* evalúan parámetros integrales experimentalmente confiables como supervivencia, crecimiento poblacional y fertilidad de los individuos (Persoone et al., 2009; Olkova et al., 2018). Se considera como organismo modelo en los protocolos estandarizados de la OCDE y de ISO para la evaluación toxicológica de sustancias.

Cada capítulo de la tesis doctoral corresponde a artículos que han sido publicados o están en fase de preparación para ser enviados a revistas científicas. A continuación, se expone un resumen de los 5 capítulos que conforman esta tesis doctoral.

Capítulo I: Effect of Sublethal Concentrations of Agrochemicals on Zooplankton Populations: A Meta-analysis (Objetivo 1). En preparación para su publicación.

Capítulo II: Environmental disturbance history undermines population responses to cope with anthropogenic and environmental stressors (Objetivo 2 y 3). Publicado.

Capítulo III: Sublethal exposure to agrochemicals impairs zooplankton ability to face future global change challenges (Objetivo 2 y 3). Publicado.

Capítulo IV: Zooplankton vulnerability to glyphosate exacerbated by global change (Objetivo 2 y 3). Publicado.

Capítulo V: Avoidance behavior reduction in *Daphnia magna* due to the agrochemical-induced vulnerability (Objetivo 2 y 4). En preparación para su publicación.

El propósito del Capítulo 1 fue evaluar la evidencia científica disponible sobre el efecto de concentraciones subletales de agroquímicos sobre especies zooplanctónicas y su repercusión para los ecosistemas. Para contextualizar este estudio nos basamos en que, a pesar de que los vertidos de agroquímicos se podrían encontrar en los sistemas

acuáticos en concentraciones seguras según la normativa, podría ser una de las causas que contribuyen a la pérdida actual de biodiversidad como ha sido mencionado en varios estudios (Sánchez-Bayo y Wyckhuys, 2019; Tazunoki et al., 2022). Los estudios como el de Relyea (2005) y de del Arco et al., (2016) resaltan la importancia de examinar el impacto de los pesticidas dentro del contexto ecológico natural en el que viven los organismos, demostrando que en concentraciones por debajo de los límites legales los agroquímicos generan un efecto adverso en comunidades acuáticas. En este sentido, es importante destacar que la exposición a concentraciones subletales de agroquímicos puede tener diversos efectos perjudiciales en el desarrollo de las poblaciones. Las poblaciones pueden presentar efectos en diferentes estadios, mostrándose los organismos juveniles más susceptibles y, por tanto, causar mortalidad diferencial (Mann et al., 2009). Las concentraciones subletales de agroquímicos pueden potenciar los efectos negativos sobre poblaciones en combinación con otros factores de estrés (Lydy et al., 2004). Incluso pueden ser la causa de reducciones en las densidades poblacionales (Liess et al., 2006) y generar tolerancia adquirida en las poblaciones (Barbosa et al., 2017). Además crean una mayor sensibilidad a otros factores subsecuentes (Silva et al., 2021). Por lo tanto, en este capítulo se realizó una recopilación de artículos que habían estudiado los efectos de concentraciones subletales de agroquímicos sobre la abundancia de poblaciones zooplanctónicas. Posteriormente se llevó a cabo un metaanálisis con los datos recopilados. La finalidad de este metaanálisis fue evaluar la solidez de la evidencia presente sobre el efecto de concentraciones subletales de agroquímicos sobre las poblaciones zooplanctónicas.

En los capítulos 2, 3, 4 y 5 se aborda el efecto de factores de cambio global sobre poblaciones zooplanctónicas que han sido expuestas a una concentración subletal

de agroquímicos, generando así una historia de perturbación previa. La premisa de estos capítulos se basa en que las poblaciones pueden persistir en ambientes perturbados mediante mecanismos de desintoxicación (lo que podría suponer un proceso de adaptación o aclimatación poblacional), con la posibilidad de que dicha respuesta protectora también pueda afectar negativamente a los individuos y a las poblaciones (alterando las tasas de crecimiento y reproducción). Por lo tanto, a pesar de los mecanismos que permiten que una población persista en ambientes perturbados, las diferencias entre poblaciones en los mecanismos de adaptación y sus costes pueden disminuir la capacidad de respuesta de las poblaciones a exposiciones adicionales futuras (Wuerthner et al., 2019). Evaluar los efectos de la exposición a tóxicos sobre la resistencia de poblaciones asociadas a la variabilidad genética ha sido el objetivo de algunos estudios científicos (De Coninck et al., 2014; Nys et al., 2018). Según Klerks et al. (2011), *"Para maximizar la comprensión de las consecuencias a largo plazo de la adaptación, es importante no solo observar la resistencia en sí misma, sino también las consecuencias para el fitness y las respuestas correlacionadas en características distintas a la resistencia"*. De hecho, los factores estresantes químicos y ambientales tienen efectos en diferentes niveles, incluido el nivel bioquímico y genético (por ejemplo, daño al ADN, peroxidación lipídica), el nivel individual (por ejemplo, alimentación, tasas de crecimiento y reproducción) y el nivel poblacional (por ejemplo, cambios en la biomasa y dinámica poblacional) (Hyland et al., 2003), lo que conduce a cambios estructurales y funcionales a nivel comunitario (Pilière et al., 2014). Para poner de manifiesto que realmente esa perturbación previa ha generado un efecto, es importante evaluar el efecto de factores estresantes subsecuentes en dichas poblaciones impactadas. Según Jansen et al. (2011), se espera que los costes de adaptación se manifiesten cuando una población que se ha adaptado o aclimatado a un determinado

factor estresante tenga que lidiar con un nuevo factor estresante. Este coste podría entenderse como vulnerabilidad futura. Paradójicamente, la población inicialmente llamada "resistente" (al primer factor estresante) podría ser, de hecho, vulnerable (a factores estresantes posteriores), debido a la perturbación ambiental previa.

En todos los capítulos experimentales se genera una historia previa de perturbación que potencialmente induce vulnerabilidad en la población de *D. magna* expuesta respecto a la población control. Seguidamente se estudia el efecto a la exposición de factores estresantes subsecuentes para evaluar dicha vulnerabilidad. La complejidad de los escenarios planteados se hace mayor con cada capítulo, ya que se van incluyendo varios factores de cambio global, como es la exposición a condiciones desfavorables, como la falta de alimento (inanición), la exposición a agroquímicos con diferentes modos de acción (insecticidas y herbicidas), el aumento de temperatura, los cambios de temperatura, el aumento en la salinidad y la exposición a contaminantes emergentes (medicamentos). El cambio global potencialmente alteraría la distribución ambiental de la biota y los efectos biológicos de los agentes tóxicos químicos (Noyes et al., 2009). La disponibilidad de alimentos en los ecosistemas acuáticos perturbados es importante, ya que puede influir en el nivel de tolerancia a los contaminantes. Una mayor disponibilidad de alimento permite una mayor tolerancia a otros factores estresantes en comparación con escenarios de limitación de alimentos o inanición (Cuenca-Cambronero et al., 2021). El aumento proyectado de la temperatura global y el aumento proyectado de olas de calor serán especialmente relevantes en los ecosistemas acuáticos con altas relaciones superficie/volumen y en aquellos que son temporales (Verheyen et al., 2019), como los humedales temporales de nuestro entorno. Condiciones térmicas estresantes como olas de calor provocan respuestas más intensas a

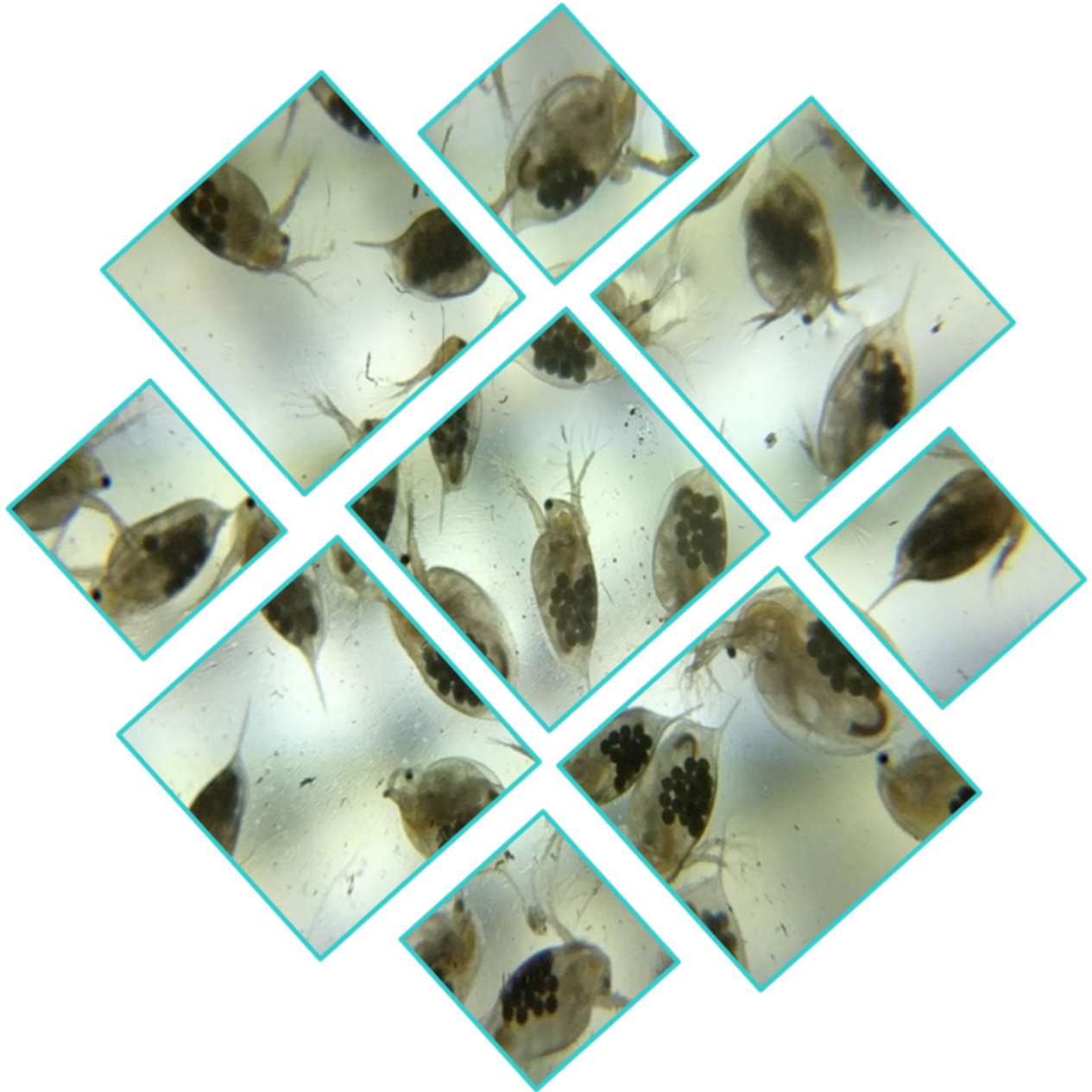
sustancias tóxicas (Tüzün y Stoks, 2021). Los cambios en los regímenes de temperatura y precipitación afectarán al destino y el comportamiento de los contaminantes, aumentarán la toxicidad, alterarán la salinidad ambiental, afectarán las respuestas fisiológicas y la homeostasis. Esta situación es particularmente problemática para las poblaciones que habitan en sistemas acuáticos lóticos, rodeados de agricultura intensiva, y expuestos a una entrada difusa de agroquímicos.

En el capítulo 2 tras la generación de la historia de perturbación previa (exposición a concentraciones subletales del insecticida dimetoato) los individuos de *D. magna* fueron sometidos a dos estresores, por un lado, la falta de alimento (inanición) y, por otro, a la exposición a un agroquímico diferente (el herbicida glifosato). En el capítulo 3 las poblaciones *D. magna*, fueron expuestas a un agroquímico con diferente modo de acción que en el capítulo anterior, el herbicida glifosato, para generar la historia de perturbación, y posteriormente fueron sometidas a inanición, temperatura elevada y salinidad aumentada, como estresores. El capítulo 4 las poblaciones *D. magna*, fueron expuestas al herbicida glifosato, para generar la historia de perturbación, pero bajo dos diferentes temperaturas de cultivo (20°C y 25°C). Posteriormente fueron expuestas a los siguientes estresores: inanición, aumento de salinidad y paracetamol, todas estas exposiciones realizadas a las mismas condiciones de temperatura en las que se había generado la historia de perturbación (temperatura inicial) y también cambiando de temperatura (e.g. de 20°C a 25°C o a la inversa, suponiendo un estrés doble, al estresor y al cambio de temperatura).

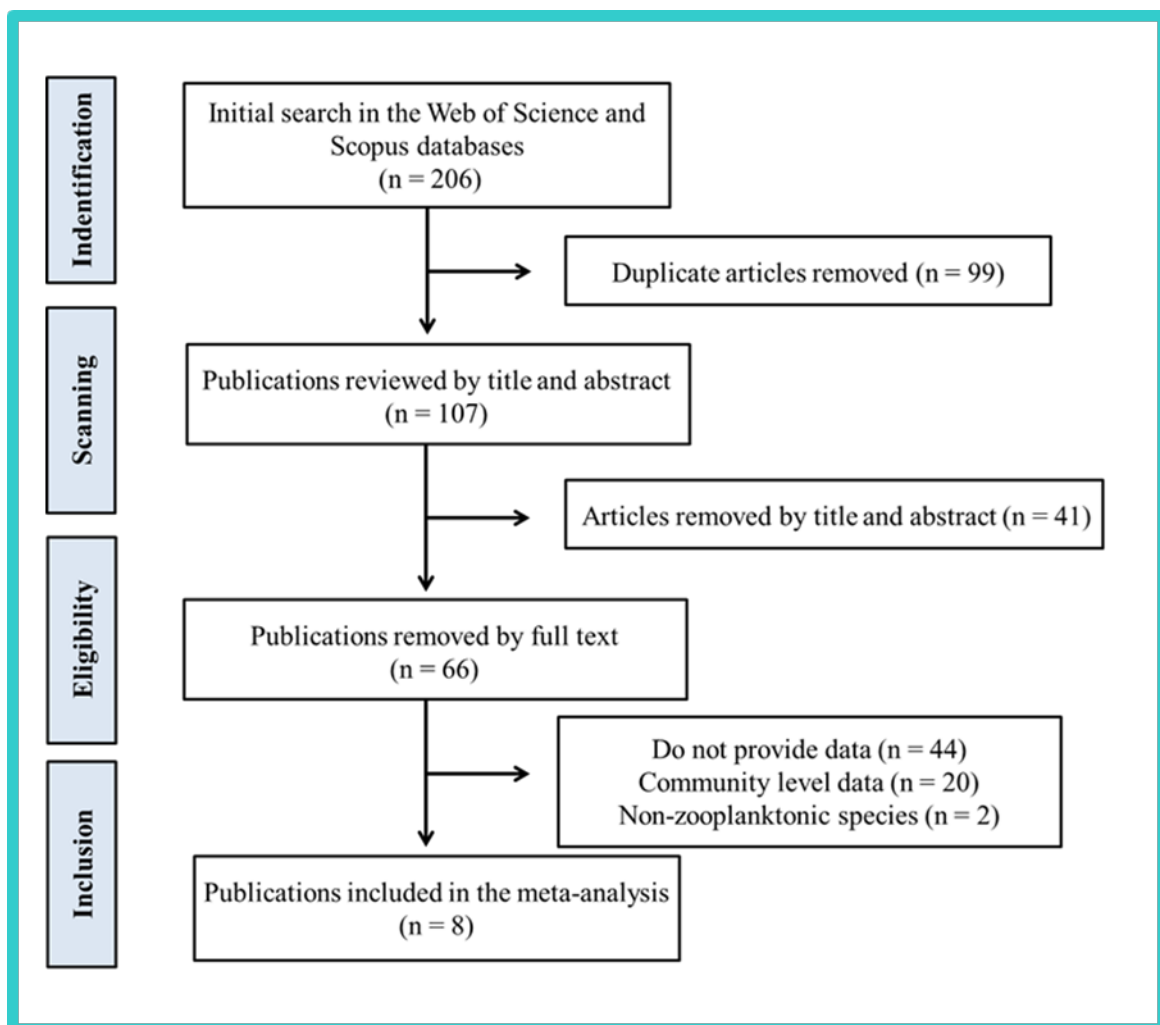
En el capítulo 5, se estudió el comportamiento de escape de los individuos procedentes de dos poblaciones de *D. magna*, con y sin historia previa de perturbación, dentro de un sistema químicamente fragmentado y abierto. Este escenario se simuló con

un sistema de exposición multicompartimental no forzado: Heterogeneous Multiple Habitat Avoidance System (Araújo et al., 2018). Este capítulo ha sido incluido dentro de la tesis dado que la disminución en la conectividad de hábitats representa una amenaza significativa para la biodiversidad, por lo tanto, es esencial considerar el impacto que la contaminación por agroquímicos supone en el contexto de la fragmentación química de los hábitats (Araújo et al., 2016; Alcívar et al., 2021).

CAPÍTULOS



Effect of Sublethal Concentrations of Agrochemicals on Zooplankton Populations: A Meta-analysis study



Effect of Sublethal Concentrations of Agrochemicals on Zooplankton

Populations: A Meta-analysis study

María Eugenia López-Valcárcel, Manuel Miguel Ramos Álvarez, Ana del Arco, Gema Parra.

Abstract

Intensive agriculture linked to the growth of the human population has led to an increase in the discharge of agrochemicals into aquatic systems impacting aquatic biota. Numerous studies have demonstrated the lethal effects of agrochemicals on zooplankton populations, and the information obtained has been used in environmental risk assessment programs. However, little attention has been given to the effects that sublethal concentrations of agrochemicals, found within legally permitted ranges, may cause on zooplankton. Therefore, the purpose of this study is to analyze the effect of agrochemicals sublethal concentrations on the abundance of zooplankton populations through a meta-analysis. The search for studies was conducted in digital databases, and the selection and data extraction were independently performed by three authors. Using a random-effects model, the effect size (ES) of the standardized mean difference was calculated. Heterogeneity was examined using the Q statistic and I^2 consistency. Eight studies met the inclusion criteria, resulting in a total of 139 ES calculations. The effect of exposure to sublethal concentrations on zooplankton abundance was negative, which means that zooplankton abundance is reduced under these exposures (ES = -1.03; 95% CI = -1.17; Q = 97.11; $I^2 = 4\%$; $p < 0.001$). Considering the extracted information from the selected studies, the location, type of agrochemical, agrochemical composition, agrochemical concentration range, experimental setup, taxonomic order, and species

were analyzed as moderator variables. Just type of agrochemical, agrochemical composition, taxonomic order, and species were found to be significant. Therefore, the results indicate that the exposure to agrochemical sublethal concentration has effects on zooplankton abundance, which should be considered in the development of toxicological risk assessment programs. Furthermore, simultaneous or subsequent stressors resulting from these exposures can impact zooplankton organisms and, consequently, the functioning of aquatic systems.

Keywords: Agrochemicals, Sublethal concentrations, Meta-Analysis, Zooplankton abundance, Moderator variables.

1. Introduction

Intensive agriculture relies on the use of synthetic pesticides, primarily herbicides, fungicides and insecticides, to prevent losses from pests (Oerke and Dehne, 2004; Steffen et al., 2015). The constant human population increase and the high demand for food associated with it, lead to the widespread use of large quantities of agrochemicals globally (Landrigan et al., 2018). This excessive use of agrochemicals demonstrates significant potential for adverse environmental effects on non-target communities (Tilman et al., 2002; Kumar et al., 2021). Natural processes such as drift, runoff, and leaching result in the agrochemicals used in intensive cultivation systems reaching aquatic bodies, damaging biota and their processes (Parra et al., 2005; del Arco et al., 2019; Kumar et al., 2021). Within continental aquatic systems, natural communities may be directly or indirectly affected by the discharge of agrochemicals (Schäfer et al., 2011). Additionally, it is important to highlight that ecotoxicological assessment of agrochemical effects on zooplankton are based on laboratory assays carried out under simplified and controlled environments (Hébert et al., 2020). There is a wealth of toxicological information on the effect of agrochemicals based on different acute toxicity tests on zooplanktonic organisms to reveal lethal concentrations of these agrochemicals on study species (Bickham, 2011). While such assays facilitate the identification of the effects of agrochemicals on zooplankton, which is crucial for establishing fundamental knowledge about the direct effects of agrochemicals, they do not assess how exposure to sublethal concentrations of such agrochemicals could affect zooplankton populations (Bendis and Relyea, 2014; Liao et al., 2015; del Arco et al., 2016). This approach allows environmental risk assessment programs to establish

regulations regarding permissible concentrations of agrochemicals in aquatic systems (non-lethal), but it overlooks the environmental reality where there are a large number of pollutants and their concentration levels are generally low, even reaching level of ng L^{-1} . Therefore, it is important to consider the potential effects of sublethal concentrations of agrochemicals on zooplankton organisms (Pease and Bull, 1988; Hoffmann and Parsons, 1991; Saro et al., 2012; Robles-Molina et al., 2014).

Zooplankton populations can persist in disturbed environments through detoxification mechanisms that, however, could negatively affect population fitness (growth and reproduction) due to the associated detoxification cost (Hua et al., 2014; Liao et al., 2015). Therefore, despite the survival mechanisms that allow populations to endure in disturbed environments, these populations may be affected by other extrinsic factors (Bell and Gonzalez, 2011; Agra et al., 2011; Barbosa et al., 2017). The sublethal concentrations of agrochemicals to which biota in aquatic systems are exposed, can have various harmful effects, such as differential effects on life stages of organisms, with juveniles being more susceptible (Mann et al., 2009), generating different types of damage depending the exposure time (Ahlers et al., 2006), enhancing negative effects in combination with other stress factors (Lydy et al., 2004), generating acquired tolerance in populations (Barbosa et al., 2017), or result on increased sensitivity to other subsequent factors (Silva et al., 2021; López-Valcárcel et al., 2021; López-Valcárcel et al., 2023), which could lead to reductions in population densities (Liess et al., 2006). These effects, although non-lethal, could undermine the development of zooplankton populations, indirectly affecting the trophic web. For example, zooplankton scarcity means reduced grazing rates, leading to increased phytoplankton biomass that could result in eutrophication (Schindler, 2006; Downing et al., 2023). The impacts on tropic

web can lead to direct effects such as species loss or indirect effects such as alterations in biological interactions, trophic structure, and primary productivity, with consequences for ecosystem function and service provision (Wang et al., 2016; Cook et al., 2018; Bhagowati and Ahamad, 2019).

Knowledge about the effect of agrochemicals sublethal concentrations on zooplankton populations is limited (Untersteiner et al., 2003; Coelho et al., 2011). Due to the lack of information and knowledge on this topic, the following hypothesis was proposed: exposure to sublethal concentrations of agrochemicals will have a negative effect on population abundance. Therefore, in this study, a literature search was conducted for articles evaluating the effects of exposure to agrochemicals at sublethal concentrations on zooplankton populations' abundance.

The main objective of this study is to compile and analyze published information to provide quantitative insight on the effects of the sublethal concentrations of agrochemicals on zooplankton and how this may impact the structure and functions of aquatic systems. Based on the main objective, which provides a more comprehensive view of the effect, the following specific objectives were established: a) Conduct a meta-analysis based on a systematic literature search that provide information on the effect of sublethal concentrations of agrochemicals on zooplankton abundance; b) Confirm the existence of a significant effect on exposed populations compared to non-exposed ones; c) Study and analyze possible moderator variables on the agrochemical exposure effect on zooplankton. The results obtained from the meta-analysis and the analyses of moderator variables allow us to discuss the potential impact of environmentally relevant concentrations on zooplankton and on the structure and function of aquatic systems.

2. Materials and methods

2.1. Systematic Literature Search

2.1.1. Data Sources and Search Strategies

A comprehensive search was conducted across different databases on the effects of agrochemicals exposure in zooplankton, following PRISMA recommendations proposed by Moher et al. (2009). The consulted databases included Web of Science (WOS) and Scopus. Search filters applied in both databases were as follows: journal articles, works with full-text access, and peer-reviewed articles.

Regarding search strategies, an advanced search was performed using Boolean operators "AND," "OR," and "NOT". The keywords used were: "toxic OR pollutant," "abundance OR density OR individual number," "insecticide OR herbicide OR agrochemical," and "zooplankton." Additionally, the exclusion filter "NOT" was applied to the word "plastic" and its derivatives. This search yielded 206 articles for review and reading, spanning from 1980 to 2022.

2.1.2. Inclusion and Exclusion Criteria

For being included articles met the following criteria: 1) The study subject was a zooplankton species; 2) The pollutants were agrochemicals; 3) The exposure concentrations were sublethal for zooplankton (see results section for further explanation); 4) Zooplankton abundance was the measured parameter (dependent variable); 5) Controlled laboratory experiments or experiments in controlled natural systems (microcosms and mesocosms) were considered. Exclusion criteria were: 1)

Duplicated works; 2) Those providing only qualitative or insufficient data; 3) Theses, review chapters, books, meta-analyses, and guidelines. After excluding articles that did not meet these criteria, the remaining articles were used in the analysis.

2.1.3. Data Extraction

For every study that met the inclusion criteria we collected the following information: Data points (can be different data points within the same publication, as there may be different species studied within a single research.), authors, year of publication, laboratory, agrochemical, agrochemical composition, concentration range, type of experiment, taxonomic order, and species. Additionally, quantitative data related to sample size and outcome variable measures were extracted.

The entire process involved three reviewers to ensure reliability in studies selection. Controversies among reviewers were resolved through consensus in meetings. Article selection involved reading the title and abstract to enforce the established inclusion and exclusion criteria, as the scanning phase. Subsequently, a comprehensive full text reading was conducted to enforce the established conceptual and methodological criteria, as the eligibility phase.

2.2. Meta-Analysis

2.2.1. Treatment Selection

To determine comparative treatments for evaluating the effect on zooplankton abundance, articles providing information on both non-exposed zooplankton

populations (from now on Control populations) and exposed to agrochemicals populations (from now on Exposed populations) were selected.

2.2.2. *Bias Risk*

Bias risk was assessed through Egger's bias test on the intersection parameter of the standardized effect size regression model on precision.

2.2.3. *Data Analysis: Meta-Analysis*

Studies that fully met the inclusion criteria were selected for the meta-analysis. Works providing numerical data for both control and agrochemical-exposed populations regarding sample size were also selected. The standardized mean difference, the difference between the means of the treatment and the control groups, d , was used as the effect size index. On the values of d , a random-effects model was applied according to which each d index was weighted by its inverse variance (the sum of the within-study variance and an estimate of the between-studies variance). Once calculated the mean effect size with its 95% confidence interval, the heterogeneity test, Q , and the I^2 index to assess the degree of heterogeneity of the effect sizes around the mean effect were calculated (Cooper et al., 2009). Once confirmed that the effect sizes were heterogeneous, mixed-effects models (Viechtbauer, 2010) were applied to test the influence of the moderator variables. Finally, since our meta-analysis did not include any unpublished papers, a test for publication bias was carried out (Rothstein et al., 2005). All analyses were conducted using the GNU R program, version 4.1.2 (R Core Team, 2021), with specialized libraries: "metamedian" (McGrath et al., 2020), "meta" (Schwarzer, 2019), and "metafor" (Viechtbauer, 2010) for meta-analysis, as well as "data.table" (Dowle et al., 2019) for data processing. An analysis of potential outliers

(basic outlier removal) (Harrer et al., 2021) was also performed. All statistical decisions were made with a significance level of 0.05.

3. Results

3.1. Selection Process

In WOS and Scopus databases, 206 studies were identified, of which 99 duplicate records were eliminated. A total of 107 studies were reviewed, and, following the inclusion and exclusion criteria, during the scanning phase, 66 were selected for review. Afterwards, during the eligibility phase, 59 articles were excluded for various reasons (no quantitative data, non-zooplankton species; Fig. 1), leaving a total of 8 studies for the meta-analysis. These studies are characterized by providing extensive information, contributing with 139 data points for a comprehensive analysis. These data were evaluated by comparing the abundance data of the Control population with those of the Exposed population.

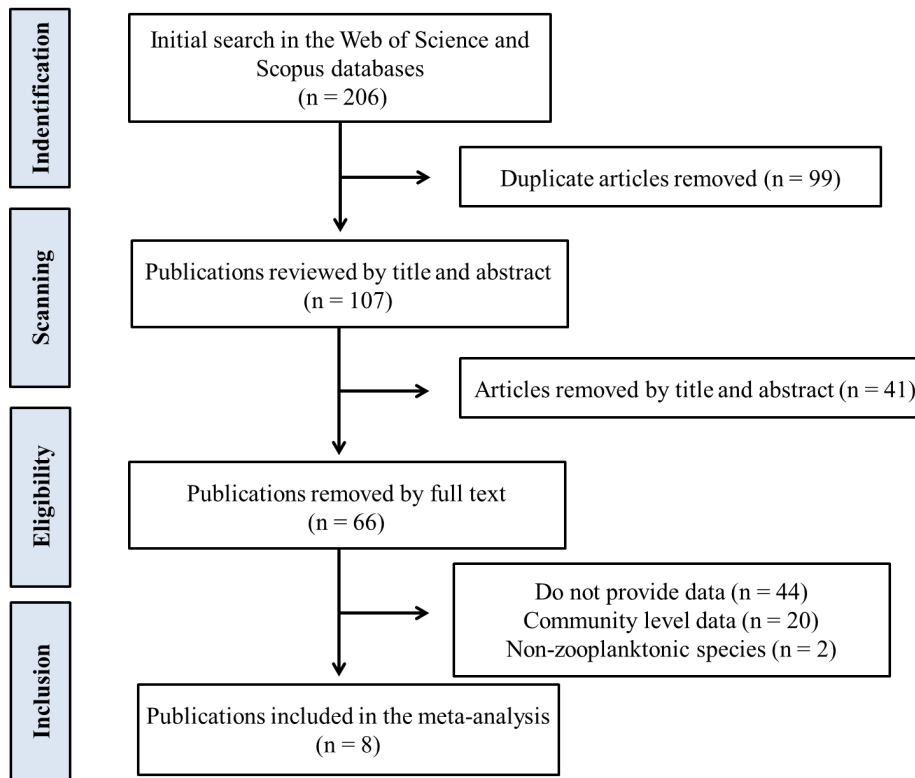


Fig. 1. Inclusion and exclusion procedure of studies conducted following the literature search using the keywords: "toxic OR pollutant," "abundance OR density OR individual number," "insecticide OR herbicide OR agrochemical," and "zooplankton." Additionally, the exclusion filter "NOT" was applied to the word "plastic" and its derivatives.

Studies were organized following this sort process: 1) Author and year of publication; 2) Laboratory; 3) Agrochemical; 4) Agrochemical composition (and product brand; 5) Concentration range; 6) Taxonomic order; 7) Species; 8) Sample size; 9) Mean of the exposed population; 10) Standard deviation of the exposed population; 11) Mean of the control population; 12) Standard deviation of the control population.

It is important to explain the criteria we have used to classify the agrochemical concentration used in each study into a determined concentration range. Different ranges (Range 1, Range 2, and Range 3) were assigned based on the value of the

Daphnia magna LC₅₀ of each product determined in standardized assays. Range 1: concentrations between LC₅₀ and LC₅₀/10 (excluding both values); Range 2: Concentrations between LC₅₀/10 and LC₅₀/100 (excluding LC₅₀/100); Range 3: Concentrations equal to or smaller than LC₅₀/100.

Two studies were carried out in medium-sized controlled natural systems (mesocosms) (Geyer et al., 2016; Rumschlag et al., 2020), while four studies were carried out in small-sized controlled natural systems (microcosms) (Leboulanger et al., 2011 Knillmann et al., 2012; del Arco et al., 2016; del Arco et al., 2014), and the remaining two studies were carried out under controlled laboratory conditions (Jung et al., 2017; Sumon et al., 2018).

The sample size of the studies ranged from 21 to 4 replicates per treatment. This variation is due to the fact that assays in controlled natural systems (microcosms and mesocosms) require significant infrastructure, limiting the number of replicates but allowing for a high number of experimental individuals than those carried out under controlled laboratory conditions.

The experiments involved various types of zooplankton species belonging to the orders Cladocera, Anomopoda, Copepoda, Anostraca, and Rotifera, including nauplii of unidentified species, as reported in del Arco et al., (2016) study.

Regarding the types of agrochemicals used in the different assays, the data indicated that 40% of zooplankton populations were exposed to herbicides, 34% to insecticides, and 26% to fungicides.

3.2. Data Analysis: Meta-analysis

3.2.1. Bias Risk

Since all analyzed studies are derived from published articles, publication bias against null results could be a source of bias in effect size estimates. The Egger's bias test revealed significant differences, indicating the presence of bias (Table 1). This identified bias could stem from unpublished works, lack of access to studies published in different languages, among other reasons (Sedgwick and Marston, 2015).

3.2.2. Outlier Analysis and Meta-analysis

The analysis of potential outliers (basic outlier removal) (Harrer et al., 2021) highlighted that a total of 45 data points (out of 139, 32.37%) could be categorized as outliers (see Fig. 2, data in blue: outliers). These data points are distributed across the entire scale (Fig. 2), eliminating the inclusion of potential bias. However, variability significantly decreases when comparing meta-analysis results from the original sample to the one excluding outliers (the I^2 variability index drops from 85% to 4%) (Table 1), and the Q-test of heterogeneity is no longer significant. Additionally, at least 8 of these studies also presented high influence values (identified using leave-one-out method) (Kocaguneli and Menzies, 2013). A decision was made to exclude these 45 data points, with extreme values, in subsequent analyses. Consequently, the prediction interval of our estimation has also been reduced, providing more certainty about the robustness of the combined effect in future studies.

3.2.3. Global Effect Size

Considering widely agreed-upon interpretative values for effect size (0.20, 0.35, and 0.80 for small, moderate, and large, respectively), we can conclude that the effect

size of sublethal concentration of agrochemical exposure on zooplankton abundance is of large magnitude, despite removing extreme values (Table 1). This implies that the global effect size between abundance in Control and Exposed zooplankton populations indicates a significant reduction in zooplankton abundance in the Exposed group compared to the Control group (Table 1; Fig. 2).

Model	k	ES	SEM	z	p(z)	Q	p(Q)	t ²	I ²	H ²	95%-CI	Bias	pBias	Half	pHalf	NFs
All data	139	-1.34	0.22	-6.09**	<.0001	905.48**	<.0001	5.92	85.00%	6.56	[-1.77, -0.91]	-6.9**	<.0001	13764	<.0001	1638
Removing outliers	94	-1.03	0.07	-14.55**	<.0001	97.11	.3648	0.00	4.00%	1.04	[-1.17, -0.90]	-6.9**	<.0001	13764	<.0001	946

Table 1. Summary of the meta-analysis on the effect of sublethal concentrations of agrochemicals on abundance in zooplankton populations across all data points (All data) and after the removal of outlier data (Removing outliers).

