

03096  
2



**Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología**  
Universidad Nacional Autónoma De México



UNAM

**ESTUDIO CRÓNICO CONJUNTO DEL PARATION METILICO Y  
DENSIDAD ALIMENTICIA (*Chlorella vulgaris*): EFECTOS A NIVEL  
POBLACIONAL DE ESPECIES DE ROTÍFEROS SELECCIONADOS**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRIA EN CIENCIAS  
(LIMNOLOGÍA)**

**P R E S E N T A**

**JOSÉ LUIS GAMA FLORES**

296352  
OK.

DIRECTOR DE TESIS DR EN C. S.S.S SARMA

COMITÉ TUTORIAL: DRA NANDINI SARMA

DRA CECILIA VANEGAS PÉREZ

CIUDAD UNIVERSITARIA . MÉXICO D.F., 2001



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## INDICE

Agradecimientos	
Dedicatoria	
Síntesis	
Introducción	1-4
Antecedentes	5-6
Justificación y hipótesis	6-7
Objetivos	7
Material y métodos	
Substancia química	8-9
Organismos	9-12
Procedimientos	13-14
Valoración estadística de los datos	14-15
Resultados	
Global	
Toxicidad Agudas	16
Toxicidad Crónicas	17-30
Detalladas de cada especie	
<i>B. calyciflorus</i>	31-32
<i>B. patulus</i>	33-34
<i>E. dilatata</i>	34-36
Discusión de los resultados	
Toxicidad aguda	36-37
Toxicidad crónica	37-41
Conclusiones	42
Referencias	43-49
Apéndice	
Procedimiento para cuantificar CE <sub>50</sub> en <i>Euchlanis dilatata</i>	50-54
Anexo de artículos publicados a partir de este trabajo	

## AGRADECIMIENTOS:

Deseo expresar mi sincero reconocimiento al Dr en C. S.S.S. Sarma la dirección, su tiempo, su deferencia hacia mi, su calidad humana y sus valiosas opiniones para la realización del presente trabajo. Siento igual magnitud de agradecimiento por la Dra en C. Nandini Sarma tutora de esta investigación y quien me privilegia con su amistad, apoyo, colaboración y orientación constante para este trabajo. No tengo con que pagarles a ambos más que con un desempeño profesional que pueda enorgullecerlos. **Me aseguraré que así sea.**

Asimismo, manifiesto mi reconocimiento amplio y profundo al resto de revisores de este estudio: Dra en C Ruth Cecilia Vanegas Pérez, Dra en C Sonia Espina, Dra en C Maria Esther de la Rosa Duque, quienes con sus comentarios y sugerencias lo enriquecieron ampliamente. Sus observaciones fueron fundamentales.

También, en este espacio agradezco infinitamente al Dr en C Martín Merino Ibarra su apoyo invaluable y confianza que tuvo en mi para ingresar al posgrado que dignamente representa. A la Sra Norma Suazo, su grandísima paciencia, calidad humana y apoyo para solventar todo tipo de problema académico administrativo. A los docentes que me dieron un poco o un mucho de ellos. Para todos ellos, muchas gracias.

No podría en estos momentos olvidarme de gente, amigos que me han hecho más llevadera esta etapa de mi vida como son el M en C. Mario Fernandez Araiza (mariño), el Ing. Harm Gerdes y Martha Carmona con quienes comparto ideas discutidas a punta de cañonazos (tal como debe de ser cuando están suficientemente fundamentadas aunque a veces me han partido la mandarina en gajos). A todos ellos, les expreso que su amistad fue un aliciente moral definitivo. No podría fallar con ella.

Mención especial merecen todos los alumnos que siempre confiaron y confían en mi. En especial a Omar Rodríguez y Antonio Orozco cuyos conocimientos y habilidades computacionales resolvieron mis últimos problemas gráficos y de impresión de este trabajo. Para ellos y otros (no alcanza el espacio, perdón) mi afecto y compromiso de hacer todo lo que este en mis manos para mejorarnos recíprocamente.

## DEDICATORIA

A la memoria de quien siempre con su imagen  
normará mi vida, **mi madre, mi madre,**  
**mi madre** cuya figura y enseñanzas se  
agrandan conforme pasa el tiempo.