Note: **k**: Number of data points; **ES**: Average Effect Size based on the difference between the Means of the Control vs. Exposed populations; **SEM**: Standard Error associated with the Mean difference; **z**: Standardized effect size. 95%-C.I.: 95% Confidence Interval constructed from the bounds around the Difference; **Q**: Q-statistic expressing the weighted sum of squared differences between study means and the fixed-effects estimate; **t²**: underlying variability between studies; **I²**: Proportion of variance explained by the analysed variable attributable to heterogeneity between studies and not sampling error; **H²**: ratio of total variability in effect size estimates to sampling variability. Among all heterogeneity statistics, **I²** stands out as it is the only one independent of the number of studies and precision (study size); **Bias**: Egger's significance test on the regression model intercept parameter of standardized effect sizes on precision; **Half**: Median Effect Size; **pHalf**: Confidence Interval of the Median; **NFs**: fail-safe N index, the number of studies with an average of null results that would need to be added to the given set of observed results to reduce the observed significance level to a particular alpha level (e.g., 0.05). ** p<0.01. * p<0.05.

3.2.4. Moderator Variables Analysis

The moderator variables included in the analysis were: location of the trials (Laboratory), type of agrochemical (Agrochemical), category of the agrochemical composition (Agrochemical composition), concentration range of agrochemicals (Concentration Range; see selection process section), type of experiment (Experiment), taxonomic order (Taxonomic Order), and zooplankton species (Species). As all variables are categorical, they were analyzed through subgroup comparisons.

3.2.4.1. Laboratory

The variable "Laboratory" refers to the geographical location where the experiments included in this meta-analysis were conducted. Although the *p*-value of the Moderator Effect Test indicates no significant differences ($p = 0.0709$), caution is needed in interpreting these results due to their trend towards the significance threshold (Table 2).

There are no significant differences between the laboratories ($p = 0.09$). Low heterogeneity ($I^2 = 4\%$) strengthens the consistency in results across studies. It is important to consider these findings in the context of meta-analysis limitations and the interpretation of individual studies (Table 2; Table 3; Fig. 3a).

3.2.4.2. Agrochemical

The variable "Agrochemical" refers to the type of agrochemical according to its use and function (insecticide, herbicide, or fungicide). This variable has a significant moderating impact on the relationship between agrochemicals and zooplankton abundance ($p = 0.0015$). The type of agrochemical appears to significantly influence the observed effects on zooplankton (Table 2). Overall, exposure to sublethal

concentrations of the mentioned agrochemicals, fungicides, herbicides, and insecticides, is associated with significant reductions in zooplankton abundance. The low heterogeneity ($I^2 = 4\%$) indicates consistency in the effects of sublethal agrochemical concentration across studies. However, subgroup differences testing suggests significant variability among different types of products ($p < 0.01$), with insecticides being the most harmful, followed by herbicides, and lastly fungicides (Table 2; Table 3; Fig 3b).

3.2.4.3. *Agrochemical composition*

The variable "Agrochemical composition" refers to the type of agrochemical according to its formulation, as this can vary by brand, especially when mixed with other active substances or aditives. This variable has a significant moderating impact on the relationship between agrochemicals and zooplankton abundance ($p = 0.0035$). The specific agrochemical, identified by its name, seems to be an important factor influencing the effects of sublethal concentration on zooplankton abundance (Table 2). Low heterogeneity ($I^2 = 4\%$) indicates consistency in the effect, but the subgroup differences test suggests significant variability among different agrochemical compounds ($p < 0.01$) (Table 2; Table 3; Fig 3c).

3.2.4.4. *Concentration Range*

The variable "Concentration range" refers to the three different concentration ranges assigned for each agrochemical (as has been mentioned before, based on the *D. magna* LC_{50}). Although the p-value of the Moderator Effect Test indicates no significant differences ($p = 0.0731$), caution is needed in interpreting these results due to their trend towards the significance threshold (Table 2).

The concentration of agrochemicals significantly impacts zooplankton abundance. Low heterogeneity ($I^2 = 4\%$) indicates consistency in effects at different

concentration ranges. The subgroup differences test ($p = 0.20$) does not show significant variability among different concentration ranges, suggesting that the effects are relatively consistent across all evaluated concentration ranges (Table 2; Table 3; Fig 3d).

3.2.4.5. *Experiment*

The variable "Experiment" refers to the type of experiment conducted, whether indoor experiments (controlled lab conditions) or outdoor experiments (Microcosms and mesocosms). This variable does not have a significant moderating effect on the relationship between agrochemicals and zooplankton abundance ($p = 0.4192$). The type of agrochemical exposure experiment does not appear to be directly associated with variations in the effect on zooplankton abundance (Table 2). Low heterogeneity ($I^2 = 4\%$) indicates consistency in effects among different types of experiments. The subgroup differences test ($p = 0.45$) does not show significant variability among different types of experiments, suggesting that effects are relatively consistent regardless of the type of experiment conducted (Table 2; Table 3; Fig 3e).

3.2.4.6. *Taxonomic order*

The variable "Taxonomic order" has a significant moderating impact on the relationship between agrochemicals and zooplankton abundance ($p = 0.0320$). The taxonomic classification of zooplankton into different orders appears to be an important factor influencing observed effects in zooplankton (Table 2).

The taxonomic order has a significant impact on the effect of sublethal concentration exposure on zooplankton abundance. Low heterogeneity ($I^2 = 4\%$) indicates consistency in the effect of sublethal concentration among different taxonomic orders. The subgroup differences test ($p = 0.03$) suggest some variability among different orders, indicating that effects may vary depending on the taxonomic order

considered. The subgroup differences test ($p = 0.03$) suggests some variability among different orders, indicating that effects may vary depending on the taxonomic order considered. Rotifera was the most damaged order by exposure to sublethal agrochemicals concentrations, followed by the Cladocera and Copepoda orders (Table 2; Table 3; Figure 3f).

3.2.4.7. Species

The variable "Species" has a significant modulating effect on the relationship between agrochemicals and zooplankton abundance ($p = 0.0317$). Therefore, variations in zooplankton population abundance due to sublethal concentration exposure depend on the species study (Table 2).

Sublethal concentrations of agrochemicals generally have a negative impact on zooplankton population abundance, although this effect can be more or less harmful depending on the species. Low heterogeneity ($I^2 = 0\%$) indicates consistency in effects among different species. The subgroup differences test ($p = 0.02$) suggests some variability among different species, with *Daphnia* sp. being the most sensitive, followed by *Diaphanosoma* sp. and *Thermocyclops decipiens* (Table 2; Table 3; Figure 3g).

Variables	Group Differences			Moderator Effect		
	df	QM test	p	df	QM test	p
Laboratory	5	9.51	.0905	5	10.16	.0709
Agrochemical	2	13.04	.0015	2	13.04	.0015
Agrochemical composition	12	28.59	.0045	12	29.35	.0035
Concentration range	2	3.22	.1995	1	3.21	.0731
Experiment	2	1.61	.4476	2	1.74	.4192
Taxonomic order	5	12.12	.0331	5	12.21	.0320
Species	7	16.16	.0237	7	15.36	.0317

Table 2. Summary of the analysis of moderator variables. Group differences within each variable have been examined through the Group Differences Test, investigating whether these

variables have a moderating effect on the sublethal effect of agrochemicals on abundance in zooplankton populations.

Variable	Levels	k	ES	SEM	z	p(z)	95%-CI	Q	p(Q)	t ²	I ²	H ²
Laboratory	Asan, South Korea	13	-0.97	0.13	-7.36**	<.0001	[-1.23,-0.71]	8.80	.7202	0.00	0.00	1.00
	Graville, USA	1	-1.97	0.86	-2.28*	.0224	[-3.65,-0.28]	0.00	-	-	-	-
	Jaén, Spain	8	-1.60	0.27	-5.98**	<.0001	[-2.13,-1.08]	8.38	.3001	0.12	0.16	1.20
	Mayote Island, Mozambique	14	-0.86	0.24	-3.61**	.0003	[-1.33,-0.39]	14.24	.3572	0.00	0.09	1.10
	Mymensingh, Bangladesh	1	-1.57	0.35	-4.45**	<.0001	[-2.26,-0.88]	0.00	-	-	-	-
	Pennsylvania Furiance, EELU	57	-0.95	0.10	-9.28**	<.0001	[-1.15,-0.75]	55.53	.4924	0.00	0.00	1.00
Agrochemical	Fungicide	19	-1.16	0.12	-9.39**	<.0001	[-1.40,-0.92]	20.37	.3125	0.00	0.12	1.13
	Herbicide	47	-0.75	0.11	-6.85**	<.0001	[-0.96,-0.53]	41.77	.6501	0.00	0.00	1.00
	Insecticide	28	-1.36	0.14	-9.46**	<.0001	[-1.64,-1.08]	21.94	.7406	0.00	0.00	1.00
Agrochemical composition	Carbamate	11	-1.26	0.24	-5.27**	<.0001	[-1.73,-0.79]	8.04	.6246	0.00	0.00	1.00
	Chloroacetanilide	17	-0.48	0.18	-2.73**	.0063	[-0.83,-0.14]	8.69	.9257	0.00	0.00	1.00
	Chlorothalonil	6	-1.03	0.21	-4.95**	<.0001	[-1.44,-0.62]	6.17	.2901	0.03	0.19	1.23
	Copper sulphate	8	-1.60	0.27	-5.98**	<.0001	[-2.13,-1.08]	8.38	.3001	0.12	0.16	1.20
	Dicloruro-dimetil-bipiridilo	5	-1.71	0.57	-2.98**	.0029	[-2.84,-0.59]	6.43	.1695	0.64	0.38	1.61
	dimetilditiocarbamato+Zn	1	-0.78	0.46	-1.68	.0922	[-1.69,0.13]	0.00	-	-	-	-
	ditiocarbamato+Zn	4	-1.05	0.24	-4.38**	<.0001	[-1.52,-0.58]	1.41	.7030	0.00	0.00	1.00
	Diuron	7	-0.64	0.25	-2.56**	.0103	[-1.12,-0.15]	3.41	.7560	0.00	0.00	1.00
	Glyphosate	1	-1.97	0.86	-2.28*	.0224	[-3.65,-0.28]	0.00	-	-	-	-
	Neonicotinoid	1	-1.57	0.35	-4.45**	<.0001	[-2.26,-0.88]	0.00	-	-	-	-
	Organofosforado	4	-0.74	0.43	-1.72	.0850	[-1.58,0.10]	1.52	.6787	0.00	0.00	1.00
Organofosfophate	12	-1.55	0.24	-6.51**	<.0001	[-2.02,-1.08]	9.08	.6143	0.00	0.00	1.00	
Triazine	17	-0.90	0.19	-4.86**	<.0001	[-1.26,-0.54]	14.63	.5518	0.00	0.00	1.00	
Concentration Range	1	26	-1.18	0.11	-10.37**	<.0001	[-1.40,-0.95]	27.43	.3347	0.00	0.09	1.10
	3	25	-0.84	0.16	-5.13**	<.0001	[-1.16,-0.52]	25.12	.3994	0.00	0.04	1.05
	2	43	-0.99	0.11	-9.00**	<.0001	[-1.21,-0.77]	41.34	.4998	0.00	0.00	1.00
Experiment	Acute test	14	-1.05	0.12	-8.46**	<.0001	[-1.29,-0.81]	11.31	.5845	0.00	0.00	1.00
	Mesocosmos	58	-0.96	0.10	-9.48**	<.0001	[-1.16,-0.76]	56.92	.4780	0.00	0.00	1.00
	Microcosmos	22	-1.23	0.19	-6.49**	<.0001	[-1.60,-0.86]	27.14	.1664	0.15	0.23	1.29
Taxonomic Order	Anomopoda	12	-0.45	0.21	-2.19*	.0288	[-0.86,-0.05]	1.17	.9999	0.00	0.00	1.00
	Anostraca	13	-0.97	0.13	-7.36**	<.0001	[-1.23,-0.71]	8.80	.7202	0.00	0.00	1.00
	Cladocera	36	-1.22	0.14	-8.99**	<.0001	[-1.48,-0.95]	33.38	.5463	0.00	0.00	1.00
	Copepoda	24	-1.04	0.18	-5.74**	<.0001	[-1.39,-0.68]	32.29	.0942	0.21	0.29	1.40
	Nauplii	2	-1.30	0.81	-1.60	.1088	[-2.88,0.29]	3.01	.0830	0.88	0.67	3.01
	Rotifera	7	-1.46	0.29	-5.06**	<.0001	[-2.03,-0.89]	6.25	.3960	0.02	0.04	1.04
Species	Artemia sp.	13	-0.97	0.13	-7.36**	<.0001	[-1.23,-0.71]	8.80	.7202	0.00	0.00	1.00
	Bosmi- sp.	12	-1.25	0.22	-5.57**	<.0001	[-1.69,-0.81]	2.03	.9984	0.00	0.00	1.00
	Chydori sp.	12	-0.45	0.21	-2.19*	.0288	[-0.86,-0.05]	1.17	.9999	0.00	0.00	1.00
	Cyclops sp.	11	-1.18	0.24	-4.99**	<.0001	[-1.64,-0.72]	8.11	.6180	0.00	0.00	1.00
	Daphnia sp.	13	-1.46	0.26	-5.61**	<.0001	[-1.97,-0.95]	15.18	.2319	0.20	0.21	1.26
	Diapha-soma sp.	5	-1.44	0.43	-3.35**	.0008	[-2.29,-0.60]	5.80	.2146	0.24	0.31	1.45
	Diaptomus sp.	6	-0.36	0.38	-0.95	.3446	[-1.10,0.38]	12.37*	.0301	0.45	0.60	2.47
	Thermocyclops decipiens	5	-1.27	0.48	-2.64**	.0082	[-2.21,-0.33]	5.46	.2429	0.27	0.27	1.37

Table 3. Extended Analysis of Moderator Variables.

Note: **k**: Number of data points; **ES**: Average Effect Size based on the difference between the Means of the Control vs. Exposed populations; **SEM**: Standard error associated with the Mean Difference; **z**: Standardized effect size. 95%-C.I.: 95% Confidence Interval constructed from the bounds around the difference; **Q**: Q-statistic expressing the weighted sum of squared differences between study means and the fixed-effects estimate; **t²**: underlying variability between studies; **I²**: Proportion of variance explained by the analyzed variable attributable to heterogeneity between studies and not sampling error; **H²**: ratio of total variability in effect size estimates to sampling variability. Among all heterogeneity statistics, I² stands out as it is the only one independent of the number of studies and precision (study size).

4. Discussion

The purpose of this meta-analysis was to assess the effect size effect of the exposure of sublethal agrochemicals concentrations on zooplankton abundance. The results obtained support the premise, confirming a widespread negative and significant effect on zooplankton abundance, confirming the initial hypothesis and highlighting the need for further advancements in the study of the effects of sublethal agrochemicals concentrations on aquatic ecosystems. Additionally, this study revealed that this negative effect is influenced by different moderating variables studied within this meta-analysis.

4.1. Global Effect Size

The strong magnitude of the overall effect size confirms that exposure to sublethal concentrations of agrochemicals significantly affects the abundance of zooplankton populations (Table 1; Figure 1). This is supported by various studies (Silva et al., 2021; Plangklang and Athibai, 2021). For instance, Plangklang and Athibai, (2021) evaluated the impact of sublethal herbicides concentrations on zooplankton communities in rice fields, observing a widespread decrease in different population density, particularly in cladocerans and nauplii, affecting their reproductive capacity, habitat selection, and feeding habits. Similarly, Silva et al. (2021) noted a reduction in cladoceran abundance due to sublethal pesticide concentrations and its impact on reproductive rates.

4.2. Moderator Variables Analysis

Although initially "Laboratory", "Concentration range", and "Experiment" variables were added as possible moderator variables, the results obtained after conducting the meta-analysis suggest that these variables do not predict a negative effect of exposure to sublethal agrochemical concentrations on zooplankton abundance. "Laboratory" did not emerge as a significant moderator variable, suggesting that the effect of agrochemicals on zooplankton remains consistent across different laboratories. This finding is consistent with previous literature advocating for methodological standardization in toxicological assays to reduce variability (Dewhurst, 2001; Peters et al., 2013). Regarding the "Concentration Range," it is important to consider from these results that even small sublethal concentrations (included in concentration range 3, < LC50/100), probably legally accepted and considered safe concentrations, can harm zooplankton populations, generating various types of effects such as physical fitness reduction (associated with detoxification cost compensations), alterations in metabolic, reproductive, and growth processes, and even causing genetic variation within populations (Wright, 1978; Agra et al., 2011). Furthermore, the sublethal effect of agrochemicals could influence the effect of other combined or subsequent factors, diminishing the survival capacity of zooplankton populations (Klerks et al., 2011; Rivetti et al., 2016; Barbosa et al., 2017; López-Valcárcel et al., 2023). Lastly, the type of experiment conducted did not moderate the effect of agrochemical exposure on zooplankton populations. This suggests that regardless of whether experiments were conducted indoors or outdoors, the impact of agrochemicals on zooplankton abundance remains consistent. The lack of significant differences between experiment types may

be attributed to methodological standardization in indoor experiments and similar potential climatic influences in outdoor trials (Zhu et al., 2019; Verheyen et al., 2022).

4.2.1. Significant Moderator Variables Analysis

4.2.1.1. Agrochemical

Considering the type of agrochemical used, results indicate its influence on the effect on zooplankton (Table 3; Fig. 3b). Insecticides prove to be the most harmful, aligning with Hanazato's review (2001), highlighting their high lethality and also their sublethal negative effects. However, herbicides and fungicides would also indirectly impact zooplankton dynamics by significantly reducing food availability in aquatic systems, affecting macrophyte and microalgae growth (Sarma et al., 2009; Kelly, 2018). This information emphasizes the diverse effects of different agrochemical types on zooplankton and the need for more studies using several agrochemicals with different mode of action.

4.2.1.2. Agrochemical Composition

Concerning agrochemical composition, zooplankton abundance was consistently reduced in all studied cases, considering it a moderating variable. Significant differences were observed between compounds, with Dicloruro-dimetil-bipiridilo herbicide being the most toxic, followed by copper sulfate and organophosphorus insecticides (Table 3; Figure 3c). This information is consistent with various studies on bipyridyl herbicides, confirming that they are highly harmful compounds for aquatic systems as they cause a widespread decrease in zooplankton and phytoplankton organisms, affecting mainly larger organisms such as adult cladocerans and copepods. This effect leads to a reduction in biomass, number, and overall trophic disfunction (Gagneten and Marchese, 2003; Leboulanger et al., 2011; Rico-Martínez et al., 2012).

On the other hand, there are several studies on the effect of copper sulfate on zooplankton populations and communities in the south of the Iberian Peninsula, where it is used as fungicide, inducing disruptive effects in aquatic systems, such as changes in community structure, carbon transport through the food web and ecological interactions (León et al., 2014; del Arco et al., 2014; del Arco et al., 2019). Furthermore, there are studies showing harmful effects at the population level, such as the study focused on copepod populations by Nwakanma and Chimecie (2018) and the study by De Schamphelaere et al. (2007), where *D. magna* was fed algae contaminated with copper for 21 days, and several toxicity mechanisms were observed, such as increased metabolic cost, reduced energy acquisition (potentially through the inhibition of digestive enzyme activity), targeted inhibition of reproduction (potentially through the inhibition of vitellogenesis), and/or direct inhibition of molting. Lastly, it is important to highlight the negative effect of organophosphate insecticides, as two of the most widely used insecticides worldwide, dimethoate and chlorpyrifos, belong to this group, acting as inhibitors of the acetylcholinesterase hormone (AChE), which is responsible for inhibiting molting processes, thus delaying zooplankton growth and consequently leading to population decline (Bendis and Relyea, 2014; Van Scoy et al., 2016).

4.2.1.3. Taxonomic Order

Considering the taxonomic order of zooplankton, results indicate it is a moderating variable, with significant differences between the included taxonomic orders (Table 3; Fig. 3f). Although all taxonomic orders studied are negatively affected by sublethal concentrations of agrochemicals, there is more information available on Cladocera and Copepoda, as they are the most studied orders in the field of ecotoxicology (Dahms et al., 2011). For example, the study by Planklang and Athibai

(2011) demonstrates the effect of the herbicide glyphosate on cladocerans and copepod nauplii, decreasing the density of both taxa. Additionally, Portinho et al., (2018) reported that sublethal concentrations of agrochemicals could disrupt their reproductive capacity, habitat selection, and feeding habits, creating changes in predator-prey relationships and interspecific competition. On the other hand, rotifers are the organisms most affected by sublethal concentrations of agrochemicals, as they are among the most sensitive primary consumers to chemical substances, compared to cladocerans and copepods (Dahms et al., 2011; Moreira et al., 2016; Xiao et al., 2017). Although in Hanazato et al., (2001) study, they defend that at the community level, rotifers show higher abundance, due to less competition for food due to the death of more sensitive crustacean taxa, especially referring to larger cladocerans, which could also alter community structure (Downing et al., 2008).

4.2.1.4. Species

When considering the species included in the meta-analysis, a negative effect of sublethal concentrations of agrochemicals on all analyzed species is observed. Additionally, significant differences are observed between the studied species, with *D. magna* being the most affected species (Table 3; Fig. 3g). As mentioned above, this would make sense, as populations of large cladocerans are easily affected by exposure to agrochemicals (Downing et al., 2008). Furthermore, *D. magna* is the most commonly used non-target zooplankton species for ecotoxicological assays worldwide (Bickham, 2011). Therefore, there are many studies providing information on sublethal effects of contaminants on *D. magna*. For example, in the studies by Jansen et al. (2011) and Hintz et al. (2019), a fitness cost in *D. magna* populations caused by sublethal exposures was reported. These results raise questions about the importance of this cost

of sublethal exposure in zooplankton populations, considering future exposure to new stressors, as aquatic systems are largely disturbed with contaminants (Micheli et al., 2013; De Laender and Janssen, 2013). There are studies that have considered this possibility, such as those by Barbosa et al. (2015) and Radersma et al. (2018) where, a previous exposure to a stressor results in zooplankton having a lower survival capacity to new stressors.

4.3. Strengths and Limitations

This meta-analysis confirms the negative effects of sublethal agrochemical concentrations on zooplankton abundance, representing the first of its kind. The analysis of moderating variables contributes to exhibit the complexity of the impact of sublethal concentrations exposure on zooplankton populations, supporting to a better understanding for developing more realistic ecological risk assessment of these products. The study's strength lies in the quality of individual research studies included in the analysis. However, a limitation is the exclusion of relevant studies, due to insufficient statistical information, potentially affecting bias analysis, although a representative number of studies were included.

In conclusion, the results of this meta-analysis suggest that sublethal concentrations of agrochemicals, although affecting the abundance, may not immediately obliterate zooplankton populations but have detrimental effects, affecting their ability to sustain over time. This study calls for a shift in ecological risk assessments, emphasizing the importance of evaluating not only the lethality of agrochemicals but also their sublethal effect that would have repercussion in the long-term on populations, communities, and ecosystems, and considering how the

detrimental consequences they induce affect the ability to face simultaneous or subsequent stressors.

5. Conclusions

In this meta-analysis, a significant negative effect of sublethal concentrations of agrochemicals exposure on the abundance of zooplankton populations has been confirmed. Furthermore, various moderating variables of this effect have been confirmed (“Agrochemical”, “Agrochemical composition”, “Taxonomic order” and “Species”). Consequently, we emphasize the importance of delving deeper into this research line on sublethal concentrations’ effects including potential scenarios of exposure to combined or subsequent stressors. We defend that environmental risk assessments could enhance ecological realism by considering sublethal concentrations as disruptors of aquatic communities.

Figure 2

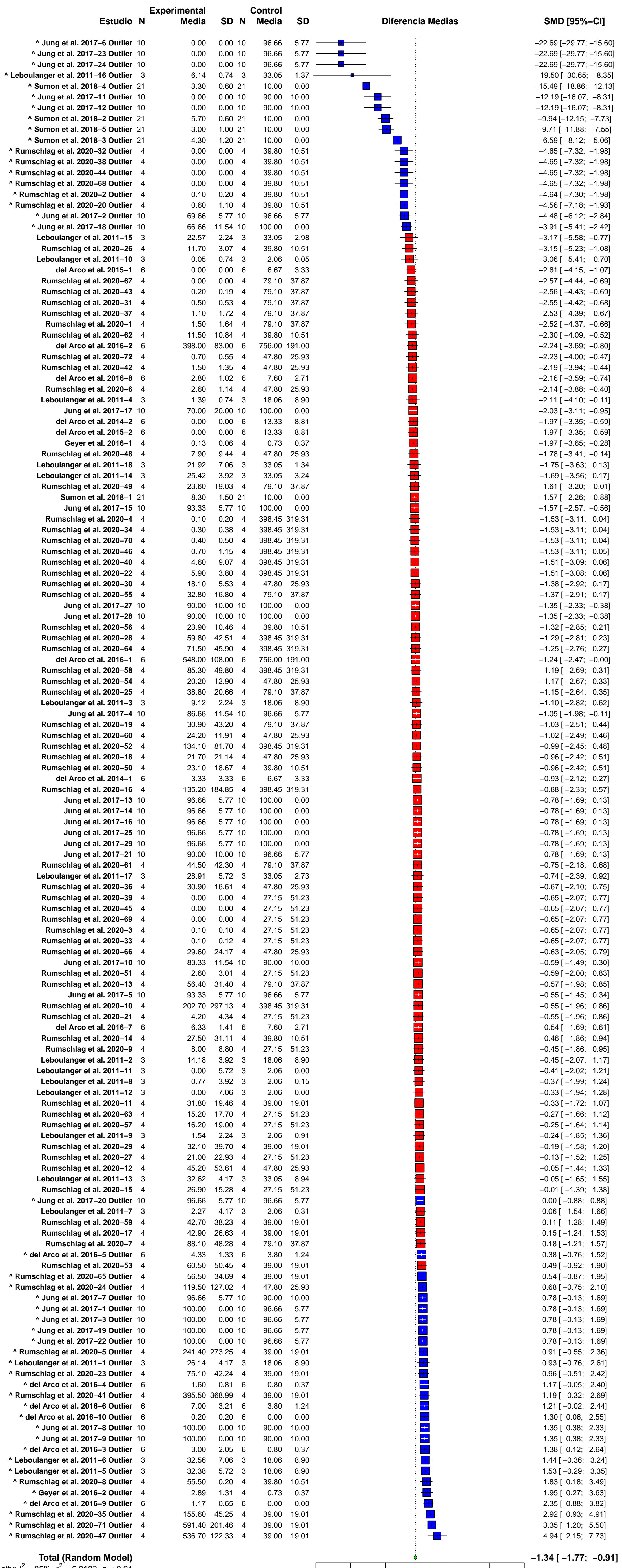
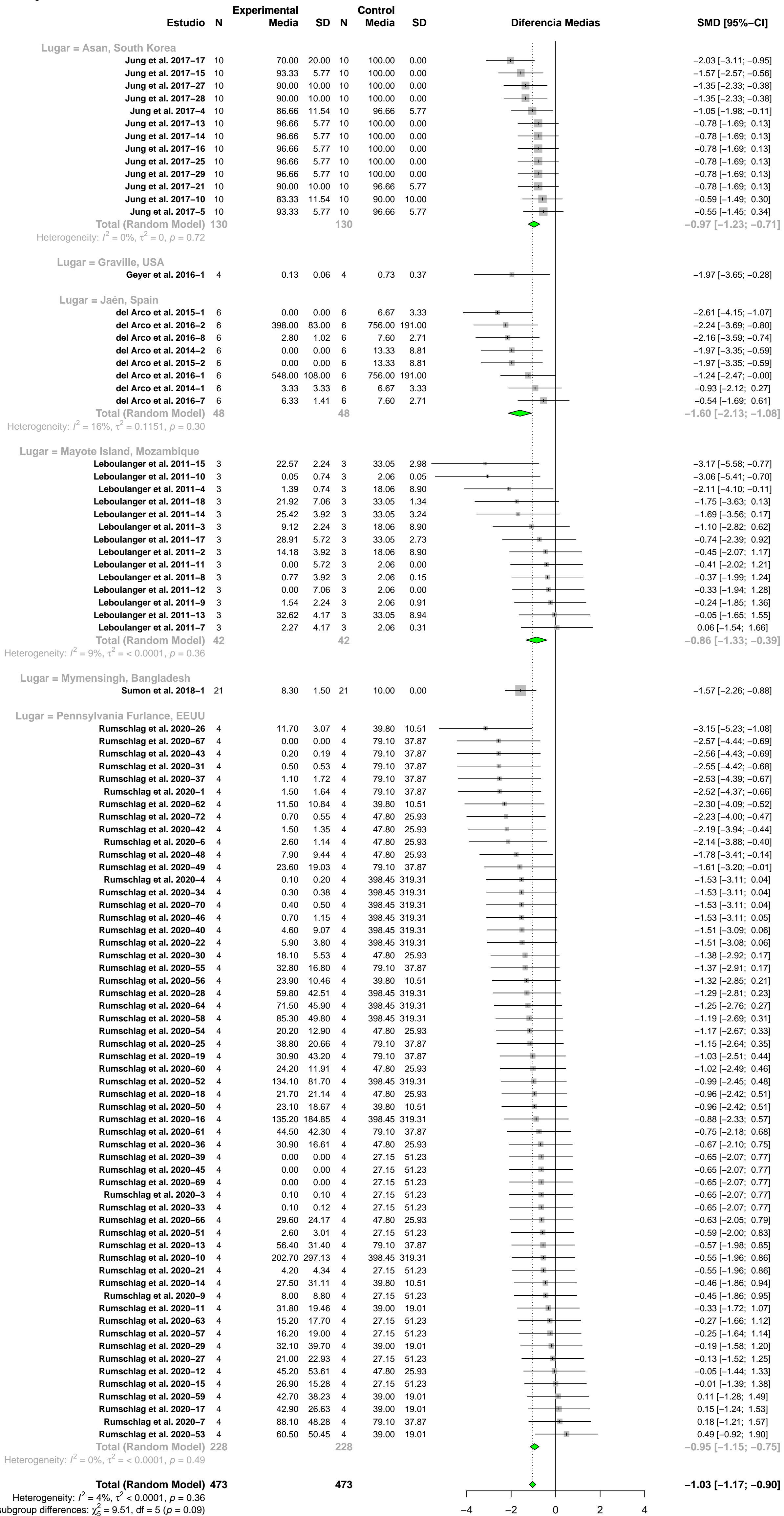
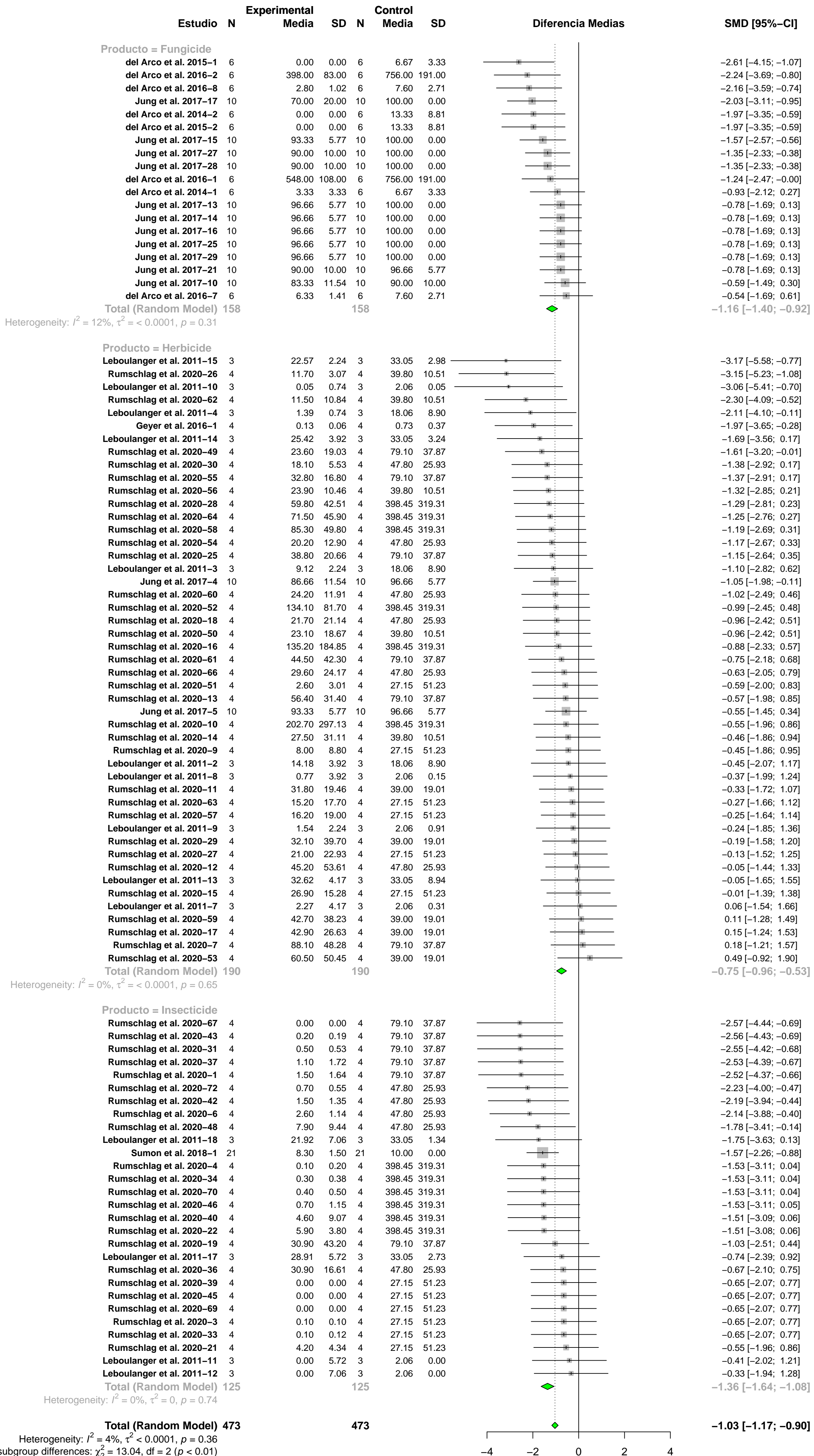
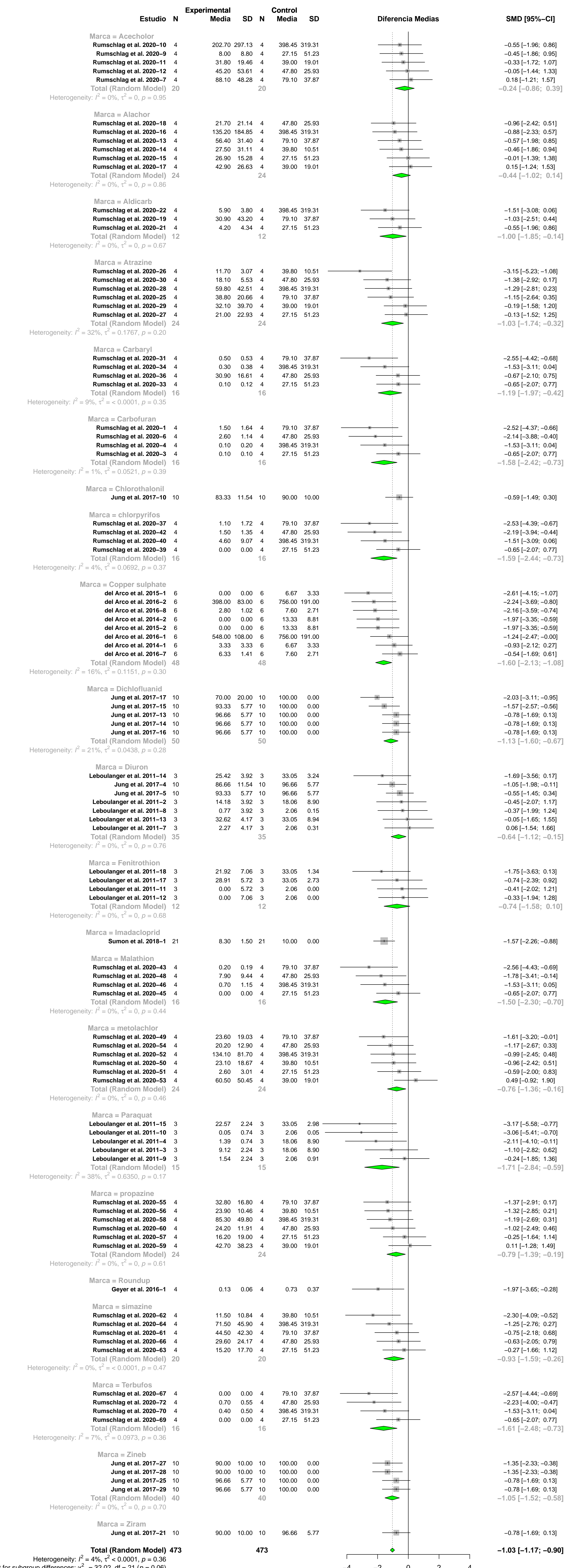
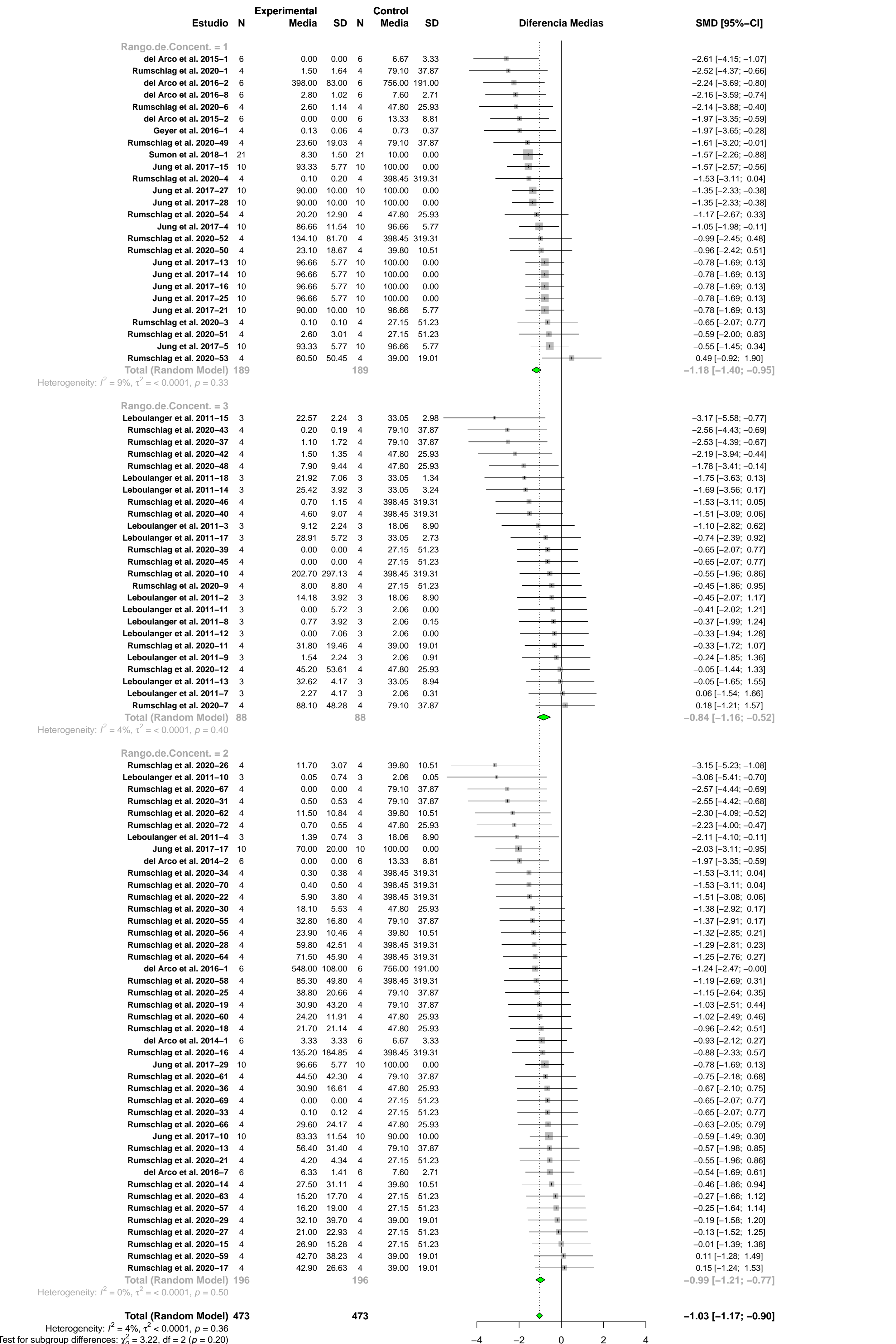