A mi querida hija Gisela lo mismo que  
mi Amadisimo nieto, chiqui chiqui  
Ambos son la razón primordial de mi vida

A salud también de mis consanguíneos; Ana Maria  
Ruth, Sara Margarita, Elizabeth y Alfredo. Mención  
aparte para mi hermana Juana quien junto con mi  
primo hermano, Mario Humberto Alva flores han sido  
baluartes en algunos momentos muy difíciles para mi.

## Síntesis del Trabajo

En este trabajo se estudió el efecto combinado de diferentes concentraciones de paratión metílico y niveles de la microalga verde, *Chlorella vulgaris* sobre variables poblacionales de *Brachionus calyciflorus*, *B. patulus* y de *Euchlanis dilatata*.

Los resultados mostraron que existen distintas estrategias de respuesta poblacional al tóxico por parte de las especies consideradas. En general, independiente del nivel de alimentación, se observó una reducción significativa de la máxima densidad poblacional y de la tasa de crecimiento diario de los rotíferos bajo estrés tóxico. Las máximas densidades oscilaron entre 91-400 ind./ml en tanto que el intervalo de la tasa de crecimiento varió entre 0.248-0.396 ind./día.

La toxicidad del paratión metílico en todos los tratamientos considerados tuvo una influencia dependiente de la densidad de la microalga tanto en los ensayos de toxicidad aguda (CL<sub>50</sub>) así como en los crónicos. A cualquier concentración del paratión metílico, los rotíferos alimentados con mayor densidad de alga exhibieron crecimientos poblacionales significativamente mayores que aquellos expuestos a menores niveles alimenticios.

Los resultados obtenidos hasta este momento, sugieren una sensibilidad de los rotíferos al paratión metílico decreciente, de acuerdo al siguiente orden; *E. dilatata*, *B. patulus* y *B. calyciflorus*, respectivamente.

## INTRODUCCIÓN

El crecimiento poblacional de los organismos, definido como el incremento en el tiempo de ciertos parámetros característicos como la densidad, la tasa de crecimiento y de mortalidad etc., depende de numerosas condiciones medioambientales. Variables como el consumo y disponibilidad de recursos, asociadas a condiciones físicas o químicas particulares del medio e interrelacionados entre sí, pueden ejercer efectos complejos directos e indirectos en el organismo. Así, fluctuaciones estacionales grandes en luz, temperatura y cantidad de nutrimentos (estresores) pueden provocar con frecuencia restricciones o estrés a niveles poco apropiados funcionalmente para los requerimientos de los organismos (Chapin, 1991). Bajo estas condiciones, los individuos suelen presentar crecimiento lento o nulo y baja capacidad para adquirir recursos energéticos y/o nutrimentales, entre otras características.

El estrés se ha definido de distintas formas: como el efecto de cualquier alteración ambiental que extiende o estabiliza los procesos homeostáticos por encima de sus límites promedio (Esch y Hazen, 1978 en Adams, 1990), o como la respuesta a restricciones que limitan el desarrollo de un organismo o parte de él y su reproducción por debajo del potencial del genotipo (Osmond *et al.* 1987). La mayoría de los especímenes experimenta alguna forma de estrés durante los distintos estadios de sus ciclos de vida. El estrés que por su intensidad en periodos cortos excede la tolerancia del espécimen, obviamente es letal o agudo, en tanto que el de menor magnitud y periodos mayores es subletal o crónico (Adams, 1990). Esta manifestación puede ser provocada por agentes bióticos como la competencia, parasitismo, alimentación, o bien abióticos (Bazzaz *et al.* 1987) entre los que la contaminación es uno de ellos.

En ambientes con mucha restricción, los organismos suelen mostrar dos tipos de comportamiento adaptativo: sobrellevan (toleran) o evitan. La tolerancia a un estresor faculta al organismo para mantener una alta actividad metabólica en condiciones de estrés ligero, y a reducirla ante una exposición severa. Por su parte, el mecanismo de evitación le permite a muchos organismos adecuarse con mayor facilidad al cambiante medio deviniendo en estados de latencia o dormancia cuando existe estrés severo (Osmond *op cit.* 1987; Ricci, 2001). La dormancia en los rotíferos en particular, faculta al grupo de los monogonontos a entrar en diapausa como respuesta al deterioro ambiental en fases ontogénicas específicas como las de huevo de resistencia (Ricci, *op cit.*). En complemento a lo anterior, Chapin (1991) y Adams (1990) resaltan que en el estrés crónico, considerando la ruta o mecanismo principal por la cual se afecta la estructura y la función en los distintos niveles de organización biológica, existen dos grandes grupos de tipos de estrés: directo e indirecto.

En el primero, sus efectos se perciben en el funcionamiento de componentes celulares (enzimas y membranas), en la alteración de procesos metabólicos como la respiración, la osmorregulación, la respuesta inmune e incluso la modificación del comportamiento y la reproducción del organismo. Los efectos indirectos de un estresor se expresan en principio a través de la cadena alimentaria (energía disponible para el individuo) comprometiendo la cantidad necesaria de recursos energéticos requeridos por el

individuo lo cual le impide alcanzar el máximo desarrollo y la reproducción (Adams, 1990).

En los sistemas acuáticos del mundo, debido al desmedido aumento de la industria, la urbanización, y al rápido crecimiento poblacional del hombre y de sus demandas, se han dado excesivas liberaciones de productos, desechos tóxicos (xenobióticos) que los contaminan por lo que las comunidades acuáticas están permanentemente en condiciones de estrés y con variabilidad temporal, incluso (Hanazato *et al.*, 1987). En México, de las 34 cuencas hidrológicas de importancia por su caudal, 20 de ellas presentan índices de calidad del agua (ICAs) con valores de calidad media a baja (Toledo *et al.*, 1989).

Un grupo muy importante de esas sustancias contaminantes en las aguas son los pesticidas cuyo uso para erradicar plagas en los sectores agrícolas y domésticos es una práctica normal en todo el mundo y México no es la excepción. En la actualidad en la agricultura de nuestro país, la demanda de distintos plaguicidas está en aumento (Restrepo, 1988), siendo el paratión metílico uno de ellos, si bien aparece en el catálogo oficial de plaguicidas para la república mexicana como de uso restringido (CONADE, 1991).

En condiciones naturales, el destino final de pesticida normalmente incluye los cuerpos de agua como ríos, lagos, lagunas, cauces y depósitos subterráneos, con costo de deterioro muy alto para los sistemas (Henaó y Corey, 1986). Los contaminantes interactúan física, química y biológicamente al interior de los mismos, originando modificaciones en ambos sentidos, casi siempre con efectos adversos para las comunidades al alterarse la composición específica y los procesos de autodepuración naturales (Patin, 1982). Algunos contaminantes en cantidades reducidas tienen efectos bioestimuladores y promueven la productividad primaria (Patin, *op cit.*). Sin embargo, la mayoría resultan nocivos aún en pequeñas concentraciones, como es el caso de los pesticidas, hidrocarburos y compuestos radioactivos

En toxicología, la relación dosis-efecto biológico es la más fundamental (dosis es la cantidad medida de una sustancia química o mezclas que se administra directamente a un individuo), y por lo común se estima como la cantidad que produce un efecto específico en periodos dados (Forbes y Forbes, 1994). En ecología acuática en particular, la toxicidad sobre las poblaciones se estima mediante la exploración de los efectos de uno o de una combinación de xenobióticos sobre las características estructurales y funcionales de las comunidades, y del impacto sobre la estabilidad de los ecosistemas y ciclos biogeoquímicos (Patin *op. cit.*). Cabe señalar que en este último nivel a los organismos se les expone a concentraciones conocidas de tóxico (concentraciones reales) añadidas a la comida o al medio. Ambas aproximaciones, toxicología y ecotoxicología, son de uso corriente para detectar efectos particulares a distintos niveles de organización biológica (Forbes y Forbes *op cit.*)