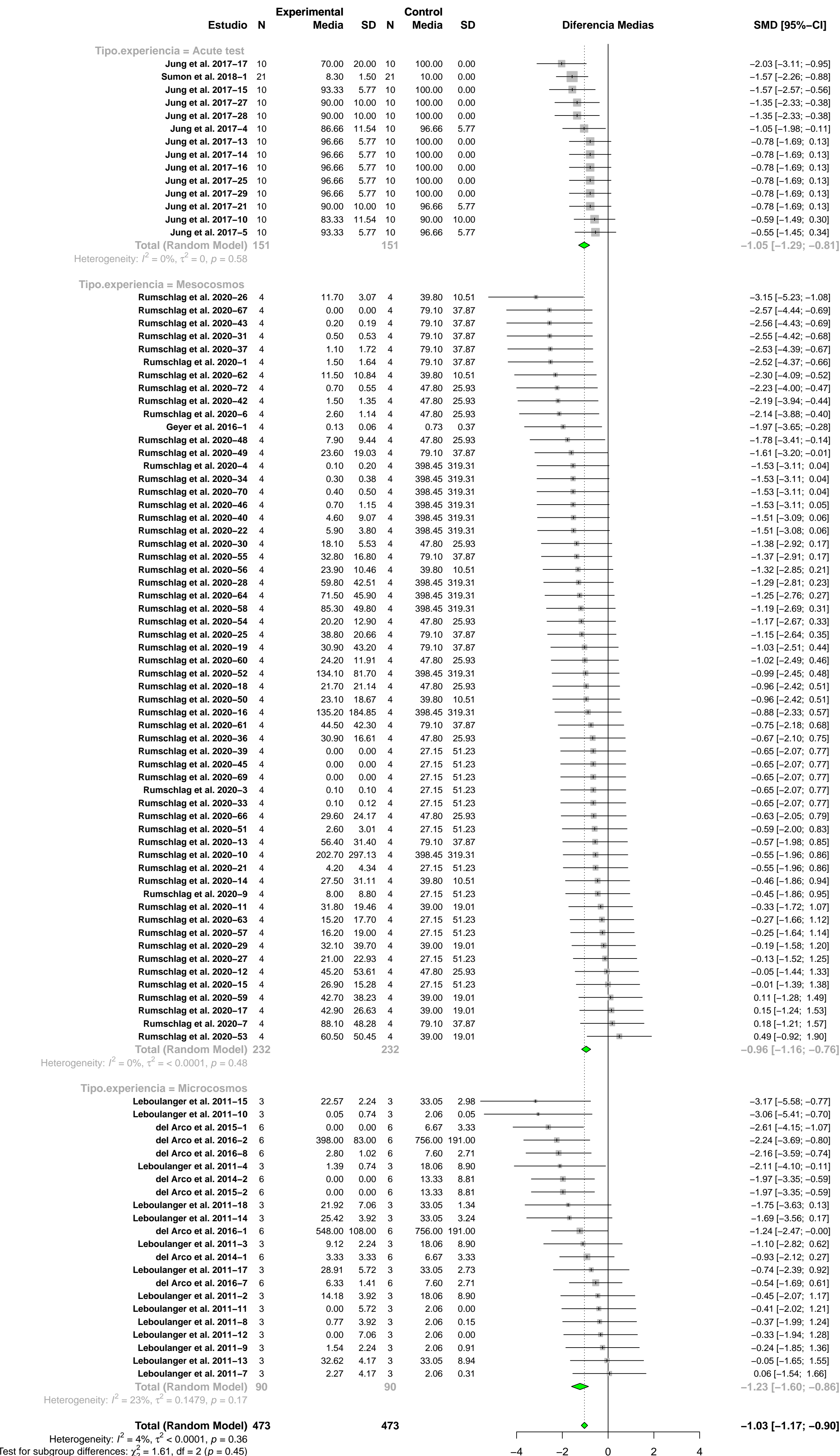
Figure 3

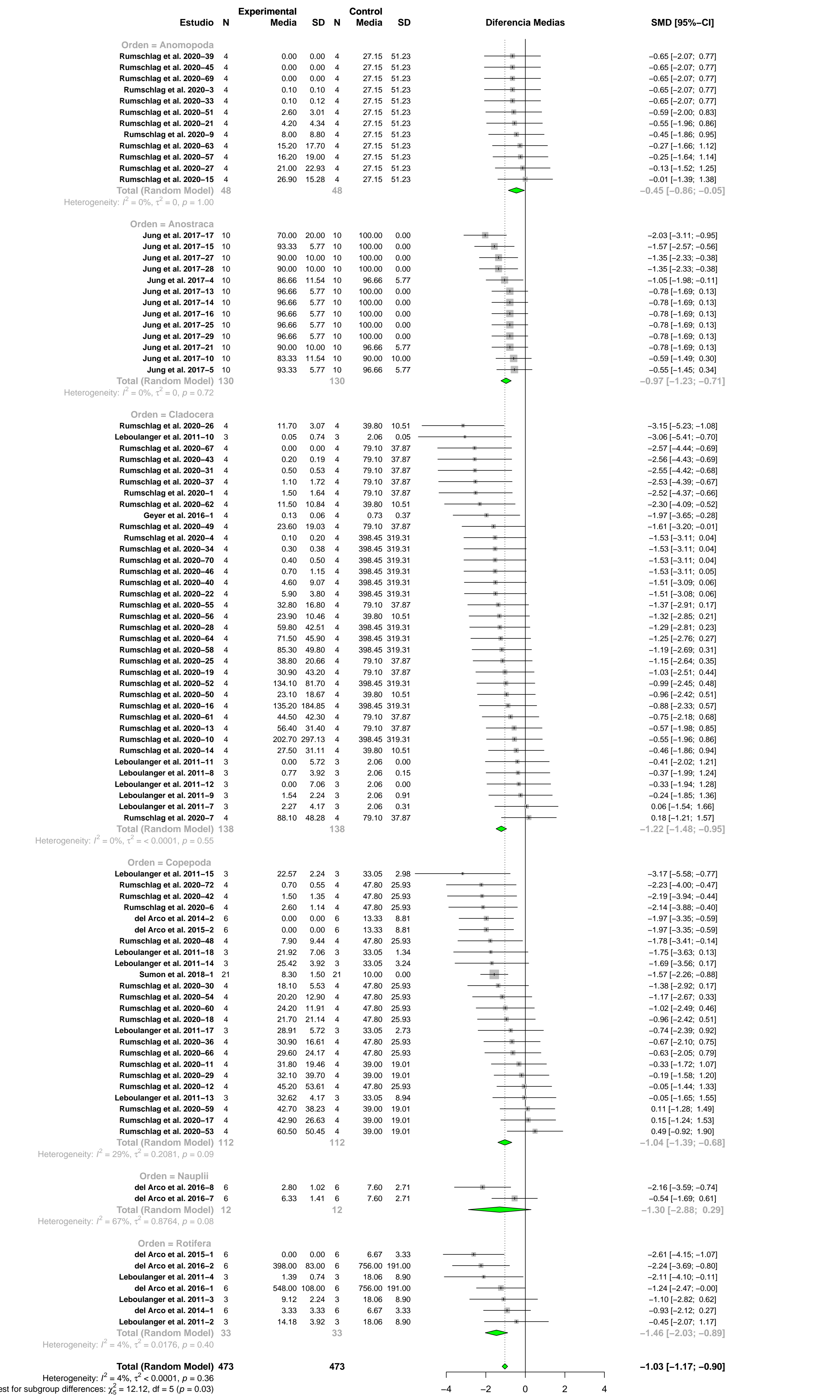












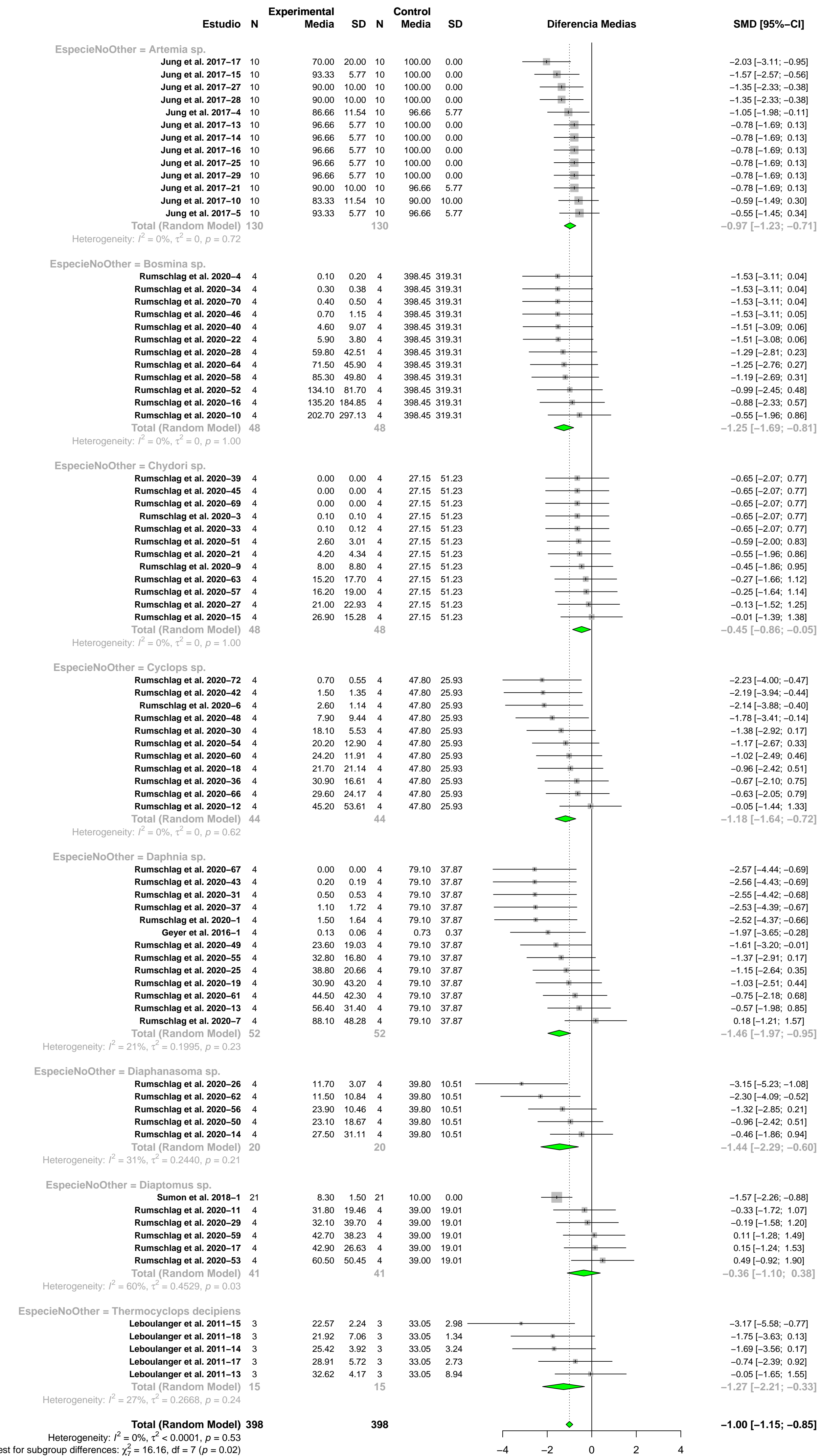


Fig. 2. The Forest Plot for sublethal effects of agrochemicals on zooplankton population abundance is presented as follows: In the central-right graph, the differences between Control and Experimental groups (Mean Difference statistic) and their corresponding 95% Confidence Intervals for means are shown for each of the collected studies, detailed in the left-hand section. This graph includes a square centered on the MD value for each study, with the area proportional to the study's weight in the meta-analysis. Additionally, a diamond is depicted for the overall effect, located in the total row at the bottom. The center of the diamond corresponds to the total summary measure, from which a dashed line is vertically projected. The extension of the diamond is proportional to the confidence interval around the total measure. The continuous vertical line indicates the absence of an effect, i.e., a null difference between the means of the compared groups. In the left-hand section, information for each study in the meta-analysis is provided regarding the compared groups (Control versus Experimental), including sample sizes (N), measures of central tendency (Mean), and dispersion measures (SD). Studies representing outliers are highlighted in blue.

Fig. 3. The Forest Plot for moderator variables in the meta-analysis is designed to observe their impact on the sublethal concentrations' effects on zooplankton population abundance. The central-right graph depicts the differences between Control and Experimental groups (Mean Difference statistic) and their corresponding 95% Confidence Intervals for means from each of the collected studies, detailed in the left-hand section. The graphs also include a square centered on the MD value for each study, with the area proportional to the study's weight in the meta-analysis, plus a diamond for the overall effect (total row at the bottom). The center of the diamond corresponds to the total summary measure, from which a dashed line is vertically projected. The extension of the diamond is proportional to the confidence interval around the total measure. The continuous vertical line reflects the absence of an effect, meaning a null difference between the means of the compared groups. In the left-hand section, information for each study in the meta-analysis is provided regarding the compared groups (Control versus Experimental), including sample sizes (N), measures of central tendency (Mean), and dispersion measures (SD). Studies representing outliers are highlighted in blue.

6. References

Agra, A.R., Soares, A.M., Barata, C., 2011. Life-history consequences of adaptation to pollution: "*Daphnia longispina* clones historically exposed to copper". *Ecotoxicol.* 20, 552-562. <https://doi.org/10.1007/s10646-011-0621-5>

Ahlers, J., Riedhammer, C., Vogliano, M., Ebert, R., Kühne, R., Schüürmann, G., 2006. Acute to chronic ratios in aquatic toxicity variation across trophic levels and relationship with chemical structure. *Environ. Sci. Technol.* 40, 2937-2945. <https://doi.org/10.1897/05-701R.1>

Barbosa, M., Inocentes, N., Soares, A.M., Oliveira, M., 2017. Synergy effects of fluoxetine and variability in temperature lead to proportionally greater fitness costs in *Daphnia*: A multigenerational test. *Aquat. Toxicol.* 193, 268-275. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2017.10.017>

Barbosa, M., Lopes, I., Venâncio, C., Janeiro, M.J., Morrissey, M.B., Soares, A.M., 2015. Maternal response to environmental unpredictability. *Ecol. Evol.* 5, 4567-4577. <https://doi.org/10.1002/ece3.1723>

Bell, G., Gonzalez, A., 2011. Adaptation and evolutionary rescue in metapopulations experiencing environmental deterioration. *Science* 332, 1327-1330. <https://doi.org/10.1126/science.1203105>

Bendis, R.J., Relyea, R.A., 2014. Living on the edge: populations of two zooplankton species living closer to agricultural fields are more resistant to a common insecticide. *Environ. Toxicol. Chem.* 33, 2835-2841. <https://doi.org/10.1002/etc.2749>

Bhagowati, B., Ahamad, K.U., 2019. A review on lake eutrophication dynamics and recent developments in lake modeling. *Ecol. Hydrol.* 19, 155-166. <https://doi.org/10.1016/j.ecohyd.2018.03.002>

Bickham, J.W., 2011. The four cornerstones of evolutionary toxicology. *Ecotoxicol.* 20, 497-502. <https://doi.org/10.1007/s10646-011-0636-y>

Coelho, S., Oliveira, R., Pereira, S., Musso, C., Domingues, I., Bhujel, R.C., Soares, A.M., Nogueira, A.J., 2011. Assessing lethal and sub-lethal effects of trichlorfon on different trophic levels. *Aquat. Toxicol.* 103, 191-198. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2011.03.003>

Cook, S.C., Housley, L., Back, J.A., King, R.S., 2018. Freshwater eutrophication drives sharp reductions in temporal beta diversity. *Ecol.* 99, 47-56. <https://doi.org/10.1002/ecy.2069>

Cooper, H., Hedges, L.V., Valentine, J.C., 2019. *The Handbook of Research Synthesis and Meta-Analysis.* Russell Sage Foundation. <https://doi.org/10.7758/9781610448864>

Dahms, H., Hagiwara, A., Lee, J., 2011. Ecotoxicology, ecophysiology, and mechanistic studies with rotifers. *Aquat. Toxicol.* 101, 1-12. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2010.09.00>

De Laender, F., Janssen, C.R., 2013. Brief communication: The ecosystem perspective in ecotoxicology as a way forward for the ecological risk assessment of chemicals. *Integr. Environ. Assess. Manag.* 9, 34-38. <https://doi.org/10.1002/ieam.1428>

De Schampelaere, K., Forrez, I., Dierckens, K., Sorgeloos, P., Janssen, C.R., 2007. Chronic toxicity of dietary copper to *Daphnia magna*. *Aquat. Toxicol.* 81, 409-418. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2007.01.002>

del Arco, A.I., Guerrero, F., Jimenez-Gomez, F., Parra, G., 2014. Shifts across trophic levels as early warning signals of copper sulfate impacts in plankton communities. *Appl. Ecol. Environ. Res.* 12, 493-503. https://doi.org/10.15666/aeer/1202_493503

del Arco, A.I., Jiménez-Gómez, F., Guerrero, F., Parra, G., 2016. Can a copper sulphate pulse below toxic threshold change plankton communities? *Aquat. Ecosyst. Health Manage.* 19, 64-73. <https://doi.org/10.1080/14634988.2016.1138791>

del Arco, A., Guerrero, F., Jiménez-Gómez, F., Parra, G., 2019. Plankton community responses to environmentally-relevant agrochemical mixtures. *Limnology* 55, 5. <https://doi.org/10.1051/limn/2019004>

Dewhurst, I.C., 2001. Toxicological assessment of biological pesticides. *Toxicol. Lett.* 120, 67-72. [https://doi.org/10.1016/S0378-4274\(01\)00308-3](https://doi.org/10.1016/S0378-4274(01)00308-3)

Dinh, K.V., Konestabo, H.S., Borgå, K., Hylland, K., Macaulay, S.J., Jackson, M.C., Verheyen, J., Stoks, R., 2022. Interactive effects of warming and pollutants on marine and freshwater invertebrates. *Curr. Pollut. Rep.* 8, 341-359. <https://doi.org/10.1007/s40726-022-00245-4>

Dowle, M., Srinivasan, A., Gorecki, J., Chirico, M., Stetsenko, P., Short, T., Lianoglou, S., Antonyan, E., Bonsch, M., Parsonage, H., 2019. Package ‘data.table’. *Extension of ‘data.frame’* 596. <https://cran.r-hub.io/web/packages/data.table/data.table.pdf>

Downing, A.L., DeVanna, K.M., Rubeck-Schurtz, C.N., Tuhela, L., Grunkemeyer, H., 2008. Community and ecosystem responses to a pulsed pesticide disturbance in freshwater ecosystems. *Ecotoxicol.* 17, 539-548. <https://doi.org/10.1007/s10646-008-0211-3>

Downing, A.L., Parra, G., 2023. The response of freshwater plankton communities to temporal concurrence of agrochemical mixtures. *Limnology* 42, 189-202. <https://doi.org/10.23818/limn.42.14>

Fantón, N., Bacchetta, C., Rossi, A., Gutierrez, M.F., 2020. Effects of a glyphosate-based herbicide on the development and biochemical biomarkers of the freshwater copepod *Notodiaptomus carteri* (Lowndes, 1934). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 196, 110501. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.110501>

Field, C.B., Barros, V.R., 2014. *Climate Change 2014. Impacts, Adaptation and Vulnerability: Regional Aspects*. Cambridge University Press.

Gagneten, A.M., Marchese, M., 2003. Effect of Paraquat on freshwater zooplankton and zoobenthic assemblages in enclosure experiments. *Int. J. Ecohydro. Hydrobiol.* 3, 389-398.

Geyer, R.L., Smith, G.R., Rettig, J.E., 2016. Effects of Roundup formulations, nutrient addition, and Western mosquitofish (*Gambusia affinis*) on aquatic communities. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 23, 11729-11739. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-6381-2>

Hanazato, T., 2001. Pesticide effects on freshwater zooplankton: an ecological perspective. *Environ. Pollut.* 112, 1-10. [https://doi.org/10.1016/S0269-7491\(00\)00110-](https://doi.org/10.1016/S0269-7491(00)00110-X)

X

Harrer, M., Cuijpers, P., Furukawa, T., Ebert, D., 2021. Doing Meta-Analysis with R: A Hands-on Guide. Chapman and Hall/CRC. <https://doi.org/10.1201/9781003107347>

Hébert, M., Fugère, V., Beisner, B.E., Barbosa da Costa, N., Barrett, R.D., Bell, G., Shapiro, B.J., Yargeau, V., Gonzalez, A., Fussmann, G.F., 2021. Widespread agrochemicals differentially affect zooplankton biomass and community structure. *Ecol. Appl.* 31, 02423. <https://doi.org/10.1002/eap.2423>

Hintz, W.D., Jones, D.K., Relyea, R.A., 2019. Evolved tolerance to freshwater salinization in zooplankton: life-history trade-offs, cross-tolerance and reducing cascading effects. *Philos. Trans. R. Soc. B* 374, 20180012. <https://doi.org/10.1098/rstb.2018.0012>

Hoffmann, A.A., Parsons, P.A., 1991. Evolutionary genetics and environmental stress. Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/oso/9780198577324.001.0001>

Hua, J., Jones, D.K., Relyea, R.A., 2014. Induced tolerance from a sublethal insecticide leads to cross-tolerance to other insecticides. *Environ. Sci.* 48, 4078-4085. <https://doi.org/10.1021/es500278f>

Islam, S.S., Midya, S., 2023. Growth Regulatory Pattern of Zooplankton in Herbicide and Antibiotic Contaminated Aquatic Ecosystem: An overview. *Watershed Ecol. Environ.* <https://doi.org/10.1016/j.wsee.2023.06.001>

Jansen, M., Stoks, R., Coors, A., Van Doorslaer, W., De Meester, L., 2011. Collateral damage: Rapid exposure-induced evolution of pesticide resistance leads to increased susceptibility to parasites. *Evolution* 65, 2681-2691. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.2011.01331.x>

Jung, S.M., Bae, J.S., Kang, S.G., Son, J.S., Jeon, J.H., Lee, H.J., Jeon, J.Y., Sidharthan, M., Ryu, S.H., Shin, H.W., 2017. Acute toxicity of organic antifouling biocides to phytoplankton *Nitzschia pungens* and zooplankton *Artemia larvae*. Mar. Pollut. Bull. 124, 811-818. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2016.11.047>

Kelly, M.R., 2018. The Combined Effects of Atrazine and Tetracycline on Primary Producers and Zooplankton in Freshwater Microcosms. Honors College Theses. 323. <https://digitalcommons.georgiasouthern.edu/honors-theses/323>

Klerks, P.L., Xie, L., Levinton, J.S., 2011. Quantitative genetics approaches to study evolutionary processes in ecotoxicology; a perspective from research on the evolution of resistance. Ecotoxicol. 20, 513-523. <https://doi.org/10.1007/s10646-011-0640-2>

Knillmann, S., Stampfli, N.C., Beketov, M.A., Liess, M., 2012. Intraspecific competition increases toxicant effects in outdoor pond microcosms. Ecotoxicol. 21, 1857-1866. <https://doi.org/10.1007/s10646-012-0919-y>

Kocaguneli, E., Menzies, T., 2013. Software effort models should be assessed via leave-one-out validation. J. Syst. Software 86, 1879-1890. <https://doi.org/10.1016/j.jss.2013.02.053>

Kumar, R., Sankhla, M.S., Kumar, R., Sonone, S.S., 2021. Impact of pesticide toxicity in aquatic environment. BRIAC. 11, 10131-10140. <https://doi.org/10.33263/BRIAC113.1013110140>

Landrigan, P.J., Fuller, R., Acosta, N.J., Adeyi, O., Arnold, R., Baldé, A.B., Bertollini, R., Bose-O'Reilly, S., Boufford, J.I., Breyse, P.N., 2018. The Lancet

Commission on pollution and health. *Lancet* 391, 462-512.
[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)32345-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)32345-0)

Leboulanger, C., Bouvy, M., Carré, C., Cecchi, P., Amalric, L., Bouchez, A., Pagano, M., Sarazin, G., 2011. Comparison of the effects of two herbicides and an insecticide on tropical freshwater plankton in microcosms. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 61, 599-613. <https://doi.org/10.1007/s00244-011-9653-3>

Leboulanger, C., Schwartz, C., Somville, P., Diallo, A.O., Pagano, M., 2011. Sensitivity of two Mesocyclops (Crustacea, Copepoda, Cyclopidae), from tropical and temperate origins, to the herbicides, diuron and paraquat, and the insecticides, temephos and fenitrothion. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 87, 487-493.
<https://doi.org/10.1007/s00128-011-0406-9>

León, D., Peñalver, P., Casas, J., Juan, M., Fuentes, F., Gallego, I., Santillana, J.T., 2014. Effects of copper sulphate on zooplankton communities in ponds submitted to agricultural intensification. *Bol. Biodivers. Chile* 1-10.
<https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=5526774>

Liao, Y.F., Faulks, L.K., Ostman, O., 2015. Stress tolerance and population stability of rock pool *Daphnia* in relation to local conditions and population isolation. *Hydrobiol.* 742 (1), 267e278. <https://doi.org/10.1007/s10750-014-1990-6>.

Liess, M., Pieters, B.J., Duquesne, S., 2006. Long-term signal of population disturbance after pulse exposure to an insecticide: rapid recovery of abundance, persistent alteration of structure. *Environ. Toxicol. Chem.* 25, 1326-1331.
<https://doi.org/10.1897/05-466R.1>

Lim, X.E., Koksong, L., Koksong, L., Liew, H., Loh, J., Loh, J., 2019. Acute toxicity of glyphosate on various life stages of calanoid copepod, *Pseudodiaptomus annandalei*. Asia Pac. J. Mol. Biol. Biotechnol. 27, 24-31.

López-Valcárcel, M.E., Parra, G., Del Arco, A., 2021. Environmental disturbance history undermines population responses to cope with anthropogenic and environmental stressors. Chemosphere 262, 128373. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.128373>.

López-Valcárcel, M.E., Del Arco, A., Parra, G., 2023. Sublethal exposure to agrochemicals impairs zooplankton ability to face future global change challenges. Sci. Total Environ. 873, 162020. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.162020>.

Lydy, M.J., Austin, K.R., 2004. Toxicity assessment of pesticide mixtures typical of the Sacramento San Joaquin Delta using *Chironomus tentans*. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 48, 49-55. <https://doi.org/10.1007/s00244-004-0056-6>

Mann, R.M., Hyne, R.V., Choung, C.B., Wilson, S.P., 2009. Amphibians and agricultural chemicals: review of the risks in a complex environment. Environ. Pollut. 157, 2903-2927. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2009.05.015>

McGrath, S., Sohn, H., Steele, R., Benedetti, A., 2020. Meta-analysis of the difference of medians. Biometrics 62, 69-98. <https://doi.org/10.1002/bimj.201900036>

McLuckie, C., Moltchanivskyj, N., Gaston, T., Dunstan, R.H., Crompton, M., Butcherine, P., Benkendorff, K., Taylor, M.D., 2020. Lethal and sub-lethal effects of environmentally relevant levels of imidacloprid pesticide to Eastern School Prawn, *Metapenaeus macleayi*. Sci. Total Environ. 742, 140449. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140449>

Micheli, F., Halpern, B.S., Walbridge, S., Ciriaco, S., Ferretti, F., Fraschetti, S., Lewison, R., Nykjaer, L., Rosenberg, A.A., 2013. Cumulative human impacts on Mediterranean and Black Sea marine ecosystems: assessing current pressures and opportunities. *PLoS One* 8, 79889. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0079889>

Moher, D., Liberati, A., Tetzlaff, J., Altman, D.G., PRISMA Group*, 2009. Preferred reporting items for systematic reviews and meta-analyses: the PRISMA statement. *Ann. Intern. Med.* 151, 264-269. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-151-4-200908180-00135>

Moreira, R.A., da Silva Mansano, A., Rocha, O., Daam, M.A., 2016. The use of rotifers as test species in the aquatic effect assessment of pesticides in the tropics. *Hydrobiologia* 773, 1-9. <https://doi.org/10.1007/s10750-016-2675-0>

Nwakanma, C., Chimezie, A.F., 2018. Toxicity of Copper Sulphate on Copepod species. *Int. J. Sci. Adv. Innov. Res.* 3, 2536-7323.