Para evaluar o diagnosticar el posible impacto de los xenobioticos en los sistemas, la mayoría de las pruebas estándar de toxicidad en cuerpos de agua epicontinentales, se basan en organismos indicadores, conocidos como bioindicadores. Según Hellawell (1986), éstos se caracterizan por responder predictivamente en formas cuantificables a perturbaciones o cambios del ambiente. Los organismos seleccionados para los bioensayos



se usan como reactivos de laboratorio para detectar la presencia y las concentraciones de contaminantes o bien categorizar estos en función de grados de toxicidad (McGeoch, 1998). En la actualidad se reconoce que la toxicidad de un xenobiotico debe evaluarse en un espectro de organismos (bioindicadores) que comprendan diferentes niveles tróficos para determinar globalmente la naturaleza peligrosa de un compuesto (Centeno *et al.*, 1993). Entre estos organismos se tienen las microalgas (Faust *et al.*, 1994; Megharaj *et al.*, 1994; Tadros *et al.*, 1994) algunos crustáceos (Kaur y Ansal, 1996; Versteeg *et al.*, 1997), peces (Van-Wijk y Kraaij, 1994; Neilson, 1994) y rotíferos (Snell y Janssen, 1995; Sarma *et al.*, 2000), entre otros y cuya selección depende de los objetivos de la investigación.

Previo a la última década, en las estimaciones ecotoxicológicas a nivel de población las variables de respuesta o puntos finales de uso más frecuente fueron la sobrevivencia y la tasa de mortandad de individuos en experimentación mientras que los puntos finales relacionados con fisiología, aspectos de morfología y comportamiento fueron menos comunes (Forbes y Calow, 1999). Otras variables de respuestas adicionales han sido la máxima densidad y la tasa de crecimiento. En la actualidad, está ampliamente aceptado que la vigilancia sobre los sistemas debe fundamentarse tanto en valoraciones de tiempo de exposición como de la magnitud de efecto o impacto (Van-Wijk y Kraaij, 1994). En la práctica, el efecto de la valoración está en relación con datos ecotoxicológicos de laboratorio.

Las observaciones son relacionadas con concentraciones a tiempo determinado con índices como la concentración letal a la que muere el 50% de los individuos de poblaciones en periodos de exposición dados ( $CL_{50}$ ) (Dave 1993). Otros parámetros también sensibles son la concentración mínima sin efecto (CMSE), la concentración mínima con efecto observable (CMCE) y la concentración máxima de tóxico aceptable (CMTA) entre otros (Forbes y Forbes 1994; Neilson 1994). Todos los índices anteriores, son análisis derivados de exposición tóxica de un conjunto de individuos a través de ciclos generacionales.

Por otra parte, es muy conocido que los sistemas acuáticos continentales poseen una amplia diversidad de organismos por ejemplo, fitoplancton, Protozoa, zooplancton multicelular (turbellaria, gastrotricha, cladóceros, copépodos y rotíferos), como organismos predominantes (Pennak, 1989). En estos sistemas de agua dulce, los rotíferos en particular, desempeñan una función importante en los procesos ecológicos. Regulan las abundancias del fitoplancton (Gilbert y Bogdan, 1984), de grupos de detritus y de bacterias (Dumont, 1977). Además, es muy conocida su contribución en las cadenas tróficas como fuente de alimento para muchos predadores como larvas de crustáceos y peces (Khadka y Rao, 1986). Por otra parte, los rotíferos son buenos indicadores de los cambios ambientales (Sladeczek, 1983) ya que muestran respuestas rápidas a ellos (Rao y Sarma, 1986), sobre todo por que son capaces de crecer en desechos líquidos y por ende de reducir la contaminación orgánica (Arévalo-Stevenson *et al.*, 1998) y crecer en sistemas eutróficos bajo condiciones de limitación de alga comestible y otros recursos (Merriman y Kirk, 2000). Debido a lo anterior se consideran parte fundamental de los procesos de purificación de estos sistemas. Asimismo, se consideran organismos excelentes para bioensayos de contaminación acuática y recientemente para estudios ecotoxicológicos (Snell y Janssen, 1995).