Oerke, E., Dehne, H., 2004. Safeguarding production—losses in major crops and the role of crop protection. *Crop prot.* 23, 275-285. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2003.10.001>

Parra, G., Jiménez-Melero, R., Guerrero, F., 2005. Agricultural impacts on Mediterranean wetlands: the effect of pesticides on survival and hatching rates in copepods. *Limnetica* 41, 161-167. <https://doi.org/10.1051/limn:20054130161>

Pease, C.M., Bull, J.J., 1988. A critique of methods for measuring life history trade-offs. *J. Evol. Biol.* 1, 293-303. <https://doi.org/10.1046/j.1420-9101.1988.1040293.x>

Peters, K., Bundschuh, M., Schäfer, R.B., 2013. Review on the effects of toxicants on freshwater ecosystem functions. *Environ. Pollut.* 180, 324-329. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2013.05.025>

Portinho, J.L., Nielsen, D.L., Daré, L., Henry, R., Oliveira, R.C., Branco, C.C., 2018. Mixture of commercial herbicides based on 2, 4-D and glyphosate mixture can suppress the emergence of zooplankton from sediments. *Chemosphere* 203, 151-159. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.03.156>

Planklang, N., Athibai, S., 2021. Comparisons of Zooplankton Community Structure between with-and without-Pesticide Applications on Rice Fields. *Diversity* 13, 644. <https://doi.org/10.3390/d13120644>

R Core Team. (2021). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <https://www.R-project.org/>

Radersma, R., Hegg, A., Noble, D.W., Uller, T., 2018. Timing of maternal exposure to toxic cyanobacteria and offspring fitness in *Daphnia magna*: Implications for the evolution of anticipatory maternal effects. *Ecol. Evol.* 8, 12727-12736. <https://doi.org/10.1002/ece3.4700>

Rico-Martínez, R., Arias-Almeida, J.C., Pérez-Legaspi, I.A., Alvarado-Flores, J., Retes-Pruneda, J.L., 2012. Adverse effects of herbicides on freshwater zooplankton. In *Herbicides - Properties, Synthesis and Control of Weeds*. London: InTechOpen, 405-434.

Rivetti, C., Campos, B., Barata, C., 2016. Low environmental levels of neuro-active pharmaceuticals alter phototactic behaviour and reproduction in *Daphnia magna*. *Aquat. Toxicol.* 170, 289-296. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2015.07.019>

Robles-Molina, J., Gilbert-López, B., García-Reyes, J.F., Molina-Díaz, A., 2014. Monitoring of selected priority and emerging contaminants in the Guadalquivir River and other related surface waters in the province of Jaen, South East Spain. *Sci. Total Environ.* 479, 247-257. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.01.121>

Robles-Vargas, D., 2015. Toxicity of agrochemicals on freshwater invertebrates a short review. *Toxicity Hazard Agrochem.* <https://doi.org/10.5772/60762>

Rothstein, H.R., Sutton, A.J., Borenstein, M., 2005. Publication bias in meta-analysis. *Publication bias meta-analysis: Prevention, assessment adjustments*, 1-7. <https://doi.org/10.1002/0470870168>

Rumschlag, S.L., Casamatta, D.A., Mahon, M.B., Hoverman, J.T., Raffel, T.R., Carrick, H.J., Hudson, P.J., Rohr, J.R., 2022. Pesticides alter ecosystem respiration via phytoplankton abundance and community structure: Effects on the carbon cycle? *Glob. Change Biol.* 28, 1091-1102. <https://doi.org/10.1111/gcb.15952>

Sarma, S., Nandini, S., Pena-Aguado, F., Chaparro-Herrera, D.J., 2009. Effects of asplanchnin allelochemical on the toxicity of triasulphuron herbicide to rotifer *Brachionus patulus* (Rotifera: Brachionidae). *Allelopathy J.* 23.

Saro, L., Lopes, I., Martins, N., Ribeiro, R., 2012. Testing hypotheses on the resistance to metals by *Daphnia longispina*: differential acclimation, endpoints association, and fitness costs. *Environ. Toxicol. Chem.* 31, 909-915. <https://doi.org/10.1002/etc.1762>

Schäfer, R.B., van den Brink, P.J., Liess, M., 2011. Impacts of pesticides on freshwater ecosystems. *Environ. Sci. Res. Int.* 20, 11, 111-137. <https://doi.org/10.1080/15487717.2011.607676>

Schindler, D.W., 2006. Recent advances in the understanding and management of eutrophication. *Limnol. Oceanogr.* 51, 356-363. https://doi.org/10.4319/lo.2006.51.1_part_2.0356

Schwarzer, G., 2019. How to perform a meta-analysis with R: a practical tutorial, *Evidence-Based Mental Health.* 22, 153-160. <https://doi.org/10.1136/ebmental-2019-300117>

Sedgwick, P., Marston, L., 2015. How to read a funnel plot in a meta-analysis. *BMJ* 351. <https://doi.org/10.1136/bmj.h4718>

Silva, L.C., Moreira, R.A., Pinto, T.J., Vanderlei, M.R., Athayde, D.B., Lopes, L.F., Ogura, A.P., Yoshii, M.P., Freitas, J.S., Montagner, C.C., 2021. Lethal and sublethal toxicity of pesticides and vinasse used in sugarcane cultivation to *Ceriodaphnia silvestrii* (Crustacea: Cladocera). *Aquat. Toxicol.* 241, 106017. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2021.106017>

Steffen, W., Richardson, K., Rockström, J., Cornell, S.E., Fetzer, I., Bennett, E.M., Biggs, R., Carpenter, S.R., De Vries, W., De Wit, C.A., 2015. Planetary boundaries: Guiding human development on a changing planet. *Science* 347, 1259855. <https://doi.org/10.1126/science.1259855>

Sumon, K.A., Ritika, A.K., Peeters, E.T., Rashid, H., Bosma, R.H., Rahman, M.S., Fatema, M.K., Van den Brink, P.J., 2018. Effects of imidacloprid on the ecology of sub-tropical freshwater microcosms. *Environ. Pollut.* 236, 432-441. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.01.102>

Tilman, D., Cassman, K.G., Matson, P.A., Naylor, R., Polasky, S., 2002. Agricultural sustainability and intensive production practices. *Nature* 418, 671-677.

<https://doi.org/10.1038/nature01014>

Untersteiner, H., Kahapka, J., Kaiser, H., 2003. Behavioural response of the cladoceran *Daphnia magna* Straus to sublethal Copper stress validation by image analysis. *Aquat. Toxicol.* 65, 435-442. [https://doi.org/10.1016/S0166-445X\(03\)00157-7](https://doi.org/10.1016/S0166-445X(03)00157-7)

Van Scoy, A., Pennell, A., Zhang, X., 2016. Environmental fate and toxicology of dimethoate. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 237, 53-70. https://doi.org/10.1007/978-3-319-23573-8_3

Verheyen, J., Delnat, V., Theys, C., 2022. Daily temperature fluctuations can magnify the toxicity of pesticides. *Curr. Opin. Insect Sci.*, 100919 <https://doi.org/10.1016/j.cois.2022.100919>

Viechtbauer, W., 2010. Conducting meta-analyses in R with the metafor package. *Behav. Res. Methods* 36, 1-48. <https://doi.org/10.18637/jss.v036.i03>

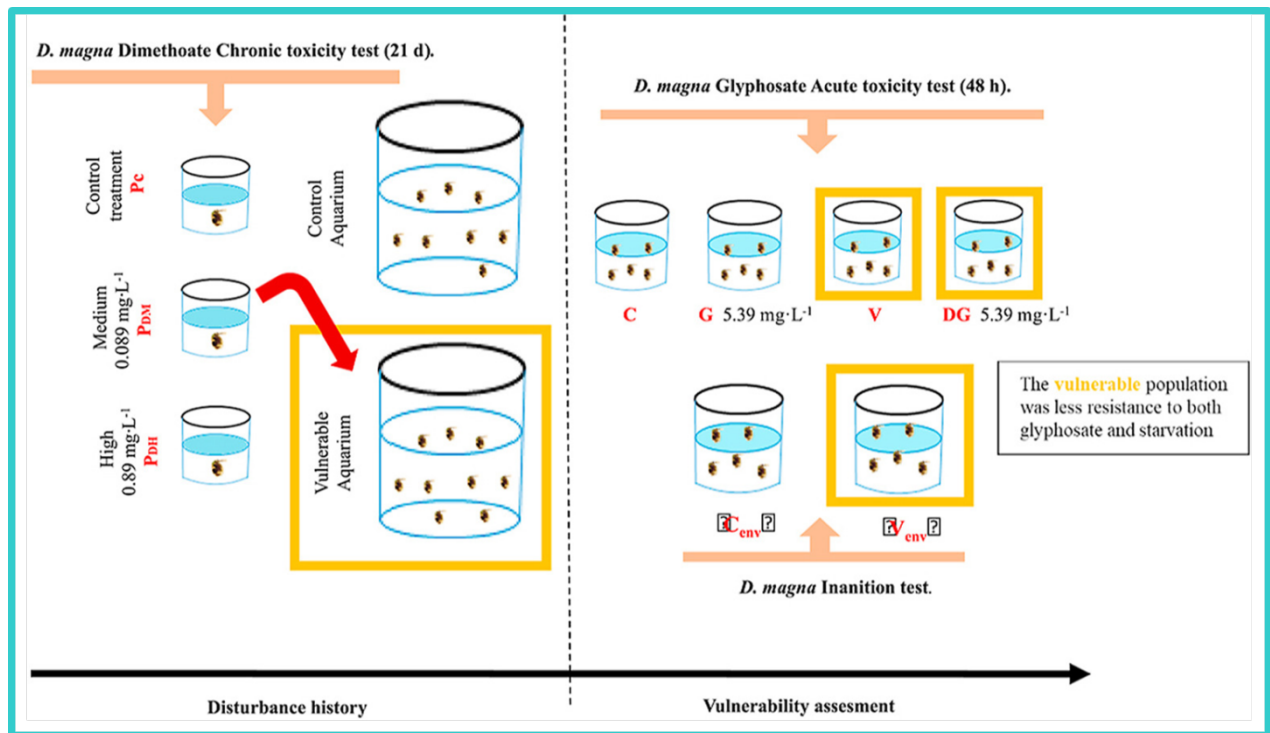
Wang, J., Pan, F., Soininen, J., Heino, J., Shen, J., 2016. Nutrient enrichment modifies temperature-biodiversity relationships in large-scale field experiments. *Nat. Commun.* 7, 13960. <https://doi.org/10.1038/ncomms13960>

Wright, S., 1978. Variability within and among populations. *Evolution Genetics Populations.* <https://doi.org/10.2307/2529965>

Xiao, P., Liu, F., Liu, Y., Yao, S., Zhu, G., 2017. Effects of pesticide mixtures on zooplankton assemblages in aquatic microcosms simulating rice paddy fields. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 99, 27-32. <https://doi.org/10.1007/s00128-017-2105-7>

Zhu, X., Wang, Y., Hou, X., Kong, Q., Sun, Y., Wang, J., Huang, Y., Yang, Z.,
2019. High temperature promotes the inhibition effect of Zn²⁺ on inducible defense of
Scenedesmus obliquus. Chemosphere 216, 203-212.
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.10.116>

Environmental disturbance history undermines population responses to cope with anthropogenic and environmental stressors



Environmental disturbance history undermines population responses to cope with anthropogenic and environmental stressors

Cita: López-Valcárcel, M.E., Parra, G., Del Arco, A., 2020. Environmental disturbance history undermines population responses to cope with anthropogenic and environmental stressors. *Chemosphere* 262, 128373. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.128373>.

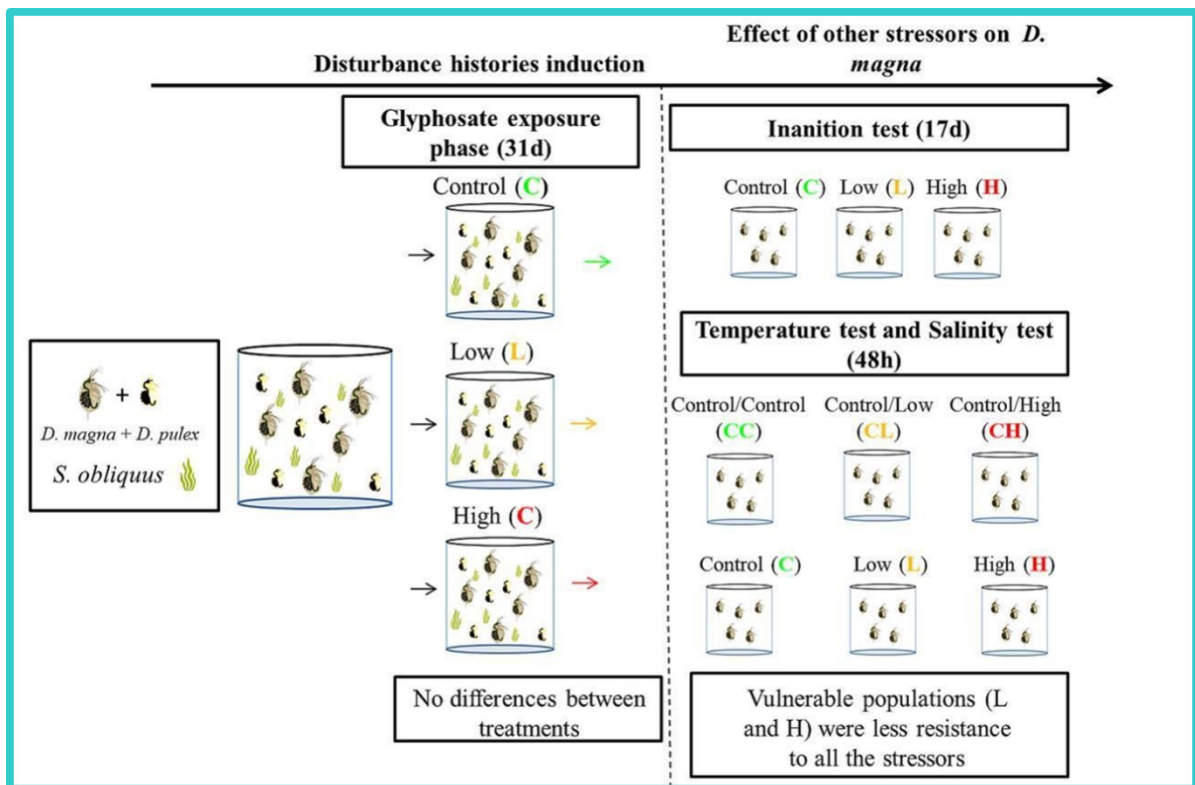
Abstract

Since aquatic ecosystems receive runoff of most anthropogenic pollutants, risk assessment tools and protocols have been developed in order to protect them. However, most ecological risk assessments focus on the study of single species exposed to a single chemical, overlooking the environmental reality of multiple chemical exposures and stresses over generations. To advance in realistic predictions of population and community changes, the environmental disturbance history should be considered. The aim of this study was to evaluate how environmental disturbance history (continuous expected sublethal exposure to one chemical for several generations) determines populations' responses to another stressors. The experiments were performed with *Daphnia magna* as model organisms. To create a disturbance history, dimethoate was used as first stressor at two different concentrations: medium (0.089 mg L^{-1}) and high (0.89 mg L^{-1}). The population exposed to medium concentration ("vulnerable population") showed no differences from the control population in the selected parameters (body size and reproductive success). Our interest in the vulnerable population was to determine whether, after a first stressor, the detected non-effect hides a population impairment, which might undermine populations' responses to future

stressors. After 4 generations under dimethoate exposure, the vulnerable *D. magna* population was exposed to a second chemical stressor (glyphosate) and an environmental stressor (food scarcity) as compared to control. The vulnerable population showed both less resistance to glyphosate and less resistance to starvation, corroborating the hypothesis that a disturbance history of continuous expected sublethal chemical exposures undermines populations' responses to further chemical and environmental stressors.

Keywords: Zooplankton, Pollutants, Multiple stressors, Sublethal concentrations, Sequential exposure.

Sublethal exposure to agrochemicals impairs zooplankton ability to face future global change challenges



Sublethal exposure to agrochemicals impairs zooplankton ability to face future global change challenges

Cita: López-Valcárcel, M.E., Del Arco, A., Parra, G., 2023. Sublethal exposure to agrochemicals impairs zooplankton ability to face future global change challenges. *Sci. Total Environ.* 873, 162020 <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.162020>

Abstract

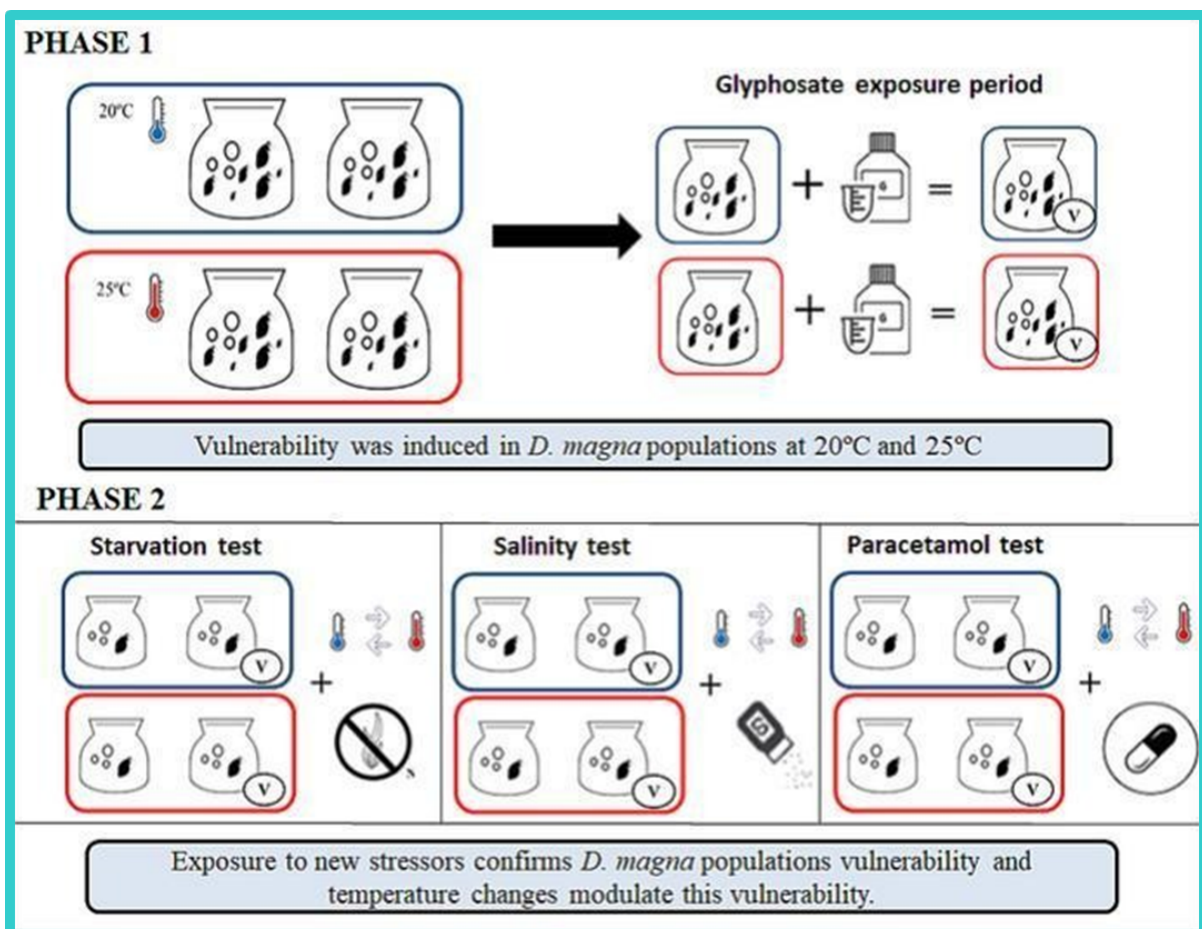
Intensive agriculture is characterized by the application of multiple stressors that damage aquatic systems. Currently, ecotoxicological evaluations are considered insufficient to understand the environmental risks of stressor mixtures and their consequences in ecosystems. In addition, future global change scenarios could alter the predicted effects of agrochemicals in aquatic systems based on single exposures, making it necessary to consider the history of environmental disturbances that may result in vulnerability to subsequent environmental changes. The objectives of this study were to induce disturbance histories by exposure to sublethal glyphosate concentrations in microcosms and to assess whether this disturbance results in vulnerable populations using *Daphnia magna* as the target species. Populations were considered vulnerable if their sensitivity to new stressors (inanition, temperature, and salinity) was higher than that of undisturbed populations. To induce disturbance history, microcosm aquatic communities (two cladocerans and one microalgae) were exposed to two glyphosate sublethal concentrations (below the No Observed Effect Concentration, NOEC values for *D. magna*, 0.1 and 1 mg L⁻¹) in microcosms under controlled conditions in a culture chamber for 48 days. After this period, no significant differences were observed with

respect to the control microcosms in the selected parameters (cladoceran abundance, microalgae cell abundance, microalgae colony formation, pH, and dissolved oxygen).

To test vulnerability, our target *D. magna* populations, which were previously exposed to different glyphosate treatments, were subjected to inanition, elevated temperature, and salinity. Our results showed that *D. magna* populations with disturbance history performed worse in all the scenarios compared to the populations from undisturbed conditions. These results underscore the need to study how environmental disturbance history influences population responses to new and future stressors. Moreover, our findings raise concern regarding the sublethal effects of pesticides on aquatic populations.

Keywords: Vulnerability, Global change, Environmental disturbance history, Stressors.

Zooplankton vulnerability to glyphosate exacerbated by global change



Zooplankton vulnerability to glyphosate exacerbated by global change

Cita: López-Valcárcel, M.E., Del Arco, A., Parra, G., 2024. Zooplankton vulnerability to glyphosate exacerbated by global change. *Sci. Total Environ.* 913, 169806. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.162020>

Abstract

Anthropogenic activities generate a severe footprint at a global scale. Intensive agriculture, as a global change driver, profoundly impacts aquatic systems through the discharge of pollutants. This situation may be further influenced or exacerbated by factors such as disturbance history and other global change factors. In line with our research focus, it is crucial to evaluate how disturbance history, combined with temperature changes, can affect the functioning of aquatic systems. The objectives of this study were divided into two phases. In Phase 1, the aim was to induce vulnerability in *Daphnia magna* populations through a disturbance history based on exposure to sublethal glyphosate concentrations under different temperature conditions (20°C and 25°C). In Phase 2, vulnerability was assessed through exposure to subsequent stressors (starvation, increased salinity, and paracetamol) combined with temperature changes. During the glyphosate exposure period in Phase 1, differences were observed in *D. magna* populations concerning temperature, with lower abundance at 25°C compared to 20°C. However, no differences were observed in abundance regarding glyphosate treatment. The results obtained in Phase 2, with the introduction of new stressors combined with temperature changes in both directions, revealed stronger effects in vulnerable populations than in control populations. Additionally, temperature changes modulated the effects in the starvation and increased salinity tests. The findings suggest

that agrochemical sublethal concentrations induce vulnerability in *D. magna* populations, and inflicted temperature changes can act as a modulating factor for this vulnerability. This highlights the complexity involved in assessing responses under the multiple scenarios associated with global change.

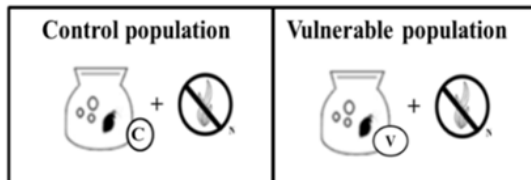
Keywords: *Daphnia magna*, Pollution, Disturbance history, Climate change

Avoidance behavior reduction in *Daphnia magna* due to the agrochemical-induced vulnerability

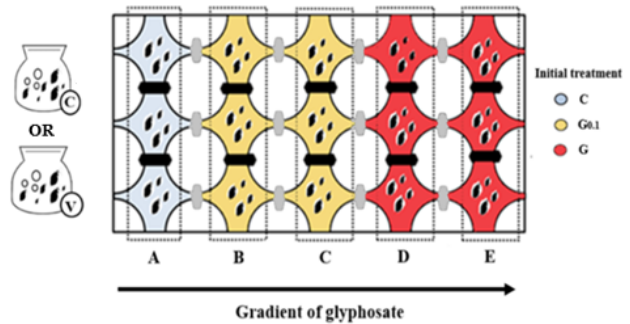
1) Vulnerability induction in *D. magna* populations



2) Vulnerability verification: Starvation test



3) Avoidance test in *D. magna* populations



The vulnerability induced by glycosate sublethal concentration exposure impairs the avoidance capacity in *D. magna*.

Avoidance behavior reduction in *Daphnia magna* due to the agrochemical-induced vulnerability

María Eugenia López-Valcárcel, Gema Parra, Ana del Arco, Cristiano V.M. Araújo

Abstract

The continuous discharge of agrochemicals used in intensive agriculture contaminates aquatic systems, harming aquatic biota and their processes. Although mobile organisms can avoid continuous exposure by moving to less affected habitats, this capacity can be altered due to pollutants exposure. Populations with a previous disturbance history show less ability to respond to subsequent stressor, which defines them as vulnerable. However, the escape capacity of a vulnerable zooplankton population previously exposed to contaminated environment is unknown. Therefore, in this study, agrochemical driven vulnerability was induced in populations of *Daphnia magna* by exposure to sublethal concentrations of glyphosate. Vulnerability was verified through a starvation test, where significant differences were obtained between Control populations and populations with a disturbance history, resulting in a Vulnerable population. Then, both Control and Vulnerable populations were assessed for the avoidance capacity exposing them to a glyphosate gradient in the Heterogeneous Multiple Habitat Avoidance System (HeMHAS). Control populations had a rapid reaction from the beginning of the assay, showing avoidance rates that increased over 24 h, while Vulnerable populations were unable to avoid contaminated habitats, up to 24 h of testing. Therefore, we conclude that Vulnerable populations show a lower capacity to avoid contaminated habitats. In the context of chemically fragmented

habitats, the lower avoidance capacity would be responsible of a differential spatial distribution of the species. Specifically, agrochemical-induced vulnerability would affect ecosystem functioning due to the effect on zooplankton populations and ecosystem structure due to their ability to escape from contaminants.

Keywords: Chemical fragmentation, *D. magna*, Vulnerability, HeMHAS, Sublethal concentration

1. Introduction

Human population growth imposes a high food demand requiring intensive agriculture, which is considered one of the main drivers of global change (Matson and Vitousek, 2006; Steffen et al., 2015). Natural processes of drift, runoff, and leaching imply that the agrochemicals applied to intensive cultivation systems reach water bodies, damaging biota and their processes (Parra et al., 2005; del Arco et al., 2019; Kumar et al., 2021). A significant effect of this agrochemical contamination is the formation of chemical barriers that create a discontinuity in aquatic systems (Mena et al., 2022). This results on chemically fragmented habitat, which is habitat without a physical barrier where contamination level in various areas limits the movement and displacement of organisms within it (Fuller et al., 2015; McFadden et al., 2022). This habitat discontinuity can severely impact freshwater systems as they can significantly alter species dispersal patterns, particularly affecting aquatic invertebrates (Brooks et al., 2013; Sondermann et al., 2015; McFadden et al., 2022).

Since the decrease in habitat connectivity poses a significant threat to biodiversity, it is essential to consider the impact of agrochemical pollution on the spatial distribution and habitat selection by aquatic species (Araújo et al., 2016; Alcívar et al., 2021). In this respect, there are efforts towards studying the spatial avoidance behavior of zooplankton populations in contaminated habitats, utilizing a non-forced multicompartamental exposure system (the Heterogeneous Multiple Habitat Avoidance System - HeMHAS) to simulate the habitat connectivity (Araújo et al., 2018). This exposure system aids in obtaining more information about zooplankton trends, focusing on displacement in contaminated aquatic systems, thereby moving towards a more

realistic approach regarding the chemical heterogeneity (as gradient or patches of contamination) of habitats (Alcívar et al., 2021). Furthermore, through HeMHAS tests, it is possible to simulate scenarios of global change with individual or combined stressors, allowing for the anticipation of the behavior of zooplankton populations within contaminated aquatic systems (Mena et al., 2020; Moreira et al., 2021).

Considered a fundamental model in the field of Ecotoxicology, *Daphnia magna* is a non-target species used for the ecological risk assessment of agrochemicals in aquatic systems through standardized toxicity tests (Brock and Van Wijngaarden, 2012). In some instances, *D. magna* populations do not show a reduction in population abundance when exposed to sublethal concentrations of toxic substances (Bendis and Relyea, 2014), suggesting that these concentrations do not harm the organism. However, there are cases where exposure to sublethal concentrations leads to a decreased fitness, suggesting the possibility that these organisms are vulnerable to subsequent stress factors ultimately affecting following generations (Dutilleul et al., 2017; Toyota et al., 2019; Hintz et al., 2019). In our previous research, we showed that sublethal exposure of *D. magna* to agrochemicals over a specified period, regardless of their mode of action, induces vulnerable populations that are less tolerant to subsequent stressors compared to populations without a disturbance history (López-Valcárcel et al., 2021; López-Valcárcel et al., 2023; López-Valcárcel et al., 2024). In the context of global changes scenarios, the subsequent stressors to which the daphnids were exposed were factors such as low food availability, exposure to new toxics, high salinity, and changes in temperature. *D. magna* responses confirmed the vulnerability of these populations in all mentioned cases through significant differences compared to daphnid populations without a previous disturbance history. A follow up question is how

agrochemical-induced vulnerability might influence *D. magna* behaviour affecting population dispersal in chemically fragmented habitats.

Glyphosate, one of the most widely used broad-spectrum herbicides, has been detected in both marine and freshwater environments, with concentrations ranging from 0.001 mg L⁻¹ to 0.7 mg L⁻¹ (Giesy et al., 2000; Kjaer et al., 2004; Peruzzo et al., 2018). In this study, glyphosate was used to induce Vulnerable *D. magna* populations. Expanding the analysis to characterize the consequences of vulnerability for populations, here we study differences in avoidance behaviour between Vulnerable populations and those without a previous disturbance history. These differences were tested in the HeMHAS test (Araújo et al., 2018) by simulating a gradient of contamination with different glyphosate concentrations. This study hypothesized that *D. magna* populations with vulnerability induced by a previous exposure to sublethal glyphosate concentrations will have a lower capacity to avoid habitats contaminated by glyphosate than *D. magna* Control populations without a disturbance history. The objectives of this study were: a) to induce vulnerability through a sublethal exposure to glyphosate on *D. magna*; b) to verify the existence of this vulnerability through a starvation test; and c) to evaluate and compare the capacity of the Vulnerable populations and the Control populations to avoid habitats contaminated by different glyphosate concentrations in a spatially connected landscape.

2. Materials and Methods

2.1. Test organisms and culture conditions

The test organism utilized was *Daphnia magna* sourced from the natural wetland "Laguna grande" (Baeza, Jaén, Spain). Specimens belonging to the same clone had been

cultivated in the laboratory for several years. The microalga *Scenedesmus obliquus* (Turpin) Kützing 1833, obtained from the Chemical Engineering Laboratory at the University of Jaén, served as the primary nutritional resource. These algae were routinely maintained in the 3N-BBM*V culture medium, with a pH range of 8.3-8.5 (adapted from CCAP, Scotland). Both *D. magna* and *S. obliquus* were cultivated in a chamber with controlled temperature conditions (ARALAB-600PHL-LED) and under identical settings (20 °C and a light-dark cycle of 12-12 h). Commercial mineral water (<4g P/L), with a total hardness of 209 mg L⁻¹ (Álvarez-Manzaneda et al., 2017), enriched with thiamine (0.0075 g L⁻¹), vitamin B12 (0.010 g L⁻¹), biotin (0.0075 g L⁻¹), and sodium selenite (0.0010 g L⁻¹), was used following the cultivation protocol outlined by Díaz-Báez et al. (2004).

2.2. Selected glyphosate concentrations

Throughout the experiment, sublethal concentrations of the commercial liquid herbicide Roundup® Bayer glyphosate were employed. The No Observed Effect Concentration (NOEC) for our target species, *D. magna*, is 1 mg L⁻¹ (Huaraca, 2017). We chose a herbicide concentration 1/10th of the NOEC, i.e., 0.1 mg L⁻¹, to operate in the vulnerability induction phase (see below) within concentrations deemed safe based on standard safety factors from the Ecological Risk Assessment (ERA) (Calow et al., 1997). The herbicide stock solution (100 mg L⁻¹) was prepared using Milli-Q water. Aliquots of the stock solution were applied to the surface water of the glyphosate treatments, gently stirred to ensure homogeneous chemical distribution in the water column.

2.3. Induction and verification of vulnerability

2.3.1. Microcosm setup

Six glass aquariums (2 L) were established at 20 °C. The aquariums underwent a 2-week stabilization period to ensure successful and balanced population growth under those conditions. Weekly samples of daphnids and microalgae were taken to measure abundance and assess population growth. Daphnids were counted using a stereoscopic microscope (Leica M712), and microalgae cell density was estimated with a Sedgewick Rafter chamber, using a microscope (Leica Leitz DMIL). Additionally, to assess the status of *S. obliquus*, the colony formation rate was measured (Galotti et al., 2018). Colonies were defined regardless of whether the colony (cenobia) was composed of two, four, or eight cells. As physical-chemical parameters, dissolved oxygen (DO) and pH were recorded weekly using a multiparametric probe (YSI) (Table 1).

2.3.2. Vulnerability induction: Glyphosate exposure period

After the stabilization period, 2 treatments with 3 replicates each were established, C, Control population, without glyphosate, and V, Vulnerable population, with glyphosate at 0.1 mg L⁻¹. Population was assumed as vulnerable due to the results in previous studies (López-Valcárcel et al., 2021; López-Valcárcel et al., 2023; López-Valcárcel et al., 2024). The experiment lasted 21 days and, to maintain the initial concentration, the medium was renewed weekly. The abundance of *D. magna*, as well as algae abundance and colony formation, were quantified weekly by extracting 200 mL from each microcosm. Physical-chemical parameters, DO and pH, were also measured weekly (Table 1).

2.3.3. Vulnerability verification: Starvation test

Adults from Control and Vulnerable treatments (C and V) were isolated to obtain neonates (<24 h) for the starvation test. The experiment took place in 50 mL containers, and treatments were named according to their maternal population: C, neonates from a population without glyphosate exposure and V, neonates from a population under glyphosate exposure (replicates per treatment $n = 5$; 5 neonates/container). Culture conditions were the same as in the previous stages, but no food was added throughout the experimental period. Individual survival was assessed daily until the death of the last individual.

2.4. Avoidance test

For the avoidance tests, the unforced exposure system HeMHAS was used. This system consisted of 15 compartments in an arrangement of 3x5 compartments, each with a capacity of 320 mL. Such systems are employed to simulate different pollution scenarios with the possibility of escape through doors that connect the experimental compartments. These doors can be opened and closed, allowing the creation of different connectivity scenarios.

This assay comprised two independent tests: in the first, daphnids only from the Control population (C) and, in the second, only organisms from the population with induced vulnerability (V) were used. (Fig. 1). The treatments used for the tests were: clean water (C), 1/10 glyphosate NOEC ($G_{0.1}$), and glyphosate NOEC (G). In order to simulate the gradient of glyphosate, the doors connecting the compartments of the HeMHAS were closed till the beginning of the exposure period and different concentrations were placed the compartments. Then, 10 *D. magna* individuals were introduced into each compartment. Fifty daphnids were used per replicate, and there were 3 replicates per test. Afterwards, the doors were open till the end of the

experimental exposure period, and data (number of organisms per compartment) were collected every half hour during the first 4 h and at 24 h to check the trend of the avoidance behaviour along time. The daphnids used for these tests were 6-8 days old, and the tests were conducted under constant illumination. No food was provided during the experimental period.

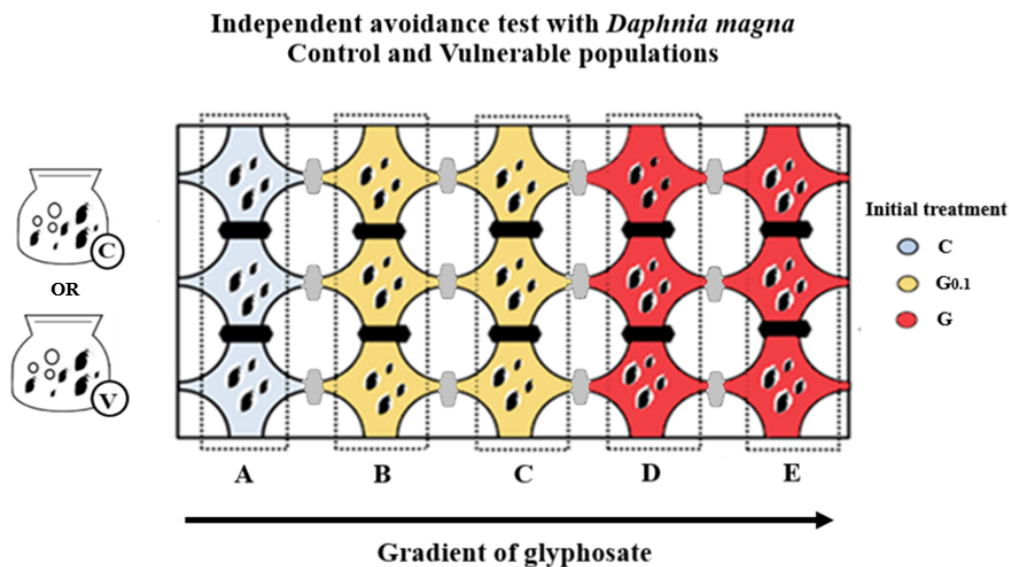


Fig. 1. Scheme of the avoidance tests conducted in a non-forced exposure system (HeMHAS). Two assays were performed: Avoidance test using *D. magna* Control populations, where daphnids from populations without a disturbance history were introduced into the system. Avoidance test using *D. magna* Vulnerable populations, where daphnids from populations with induced vulnerability were introduced into the system. Each row in this system represents a replicate of the exposure circuit. The grey doors are open doors allowing connection between compartments, while black doors are closed doors helping to separate experimental replicates. The letters below refer to the compartments, and each compartment has an initial treatment. Each color appearing in the compartments has been assigned to an initial treatment: Light blue: C (Control treatment; clean water); Light orange: $G_{0.1}$ (Glyphosate: 0.1 mg L^{-1}); Red G (Glyphosate: 1 mg L^{-1}).

2.5. Data Analysis

Data analysis was conducted using the R-Studio (R-Studio Team, 2022) and R (R Core Team, 2022) programs. R packages used for data management, graphics, and statistical analysis included "Metrics" (Hamner and Frasco, 2018), "DescTools" (Signorell et al., 2022), "dplyr" (Wickham et al., 2022), "ggplot2" (Wickham, 2016), "cowplot" (Wike, 2020), and "forcats" (Wickham, 2021). For the microcosm experiment, a generalized linear model (GLM) was used to compare *D. magna* abundance, algae cell abundance, colony cell count, dissolved oxygen (DO), and pH between microcosms in different treatments (C and V) during the experimental period. A two-level factor (C and V) was considered.

For the starvation test, a generalized linear model (GLM) with a two-level factor (C and V) was used. Additionally, the median lethal time (LT_{50}) was calculated for the two different populations.

Concerning the avoidance tests, two different statistical analyses were conducted. Firstly, a Generalized Linear Model (GLM) was performed using the combined data from the experiments conducted with Control populations (C, no disturbance history) and populations with induced vulnerability (V). The purpose was to assess whether there were differences in avoidance capacity between Control and Vulnerable populations. This GLM included a five-level factor (A, B, C, D, E), analyzing abundance as the dependent variable, with compartment (A, B, C, D, E), time (0.5, 4, and 24 h), and vulnerability (Control and Vulnerable) as independent variables. Each compartment is associated with an initial treatment: A (C), B ($G_{0.1}$), C ($G_{0.1}$), D (G), and E (G) (Fig. 1). However, they have been analyzed separately due to the

concentration gradient generated over the experimental time. Subsequently, with a more specific focus within each experiment, separate Generalized Linear Models (GLMs) were conducted for Control populations (C, no disturbance history) and populations with induced vulnerability (V). An analysis was performed for each of the time points where data were collected: 0.5, 4, and 24 h, to evaluate variations in abundances across different compartments (A, B, C, D, E). In case of significant differences, the Tukey post hoc test was used to identify specific treatment pairs with mean differences. Finally, the percentage of avoidance was used to present the results.

3. Results

3.1. Vulnerability induction: Microcosm setup

During the glyphosate exposure period, no differences were detected among treatments (C and V) for all measured parameters. There were no significant differences in *D. magna* abundance ($\chi^2 = 26.054$, $df = 22$, $p = 0.9006$). Similarly, treatments did not induce differences in phytoplankton abundance ($\chi^2 = 42.701$, $df = 22$, $p = 0.7335$), colony formation (percentage of individual cells/colonies) ($\chi^2 = 28.841$, $df = 22$, $p = 0.5310$), pH ($\chi^2 = 0.044697$, $df = 22$, $p = 0.8087$), neither in dissolved oxygen (DO) ($\chi^2 = 0.34109$, $df = 22$, $p = 0.2872$). The sublethal glyphosate concentration used in this study had no significant effect on the selected biological and physicochemical parameters (Table 1).

Population Treatments	Days			
	0	7	14	21
<i>D. magna</i> abundance				
C	18±3.60	19±2.64	20.33±6.50	19.33±2.51
V	15±4.35	19±7.93	20.66±6.11	21±7
Algae abundance				
C	52.66±8.50	57.33±7.50	46±12.52	49±13.07
V	52.00±7.00	44.33±6.11	58.66±14.01	55.66±8.50
Colony formation				
C	6.60±11.50	12.20±5.70	20±17.30	13.30±15.20
V	16.66±20.80	16.60±15.20	13.30±20.00	20±10
pH				
C	8.55±0.10	8.55±0.23	8.67±0.10	8.56±0.07
V	8.57±0.12	8.58±0.18	8.63±1.17	8.61±0.10
DO				
C	6.37±0.23	6.43±0.32	6.40±0.14	6.40±1.52
V	6.48±0.27	6.74±0.44	6.46±0.40	6.48±1

Table 1. *D. magna* abundance (individuals L⁻¹), phytoplankton parameters: cell count (cell mL⁻¹) and colony formation (single cell/colony percentage) and physical-chemical parameters: pH and DO (ppm) means and standard deviation during the microcosm experiment.

3.2. Vulnerability verification: Starvation test

The starvation test revealed that the population exposed to sublethal glyphosate concentration (V) was more susceptible to starvation than the Control population (C) ($\chi^2 = 55.97$, $df = 155$, $p < 0.001$). Individuals from the Vulnerable population (V) died approximately 5 days earlier than individuals from the Control population (C). The LT₅₀ in V was 10.7 ± 2.16 days, while the LT₅₀ in C was 16.3 ± 0.83 days (Fig. 2).

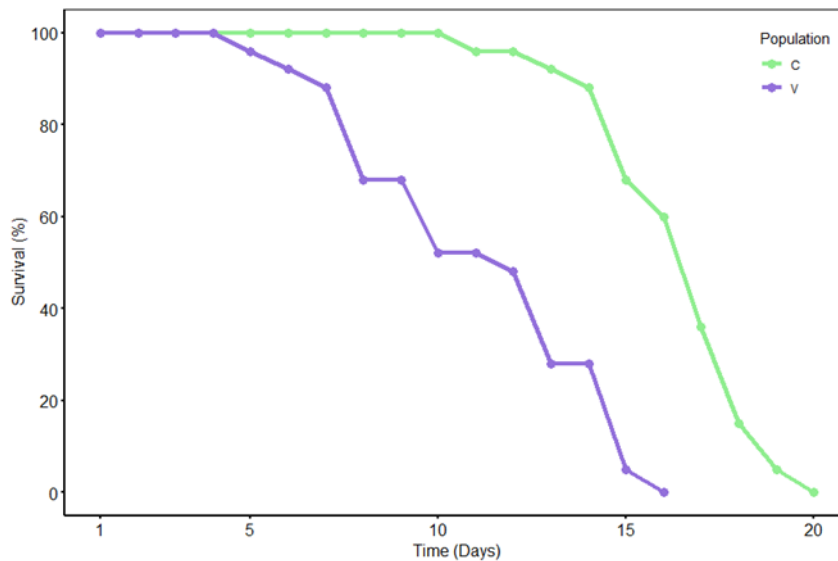


Fig. 2. Starvation test graph comparing the *D. magna* survival percentage belonging to the Vulnerable population (V) and Control population (C) over time (days). In this graph it can be seen how vulnerable population (V) keeps its last individual alive up to 15 days, while control population reaches up to 20, thus demonstrating the vulnerability caused by the previous disturbance history.

3.3. Avoidance test

3.3.1. Comparison of the avoidance test in Control and Vulnerable populations

Significant differences were found in the abundance of daphnids concerning the independent variable "Compartment" ($\chi^2 = 88.129$, $df = 86$, $p < 0.001$), as well as, significant differences related to the independent variable "Vulnerability" ($\chi^2 = 37.739$, $df = 80$, $p = 0.002$). No significant differences were observed concerning the independent variable "Time" ($\chi^2 = 25.200$, $df = 80$, $p = 0.168$). These results indicate that there are differences in the avoidance capacity from contaminated habitats,

depending on the level of toxicity (glyphosate concentrations) and whether the population has had a previous disturbance history (Fig. 3).

3.3.1.1. Avoidance test in Control populations

At 0.5 h from the start of the test, the number of organisms in each compartment with different glyphosate concentrations was different ($\chi^2 = 44.5$, $df = 12$, $p < 0.001$). The significant results of Tukey's post hoc test were: A-D ($p = 0.008$), A-E ($p = 0.008$), B-D ($p = 0.03$), B-E ($p = 0.003$) (Fig. 3). After 4 h of exposure, there were still differences ($\chi^2 = 44.5$, $df = 12$, $p < 0.001$), and the significant results of Tukey's post hoc test, were: A-C ($p < 0.001$), A-D ($p < 0.001$), A-E ($p < 0.001$), B-C ($p = 0.01$), B-D ($p = 0.08$), B-E ($p < 0.001$), C-E ($p = 0.02$) and D-E ($p = 0.03$) (Fig. 3). After 24 h of exposure, there were still differences among the compartments ($\chi^2 = 44.5$, $df = 12$, $p < 0.001$). The significant results of Tukey's post hoc test were: A-B ($p < 0.001$), A-C ($p < 0.001$), A-D ($p < 0.001$), A-E ($p < 0.001$), B-C ($p < 0.001$), B-D ($p < 0.001$), B-E ($p < 0.001$) and C-E ($p = 0.01$) (Fig. 3). These results show that individuals exposed to the two different concentrations of glyphosate try to flee towards clean water compartments throughout the experimental period. The average percentage of organisms obtained at 0.5, 4 and 24 h in the avoidance test conducted on individuals belonging to Control populations (C) is shown in Fig. 4.

3.3.1.2. Avoidance test in Vulnerable populations

At 0.5 h from the start of the test, the number of organisms in each compartment with different glyphosate concentrations were not different ($\chi^2 = 44.5$, $df = 12$, $p = 0.77$) (Fig. 3), as well as after 4 h of exposure ($\chi^2 = 44.5$, $df = 12$, $p = 0.15$) (Fig. 3). However, after 24 h, the number of organisms in each compartment with different glyphosate concentrations was different ($\chi^2 = 44.5$, $df = 12$, $p = 0.03$). The significant

results of Tukey's post hoc test were: A-E ($p = 0.02$), and B-E (0.02) (Fig. 3). These results show a greater inability to avoid glyphosate concentrations, with avoidance behaviour in compartment E just after 24 h of exposure. The average percentage of organisms obtained at 0.5, 4 and 24 h in the avoidance test conducted on individuals belonging to Vulnerable populations (V) is shown in Fig. 4.

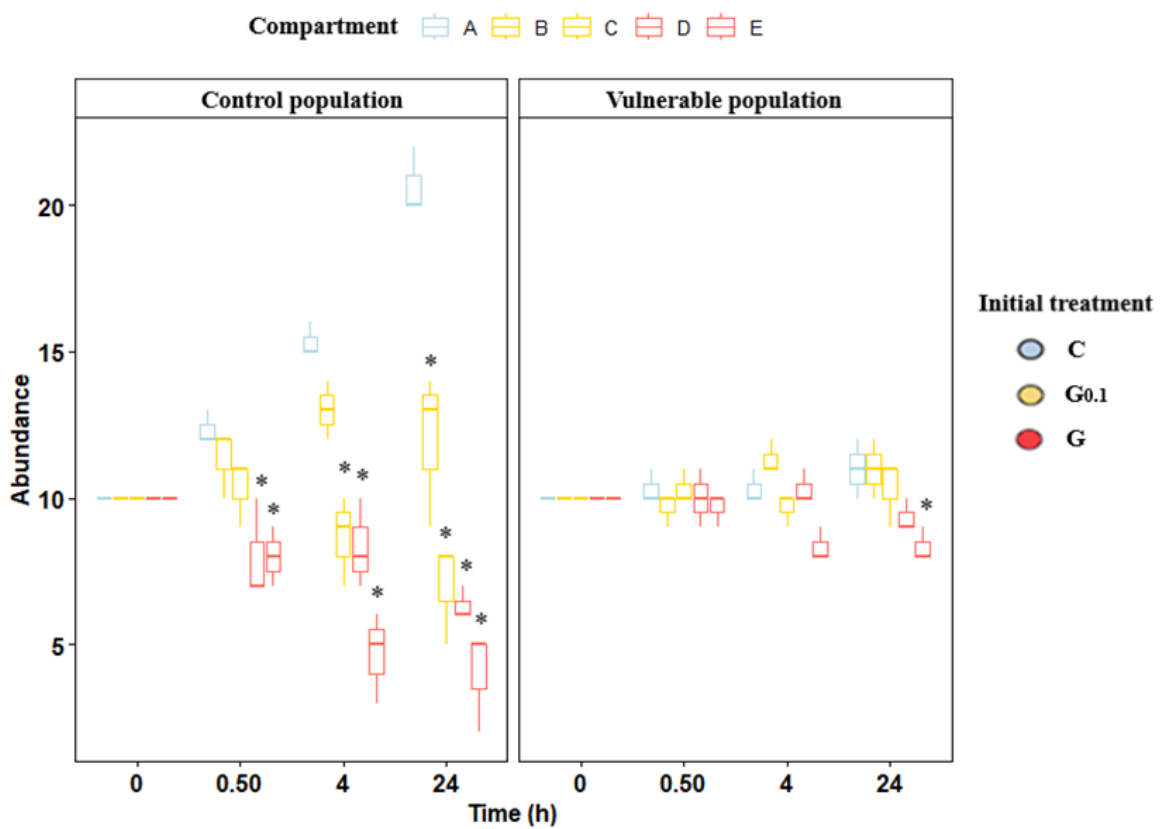


Fig. 3. Changes over time of *D. magna* abundance during the avoidance tests for both Control (left) and Vulnerable (right) populations exposed to a glyphosate gradient. The selected times for this analysis were: Initial time (0 h), 30 min and 4 and 24 h from the start of the assay. Each color in the compartments corresponds to a specific treatment: Light blue for C (Control treatment; clean water); Light orange for G0.1 (Glyphosate 0.1 mg L⁻¹); Red for G (Glyphosate: 1 mg L⁻¹).

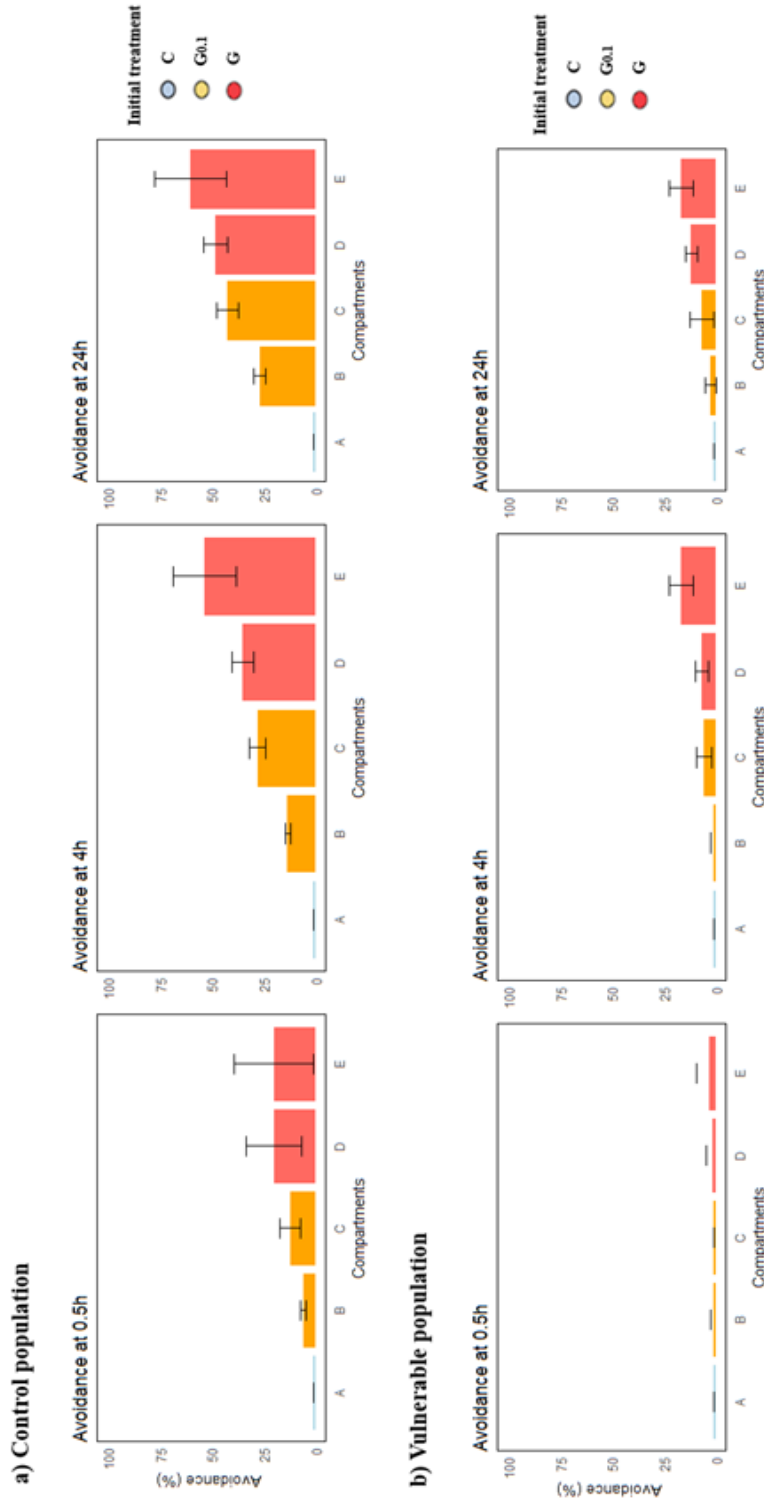


Fig. 4. Avoidance (in %) of *D. magna* Control (a) and Vulnerable (b) population in the avoidance test after 0.5h, 4, and 24 h of exposure to a glyphosate gradient. Each color in the compartments corresponds to a specific treatment: Blue for C (Control treatment; clean water); Light orange for G_{0.1} (Glyphosate NOEC/10: 0.1 mg L⁻¹); Red for G (Glyphosate: 1 mg L⁻¹).

4. Discussion

A chemically fragmented system was simulated using an unforced exposure system (HeMHAS) to verify the avoidance capacity of *D. magna* populations with induced vulnerability. For this purpose, vulnerability was initially induced in *D. magna* populations by creating a disturbance history through exposure to a sublethal concentration of glyphosate. The purpose of this procedure was to subsequently study the avoidance capacity of vulnerable populations towards contaminated habitats compared to the avoidance capacity of control populations. Our results show that Control populations have the ability to escape from the contaminated compartments, while Vulnerable populations take longer to escape from them and therefore remain much longer occupying contaminated habitats.

4.1. Vulnerability induction and verification

Exposure to sublethal concentrations of glyphosate did not produce differences in the abundance of *D. magna*, microalgae abundance, and algae colony formation. It is also important to highlight the verification of the vulnerability induction through the starvation test, where significant differences were observed between the Control population and the Vulnerable population, being consistent with our previous studies (López-Valcárcel et al., 2021; López-Valcárcel et al., 2023; López-Valcárcel et al., 2024). The sublethal concentration used to generate disturbances in *D. magna* populations was 0.1 mg L⁻¹ of Roundup glyphosate (Huaraca, 2017). This concentration is considered safe within aquatic systems as it falls within range of concentration calculated using the standard safety levels of the Ecological Risk Assessment procedure

(ERA) (Calow et al., 1997). However, vulnerability was confirmed as individuals were less resistant to starvation, raising concerns about the risk that sublethal agrochemical concentrations might impose on natural communities. It is important to note the lack of studies investigating such low concentrations over a chronic exposure period. There is some examples such as that of Cuhra et al. (2013), where various chronic toxicity tests of Roundup glyphosate on *D. magna* were conducted at concentrations ranging from 0.05 to 4.05 mg L⁻¹, resulting in a significant reduction in juvenile size, even at the lowest concentration, and there was also a negative effect on reproductive parameters due to an increase in abortion rate. Our results indicate that environmentally relevant concentrations of an important herbicide, such as glyphosate, affect zooplankton ability to cope starvation and alter its avoidance behavior. The energetic cost of sublethal exposure could negatively affect zooplankton through the effects on their regular behavior. Therefore, it would be necessary to review the way we establish safe concentrations of chemicals (Cuhra et al., 2013; Cuhra et al., 2015; Toyota et al., 2019; López-Valcárcel et al., 2023).

4.2. Avoidance test

4.2.1. Comparison of the avoidance test in Control and Vulnerable populations

We analyzed the avoidance behavior in *D. magna* populations with and without any disturbance history. It was observed that Control populations showed an early reaction to escape from compartments with concentrations of glyphosate, avoiding the highest concentrations at 0.5 h from the start of the experiment, and increasing this response as the experimental time progressed up to 24 h (Figs. 2 and 3). This is consistent with the study by Lopes et al. (2004) where populations of *D. longispina*

showed early reactivity to avoid the copper concentrations they were exposed to, and the study by Rosa et al. (2012) where *D. magna* significantly avoided atrazine in a 12-h exposure experience. Therefore, glyphosate could be considered a repellent contaminant for *D. magna*, as they would fly from areas where glyphosate concentrations were below the NOEC. This could lead to an alternative habitat selection, changing from a contaminated habitat to a clean/less disturbed one (Araújo et al., 2020). Although there are cases where the level of toxicity of a contaminant and its repellence level are not related (e.g., a contaminant may be highly toxic and at the same time attract the study organisms) (Costantini et al., 2010), glyphosate exhibits both high levels of toxicity and repellence on *D. magna*, making this information relevant for the protection of aquatic systems. It is crucial not only to understand the toxic effect of contaminants, but also their repellence level and whether they induce fleeing, as these factors directly affect the spatial distribution of zooplankton populations within aquatic systems. This should be studied and considered in ecological risk assessments, as this information would allow for the creation of better ecotoxicological assessments with high ecological realism and could reduce cases of uncertainty by contributing to the inclusion of greater ecological complexity in studies (Raimondo et al., 2008; Alcívar et al., 2021).

Concerning *D. magna* Vulnerable populations, the individuals showed avoidance behavior towards glyphosate after 24 h, which directly contrasts with the early reaction of Control populations (Figs. 2 and 3). Studies such as Araújo et al. (2018) and Moreira et al. (2023) explain that in these types of assays, daphnids are in direct contact with the contaminant from the start of the experiment, which could impair population escape capacity, leading to certain lethargy in the organisms. In our study, after observing the early reaction of the Control population, we assumed glyphosate as a

repellent contaminant for *D. magna* (Constantini et al., 2010). Thus, it is important to highlight that the escape capacity of *D. magna* is diminished by a disturbance history and hence, becomes a vulnerable population. This raises different scenarios. On the one hand, as the Vulnerable population has been previously exposed to glyphosate sublethal concentrations for 5 generations, acclimation could be considered an option in this study, since organisms remain in contaminated compartments for most of the exposure period. In the study by Poulsen et al. (2021), the acclimation capacity of *D. magna* to the pesticide prochloraz was studied and confirmed after continuous exposure for 3 generations. Furthermore, in the study by Saro et al. (2012), the association of the acclimation process with fitness cost was discussed after a long-term sublethal exposure period. This rationale could be associated with the induced vulnerability in the present study. On the other hand, we could assume that the Vulnerable population, just as it is unable to respond to subsequent stress factors (López-Valcárcel et al., 2021; López-Valcárcel et al., 2023), might have compromised contamination detection capacity, thus resulting in slower avoidance behavior. This possibility adds to the inherent differences between species, potentially leading to alterations in interspecific interactions and other aspects of the community. This scenario implies that certain species may exhibit greater sensitivity or efficacy in detecting and responding to contaminant presence than others, as demonstrated by Seuront (2010) in his study on differences in contaminant detection capacity among different zooplankton species. Moreover, considering that these species might be continuously exposed to sublethal concentrations of agrochemicals, this could have significant repercussions on the dynamics and interactions among species within a community. Chemical habitat discontinuity is a significant issue in aquatic systems, due to the functional and structural changes caused by the reduction of connectivity they produce in ecosystems (Alcívar et al., 2021). Although zooplankton organisms have the

ability to detect contaminated patches (Seuront, 2010), the effect of previous stressors can alter such ability, as we have shown. Consequently, this study highlights the need to reevaluate, in one hand, the safe concentrations within aquatic systems considering the use of behavior endpoints and, in another hand, how changes in the avoidance behavior could impact zooplankton spatial distribution.

5. Conclusions

In this study, we demonstrated that the vulnerability induced by glyphosate sublethal concentration exposure impairs the avoidance capacity in *D. magna*. Hence, we express concern that, despite scientific and regulatory efforts aimed at achieving legally safe concentrations of agrochemicals, levels below the legal thresholds may still pose risks on zooplankton. Specifically, this situation may create a discontinuity in the habitats due to contamination which could affect, initially, the spatial species distribution and, subsequently, the ecosystem functioning. For this reason, we argue that ecotoxicological risk assessments would increase its ecological realism if the assessment of the effect of contaminant sublethal concentrations on zooplankton were included.

6. References

Alcívar, M.A., Sendra, M., Silva, D.C., González-Ortegón, E., Blasco, J., Moreno-Garrido, I., Araújo, C.V., 2021. Could Contamination avoidance be an endpoint that protects the environment? An overview on how species respond to copper, glyphosate, and silver nanoparticles. *Toxics* 9, 301. <https://www.mdpi.com/2305-6304/9/11/301>

Araújo, C.V.M., Roque, D., Blasco, J., Ribeiro, R., Moreira-Santos, M., Toribio, A., Aguirre, E., Barro, S., 2018. Stress-driven emigration in complex field scenarios of habitat disturbance: the Heterogeneous Multi-Habitat Assay System (HeMHAS). *Sci.Total Environ.* 644, 31–36. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.06.336>

Araújo, C.V.M., Moreira-Santos, M., Ribeiro, R., 2016. Active and passive spatial avoidance by aquatic organisms from environmental stressors: A complementary perspective and a critical review. *Environ. Int.* 92, 405–415. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2016.04.031>

Araújo, C.V.M., González-Ortegón, E., Pintado-Herrera, M.G., Biel-Maeso, M., Lara-Martín, P.A., Tovar-Sánchez, A., Blasco, J., 2019. Disturbance of ecological habitat distribution driven by a chemical barrier of domestic and agricultural discharges: An experimental approach to test habitat fragmentation. *Sci. Total Environ.* 651, 2820–2829. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.10.200>

Araújo, C.V., Laissaoui, A., Silva, D.C., Ramos-Rodríguez, E., González-Ortegón, E., Espíndola, E.L., Baldó, F., Mena, F., Parra, G., Blasco, J., 2020. Not only toxic but repellent: What can organisms' responses tell us about contamination and

what are the ecological consequences when they flee from an environment? *Toxics* 8, 118. <https://doi.org/10.3390/toxics8040118>

Álvarez-Manzaneda, I., Ramos-Rodríguez, E., López-Rodríguez, M.J., Parra, G., Funes, A., Vicente, I., 2017. Acute and chronic effects of magnetic microparticles potentially used in lake restoration on *Daphnia magna* and *Chironomus* sp. *J. Hazard Mater.* 322, 437-444. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2016.10.035>

Bendis, R.J., Relyea, R.A., 2014. Living on the edge: populations of two zooplankton species living closer to agricultural fields are more resistant to a common insecticide. *Environ. Toxicol. Chem.* 33, 2835-2841. <https://doi.org/10.1002/etc.2749>

Brock, T., VanWijngaarden, R., 2012. Acute toxicity tests with *Daphnia magna*, *Americamysis bahia*, *Chironomus riparius* and *Gammarus pulex* and implications of new EU requirements for the aquatic effect assessment of insecticides. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 19, 3610–3618. <https://doi.org/10.1007/s11356-012-0930-0>.

Brooks, W.R., Lockwood, J.L., Jordan, R.C., 2013. Tropical paradox: a multi-scale analysis of the invasion paradox within Miami Rock Ridge tropical hardwood hammocks. *Biol. Invasions* 15, 921-930. <https://doi.org/10.1007/s10530-012-0340-8>

Calow, P., Sibly, R.M., Forbes, V., 1997. Risk assessment on the basis of simplified life-history scenarios. *Environ. Toxicol. Chem.* 16, 1983-1989. <https://doi.org/10.1002/etc.5620160931>

Costantini, D., Metcalfe, N.B., Monaghan, P., 2010. Ecological processes in a hormetic framework. *Ecol. Lett.* 13, 1435-1447. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2010.01531.x>

Cuhra, M., 2015. Ecotoxicological assessment of Roundup-ready soybean agriculture investigated in a *D. magna* model. <https://hdl.handle.net/10037/7869>

Cuhra, M., Traavik, T., Bøhn, T., 2013. Clone-and age-dependent toxicity of a glyphosate commercial formulation and its active ingredient in *Daphnia magna*. 22, 251-262. <https://doi.org/10.1007/s10646-012-1021-1>

del Arco, A., Guerrero, F., Jiménez-Gómez, F., Parra, G., 2019. Plankton community responses to environmentally-relevant agrochemical mixtures. J. Limnol. 55, 5. <https://doi.org/101051/limn/2019004>.

Díaz-Báez, M., Pica, Y., Ronco, A., 2004. Ensayo de toxicidad aguda con el cladóceros *Daphnia magna*. En: Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas: estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones. Idre. Morales, G. C. (Ed.).

Dutilleul, M., Réale, D., Goussen, B., Lecomte, C., Galas, S., Bonzom, J., 2017. Adaptation costs to constant and alternating polluted environments. Evol. Appl. 10, 839-851. <https://doi.org/10.1111/eva.12510>

Fuller, M.R., Doyle, M.W., Strayer, D.L., 2015. Causes and consequences of habitat fragmentation in river networks. Ann. N. Y. Acad. Sci. 1355, 31–51. <https://doi.org/10.1111/nyas.12853>

Galotti, A., Jiménez-Gómez, F., Parra, G., 2018. An abrupt CO₂-mediated decrease in pH affects growth rates, cellular features and the interspecific interaction of *Scenedesmus (Acutodesmus) obliquus* and *Cryptomonas pyrenoidifera*. Limnetica. 37, 267-281. <https://doi.org/10.23818/limn.37.22>

Giesy, J. P., Dobson, S., Solomon, K. R., 2000. Ecotoxicological risk assessment for Roundup® Herbicide. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 167, 120–135.

https://doi.org/10.1007/978-1-4612-1156-3_2

Hamner, B., Frasco, M., 2018. Metrics. R package version 0.1.4. <https://CRAN.R-project.org/package=Metrics>.

Hintz, W.D., Jones, D.K., Relyea, R.A., 2019. Evolved tolerance to freshwater salinization in zooplankton: life-history trade-offs, cross-tolerance and reducing cascading effects. *Philos. Trans. R. Soc.* 374, 20180012.

<https://doi.org/10.1098/rstb.2018.0012>

Huaraca, L.F., 2017. Evaluacion ecotoxicologica de aguas contaminadas con glifosato a partir de los bioindicadores *Daphnia magna* y *Artemia salina*.

<http://bibdigital.epn.edu.ec/handle/15000/19010>

Kjaer, J., Ullum, M., Olsen, P., Sjelborg, P., Helweg, A., Mogensen, B., Plauborg, F., Jørgensen, J.O., Iversen, B.V., Fomsgaard, I., 2002. The Danish Pesticide Leaching Assessment Programme: Monitoring Results May 1999-June 2001. Second Report.

https://www.researchgate.net/publication/216075829_The_Danish_Pesticide_Leaching_Assessment_Programme_Monitoring_results_1999-2003

Kumar, R., Sankhla, M.S., Kumar, R., Sonone, S.S., 2021. Impact of pesticide toxicity in aquatic environment. *Biointerface Res. Appl. Chem.* 11, 10131-10140.