Como organismos de prueba, los rotíferos tienen la ventaja sobre otros zooplanctones de presentar tasas de crecimiento muy rápidas (0.5 días o menos para duplicarse poblacionalmente), tamaño pequeño y de fácil manipulación para contarlos (<250  $\mu\text{m}$ ), distribución cosmopolita y son principalmente partenogénicos. La reproducción partenogénica produce gran número de individuos en poco tiempo lo cual asegura el éxito de cultivos masivos y la fácil clonación. Esto último garantiza una constancia de la información genética en los individuos en experimentación (Seale *et al.*, 1993).

En general, las pruebas de toxicidad en el zooplancton, en particular en los rotíferos, se conducen a distintos niveles, por ejemplo pruebas agudas, pruebas crónicas (ciclos generacionales), a niveles de comunidad en microcosmos y mesocosmos (Neilson, 1994; Forbes y Forbes, 1994). En relación con el tiempo en que se observa una respuesta, el efecto de los tóxicos puede analizarse en dos grupos: efectos observables a corto plazo (parte del período generacional del individuo) y efectos observables a larga duración (transgeneracionales).

Las pruebas de corta duración son generalmente de toxicidad aguda. Agudo significa un estímulo fuerte que ocasiona rápidamente una respuesta de envenenamiento o disfunción, que con frecuencia conduce a la muerte del individuo. Normalmente la prueba típica con la que se evalúa es la  $CL_{50}$  (para rotíferos, las  $CL_{50}$  se establecen a las 24 h). Si bien la mortalidad es el punto final usual en una prueba aguda, puede haber otras manifestaciones de efectos agudos tales como el desequilibrio, la inmovilización, el movimiento errático y la hiperactividad, que pueden en última instancia preceder al deceso de los organismos. Todas estas respuestas exhiben síntomas de estrés fisiológico de los individuos (Sprague, 1969).

Las pruebas a largo plazo en rotíferos detectan efectos que ocurren en series de generaciones. Son pruebas subagudas o crónicas que consideran variables de ciclos de vida, historia de vida y demografía. También se abordan variables morfológicas, morfométricas, conductuales bioquímica-fisiológicas, reproducción y tasas de crecimiento poblacional entre otras (Neilson, 1994; Sarma y Nandini, 1999) o de ensayos que delimitan efectos carcinogénicos, mutagénicos o teratogénicos. En estos dos últimos se evalúan genotóxicos que alteran el genoma y para los cuales no existen en principio concentraciones mínimas permisibles (Biddinger y Gloss, 1984). Halbach (1984) señala que es útil cualquier variable diferente de la mortandad que se pueda estimar numéricamente, y se adecúe de acuerdo a las características de los organismos en ensayo y a su accesibilidad experimental como son algunas de las variables ya citadas previamente. Para detectar y cuantificar el impacto del xenobiótico en las variables, se utilizan experimentos de tiempos de exposición y con distintas concentraciones de pesticida. En ecotoxicología, el efecto crónico de la contaminación en sistemas dulceacuícolas es la respuesta observada con más frecuencia (Foster *et al.*, 1994)

## ANTECEDENTES

Uno de los pioneros en ecotoxicología usando rotíferos fue Halbach (1979) quien trabajó dinámicas poblacionales de los rotíferos en el laboratorio bajo condiciones de estrés por tóxicos y distinguió efectos agudos y subletales o crónicos que le permitieron obtener modelos y predecir el crecimiento en el laboratorio. El autor argumenta que los efectos tóxicos no detectables en el nivel de individuo, podrían ser amplificados en una población, consistente en millones de especímenes. Halbach *et al.*, (1983) desarrollaron sistemas de medición usando aspectos de la dinámica de la población como puntos finales de detección del efecto tóxico subletal en los sistemas acuáticos. A partir de estas investigaciones, se exploró su potencialidad para establecer los efectos tóxicos, agudos en particular, sobre aspectos de reproducción y mortalidad, pruebas que en su mayoría se han realizado con miembros del género *Brachionus* (Snell y Persoone, 1989).