<http://dx.doi.org/10.33263/BRIAC113.1013110140>.

Lopes, I., Baird, D.J., Ribeiro, R., 2004. Avoidance of copper contamination by field populations of *Daphnia longispina*. Environ. Toxicol. Chem. 23, 1702-1708. <https://doi.org/10.1897/03-231>

López-Valcárcel, M.E., Parra, G., Del Arco, A., 2021. Environmental disturbance history undermines population responses to cope with anthropogenic and environmental stressors. Chemosphere 262, 128373. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.128373>

López-Valcárcel, M.E., Del Arco, A., Parra, G., 2023. Sublethal exposure to agrochemicals impairs zooplankton ability to face future global change challenges. Sci. Total Environ. 873, 162020. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.162020>

López-Valcárcel, M.E., Del Arco, A., Parra, G., 2024. Zooplankton vulnerability to glyphosate exacerbated by global change. Sci. Total Environ. 913, 169806. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.162020>

Matson, P.A., Vitousek, P.M., 2006. Agricultural intensification: will land spared from farming be land spared for nature? Conserv. Biol. 20, 709–710. <https://doi.org/10.1111/j.1523-1739.2006.00442.x>.

McFadden, I.R., Sendek, A., Brosse, M., Bach, P.M., Baity-Jesi, M., Bolliger, J., Bollmann, K., Brockerhoff, E.G., Donati, G., Gebert, F., 2023. Linking human impacts to community processes in terrestrial and freshwater ecosystems. Ecol. Lett. 26, 203-218. <https://doi.org/10.1111/ele.14153>

Mena, F., González-Ortegón, E., Solano, K., Araújo, C.V.M., 2020. The effect of the insecticide diazinon on the osmoregulation and the avoidance response of the

white leg shrimp (*Penaeus vannamei*) is salinity dependent. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 206, 111364. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111364>

Mena, F., Romero, A., Blasco, J., Araújo, C.V.M., 2022. Can a mixture of agrochemicals (glyphosate, chlorpyrifos and chlorothalonil) mask the perception of an individual chemical? A hidden trap underlying ecological risk. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 230,113172. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2022.113172>

Moreira, R.A., Araújo, C.V.M., da Silva Pinto, T.J., da Silva, L.C.M., Goulart, B.V., Viana, N.P., Montagner, C.C., Fernandes, M.N., Espindola, E.L.G., 2021. Fipronil and 2, 4-D effects on tropical fish: Could avoidance response be explained by changes in swimming behavior and neurotransmission impairments? *Chemosphere* 263, 127972. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.127972>

Moreira, R.A., Polo-Castellano, C., Cordero-de-Castro, A., Dias, M.A., Pinto, T.J., Montagner, C.C., Espíndola, E.L., Blasco, J., Araújo, C.V., 2023. Short and long-term exposure to the pesticides fipronil and 2, 4-D: Effects on behavior and life history of *Daphnia magna*. *Chemosphere* 310, 136719. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.136719>

Parra, G., Jiménez-Melero, R., Guerrero, F., 2005. Agricultural impacts on Mediterranean wetlands: the effect of pesticides on survival and hatching rates in copepods. *Limnetica*. 41, 161-167. <https://doi.org/10.1051/limn:20054130161>

Peruzzo, P. J., Porta, A., and Ronco, A. E., 2018. Levels of glyphosate in surface waters, sediments and soils associated with direct sowing soybean cultivation in North Pampasic region of Argentina. *Environ. Pollut.* 156, 61–66. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2008.01.015>

Poulsen, R., Henrik, H., Hansen, M., Cedergreen, N., 2021. Grandmother's pesticide exposure revealed bi-generational effects in *Daphnia magna*. *Aquat. Toxicol.* 236, 105861. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2021.105861>

R Core Team, 2022. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <https://www.R-project.org/>

R-Studio Team, 2022. RStudio: Integrated Development Environment for R. RStudio, PBC, Boston, MA. <https://www.rstudio.com/>

Raimondo, S., Vivian, D.N., Delos, C., Barron, M.G., 2008. Protectiveness of species sensitivity distribution hazard concentrations for acute toxicity used in endangered species risk assessment. *Environ. Toxicol. Chem.* 27, 2599-2607. <https://doi.org/10.1897/08-157.1>

Rosa, R., Materatski, P., Moreira-Santos, M., Sousa, J.P., Ribeiro, R., 2012. A scaled-up system to evaluate zooplankton spatial avoidance and the population immediate decline concentration. *Environ. Toxicol. Chem.* 31, 1301-1305. <https://doi.org/10.1002/etc.1813>

Saro, L., Lopes, I., Martins, N., Ribeiro, R., 2012. Testing hypotheses on the resistance to metals by *Daphnia longispina*: differential acclimation, endpoints association, and fitness costs. *Environ. Toxicol. Chem.* 31, 909-915. <https://doi.org/10.1002/etc.1762>

Seuront, L., 2010. Zooplankton avoidance behaviour as a response to point sources of hydrocarbon-contaminated water. *Mar. Freshw. Res.* 61, 263-270. <https://doi.org/10.1071/MF09055>

Signorell, A., Aho, K., Alfons, A., Anderegg, N., Aragon, T., Arachchige, C., Argenziano, G., Arslan, R. C., Bachmann, P., Bolker, B., Borchers, H. W., Buja, A., Cadarso-Suarez, C., Calvo, M., Cassotti, M., Chakraborty, A., Christensen, R. H. B., 2022. DescTools: Tools for descriptive statistics. R package version 0.99.47. <https://CRAN.R-project.org/package=DescTools>.

Steffen, W., Richardson, K., Rockström, J., Cornell, S.E., Fetzer, I., Bennett, E.M., Biggs, R., Carpenter, S.R., De Vries, W., De Wit, C.A., 2015. Planetary boundaries: Guiding human development on a changing planet. *Science* 347, 1259855. <https://www.science.org/doi/full/10.1126/science.1259855>

Stremmel, H., Weiss, L., Parra, G., Ramos-Rodríguez, E., Araújo, C.V., 2023. Ecotoxicological assessment of the effects of fluoxetine on *Daphnia magna* based on acute toxicity, multigenerational reproduction effects, and attraction-repulsion responses. *Chemosphere* 312, 137028. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.137028>

Sondermann, M., Gies, M., Hering, D., Schroeder, M., Feld, C.K., 2015. Modelling the effect of in-stream and terrestrial barriers on the dispersal of aquatic insect species: a case study from a Central European mountain catchment. *Fundam. Appl. Limnol.* 186, 99-115. <https://doi.org/10.1127/fal/2015/0597>

Toyota, K., Cuenca, M.C., Dhandapani, V., Suppa, A., Rossi, V., Colbourne, J.K., Orsini, L., 2019. Transgenerational response to early spring warming in *Daphnia*. *Sci. Rep.* 9, 4449. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-40946-3>

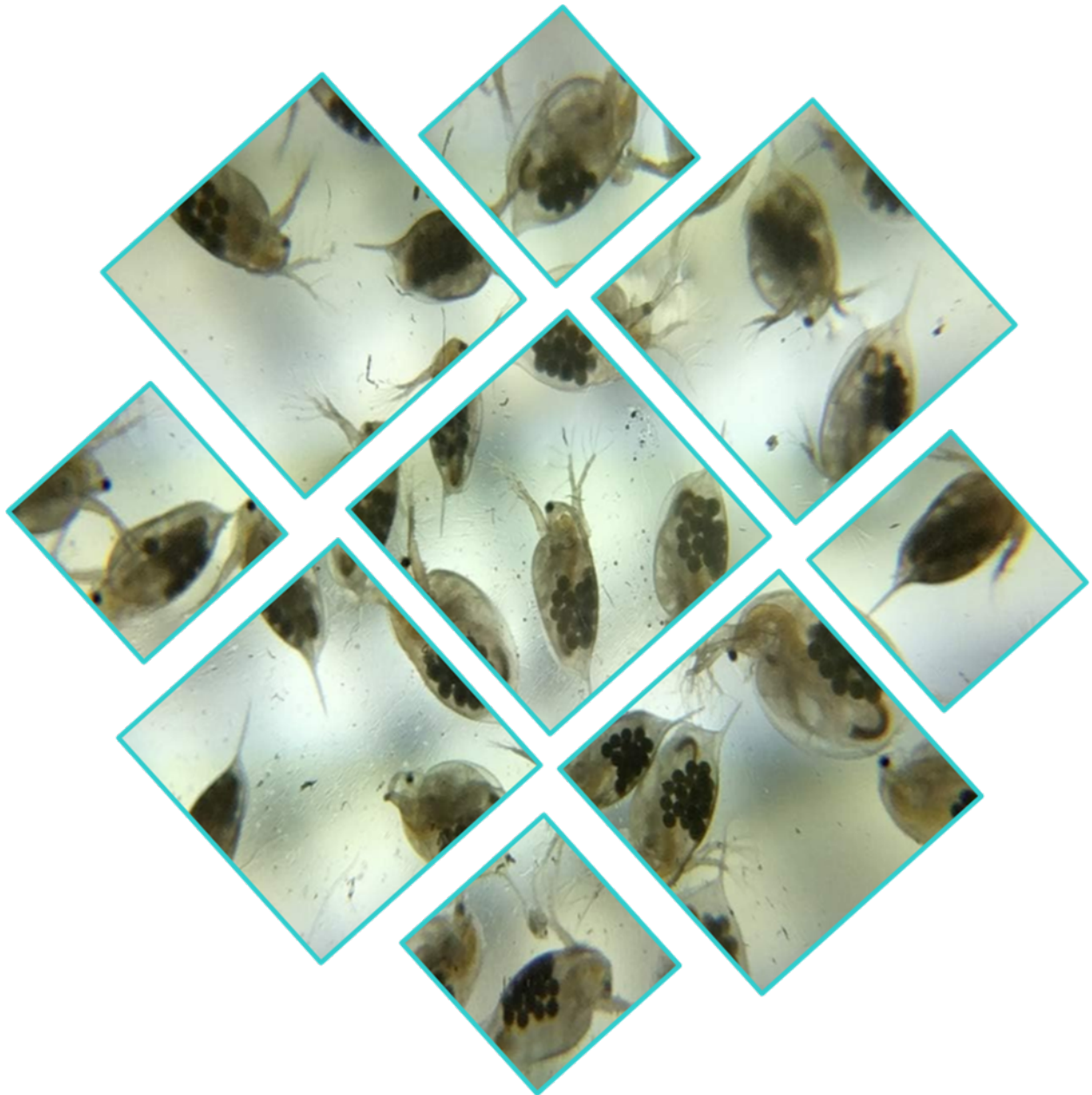
Wickham, H., François, R., Henry, L., Müller, K., 2022. dplyr: A grammar of data manipulation. R package version 1.0.9. <https://CRAN.R-project.org/package=dplyr>.

Wickham, H., 2016. *ggplot2: Elegant graphics for data analysis*. Springer-Verlag New York.

Wickham, H., 2021. *forcats: Tools for working with categorical variables (factors)*. R package version 0.5.1. <https://CRAN.R-project.org/package=forcats>.

Wike, C., 2020. *cowplot: Streamlined Plot Theme and Plot Annotations for 'ggplot2'*. R package version 1.1.1. <https://CRAN.R-project.org/package=cowplot>.

RESUMEN DE LOS RESULTADOS



Resumen de los resultados

Capítulo I. Effect of Sublethal Concentrations of Agrochemicals on Zooplankton Populations: A Meta-analysis.

En este estudio, se llevó a cabo un metaanálisis para evaluar la evidencia científica existente en torno al efecto de la exposición a concentraciones subletales de agroquímicos sobre la abundancia de poblaciones zooplanctónicas. Se identificaron 206 estudios en las bases de datos de WOS y Scopus, de los cuales se seleccionaron 66 para su revisión. De estos, tras utilizar los criterios de inclusión y exclusión, se seleccionaron 8 estudios en el metaanálisis, que proporcionaron **139 endpoints** para el análisis.

Tras la realización del metaanálisis se concluyó que el **tamaño del efecto global** de la exposición subletal a agroquímicos sobre la abundancia de poblaciones zooplanctónicas es de gran magnitud, indicando una reducción significativa en la abundancia zooplanctónica de los grupos expuestos a agroquímicos en comparación con los grupos control. Esto sugiere un impacto negativo significativo de la exposición a concentraciones subletales de agroquímicos en las poblaciones de zooplancton.

El metaanálisis permitió el análisis de las posibles **variables moduladoras** que podrían influir en la relación entre la exposición subletal de agroquímicos y la abundancia zooplanctónica. Estas variables incluyeron el tipo de ensayo empleado en los experimentos (**laboratorio** o **microcosmos/mesocosmos**), el **tipo y composición del agroquímico** utilizado, el **rango de concentración** de los agroquímicos, el **orden taxonómico** de las poblaciones zooplanctónicas estudiadas y la **especie** de zooplancton. Los resultados mostraron que algunas de estas variables tuvieron un impacto significativo en la relación entre la exposición a concentraciones subletales de

agroquímicos y la abundancia zooplanctónica. Se encontró que la exposición a diferentes tipos de agroquímicos, como fungicidas, herbicidas e insecticidas, se asoció con reducciones significativas en la abundancia del zooplancton, siendo los insecticidas los que generan un mayor efecto, seguidos por los herbicidas y fungicidas. Seguidamente se observó que la composición del agroquímico utilizado también influyó en el análisis del efecto sobre el zooplancton, destacando la importancia de considerar las diferentes formulaciones de los productos. Por otro lado, el rango de concentración de los agroquímicos y el tipo de experimento no mostraron una variabilidad significativa en los efectos sobre la abundancia zooplanctónica. Sin embargo, el orden al que pertenece el zooplancton estudiado y la especie tuvieron un impacto significativo en los resultados de los estudios incorporados en este análisis de revisión bibliográfica, lo que resalta la importancia de considerar la variabilidad de las respuestas, relacionada con la diversidad biológica, al evaluar los efectos de los agroquímicos en sistemas acuáticos. Estos hallazgos subrayan la **complejidad** de los factores que influyen en la respuesta del zooplancton a concentraciones subletales de agroquímicos y resaltan la necesidad de abordar estos aspectos en futuras investigaciones.

Capítulo II. Environmental disturbance history undermines population responses to cope with anthropogenic and environmental stressors.

El objetivo de este estudio fue evaluar cómo la **historia de perturbación** ambiental generada a través de una exposición continua subletal al insecticida **dimeteoato** durante varias generaciones, determina las respuestas de las poblaciones a otros factores estresantes subsecuentes. Los experimentos se realizaron sobre *D. magna* como organismo modelo. Para crear una historia de perturbaciones, se utilizó dimeteoato

como primer factor de estrés en dos concentraciones diferentes: concentración media ($0,089 \text{ mg L}^{-1}$) y concentración alta ($0,89 \text{ mg L}^{-1}$). La población expuesta a concentración media (la cual denominamos como **población vulnerable**) **no** mostró diferencias con respecto a la población control en los parámetros seleccionados para el estudio y comparativa entre ambas poblaciones (tamaño corporal y éxito reproductivo). Al no detectarse diferencias entre la población control y la vulnerable, nuestro interés en la población vulnerable era determinar si, detrás de esa ausencia de diferencias se oculta un deterioro de dicha población, que podría socavar su respuesta a futuros factores estresantes, asociada a la historia de perturbación previa. Después de 4 generaciones expuesta a dimetoato, la población vulnerable de *D. magna* se expuso a un segundo factor de estrés químico (el herbicida **glifosato**) y a un factor de estrés ambiental (**inanición**), siempre comparando con la población control. La población vulnerable mostró **efectos más graves** con respecto a la exposición a glifosato como a la inanición, lo que corrobora la hipótesis de que una historia de perturbación generada a través de una exposición continua a concentraciones subletales de una sustancia química socava la respuesta de la población a otros factores estresantes químicos y ambientales posteriores.

Capítulo III. Sublethal exposure to agrochemicals impairs zooplankton ability to face future global change challenges.

Los objetivos de este estudio fueron inducir una historia de perturbación creada a través de la exposición a concentraciones subletales de glifosato en microcosmos y evaluar si esta perturbación genera como resultado poblaciones **vulnerables**. Se utilizó como especie objetivo a *D. magna*. Las poblaciones se considerarían vulnerables si su

sensibilidad a nuevos factores estresantes (**inanición, temperatura y salinidad**) era significativamente mayor que la de las poblaciones no sometidas a una historia de perturbación. Para inducir la historia de perturbación, las comunidades acuáticas criadas en microcosmos (dos cladóceros y una microalga) se expusieron a dos concentraciones subletales de glifosato (por debajo de la concentración sin efecto observado, valores NOEC para *D. magna*, 0,1 y 1 mg L⁻¹). Estos microcosmos se encontraban en condiciones controladas dentro de una cámara de cultivo y el periodo experimental duró 48 días. Después de este período, no se observaron diferencias significativas en el microcosmos expuesto a concentraciones subletales de glifosato con respecto al microcosmos control en los parámetros seleccionados (abundancia de cladóceros, abundancia de células de microalgas, formación de colonias de microalgas, pH y oxígeno disuelto). Para probar la existencia de vulnerabilidad, nuestras poblaciones objetivo de *D. magna*, que previamente estuvieron expuestas a diferentes tratamientos con glifosato, fueron sometidas a **inanición, temperatura elevada y alta salinidad**. Los resultados obtenidos mostraron que las poblaciones de *D. magna* con historia de perturbación presentaron **efectos más graves** en todos los escenarios a los que fueron sometidas en comparación con las poblaciones control, por lo que se consideraron **poblaciones vulnerables**. Estos resultados subrayan la necesidad de estudiar cómo la historia de las perturbaciones ambientales influye en las respuestas de la población a factores estresantes subsecuentes a una exposición previa.

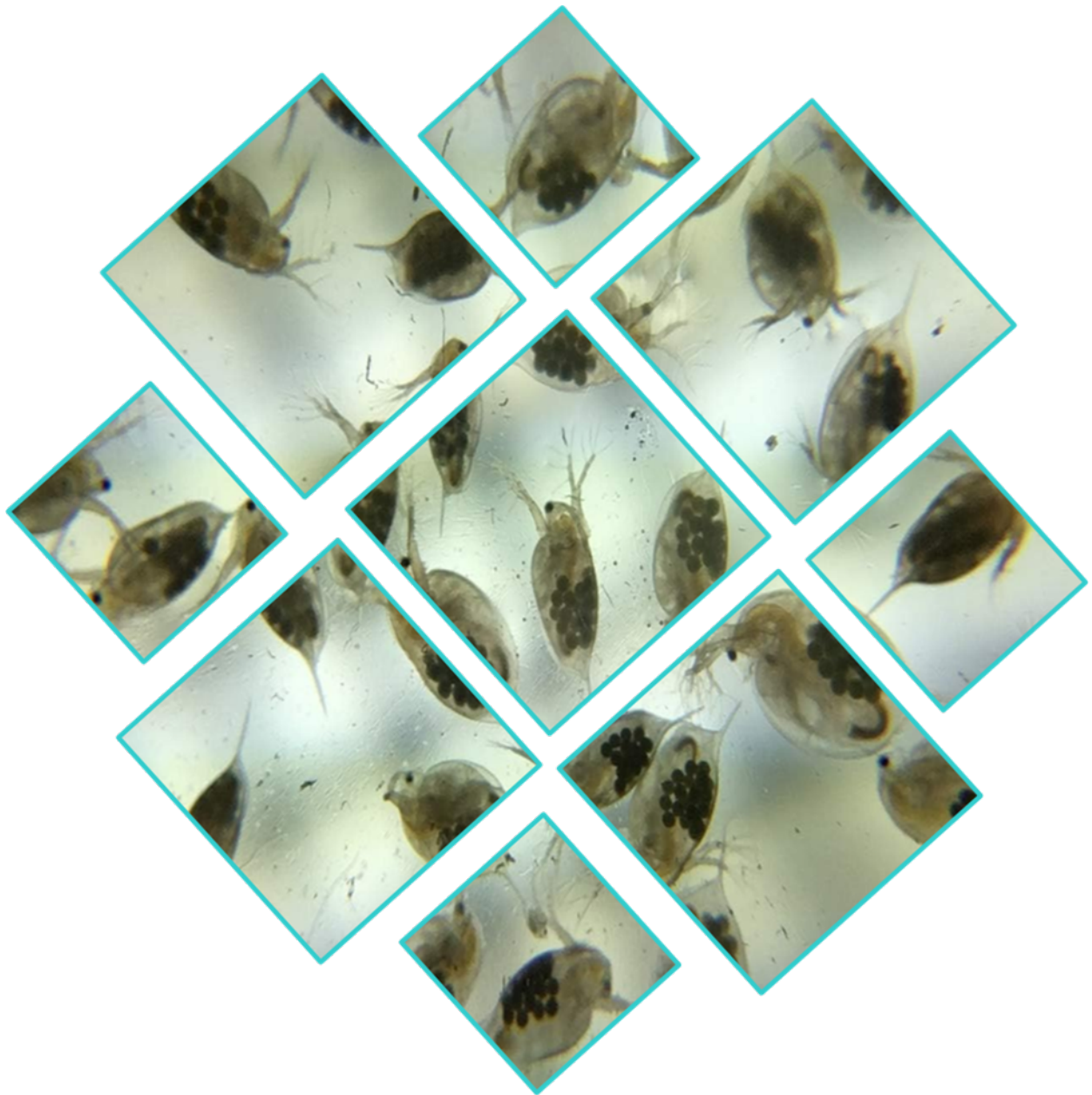
Capítulo IV. Zooplankton vulnerability to glyphosate exacerbated by global change.

Los objetivos de este estudio se dividieron en dos fases. El objetivo de la fase 1 fue **inducir vulnerabilidad** en las poblaciones de *D. magna* a través de una historia de perturbación basada en la exposición a concentraciones subletales de **glifosato** bajo diferentes condiciones de temperatura (**20 °C y 25 °C**). En la fase 2, el objetivo fue evaluar la vulnerabilidad mediante la exposición a **factores estresantes subsecuentes (inanición, aumento de la salinidad y paracetamol)** combinados con **cambios de temperatura**. Durante el período de exposición al glifosato en la fase 1 se observaron **diferencias** en las poblaciones de *D. magna* con respecto a la temperatura, con menor abundancia a 25 °C que a 20 °C. Sin embargo, no se observaron diferencias en la abundancia respecto al tratamiento con glifosato. Los resultados obtenidos en la fase 2 con los factores estresantes subsecuentes combinados con cambios de temperatura en ambas direcciones, revelaron **efectos más graves** en las poblaciones vulnerables que en las poblaciones de control. Además, los cambios de temperatura **modularon** los efectos en las pruebas de inanición y aumento de salinidad. Con este capítulo podemos concluir que las concentraciones subletales de agroquímicos inducen vulnerabilidad en las poblaciones de *D. magna* y los cambios de temperatura infligidos pueden actuar como un factor modulador de esta vulnerabilidad, lo que muestra la **complejidad** a la hora de evaluar las respuestas bajo los múltiples escenarios asociados con el cambio global.

Capítulo V. Avoidance behaviour reduction in Daphnia magna due to the agrochemical-induced vulnerability.

Como ya se ha indicado en los capítulos anteriores, las poblaciones con historia de perturbación previa, es decir vulnerables, muestran menos capacidad para responder a factores estresantes posteriores. Por lo tanto, en este estudio, la vulnerabilidad inducida por agroquímicos en poblaciones de *D. magna* por la exposición a una concentración subletal de **glifosato** se utilizó para evaluar el efecto sobre el comportamiento de escape. La vulnerabilidad se verificó mediante una prueba de **inanición** donde se obtuvieron diferencias significativas entre las poblaciones Control y las poblaciones con una historia de perturbación. Se utilizó el Sistema de Evitación de Hábitats Múltiples Heterogéneos (HeMHAS) para evaluar la capacidad de **evitación o escape** de las poblaciones vulnerables de *D. magna* y compararla con las poblaciones Control. Las poblaciones Control tuvieron una reacción rápida desde el comienzo del ensayo, mostrando tasas de evitación desde el inicio de la experiencia y que aumentaron hasta el final de la misma (24 horas), mientras que las poblaciones Vulnerables no pudieron evitar los hábitats contaminados hasta las 24 horas. Por tanto, concluimos que las poblaciones vulnerables de *D. magna* muestran una **menor capacidad para evitar hábitats contaminados**. En el contexto de **hábitats químicamente fragmentados**, la menor capacidad de evitación sería responsable de una distribución espacial diferencial de las especies que hayan desarrollado vulnerabilidad. Específicamente, la vulnerabilidad inducida por agroquímicos afectaría el **funcionamiento de los ecosistemas** debido al efecto sobre las poblaciones zooplanctónicas y sobre su capacidad para escapar de la contaminación.

DISCUSIÓN



Discusión

El propósito de esta tesis doctoral fue evaluar y analizar el efecto de la exposición a concentraciones subletales de agroquímicos sobre poblaciones zooplanctónicas. Los resultados obtenidos a lo largo de este estudio respaldan la hipótesis inicialmente planteada confirmando que la exposición a concentraciones subletales de agroquímicos, aceptadas como seguras en ecosistemas acuáticos, tienen efectos negativos sobre la capacidad de las especies zooplanctónicas a hacer frente a otros estresores. Así mismo, expresamos la preocupación de que, a pesar de los esfuerzos científicos y regulatorios dirigidos a identificar concentraciones supuestamente seguras de agroquímicos en sistemas acuáticos, los niveles por debajo de los umbrales legales aún pueden representar riesgo

Efecto de concentraciones subletales sobre poblaciones zooplanctónicas

Cumpliendo con el primer objetivo establecido en esta tesis: *Recopilación, análisis y evaluación de la información disponible sobre el efecto de concentraciones subletales de agroquímicos en especies zooplanctónicas*, en el **Capítulo I** se recopiló la información disponible en las bases de datos utilizadas sobre efectos de concentraciones subletales sobre la abundancia zooplanctónica (información que no se había recopilado y analizado en ningún estudio previo). Posteriormente, se realizó un metaanálisis donde la cuantificación del tamaño del efecto general confirmó que la exposición a concentraciones subletales de agroquímicos afecta negativa y significativamente a la abundancia de las poblaciones zooplanctónicas. Esto está respaldado por varios estudios. Por ejemplo, Planklang y Athibai, (2021) evaluaron el impacto de las

concentraciones subletales de herbicidas en las comunidades de zooplancton en campos de arroz, observando una disminución generalizada en la densidad, particularmente en cladóceros y nauplios, afectando su capacidad reproductiva, selección de hábitat y hábitos alimenticios. De manera similar, Silva et al. (2021) observaron una reducción en la abundancia de poblaciones de cladóceros debido a la exposición a concentraciones subletales de pesticidas y su impacto en las tasas reproductivas. En este metaanálisis, además del estudio del tamaño del efecto global de las referencias incluidas en el estudio, se estudiaron las variables moderadoras significativas sobre dicho efecto. Al considerar el tipo de agroquímico utilizado, los resultados indican influencia en el efecto sobre las poblaciones de zooplancton. Los insecticidas resultan ser los agroquímicos más dañinos, información que concuerda con la revisión de Hanazato (2001), donde se destaca su alta letalidad y también efectos negativos a concentraciones subletales. Los herbicidas y fungicidas podrían impactar indirectamente en la dinámica zooplanctónica al reducir significativamente la disponibilidad de alimentos en los sistemas acuáticos, afectando el crecimiento de macrofitas y microalgas (Sarma et al., 2009; Kelly, 2018). En cuanto a la composición de los agroquímicos se observaron diferencias significativas entre los compuestos, siendo el dicloruro-dimetil-bipiridilo el más tóxico, seguido por el sulfato de cobre y los organofosforados. Esta información es consistente con varios estudios sobre los compuestos basados en bipiridilo, confirmando que son altamente dañinos para los sistemas acuáticos, ya que causan una disminución generalizada en los organismos zooplanctónicos y fitoplanctónicos, afectando principalmente a los organismos más grandes como cladóceros adultos y copépodos. Este efecto conduce a una reducción en la biomasa, número y funcionamiento trófico general (Gagneten y Marchese, 2003; Leboulanger et al., 2011; Rico-Martínez et al., 2012). Por otro lado, existen varios estudios sobre el efecto del sulfato de cobre en

poblaciones y comunidades zooplanctónicas en áreas en el sur de la Península Ibérica, donde se observa que induce efectos disruptivos en los sistemas acuáticos como cambios en la estructura de la comunidad, afecta al transporte de carbono a través de la red alimentaria y genera cambios en las interacciones ecológicas (León et al., 2014; del Arco et al., 2014; del Arco et al., 2019). Además, hay estudios que muestran efectos perjudiciales a nivel poblacional, como el estudio centrado en poblaciones de copépodos de Nwakanma y Chimecie (2018) y el estudio de Schamphelaere et al. (2007), donde se alimentó a *D. magna* con algas contaminadas con cobre durante 21 días, y se observaron varios mecanismos asociados a la toxicidad, como un mayor coste metabólico, reducción de la adquisición de energía (potencialmente a través de la inhibición de la actividad de enzimas digestivas), inhibición dirigida de la reproducción (potencialmente a través de la inhibición de la vitelogénesis) y/o inhibición directa de la muda. Por último, es importante resaltar el efecto negativo de los compuestos organofosforados, ya que dos de los insecticidas más ampliamente utilizados en todo el mundo, el dimetoato y el clorpirifos, pertenecen a este grupo, actuando como inhibidores de la hormona acetilcolinesterasa (AChE), que es responsable de activar los procesos de muda, retrasando así el crecimiento del zooplancton y conduciendo consecuentemente a una reducción de la poblacional de los organismos (Bendis y Relyea, 2014; Van Scoy et al., 2016). Aunque todos los órdenes taxonómicos estudiados se ven afectados negativamente por las concentraciones subletales de agroquímicos, hay más información disponible sobre los órdenes Cladocera y Copepoda (Dahms et al., 2011). Por ejemplo, el estudio de Planklang y Athibai (2011) demuestra el efecto del herbicida glifosato en cladóceros y nauplios de copépodos, disminuyendo la densidad de ambos taxones. Se ha informado de que las concentraciones subletales de agroquímicos podrían perturbar la capacidad reproductiva, selección de hábitat y

hábitos alimenticios, creando cambios en las relaciones depredador-presa y la competencia interespecífica (Portinho et al., 2018). Existe también una toxicidad diferencial por estadíos, los nauplios son más sensibles a la exposición a agroquímicos que los copepoditos en etapas adultas, ya que el desarrollo naupliar se ve afectado en la transición de larva a etapa adulta (Lim et al., 2019; Fantón et al., 2020). Por otro lado, se han identificado a los rotíferos como los organismos más afectados por concentraciones subletales de agroquímicos, ya que están entre los consumidores primarios más sensibles a las sustancias químicas, en comparación con cladóceros y copepodos (Dahms et al., 2011; Moreira et al., 2016; Xiao et al., 2017). Al considerar las especies incluidas en el metaanálisis *D. magna* fue la especie que mostraba un tamaño del efecto mayor. Como se mencionó anteriormente, esto tendría sentido, ya que las poblaciones de grandes cladóceros son fácilmente diezmadas por la exposición a agroquímicos (Downing et al., 2008). Además, *D. magna* es la especie de zooplancton no objetivo más comúnmente utilizada para ensayos ecotoxicológicos en todo el mundo (Bickham, 2011). Por lo tanto, todos los estudios utilizados en el metaanálisis proporcionan información sobre los efectos subletales de los contaminantes en esta especie. Por ejemplo, en los estudios de Jansen et al. (2011) y Hintz et al. (2019), se demostró la existencia de un coste de adaptación en las poblaciones de *D. magna* causado por exposiciones subletales. Estos resultados plantean preguntas sobre la importancia de este coste en las poblaciones de zooplancton, considerando la exposición a futuros factores estresantes, ya que a los sistemas acuáticos están constantemente llegando contaminantes desde sus cuencas de drenaje según el uso del suelo que se haga sobre las mismas (Micheli et al., 2013; De Laender y Janssen, 2013). Hay estudios que han considerado esta hipótesis, como los de Barbosa et al. (2015) y Radersma et al. (2018), donde la exposición previa a un factor estresante hace que las poblaciones de

zooplancton tengan una capacidad de supervivencia más baja ante nuevos factores estresantes. Tras las conclusiones obtenidas del metaanálisis, en los capítulos posteriores se expuso a poblaciones de *D. magna* a una historia de perturbación generada a través de una exposición a concentraciones subletales de agroquímicos durante varias generaciones con la finalidad de cumplir con el segundo objetivo de esta tesis: *Inducción de “vulnerabilidad” en poblaciones de D. magna mediante una exposición a concentraciones subletales de agroquímicos*. Se comprobó la vulnerabilidad en las población de *D. magna* expuestas a una historia de perturbación previa tras la exposición a factores estresantes subsecuentes en los **Capítulos II** (inanición y exposición a un agroquímico con diferente modo de acción), **III** (inanición, aumento de temperatura y aumento de salinidad) y **IV** (inanición, paracetamol y aumento de salinidad, combinado con cambios de temperatura). Con los resultados obtenidos y el contraste con otros estudios podemos asumir que las poblaciones pueden persistir en ambientes perturbados mediante diversos mecanismos, como la adaptación (Bell y González, 2011), respuestas regulatorias a contaminantes reguladas por genes (Barata et al., 2002; Agra et al., 2011) y/o procesos de desintoxicación. Estos mecanismos pueden tener un coste que podría afectar a otros aspectos del fitness (por ejemplo, incluso la resistencia cruzada podría estar asociada con un coste, siendo dicha resistencia dependiente de la concentración y el contexto), como el crecimiento y la reproducción. Por lo tanto, una población puede persistir en un ambiente perturbado, convirtiéndose en una población vulnerable, comprometiendo así las respuestas de las siguientes generaciones a futuras exposiciones adicionales (Klerks et al., 2011; Rivetti et al., 2016; Zhang et al., 2016; Barbosa et al., 2017). Otros autores han señalado la relevancia de los efectos de la perturbación a nivel de población y su impacto en la capacidad de respuesta de las siguientes generaciones (Bickham, 2011; Barbosa et al.,

2017). Afirman que tales efectos en el fitness deben considerarse para comprender los cambios en la comunidad, lo que proporciona un enfoque más realista ecológicamente. Por ejemplo, Bendis y Relyea (2016) informaron cómo la resistencia de *D. pulex* al insecticida clorpirifos amortiguaba los cambios en la comunidad bajo otros agentes tóxicos con el mismo modo de acción (insecticidas que inhiben la AChE), pero solo bajo exposición baja o moderada. En esta línea, estudios previos han demostrado el impacto duradero en las poblaciones después de estar expuestas a un estresor. Por ejemplo, Barbosa et al. (2015) destacaron que la exposición a insecticidas y la variabilidad en la temperatura disminuyen el fitness en *D. magna*, observando efectos negativos en generaciones posteriores. Otro ejemplo es el estudio de Radersma et al. (2018), donde el efecto negativo en el fitness de la descendencia fue mayor cuando provenía de individuos previamente expuestos a toxinas de cianobacterias. El efecto de la exposición subletal se manifestaría, por ejemplo, en una asignación diferente de la energía disponible (por ejemplo, gasto de energía en desintoxicación), haciéndose evidente sólo después de la exposición a estresores posteriores (Gore et al., 2015; Aulsebrook et al., 2020). En este estudio pudimos detectar las consecuencias de este posible coste gracias a la fase de respuesta al estrés, que es relevante para comprender el proceso de aclimatarse y/o adaptarse a estas condiciones de exposición. Por lo tanto, es importante proponer líneas de investigación futuras para determinar qué características bioquímicas, fisiológicas o genéticas pueden verse alteradas y ser las responsables en la adquisición de esta vulnerabilidad inducida por agroquímicos a concentraciones supuestamente seguras.

Vulnerabilidad y factores de cambio global

Se analizó el efecto de factores estresantes subsecuentes de cambio global en las poblaciones vulnerables en los **Capítulos II, III y IV**. Este análisis cumple con el tercer objetivo de la tesis: *Evaluación de poblaciones con vulnerabilidad inducida de *D. magna* al efecto de la exposición a factores estresantes subsecuentes y probables en escenarios de cambio global como son la falta de alimento, el incremento de la temperatura, la salinización y la exposición a otros contaminantes*. El factor estresante de cambio global al que se ha expuesto a las poblaciones vulnerables de *D. magna* en todos los experimentos realizados durante esta tesis es la exposición a la falta de alimento a través de un test de inanición. La finalidad de haber realizado este ensayo en todos los capítulos experimentales fue tener un ensayo similar que verificara la vulnerabilidad en todos los estudios, ya que las poblaciones vulnerables murieron significativamente antes que las poblaciones control ante la ausencia de alimento. Este test puede relacionarse directamente con la disponibilidad de alimentos dentro de los sistemas acuáticos en escenarios de cambio global y su relación con una mayor o menor tolerancia a otros factores estresantes cuando hay limitación de alimento (Cuenca-Cambronero et al., 2021). Por lo tanto, la tolerancia potencial de las poblaciones impulsada tanto por la aclimatación como por la adaptación no solo está influenciada por el factor estresante expuesto, sino también por la interacción entre múltiples factores estresantes como la disponibilidad de alimentos y la historia de perturbación de la población. Existe evidencia de que los pesticidas interactúan con la fisiología y el comportamiento de los organismos, reduciendo la tolerancia a otros factores estresantes (Noyes et al., 2009; Oziolor y Matson, 2018). Específicamente, la vulnerabilidad de *D. magna* podría exacerbarse cuando la disponibilidad de alimentos y recursos es baja,

como muestran nuestros resultados, mientras que se observan menos efectos en el fitness cuando la disponibilidad de alimentos y recursos es alta (Wuerthner et al., 2019). Como ya se ha mencionado, es importante resaltar la importancia de la disponibilidad de alimentos en los sistemas acuáticos, ya que debemos evaluar los escenarios futuros de cambio global, donde se prevee que la producción primaria se verá afectada (Kushawaha et al., 2021). Además, las algas tienen un impacto directo en la toxicidad por el efecto amortiguador, ya que ayudan a reducir la concentración de los productos químicos por absorción directa y, por lo tanto, podrían reducir el efecto negativo en las poblaciones zooplanctónicas (Cuenca-Cambronero et al., 2021). Así, las concentraciones bajas de fitoplancton previstas en los escenarios futuros tendrán dos tipos de efectos, uno relacionados con la escasez de alimento y otra relacionada con una menor “captación” o retirada de contaminantes al reducirse la presencia de microalgas.

En el **Capítulo II** se evaluó el efecto de la exposición a glifosato sobre poblaciones vulnerables, un agroquímico con diferente modo de acción del agroquímico con el que se había generado la historia previa de perturbación (Dimetoato). Observamos que la exposición química secuencial (dimetoato y glifosato) tuvo efectos negativos sobre la supervivencia y la movilidad, con un mayor impacto en poblaciones con una historia de perturbación ambiental. Los resultados de exposición subsecuente a glifosato mostraron que la historia de perturbación modificó las respuestas de la población vulnerable de *D. magna*. El efecto a la exposición de glifosato en poblaciones control como vulnerables concuerda con la información proporcionada por Székács y Darvas (2018), donde se pone en manifiesto que el glifosato tiene un efecto genotóxico, hormonal e inmunomodulante en diferentes organismos. Es importante destacar que en este capítulo se confirma por primera vez la vulnerabilidad en poblaciones de *D. magna*

tras su exposición a la historia de perturbación generada con una concentración subletal de dimetoato. La exposición a concentraciones subletales del insecticida dimetoato puede contrastarse con numerosos estudios donde se evalúan el efecto de concentraciones subletales de agroquímicos con diferentes modo de acción sobre poblaciones de *D. magna* y los efectos que estas exposiciones conllevan, como efecto en el comportamiento y movilidad (Parolini et al., 2018), parámetros reproductivos (Villarroel et al., 2003), crecimiento (Hansenbein et al., 2017), entre otros factores. E incluso podemos relacionar nuestra experiencia con estudios donde existe una exposición combinada de un agroquímico y varios factores estresantes, como puede ser otro agroquímico (Shahid et al., 2019), fluctuaciones en la temperatura (Zhang et al., 2021) e incluso en estados de hipoxia y alta salinidad (Garreta-Lara et al., 2019). Se destaca que no se encontraron muchos estudios en los que se realizara una exposición a factores estresantes subsecuentes. Aunque, como se menciona anteriormente, el término de vulnerabilidad no había sido descrito, existen estudios que pueden relacionarse con nuestros resultados, aunque se encuentren enfocados a la respuesta en interacciones ecológicas, como la relación depredador-presa o de parásito-hospedador. Por un lado, tenemos el estudio de Coors y De Meester (2008) donde se demostró que la exposición de *D. magna* a concentraciones subletales del insecticida carbaryl redujo su capacidad de defenderse ante la depredación de larvas de mosquito, mientras que, por otro lado, en el estudio de Jansen et al., (2011) fue más allá, confirmando la interferencia de los costes evolutivos de la adaptación a la exposición a pesticidas. En este estudio, se mostró que poblaciones de *D. magna* fueron capaces de desarrollar rápidamente resistencia al insecticida carbaryl, pero a expensas de costes en el fitness y, además, estas poblaciones desarrollaron también una mayor susceptibilidad al desafío impuesto por el endoparásito bacteriano *Pasteuria ramosa*. Como en el capítulo II se demostró

que la historia de perturbación química, inducida por la exposición durante varias generaciones a una concentración subletal de dimetoato genera vulnerabilidad en las poblaciones de *D. magna* y socava las respuestas para enfrentar nuevos factores estresantes (glifosato y privación de alimentos), esto planteó una línea de investigación para determinar si este fenómeno representa un caso excepcional para el dimetoato o si puede generalizarse a varios tipos de agroquímicos.

En el **Capítulo III** se mostró como la historia de perturbación previa generada tras una exposición subletal continuada a glifosato resultó en poblaciones vulnerables con una sensibilidad aumentada a nuevos factores estresantes. Es importante destacar en este capítulo que la vulnerabilidad de poblaciones de *D. magna* se ha podido inducir a través de la exposición a concentraciones subletales de agroquímicos con diferentes modos de acción, en este caso se ha utilizado el herbicida glifosato en sustitución con el insecticida dimetoato utilizado en el capítulo II. Estos resultados pueden ayudar a plantear un escenario más realista donde la exposición a múltiples agroquímicos puede complicar este panorama debido a las posibles interacciones impredecibles y sinérgicas entre ellos (Relyea, 2009; Chen et al., 2020). Por lo que, la vulnerabilidad inducida por agroquímicos, sugiere que las poblaciones zooplanctónicas podrían estar en mayor riesgo de colapso o declive en entornos agrícolas donde múltiples agroquímicos están presentes (Maloney et al., 2018). Asimismo, podría socavar la resiliencia de las poblaciones frente a cambios ambientales y estresores adicionales, lo que podría tener consecuencias negativas para la estabilidad y el funcionamiento de los ecosistemas acuáticos (Polazzo et al., 2022). Con respecto a los factores estresantes utilizados en este estudio, además de la exposición a inanición las poblaciones se expusieron a un aumento de temperatura y a un aumento de salinidad. Las poblaciones vulnerables

mostraron una mayor sensibilidad al aumento de temperatura con respecto a las poblaciones control, estos resultados concuerdan con los mecanismos propuestos por Verheyen et al. (2022), quienes afirmaron que puede haber una mayor sensibilidad de los organismos a los cambios de temperatura causados por la exposición a una sustancia tóxica previa y destacaron como importante que la combinación de altas temperaturas y pesticidas es una de las causas más prominentes del declive de la biodiversidad en los ecosistemas acuáticos. Con respecto a la exposición a alta salinidad sucedió lo mismo, las poblaciones vulnerables fueron mas sensibles que las poblaciones control, estos resultados van en línea con estudios actuales que confirman que un aumento en la salinidad modifica las variables fisico-químicas del ecosistema acuático, alterando el metabolismo y el fitness de los organismos acuáticos e influyendo en la competencia entre especies, dinámicas poblacionales y estructura comunitaria (Vilas-Boas et al., 2021; Cañedo-Argüelles, 2020). Específicamente, estudios previos con *D. magna* muestran su tolerancia a ciertas concentraciones de NaCl, de modo que *D. magna* podría resistir y aumentar su supervivencia en hábitats de alta salinidad (Parlato y Kopp, 2020). Sin embargo, es este estudio la población vulnerable mostró una respuesta más grave ante el aumento de la salinidad. Por lo tanto, en este capítulo se demostró que una historia de perturbaciones ambientales causadas por concentraciones subletales de un agroquímico con diferente modo de acción que en el capítulo anterior también tiene la capacidad de inducir vulnerabilidad en la población, lo que resultó en una mayor sensibilidad a los nuevos factores estresantes escogidos (inanición, temperaturas más altas y salinidad).

En el **Capítulo IV** se aumentó la complejidad en el diseño experimental, el cultivo y los experimentos de exposición previa con *D. magna* se realizaron a diferentes

temperaturas y además hubo cambios de temperatura durante la exposición a factores estresantes subsecuentes. Como en los anteriores capítulos, se demostró que la historia previa de perturbación generada con una concentración subletal de agroquímicos induce vulnerabilidad en las poblaciones de *D. magna*. La temperatura de cultivo y los cambios de temperatura durante la exposición al estresor subsecuente, mostraron un efecto modulador en la vulnerabilidad, afectando también a la respuesta frente a estos. Este hallazgo se contrasta con el estudio de Sun y Arnott (2022) al destacar que, mientras nuestro estudio resalta el efecto modulador de la temperatura en la vulnerabilidad de las poblaciones expuestas a agroquímicos, el estudio de Sun y Arnott se centra en los efectos adversos de las interacciones entre estresores, como los cambios de temperatura y la alta salinidad, sin considerar específicamente el papel de los agroquímicos en la vulnerabilidad de las poblaciones. Estas evidencias subrayan la importancia de considerar cómo los agroquímicos pueden modular la vulnerabilidad de las poblaciones a estresores adicionales y resalta la necesidad de investigaciones más específicas sobre este tema. La vulnerabilidad ha quedado también puesta de manifiesto frente a la exposición subsecuente a paracetamol. Los resultados muestran que la exposición subsecuente al paracetamol no mostró diferencias significativas entre las poblaciones vulnerables y las poblaciones control, siendo letal en ambas, lo que sugiere que, con la concentración utilizada, el fuerte efecto del paracetamol podría enmascarar las posibles diferencias, lo que nos lleva a plantearnos futuros estudios con concentraciones más bajas de dicho medicamento. La inclusión del paracetamol, como contaminante emergente, en este estudio, está justificada por el incremento de productos farmacéuticos (PF) en los cuerpos acuáticos (Daniel et al., 2019). La contaminación por entidades novedosas o contaminantes emergentes, que incluyen muchas sustancias como los PF, es relevante en el contexto del cambio global y el marco conceptual de los

límites planetarios (Rockström et al., 2009). Recientemente, Persson et al. (2022) afirmaron que se ha superado el espacio operativo seguro del límite planetario de contaminantes emergentes, y advirtieron sobre la reducción de nuestra capacidad global para la evaluación y monitorización de esta contaminación específicamente. Asimismo, los contaminantes no están aislados en los sistemas acuáticos, sino que existen numerosos factores que pueden modificar o intensificar su efecto (Ormerod et al., 2010; Cuenca-Cambronero et al., 2021). Los resultados de nuestro estudio muestran así la relevancia de la combinación e interacción de estresores de cambio global, con efectos más devastadores que cuando se analizan estos estresores individualmente (Ormerod et al., 2010; Cuenca-Cambronero et al., 2021). Con los resultados presentados, argumentamos que las evaluaciones de riesgo ambiental aumentarían el realismo ecológico si se consideran los diferentes escenarios de cambio global, junto con las respuestas de vulnerabilidad de los organismos a nuevos factores estresantes, entre ellos, los contaminantes emergentes.

Vulnerabilidad y fragmentación química de hábitats

La fragmentación química del hábitat es un problema creciente dentro de los sistemas acuáticos, y es campo de investigación debido a los cambios funcionales y estructurales causados por la reducción de conectividad que se produce en estos ecosistemas (Alcívar et al., 2021). A pesar de esto, los organismos zooplanctónicos aún tienen la capacidad de detectar parches contaminados (Seuront, 2010). Por este motivo se planteó la pregunta ¿Se verá mermada la capacidad de poblaciones vulnerables de *D. magna* para detectar y/o huir de hábitats contaminados? Así, el cuarto objetivo de esta tesis fue la *Evaluación de la capacidad de escape en poblaciones de D. magna con vulnerabilidad inducida en escenarios de simulación de hábitats fragmentados*

químicamente, el cual fue abarcado por el **Capítulo V**. Los resultados obtenidos en este capítulo mostraron que la vulnerabilidad inducida en poblaciones de *D. magna* si afecta a su capacidad de escape. Estudios como el de Araújo et al., (2018) y Moreira et al., (2023) explican que los dáfnidos están en contacto directo con el contaminante desde el inicio del experimento, lo que podría afectar la capacidad de escape de la población, generando cierto letargo en los organismos. En nuestro estudio, después de observar la reacción de huida temprana de la población Control, consideramos al glifosato como un contaminante repelente para *D. magna* (Costantini et al., 2010). Por el contrario, en la población expuesta a una historia de perturbación, la capacidad de escape se ve disminuida y, por lo tanto, pone de manifiesto la vulnerabilidad, desde otra perspectiva a la que hemos utilizado en los capítulos anteriores, la del comportamiento, lo que, además, crea la posibilidad de generar distintos planteamientos al respecto. Por un lado, como nuestra población Vulnerable ha sido previamente expuesta a concentraciones subletales de glifosato durante 5 generaciones, el concepto de aclimatación podría considerarse una opción ante la falta de capacidad de escape detectada, ya que los organismos permanecen en compartimentos contaminados durante la mayor parte del período de exposición. En el estudio de Poulsen et al. (2021), se estudió y confirmó la capacidad de aclimatación de *D. magna* al pesticida procloraz después de una exposición continua durante 3 generaciones. Además, en el estudio de Saro et al. (2012), se discutió la asociación del proceso de aclimatación con el coste de la aptitud después de una exposición subletal a largo plazo. Por otro lado, es posible que la población Vulnerable tenga una capacidad reducida para detectar la contaminación y, por lo tanto, su respuesta ante la exposición sea más lenta. Serían necesarios otros estudios que nos permitieran identificar si las diferencias en el comportamiento de escape entre Vulnerable y Control se deben a la aclimatación o a la reducción en la capacidad de

identificación de señales químicas. En este capítulo se resalta la necesidad de evaluar cómo las concentraciones permitidas pueden afectar negativamente a las comunidades acuáticas mediante efectos en el comportamiento, ya que los organismos en sistemas acuáticos fragmentados químicamente pueden tener dificultades para escapar de parches contaminados o para detectar dicha contaminación.

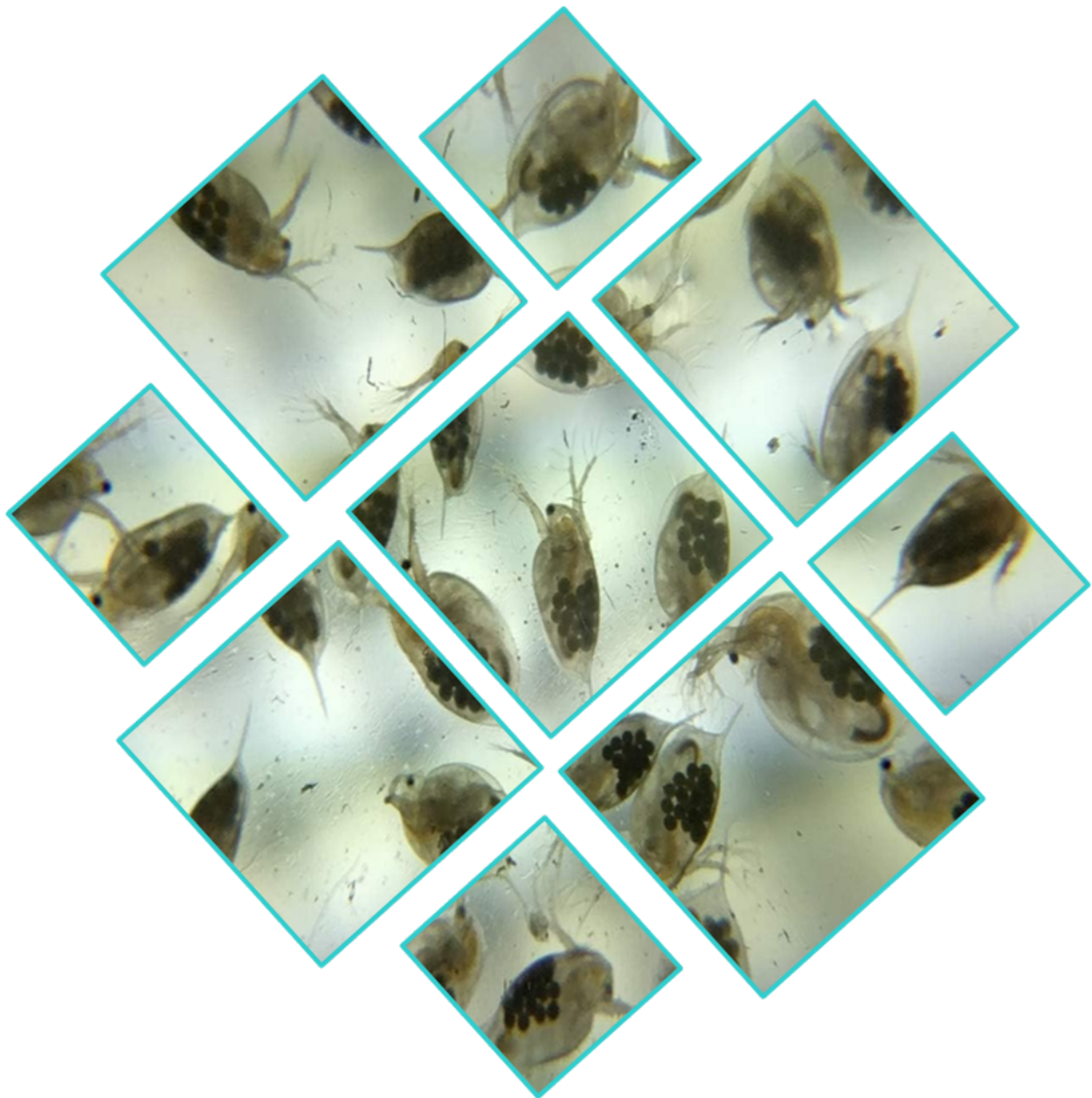
Aspectos de la tesis relacionados con la Evaluación de Riesgo Ecológico

La información recopilada durante la tesis doctoral es relevante para la mejora de la Evaluación de Riesgo Ambiental (ERA). Las evidencias científicas de este estudio podrían contribuir a la realización de cambios dentro de las diferentes legislaciones sobre las concentraciones de agroquímicos permitidas en los medios acuáticos. Se considera importante destacar que la evaluación de estos efectos en condiciones reales es complicada por lo que se recurre a ensayos estandarizados de toxicidad que, aunque simplifican la valoración de los efectos, pueden no reflejar completamente la realidad ambiental (Hébert et al., 2020). Además, la ERA también enfrenta desafíos en términos de definir y comprender los efectos tóxicos de los contaminantes en comunidades ecológicas (Encina y Díaz, 2001). Esto incluye identificar los efectos a largo plazo de la presencia prolongada de niveles bajos de contaminantes, así como evaluar las alteraciones en la biodiversidad y otros parámetros ecológicos (Andreu, 2008). En referencia a nuestro estudio de metaanálisis (Capítulo I) sobre el impacto de niveles bajos de contaminantes en poblaciones acuáticas, mostramos que la exposición continuada a concentraciones asumidas como seguras por la normativa pueden provocar efectos negativos en las poblaciones y alegamos la posibilidad de valorar esta tesis a la hora de enfrentar nuevos enfoques realistas en la generación de normativas de ERA.

Aplicabilidad de la tesis en escenarios de cambio global: Contaminantes emergentes

Ante las predicciones de los distintos escenarios de cambio global cabe resaltar la necesidad de reevaluar las concentraciones permitidas de agroquímicos y contaminantes, como se ha puesto de manifiesto en esta tesis, ya que generan vulnerabilidad y los organismos pueden verse gravemente afectados (afectando a la abundancia, el comportamiento...), lo que afectaría directamente al funcionamiento global de los ecosistemas acuáticos. Asimismo, el aumento de contaminantes emergentes, específicamente la contaminación de sistemas acuáticos por productos farmacéuticos, representa actualmente uno de los grandes desafíos de la sociedad. El uso generalizado de productos farmacéuticos en la producción de alimentos, principalmente en la ganadería y la acuicultura, añade un riesgo adicional de contaminación a los sistemas acuáticos. A pesar de la ambiciosa legislación existente, los esfuerzos para proteger la salud de los sistemas acuáticos europeos no han sido lo suficientemente efectivos, lo que ha resultado en niveles significativos de contaminación observados debido a actividades antropogénicas, con consecuencias negativas para los servicios ecosistémicos y el bienestar humano (Daniel et al., 2019; Chander et al., 2016). Los contaminantes emergentes, como los PF plantean nuevos riesgos en los sistemas acuáticos incluso encontrándose en concentraciones muy bajas (Zait et al., 2022; Mladenov et al., 2022). Por lo que, consideramos que la metodología seguida durante esta tesis doctoral es reproducible para la evaluación de diversos contaminantes que se encuentren en concentraciones aceptadas como seguras dentro de los ecosistemas acuáticos.

CONCLUSIONES

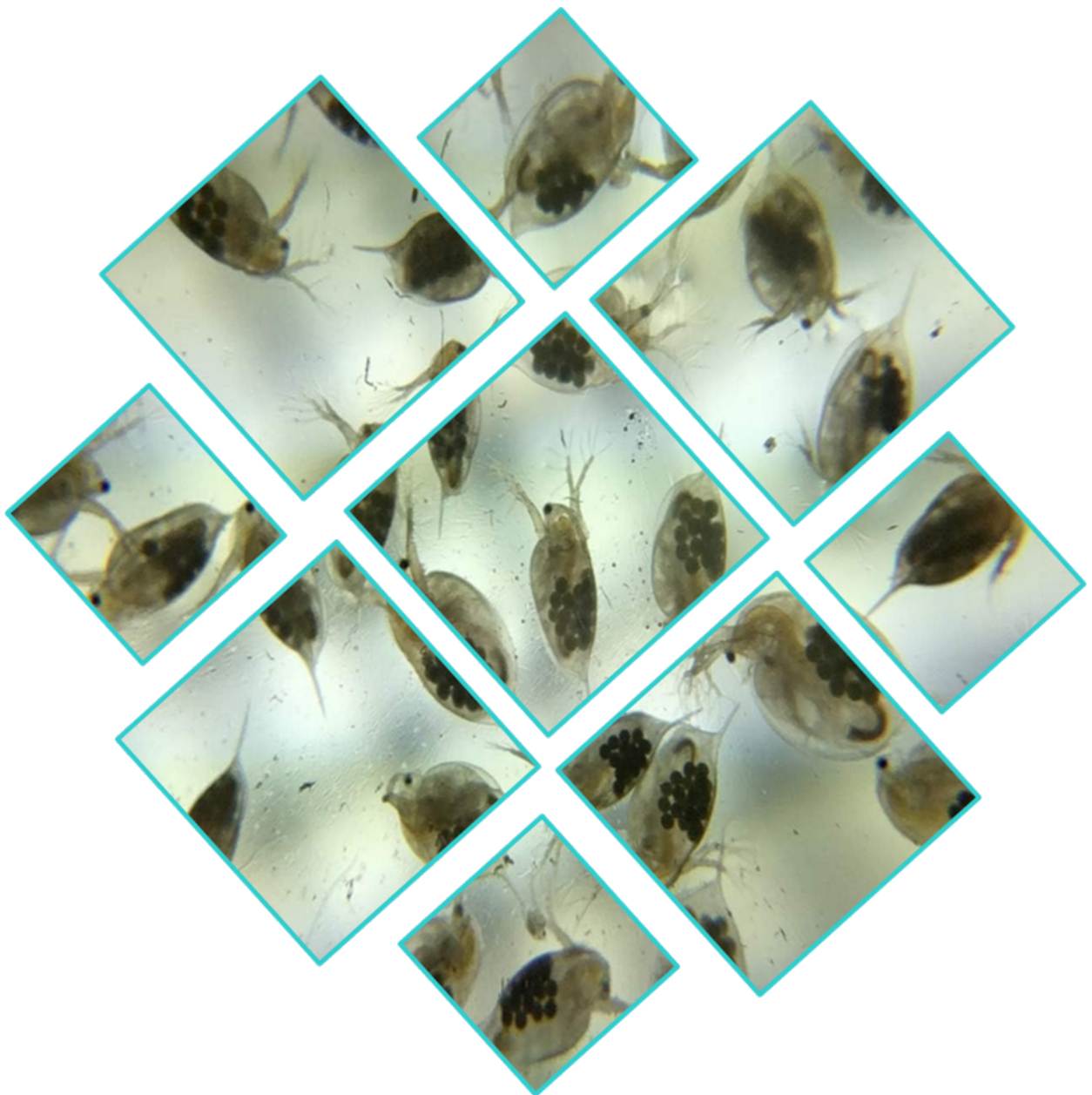


Conclusiones

1. A través de la recopilación de información disponible, extracción de datos y la realización del metaanálisis, se confirma la evidencia científica de un efecto negativo significativo por exposición a concentraciones subletales de agroquímicos sobre la abundancia de poblaciones zooplanctónicas.
2. Gracias al metaanálisis descubrimos la existencia de variables moduladoras en el tamaño del efecto de la exposición a concentraciones subletales de agroquímicos sobre poblaciones zooplanctónicas. Estas variables moduladoras fueron: el tipo de agroquímico al que estuvieron expuestas, la composición de los agroquímicos, el orden taxonómico y la especie.
3. La historia de perturbación, generada a través de la exposición a una concentración subletal de un agroquímico durante varias generaciones de *D. magna* socaba su capacidad para enfrentar factores estresantes subsecuentes, lo que convierte a estas poblaciones en poblaciones vulnerables.
4. Las poblaciones de *D. magna* con vulnerabilidad inducida por la historia de perturbación, muestran respuestas más graves ante estresantes subsecuentes que replican los factores ambientales que predicen los escenarios de cambio global. Estos factores fueron: falta de alimento (inanición), aumento de la salinidad, aumento de la temperatura, exposición a contaminantes y fluctuaciones en la temperatura.
5. Las poblaciones de *D. magna* con vulnerabilidad inducida por la historia de perturbación, muestran una menor capacidad de escape, lo que supone un nivel de vulnerabilidad asociado al comportamiento, en un sistema simulado de fragmentación química.

6. Este estudio suma evidencias científicas para contribuir a la mejora dentro de las diferentes legislaciones sobre las concentraciones de agroquímicos permitidas en los medios acuáticos y debe considerarse para la mejora de la Evaluación de Riesgo Ambiental.

REFERENCIAS



Referencias

91/271/CEE, 2020. Sobre tratamiento de las aguas residuales urbanas. https://www.miteco.gob.es/content/dam/miteco/es/agua/publicaciones/03_Manual_Directiva_91_271_CEE_tcm30-214069.pdf

Agra, A.R., Soares, A.M., Barata, C., 2011. Life-history consequences of adaptation to pollution. “*Daphnia longispina* clones historically exposed to copper”. *Ecotoxicol.* 20, 552-562. <https://doi.org/10.1007/s10646-011-0621-5>.

Ahlers, J., Riedhammer, C., Vogliano, M., Ebert, R., Kühne, R., Schüürmann, G., 2006. Acute to chronic ratios in aquatic toxicity variation across trophic levels and relationship with chemical structure. *Environ. Toxicol. Chem.* 25, 2937-2945. <https://doi.org/10.1897/05-701R.1>

Alcívar, M.A., Sendra, M., Silva, D.C., González-Ortegón, E., Blasco, J., Moreno-Garrido, I., Araújo, C.V., 2021. Could Contamination avoidance be an endpoint that protects the environment? An overview on how species respond to copper, glyphosate, and silver nanoparticles. *Toxics* 9, 301. <https://www.mdpi.com/2305-6304/9/11/301>

Amiard-Triquet, C., Amiard, J., 2015. Conventional risk assessment of environmental contaminants. Amiard-triquet C, amiard J, mouneyrac C. In: *Aquatic Ecotoxicology: Advancing Tools for Dealing with Emerging Risks*. Academic Press, New York, NY, U.S.A, pp. 25-47.

Andreu, O.E., 2008. Evaluación de riesgos ambientales del uso de plaguicidas empleados en el cultivo del arroz en el Parque Natural de La Albufera de Valencia. <https://doi.org/10.4995/Thesis/10251/2342>

Araújo, C.V.M., Roque, D., Blasco, J., Ribeiro, R., Moreira-Santos, M., Toribio, A., Aguirre, E., Barro, S., 2018. Stress-driven emigration in complex field scenarios of habitat disturbance: the Heterogeneous Multi-Habitat Assay System (HeMHAS). *Sci.Total Environ.* 644, 31-36. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.06.336>

Araújo, C.V.M., Moreira-Santos, M., Ribeiro, R., 2016. Active and passive spatial avoidance by aquatic organisms from environmental stressors: A complementary perspective and a critical review. *Environ. Int.* 92, 405-415. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2016.04.031>

Aulsebrook, L.C., Bertram, M.G., Martin, J.M., Aulsebrook, A.E., Brodin, T., Evans, J.P., Hall, M.D., O'Bryan, M.K., Pask, A.J., Tyler, C.R., 2020. Reproduction in a polluted world: implications for wildlife. *Reproduction* 160, R13-R23. <https://doi.org/10.1530/REP-20-0154>.

Barata, C., Baird, D.J., Mitchell, S.E., Soares, A.M., 2002. Among-and within-population variability in tolerance to cadmium stress in natural populations of *Daphnia magna*: implications for ecological risk assessment. *Environ. Toxicol. Chem.* 21, 5, 1058-1064. <https://doi.org/10.1002/etc.5620210523>.

Barbosa, M., Lopes, I., Venancio, C., Janeiro, M.J., Morrissey, M.B., Soares, A.M., 2015. Maternal response to environmental unpredictability. *Ecol. Evol.* 5, 4567-4577. <https://doi.org/10.1002/ece3.1723>.

Barbosa, M., Inocentes, N., Soares, A.M., Oliveira, M., 2017. Synergy effects of fluoxetine and variability in temperature lead to proportionally greater fitness costs in *Daphnia*: A multigenerational test. *Aquat. Toxicol.* 193, 268-275. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2017.10.017>

Bard, S.M., 2008. Ecotoxicology: the focal topics. *Encyclopedia of Ecology*.
<https://doi.org/10.1016/B978-008045405-4.00394-3>

Bagella, S., Caria, M.C., 2013. Sensitivity of ephemeral wetland swards with *Isoetes histrix* Bory to environmental variables: implications for the conservation of Mediterranean temporary ponds. *Aquat. Conserv. : Mar. Freshwat. Ecosyst.* 23, 277-290. <https://doi.org/10.1002/aqc.2290>

Beketov, M.A., Kefford, B.J., Schafer, R.B., Liess, M., 2013. Pesticides reduce regional biodiversity of stream invertebrates. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 11039–11043. <https://doi.org/10.1073/pnas.1305618110>.

Bendis, R.J., Relyea, R.A., 2014. Living on the edge: populations of two zooplankton species living closer to agricultural fields are more resistant to a common insecticide. *Environ. Toxicol. Chem.* 33, 2835-2841. <https://doi.org/10.1002/etc.2749>

Bell, G., Gonzalez, A., 2011. Adaptation and evolutionary rescue in metapopulations experiencing environmental deterioration. *Science* 332, 1327e1330. <https://doi.org/10.1126/science.1203105>.

Bernhardt, E.S., Rosi, E.J., Gessner, M.O., 2017. Synthetic chemicals as agents of global change. *Front. Ecol. Environ.* 15, 84-90. <https://doi.org/10.1002/fee.1450>

Bickham, J.W., 2011. The four cornerstones of evolutionary toxicology. *Ecotoxicol.* 20, 497-502. <https://doi.org/10.1007/s10646-011-0636-y>

Blanco, S., Olenici, A., Ortega, F., Jiménez-Gómez, F., Guerrero, F., 2020. Identifying environmental drivers of benthic diatom diversity: The case of Mediterranean mountain ponds. *PeerJ.* 8, 8825. <https://doi.org/10.7717/peerj.8825>

Bopp, S.K., Kienzler, A., Richarz, A., van der Linden, S.C., Paini, A., Parissis, N., Worth, A.P., 2019. Regulatory assessment and risk management of chemical mixtures: challenges and ways forward. *Crit. Rev. Toxicol.* 49, 174-189. <https://doi.org/10.1080/10408444.2019.1579169>

Brausch, J.M., Smith, P.N., 2009. Development of resistance to cyfluthrin and naphthalene among *Daphnia magna*. *Ecotoxicology* 18, 600. <https://doi.org/10.1007/s10646-009-0318-1>.

Brock, T., VanWijngaarden, R., 2012. Acute toxicity tests with *Daphnia magna*, *Americamysis bahia*, *Chironomus riparius* and *Gammarus pulex* and implications of new EU requirements for the aquatic effect assessment of insecticides. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 19, 3610-3618. <https://doi.org/10.1007/s11356-012-0930-0>

Brucet, S., Boix, D., Gascón, S., Sala, J., Quintana, X.D., Badosa, A., Søndergaard, M., Lauridsen, T.L., Jeppesen, E., 2009. Species richness of crustacean zooplankton and trophic structure of brackish lagoons in contrasting climate zones: north temperate Denmark and Mediterranean Catalonia (Spain). *Ecography* 32, 692-702. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0587.2009.05823.x>

Brühl, C.A., Zaller, J.G., 2019. Biodiversity decline as a consequence of an inappropriate environmental risk assessment of pesticides. *Frontiers in Environmental Science* 177. <https://doi.org/10.3389/fenvs.2019.00177>

Buerger, T., Kendall, R., Mueller, B., Devos, T., Williams, B., 1991. Effects of methyl parathion on northern bobwhite survivability. *Environ. Toxicol. Chem.* 10, 527-532. <https://doi.org/10.1002/etc.5620100413>.

Burton Jr, G.A., 2017. The focus on chemicals alone in human-dominated ecosystems is inappropriate. *Integr. Environ. Assess. Manag.* 13, 568-572.

<https://doi.org/10.1002/ieam.1929>

Cañedo-Argüelles, M., 2020. A review of recent advances and future challenges in freshwater salinization. *Limnetica* 39, 185–211. <https://doi.org/10.23818/limn.39.13>

Commission of the European Communities (CEC) (2003), Directive 2003/35/EC of the European Parliament and the Council of 26 May 2003 providing for public participation in respect of the drawing up of certain plans and programmes relating to the environment and amending with regard to public participation and access to justice Council Directives 85/337/EEC and 96/61/EC

Coors, A., De Meester, L., 2008. Synergistic, antagonistic and additive effects of multiple stressors: predation threat, parasitism and pesticide exposure in *Daphnia magna*. *J. Appl. Ecol.* 45, 1820-1828. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2664.2008.01566.x>

Chander, V., Sharma, B., Negi, V., Aswal, R.S., Singh, P., Singh, R., Dobhal, R., 2016. Pharmaceutical compounds in drinking water. *J. Xenobiot.* 6, 5774. <https://doi.org/10.4081/xeno.2016.5774>.

Chen, L., Li, S., Zhou, Y., Zhou, X., Jiang, H., Liu, X., Yuan, S., 2020. Risk assessment for pesticide mixtures on aquatic ecosystems in China: a proposed framework. *Pest Manag. Sci.* 76, 444-453. <https://doi.org/10.1002/ps.5529>

Coors, A., De Meester, L., 2008. Synergistic, antagonistic and additive effects of multiple stressors: predation threat, parasitism and pesticide exposure in *Daphnia magna*. *J. Appl. Ecol.* 45, 1820-1828. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2664.2008.01566.x>

Costantini, D., Metcalfe, N.B., Monaghan, P., 2010. Ecological processes in a hormetic framework. *Ecol. Lett.* 13, 1435-1447. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2010.01531.x>

Cuenca-Cambronero, M., Pantel, J.H., Marshall, H., Nguyen, T.T., Tomero-Sanz, H., Orsini, L., 2021. Evolutionary mechanisms underpinning fitness response to multiple stressors in *Daphnia*. *Evol. Appl.* 14, 2457-2469. <https://doi.org/10.1111/eva.13258>

Dahms, H., Hagiwara, A., Lee, J., 2011. Ecotoxicology, ecophysiology, and mechanistic studies with rotifers. *Aquat. Toxicol.* 101, 1-12. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2010.09.00>

Daniel, D., Dionísio, R., de Alkimin, G.D., Nunes, B., 2019. Acute and chronic effects of paracetamol exposure on *Daphnia magna*: how oxidative effects may modulate responses at distinct levels of organization in a model species. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 26, 3320-3329. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-3788-y>

De Coninck, D.I., Janssen, C.R., De Schamphelaere, K.A., 2014. An approach to assess the regulatory relevance of microevolutionary effects in ecological risk assessment of chemicals: a case study with cadmium. *Environ. Toxicol. Chem.* 33, 453-457. <https://doi.org/10.1002/etc.2434>.

De Laender, F., Janssen, C.R., 2013. Brief communication: The ecosystem perspective in ecotoxicology as a way forward for the ecological risk assessment of chemicals. *Integr. Environ. Assess. Manag.* 9, 34-38. <https://doi.org/10.1002/ieam.1428>

del Arco, A.I., Guerrero, F., Jimenez-Gomez, F., Parra, G., 2014. Shifts across trophic levels as early warning signals of copper sulfate impacts in plankton

communities. *Appl. Ecol. Environ. Res.* 12, 493-503.

https://doi.org/10.15666/aeer/1205_493503

del Arco, A.I., Jiménez-Gómez, F., Guerrero, F., Parra, G., 2016. Can a copper sulphate pulse below toxic threshold change plankton communities? *Aquat. Ecosyst. Health Manage.* 19, 64-73. <https://doi.org/10.1080/14634988.2016.1138791>

del Arco, A.I., Guerrero, F., Jiménez-Gómez, F., Parra, G., 2019. Plankton community responses to environmentally-relevant agrochemical mixtures. *Limnetica* 55, 5. <https://doi.org/10.1051/limn/2019004>

Downing, A.L., DeVanna, K.M., Rubeck-Schurtz, C.N., Tuhela, L., Grunkemeyer, H., 2008. Community and ecosystem responses to a pulsed pesticide disturbance in freshwater ecosystems. *Ecotoxicol.* 17, 539-548. <https://doi.org/10.1007/s10646-008-0211-3>

Downing, A.L., Parra, G., 2023. The response of freshwater plankton communities to temporal concurrence of agrochemical mixtures. *Limnetica* 42, 189-202. <https://doi.org/10.23818/limn.42.14>

European Environmental Agency (EEA), 2023. How pesticides impact human health and ecosystems in Europe. <https://www.eea.europa.eu/publications/how-pesticides-impact-human-health>

Eurostat, 2022, 'Agri-environmental indicator — consumption of pesticides', Eurostat Statistics Explained https://ec.europa.eu/eurostat/statistics-explained/index.php?title=Agri-environmental_indicator_-_consumption_of_pesticides

Encina, F., Diaz, O., 2001. Contaminación, estimación del riesgo ecológico y protección asociado a algas bentónicas marinas. *Sust. Biodivers.* 336-357.

EPA, 2021, Drinking water quality in public supplies 2020, Environmental Protection Agency, Ireland. <https://www.epa.ie/publications/compliance--enforcement/drinking-water/annual-drinking-water-reports/87838-EPA-Public-Report-2020-full-File-revised.pdf>

Fantón, N., Bacchetta, C., Rossi, A., Gutierrez, M.F., 2020. Effects of a glyphosate-based herbicide on the development and biochemical biomarkers of the freshwater copepod *Notodiaptomus carteri* (Lowndes, 1934). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 196, 110501. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.110501>

Gagneten, A.M., Marchese, M., 2003. Effect of Paraquat on freshwater zooplankton and zoobenthic assemblages in enclosure experiments. *Int. J. Ecohydrol. Hydrobiol.* 3, 389-398. <https://doi.org/10.2478/v10104-011-0048-8>

Garreta-Lara, E., Campos, B., Barata, C., Lacorte, S., Tauler, R., 2018. Combined effects of salinity, temperature and hypoxia on *Daphnia magna* metabolism. *Sci. Total Environ.* 610, 602-612. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.05.190>

Giesy, J.P., Dobson, S., Solomon, K.R., 2000. Ecotoxicological risk assessment for Roundup® herbicide. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 35-120. https://doi.org/10.1007/978-1-4612-1156-3_2

Gore, A.C., Chappell, V.A., Fenton, S.E., Flaws, J.A., Nadal, A., Prins, G.S., Toppari, J., Zoeller, R.T., 2015. EDC-2: the Endocrine Society's second scientific statement on endocrine disrupting chemicals. *Endocr. Rev.* 36, E1-E150. <https://doi.org/10.1210/er.2015-1010>.

Häder, D., Banaszak, A.T., Villafañe, V.E., Narvarte, M.A., González, R.A., Helbling, E.W., 2020. Anthropogenic pollution of aquatic ecosystems: Emerging

problems with global implications. *Sci. Total Environ.* 713, 136586.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.136586>

Halstead, N.T., McMahon, T.A., Johnson, S.A., Raffel, T.R., Romansic, J.M., Crumrine, P.W., Rohr, J.R., 2014. Community ecology theory predicts the effects of agrochemical mixtures on aquatic biodiversity and ecosystem properties. *Ecol. Lett.* 17, 932-941. <https://doi.org/10.1111/ele.12295>

Hanazato, T., 2001. Pesticide effects on freshwater zooplankton: an ecological perspective. *Environ. Pollut.* 112, 1-10. [https://doi.org/10.1016/S0269-7491\(00\)00110-X](https://doi.org/10.1016/S0269-7491(00)00110-X)

Hasenbein, S., Peralta, J., Lawler, S.P., Connon, R.E., 2017. Environmentally relevant concentrations of herbicides impact non-target species at multiple sublethal endpoints. *Sci. Total Environ.* 607, 733-743.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.06.270>

Hébert, M., Fugère, V., Beisner, B.E., Barbosa da Costa, N., Barrett, R.D., Bell, G., Shapiro, B.J., Yargeau, V., Gonzalez, A., Fussmann, G.F., 2021. Widespread agrochemicals differentially affect zooplankton biomass and community structure. *Ecol. Appl.* 31, 02423. <https://doi.org/10.1002/eap.2423>

Hintz, W.D., Jones, D.K., Relyea, R.A., 2019. Evolved tolerance to freshwater salinization in zooplankton: life-history trade-offs, cross-tolerance and reducing cascading effects. *Philos. Trans. R. Soc. B.* 374, 20180012.
<https://doi.org/10.1098/rstb.2018.0012>

Hoffmann, A.A., Parsons, P.A., 1991. Evolutionary genetics and environmental stress: Oxford University Press.

Hua, J., Jones, D.K., Relyea, R.A., 2014. Induced tolerance from a sublethal insecticide leads to cross-tolerance to other insecticides. *Environ. Sci.* 48, 4078-4085.

<https://doi.org/10.1021/es500278f>

Huaraca Huaraca, L.F., 2017. Evaluación Ecotoxicológica de Aguas Contaminadas con Glifosato a partir de los Bioindicadores *Daphnia magna* y *Artemia salina*. <https://doi.org/10.1002/etc.2043>.

Hyland, J.L., Balthis, W.L., Engle, V.D., Long, E.R., Paul, J.F., Summers, J.K., Van Dolah, R.F., 2003. Incidence of stress in benthic communities along the US Atlantic and Gulf of Mexico coasts within different ranges of sediment contamination from chemical mixtures. In: Anonymous Coastal Monitoring through Partnerships. Springer, pp. 149-161.

Jansen, M., Coors, A., Stoks, R., De Meester, L., 2011. Evolutionary ecotoxicology of pesticide resistance: a case study in *Daphnia*. *Ecotoxicol.* 20, 543-551. <https://doi.org/10.1007/s10646-011-0627-z>.

Jeppesen, E., Brucet, S., Naselli-Flores, L., Papastergiadou, E., Stefanidis, K., Noges, T., Noges, P., Attayde, J.L., Zohary, T., Coppens, J., 2015. Ecological impacts of global warming and water abstraction on lakes and reservoirs due to changes in water level and related changes in salinity. *Hydrobiol.* 750, 201-227. <https://doi.org/10.1007/s10750-014-2169-x>

Johnson, A.C., Sumpter, J.P., 2016. Are we going about chemical risk assessment for the aquatic environment the wrong way? *Environ. Toxicol. Chem.* 35, 1609-1616. <https://doi.org/10.1002/etc.3441>

Jorgensen, E., 2010. *Ecotoxicology*. Academic press.

Kelly, M.R., 2018. The Combined Effects of Atrazine and Tetracycline on Primary Producers and Zooplankton in Freshwater Microcosms. Honors College Theses. 323. <https://digitalcommons.georgiasouthern.edu/honors-theses/323>

Klerks, P.L., Xie, L., Levinton, J.S., 2011. Quantitative genetics approaches to study evolutionary processes in ecotoxicology; a perspective from research on the evolution of resistance. *Ecotoxicol.* 20, 513-523. <https://doi.org/10.1007/s10646-011-0640-2>.

Kumar, R., Sankhla, M.S., Kumar, R., Sonone, S.S., 2021. Impact of pesticide toxicity in aquatic environment. *BRIAC.* 11, 10131-10140. <https://doi.org/10.33263/BRIAC113.1013110140>

Kushawaha, J., Borra, S., Kushawaha, A.K., Singh, G., Singh, P., 2021. Climate change and its impact on natural resources. *Anonymous Water Conservation in the Era of Global Climate Change.* Elsevier, pp. 333-346 <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-820200-5.00002-6>.

Leboulanger, C., Bouvy, M., Carré, C., Cecchi, P., Amalric, L., Bouchez, A., Pagano, M., Sarazin, G., 2011. Comparison of the effects of two herbicides and an insecticide on tropical freshwater plankton in microcosms. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 61, 599-613. <https://doi.org/10.1007/s00244-011-9653-3>

León, D., Peñalver, P., Casas, J., Juan, M., Fuentes, F., Gallego, I., Santillana, J.T., 2014. Effects of copper sulphate on zooplankton communities in ponds submitted to agricultural intensification. *Bol. Biodivers. Chile,* 1-10. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=5526774>

Lewis, M.A., 1991. Chronic and sublethal toxicities of surfactants to aquatic animals: a review and risk assessment. *Water Res.* 25, 101-113. [https://doi.org/10.1016/0043-1354\(91\)90105-Y](https://doi.org/10.1016/0043-1354(91)90105-Y).

Liao, Y.F., Faulks, L.K., Ostman, O., 2015. Stress tolerance and population stability of rock pool *Daphnia* in relation to local conditions and population isolation. *Hydrobiol.* 742 (1), 267e278. <https://doi.org/10.1007/s10750-014-1990-6>.

Liess, M., Pieters, B.J., Duquesne, S., 2006. Long-term signal of population disturbance after pulse exposure to an insecticide: rapid recovery of abundance, persistent alteration of structure. *Environ. Toxicol.* 25, 1326-1331. <https://doi.org/10.1897/05-466R.1>

Lulei, M., 2008. REACH: Zu den Leitlinien der Europäischen Agentur für chemische Stoffe (ECHA) 1. *Bundesgesundheitsblatt-Gesundheitsforschung-Gesundheitsschutz*, 12, 1444-1452. <https://doi.org/10.1007/s00103-008-0718-z>

Lim, X.E., Koksong, L., Koksong, L., Liew, H., Loh, J., Loh, J., 2019. Acute toxicity of glyphosate on various life stages of calanoid copepod, *Pseudodiaptomus annandalei*. *AsPac. J. Mol. Biol. Biotechnol.* 27, 24-31.

Lydy, M.J., Austin, K.R., 2004. Toxicity assessment of pesticide mixtures typical of the Sacramento San Joaquin Delta using *Chironomus tentans*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 48, 49-55. <https://doi.org/10.1007/s00244-004-0056-6>

Mackay, D., Paterson, S., 1981. Calculating fugacity. *Environ. Sci. Technol.* 15, 1006-1014. <https://doi.org/10.1021/es00091a001>

Maloney, E.M., Liber, K., Headley, J.V., Peru, K.M., Morrissey, C.A., 2018. Neonicotinoid insecticide mixtures: Evaluation of laboratory-based toxicity predictions under semi-controlled field conditions. *Environ. Pollut.* 243, 1727-1739. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.09.008>

Mann, R.M., Hyne, R.V., Choung, C.B., Wilson, S.P., 2009. Amphibians and agricultural chemicals: review of the risks in a complex environment. *Environ. Pollut.* 157, 2903-2927. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2009.05.015>

Meybeck, M., 2004. The global change of continental aquatic systems: dominant impacts of human activities. *Water Sci. Technol.* 49, 73-83. <https://doi.org/10.2166/wst.2004.0420>

Micheli, F., Halpern, B.S., Walbridge, S., Ciriaco, S., Ferretti, F., Fraschetti, S., Lewison, R., Nykjaer, L., Rosenberg, A.A., 2013. Cumulative human impacts on Mediterranean and Black Sea marine ecosystems: assessing current pressures and opportunities. *PloS one* 8, 79889. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0079889>

Mladenov, N., Dodder, N.G., Steinberg, L., Richardot, W., Johnson, J., Martincigh, B.S., Buckley, C., Lawrence, T., Hoh, E., 2022. Persistence and removal of trace organic compounds in centralized and decentralized wastewater treatment systems. *Chemosphere* 286, 131621. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.131621>

Moreira, R.A., da Silva Mansano, A., Rocha, O., Daam, M.A., 2016. The use of rotifers as test species in the aquatic effect assessment of pesticides in the tropics. *Hydrobiol.* 773, 1-9. <https://doi.org/10.1007/s10750-016-2675-0>

Moreira, R.A., Polo-Castellano, C., Cordero-de-Castro, A., Dias, M.A., Pinto, T.J., Montagner, C.C., Espíndola, E.L., Blasco, J., Araújo, C.V., 2023. Short and long-

term exposure to the pesticides fipronil and 2, 4-D: Effects on behavior and life history of *Daphnia magna*. Chemosphere 310, 136719. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.136719>

Nowakowski, K., Sługocki, Ł., 2021. Short-term heat shock perturbation affects populations of *Daphnia magna* and *Eurytemora carolleeae*: a warning to the water thermal pollution. Sci. Rep. 11, 1-8. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-96464-8>.

Noyes, P.D., McElwee, M.K., Miller, H.D., Clark, B.W., Van Tiem, L.A., Walcott, K.C., Erwin, K.N., Levin, E.D., 2009. The toxicology of climate change: environmental contaminants in a warming world. Environ. Int. 35, 971–986. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2009.02.006>.

Nys, C., Van Regenmortel, T., Janssen, C.R., Oorts, K., Smolders, E., De Schamphelaere, K.A., 2018. A framework for ecological risk assessment of metal mixtures in aquatic systems. Environ. Toxicol. Chem. 37, 623-642. <https://doi.org/10.1002/etc.4039>

Nwakanma, C., Chimezie, A.F., Toxicity of Copper Sulphate on Copepod species. Int. J. Sci. Adv. Innov. Res. 3, 2536-7323.

Ormerod, S.J., Dobson, M., Hildrew, A.G., Townsend, C., 2010. Multiple stressors in freshwater ecosystems. Freshw. Biol. 55, 1- 4. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2427.2009.02395.x>

Olkova, A.S., Kantor, G.Y., Kutavina, T.I., Ashikhmina, T.Y., 2018. The importance of maintenance conditions of *Daphnia magna* Straus as a test organism for ecotoxicological analysis. Environ. Toxicol. Chem. 37, 376-384. <https://doi.org/10.1002/etc.3956>

Oziolor, E.M., Matson, C.W., 2018. Adaptation in polluted waters: lessons from killifish. *Anonymous Development And Environment*. Springer, pp. 355–375
https://doi.org/10.1007/978-3-319-75935-7_14.

Parlato, B.P., Kopp, R., 2020. Adaptive tolerance to sodium chloride in *Daphnia magna*. *KJUS*. 4, 2 <https://encompass.eku.edu/kjus/vol4/iss1/2/>
<https://encompass.eku.edu/kjus/vol4/iss1/2/>

Parolini, M., De Felice, B., Ferrario, C., Salgueiro-González, N., Castiglioni, S., Finizio, A., Tremolada, P., 2018. Benzoylcegonine exposure induced oxidative stress and altered swimming behavior and reproduction in *Daphnia magna*. *Environ. Pollut.* 232, 236-244. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.09.038>

Parra, G., Jiménez-Melero, R., Guerrero, F., 2005. Agricultural impacts on Mediterranean wetlands: the effect of pesticides on survival and hatching rates in copepods. *Limnetica* 41, 161-167. <https://doi.org/10.1051/limn:20054130161>

Parra, G., Guerrero, F., Armengol, J., Brendonck, L., Brucet, S., Finlayson, C.M., Gomes-Barbosa, L., Grillas, P., Jeppesen, E., Ortega, F., 2021. The future of temporary wetlands in drylands under global change. *Inland Waters* 11, 445-456. <https://doi.org/10.1080/20442041.2021.1936865>

Pease, C.M., Bull, J.J., 1988. A critique of methods for measuring life history trade-offs. *J. Evol. Biol.* 1, 293-303. <https://doi.org/10.1046/j.1420-9101.1988.1040293.x>

Persoone, G., Baudo, R., Cotman, M., Blaise, C., Thompson, K.C., Moreira-Santos, M., Vولات, B., Törökne, A., Han, T., 2009. Review on the acute *Daphnia magna* toxicity test. Evaluation of the sensitivity and the precision of assays performed with

organisms from laboratory cultures or hatched from dormant eggs. *Knowl. Manag. Aquat. Ecosyst.* 01. <https://doi.org/10.1051/kmae/2009012>

Persson, L., Carney Almroth, B.M., Collins, C.D., Cornell, S., de Wit, C.A., Diamond, M.L., Fantke, P., Hassellöv, M., MacLeod, M., Ryberg, M.W., 2022. Outside the safe operating space of the planetary boundary for novel entities. *Environ. Sci. Technol.* 56, 1510–1521. <https://doi.org/10.1021/acs.est.1c04158>

Pilière, A., Schipper, A.M., Breure, A.M., Posthuma, L., de Zwart, D., Dyer, S.D., Huijbregts, M.A., 2014. Comparing responses of freshwater fish and invertebrate community integrity along multiple environmental gradients. *Ecol. Indicat.* 43, 215-226. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2014.02.019>.

Pinero-Rodríguez, M.J., Gomez-Mestre, I., Díaz-Paniagua, C., 2021. Herbivory by spadefoot toad tadpoles and reduced water level affect submerged plants in temporary ponds. *Inland Waters* 11, 457-466. <https://doi.org/10.1080/20442041.2021.1933855>

Planklang, N., Athibai, S., 2021. Comparisons of Zooplankton Community Structure between with-and without-Pesticide Applications on Rice Fields. *Diversity* 13, 644. <https://doi.org/10.3390/d13120644>

Poirier, D.G., Westlake, G.F., Abernethy, S.I., 1988. *Daphnia magna* acute lethality toxicity test protocol. <http://hdl.handle.net/10214/15534>

Poulsen, R., Henrik, H., Hansen, M., Cedergreen, N., 2021. Grandmother's pesticide exposure revealed bi-generational effects in *Daphnia magna*. *Aquat. Toxicol.* 236, 105861. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2021.105861>

Polazzo, F., Dos Anjos, T.B.O., Arenas-Sánchez, A., Romo, S., Vighi, M., Rico, A., 2022. Effect of multiple agricultural stressors on freshwater ecosystems: The role of community structure, trophic status, and biodiversity-functioning relationships on ecosystem responses. *Sci. Total Environ.* 807, 151052. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.151052>

Portinho, J.L., Nielsen, D.L., Daré, L., Henry, R., Oliveira, R.C., Branco, C.C., 2018. Mixture of commercial herbicides based on 2, 4-D and glyphosate mixture can suppress the emergence of zooplankton from sediments. *Chemosphere* 203, 151-159. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.03.156>

Radersma, R., Hegg, A., Noble, D.W., Uller, T., 2018. Timing of maternal exposure to toxic cyanobacteria and offspring fitness in *Daphnia magna*: Implications for the evolution of anticipatory maternal effects. *Ecol. Evol.* 8, 12727-12736. <https://doi.org/10.1002/ece3.4700>

Ramasamy, P.K., Jeyaraaj, R., David, A., Ramaswamy, M., 2007. Toxicity of an organophosphorus pesticide, quinalphos to the catfish, *Mystus vittatus*. <https://doi.org/10.5555/20103345641>

Relyea, R.A., 2009. A cocktail of contaminants: how mixtures of pesticides at low concentrations affect aquatic communities. *Oecologia* 159, 363-376. <https://doi.org/10.1007/s00442-008-1213-9>

Relyea, R.A., 2005. The impact of insecticides and herbicides on the biodiversity and productivity of aquatic communities. *Ecol. Appl.* 15, 618-627. <https://doi.org/10.1890/03-5342>

Relyea, R.A., Hoverman, J.T., 2008. Interactive effects of predators and a pesticide on aquatic communities. *Oikos* 117, 1647-1658.

<https://doi.org/10.1111/j.1600-0706.2008.16933.x>

Relyea, R.A., 2009. A cocktail of contaminants: how mixtures of pesticides at low concentrations affect aquatic communities. *Oecologia* 159, 363-376. <https://doi.org/10.1007/s00442-008-1213-9>

Rico-Martínez, R., Arias-Almeida, J.C., Pérez-Legaspi, I.A., Alvarado-Flores, J., Retes-Pruneda, J.L., 2012. Adverse effects of herbicides on freshwater zooplankton. *Herbicides-Properties, Synthesis and Control of Weeds*. London: InTechOpen , 405-434. <https://doi.org/10.5772/45933>

Rivetti, C., Campos, B., Barata, C., 2016. Low environmental levels of neuro-active pharmaceuticals alter phototactic behaviour and reproduction in *Daphnia magna*. *Aquat. Toxicol.* 170, 289-296. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2015.07.019>.

Robles-Molina, J., Gilbert-López, B., García-Reyes, J.F., Molina-Díaz, A., 2014. Monitoring of selected priority and emerging contaminants in the Guadalquivir River and other related surface waters in the province of Jaen, South East Spain. *Sci. Total Environ.* 479, 247-257. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.01.121>

Rockström, J., Steffen, W., Noone, K., Persson, Å., Chapin III, F.S., Lambin, E., Lenton, T. M., Scheffer, M., Folke, C., Schellnhuber, H.J., 2009. Planetary boundaries: exploring the safe operating space for humanity. *Ecol. Soc.* 14, 2. <https://www.ecologyandsociety.org/vol14/iss2/art32/>.

Rumschlag, S., Boone, M., 2015. How time of exposure to the amphibian chytrid fungus affects *Hyla chrysoscelis* in the presence of an insecticide. *Herpetologica* 71, 3, 169-176. <https://doi.org/10.1655/HERPETOLOGICA-D-13-00070>.

Sánchez-Bayo, F., Wyckhuys, K.A., 2019. Worldwide decline of the entomofauna: A review of its drivers. *Biol. Conserv.* 232, 8-27. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2019.01.020>

Sarma, S., Nandini, S., Pena-Aguado, F., Chaparro-Herrera, D.J., 2009. Effects of asplanchnin allelochemical on the toxicity of triasulphuron herbicide to rotifer *Brachionus patulus* (Rotifera: Brachionidae). *Allelopathy J.* 23.

Saro, L., Lopes, I., Martins, N., Ribeiro, R., 2012. Testing hypotheses on the resistance to metals by *Daphnia longispina*: differential acclimation, endpoints association, and fitness costs. *Environ. Toxicol. Chem.* 31, 909-915. <https://doi.org/10.1002/etc.1762>

Schamphelaere, K., Forrez, I., Dierckens, K., Sorgeloos, P., Janssen, C.R., 2007. Chronic toxicity of dietary copper to *Daphnia magna*. *Aquat. Toxicol.* 81, 409-418. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2007.01.002>

Schäfer, R.B., Kühn, B., Malaj, E., König, A., Gergs, R., 2016. Contribution of organic toxicants to multiple stress in river ecosystems. *Freshwat. Biol.* 61, 2116-2128. <https://doi.org/10.1111/fwb.12811>

Schäfer, R.B., van den Brink, P.J., Liess, M., 2011. Impacts of pesticides on freshwater ecosystems. *Environ. Sci. Res. Int.* 20, 11, 111-137. <https://doi.org/10.1080/15488610.2011.618976>

Seuront, L., 2010. Zooplankton avoidance behaviour as a response to point sources of hydrocarbon-contaminated water. *Mar. Freshwater Res.* 61, 263-270.

<https://doi.org/10.1071/MF09055>

Shahid, N., Liess, M., Knillmann, S., 2019. Environmental stress increases synergistic effects of pesticide mixtures on *Daphnia magna*. *Environ. Sci. Technol.* 53, 12586-12593. <https://doi.org/10.1021/acs.est.9b04293>

Silva, L.C., Moreira, R.A., Pinto, T.J., Vanderlei, M.R., Athayde, D.B., Lopes, L.F., Ogura, A.P., Yoshii, M.P., Freitas, J.S., Montagner, C.C., 2021. Lethal and sublethal toxicity of pesticides and vinasse used in sugarcane cultivation to *Ceriodaphnia silvestrii* (Crustacea: Cladocera). *Aquat. Toxicol.* 241, 106017. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2021.106017>

Sim, L.L., Davis, J.A., Strehlow, K., McGuire, M., Trayler, K.M., Wild, S., Papas, P.J., O'Connor, J., 2013. The influence of changing hydroregime on the invertebrate communities of temporary seasonal wetlands. *Freshwater Sci.* 32, 327-342. <https://doi.org/10.1899/12-024.1>

Stremmel, H., Weiss, L., Parra, G., Ramos-Rodríguez, E., Araújo, C.V., 2023. Ecotoxicological assessment of the effects of fluoxetine on *Daphnia magna* based on acute toxicity, multigenerational reproduction effects, and attraction-repellence responses. *Chemosphere* 312, 137028. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.137028>

Sun, X., Arnott, S.E., 2022. Interactive effects of increased salinity and heatwaves on freshwater zooplankton communities in simultaneous and sequential treatments. *Freshwat. Biol.* 67, 1604-1617. <https://doi.org/10.1111/fwb.13964>

Székács, A., Darvas, B., 2018. Re-registration challenges of glyphosate in the European Union. *Front. Environ. Sci.* 6, 78. <https://doi.org/10.3389/fenvs.2018.00078>.

Tazunoki, Y., Tokuda, M., Sakuma, A., Nishimuta, K., Oba, Y., Kadokami, K., Miyawaki, T., Ikegami, M., Ueno, D., 2022. Comprehensive analyses of agrochemicals affecting aquatic ecosystems: A case study of Odonata communities and macrophytes in Saga Plain, northern Kyushu, Japan. *J. Environ. Pollut.* 292, 118334. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.118334>

Todgham, A.E., Stillman, J.H., 2013. Physiological responses to shifts in multiple Health. *Toxicol.* 33. <https://doi.org/10.5620/eht.e2018015>

Tüzün, N., Stoks, R., 2021. Lower bioenergetic costs but similar immune responsiveness under a heat wave in urban compared to rural damselflies. *Evol. Appl.* 14, 24-35. <https://doi.org/10.1111/eva.13041>

Van Scoy, A., Pennell, A., Zhang, X., 2016. Environmental fate and toxicology of dimethoate. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 237, 53-70. https://doi.org/10.1007/978-3-319-23573-8_3

Verheyen, J., Delnat, V., Stoks, R., 2019. Increased daily temperature fluctuations overrule the ability of gradual thermal evolution to offset the increased pesticide toxicity under global warming. *Environ. Sci. Technol.* 53, 4600-4608. <https://doi.org/10.1021/acs.est.8b07166>.

Verheyen, J., Delnat, V., Theys, C., 2022. Daily temperature fluctuations can magnify the toxicity of pesticides. *Curr. Opin. Insect Sci.*, 100919 <https://doi.org/10.1016/j.cois.2022.100919>

Verhougstraete, M.P., Martin, S.L., Kendall, A.D., Hyndman, D.W., Rose, J.B., 2015. Linking fecal bacteria in rivers to landscape, geochemical, and hydrologic factors and sources at the basin scale. PNAS. 112, 10419-10424. <https://doi.org/10.1073/pnas.1415836112>

Vilas-Boas, J.A., Arenas-Sánchez, A., Vighi, M., Romo, S., den Brink, Van, Paul, J., Dias, R.J.P., Rico, A., 2021. Multiple stressors in Mediterranean coastal wetland ecosystems: influence of salinity and an insecticide on zooplankton communities under different temperature conditions. Chemosphere 269, 129381. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.129381>

Villarroel, M.J., Sancho, E., Ferrando, M.D., Andreu, E., 2003. Acute, chronic and sublethal effects of the herbicide propanil on *Daphnia magna*. Chemosphere 53, 857-864. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(03\)00546-0](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(03)00546-0)

Wassens, S., Walcott, A., Wilson, A., Freire, R., 2013. Frog breeding in rain-fed wetlands after a period of severe drought: implications for predicting the impacts of climate change. Hydrobiol. 708, 69-80. <https://doi.org/10.1007/s10750-011-0955-2>

Wuerthner, V.P., Jaeger, J., Garramone, P.S., Loomis, C.O., Pecheny, Y., Reynolds, R., Deluna, L., Klein, S., Lam, M., Hua, J., 2019. Inducible pesticide tolerance in *Daphnia pulex* influenced by resource availability. Ecol. Evol. 9, 1182-1190. <https://doi.org/10.1002/ece3.4807>

Xiao, P., Liu, F., Liu, Y., Yao, S., Zhu, G., 2017. Effects of pesticide mixtures on zooplankton assemblages in aquatic microcosms simulating rice paddy fields. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 99, 27-32. <https://doi.org/10.1007/s00128-017-2105-7>

Zait, R., Fighir, D., Sluser, B., Plavan, O., Teodosiu, C., 2022. Priority pollutants effects on aquatic ecosystems evaluated through ecotoxicity, impact, and risk assessments. *Water* 14, 3237. <https://doi.org/10.3390/w14203237>

Zhang, C., Jansen, M., De Meester, L., Stoks, R., 2016. Energy storage and fecundity explain deviations from ecological stoichiometry predictions under global warming and size-selective predation. *J. Anim. Ecol.* 85, 1431-1441. <https://doi.org/10.1111/1365-2656.12531>

Zhang, Y., Guo, P., Wang, M., Wu, Y., Sun, Y., Su, H., Deng, J., 2021. Mixture toxicity effects of chloramphenicol, thiamphenicol, florfenicol in *Daphnia magna* under different temperatures. *Ecotoxicol.* 30, 31-42. <https://doi.org/10.1007/s10646-021-02347-z>