Otras investigaciones se hicieron con objeto de detectar niveles tóxicos en el medio, evaluando variaciones morfométricas de especies particulares del sistema (Stemberger y Gilbert, 1984), sobre variables de comportamiento como la actividad natatoria (Snell *et al.*, 1987; Janssen *et al.*, 1994), y sobre las estrategias alimenticias (Fernández-Casalderrey *et al.*, 1992). También se han abordado investigaciones en relación a los factores ambientales bióticos (tipo y densidad de alimento), y abióticos (pH, temperatura, salinidad) observando los cambios que éstos producen, sobre las poblaciones en laboratorio y en condiciones naturales (Snell y Janssen, 1995). Se ha estudiado el papel de tóxicos como estresores y la relación con alimentación en *Brachionus rubens* (Kooijmann y Metz, 1984. Al respecto, Rao y Sarma (1986) encontraron que la alimentación influye en la magnitud de la toxicidad de pesticidas en los rotíferos, en tanto que Merriman y Kirk (2000) determinaron la ocurrencia, intensidad y variación temporal de la limitación de recursos alimenticios en poblaciones naturales de rotíferos herbívoros en sistemas eutróficos. Por su parte, Persoone (1991) empleó braquiiónidos para estimar los niveles tóxicos de descargas agrícolas e industriales. En referencia a las enzimas relacionadas con el metabolismo de xenobioticos, Bowman *et al.*, (1990) aislaron y caracterizaron en *B. calyciflorus* y *B. plicatilis*, la glutation S- transferasa considerada como crítica en dicho proceso. Liber y Salomon (1995) informan de la sensibilidad a tóxicos y períodos de exposiciones de varios grupos planctónicos (cladóceros y rotíferos).

Para México, el manejo de rotíferos en evaluaciones de deterioro o restricciones ambientales es relativamente reciente. Por ejemplo, Vilaclara y Sladeczek (1989) y Flores-Burgos (1997), realizaron estudios de la calidad del agua de varios sistemas utilizando a los rotíferos como bioindicadores detectores de la calidad del agua. Por su parte, Rico-Martínez Pérez-Legaspi (1997) desarrollaron bioensayos toxicológicos con rotíferos y su aplicación para programas de vigilancia de la calidad del agua proveniente de sistemas abastecedores para el Municipio de Aguascalientes. También, De la Vega-Salazar *et al.* (1997) en una investigación sobre la presencia y destino del paratión metílico en el ambiente de la presa Ignacio Ramírez, Estado de México, cuantificaron la cantidad del pesticida que se compartamentaliza en rotíferos del sistema, lo mismo que otros grupos faunísticos.

Más recientemente, Sarma *et al.* (1998) comunican sus hallazgos del impacto en el crecimiento poblacional del rotífero depredador *Asplanchna sieboldi* alimentado con presas expuestas al tóxico órgano fosforado, paratión metílico. Este mismo autor y colaboradores (2000), realizan una comparación de la sensibilidad de dos especies de braquiúridos expuestas combinaciones de metales pesados y niveles de alimentación. Otras variables consideradas para estimar la calidad del medio son los cambios morfológicos en respuesta a condiciones particulares (Sarma y Martínez-Figueroa, 2000), y su uso como biomarcadores enzimáticos para detectar tóxicos en medios acuáticos de Aguascalientes y Jalisco (Rico-Martínez *et al.*, 2000). Por su parte, Pérez-Legaspi y Rico-Martínez (2001) estimaron la toxicidad aguda en tres especies de Lecanidae.

Como se puede observar, cualquier rasgo que afecte de manera adversa la morfología, la reproducción de una biota o su papel en el sistema, puede considerarse como indicador de alguna situación de estrés (Sarma, 1996).

## JUSTIFICACIÓN

El paratión metílico frecuentemente no es detectable a concentraciones mayores a 1 mg/l en los sistemas acuáticos (De la Vega-Salazar *et al.*, 1997) debido a su escasa persistencia (Megharaj, *et al.*, 1994; Mok *et al.*, 1994 ) y cuando así sucede las concentraciones se encuentran en valores menores a las propuestas de aceptables por organizaciones internacionales como la FAO. Para México, existe muy escasa literatura al respecto y no se documenta su presencia en sistemas naturales, sólo excepcionalmente (De la Vega-Salazar *op cit.*). Sin embargo, la contaminación reciente puede representar una seria amenaza para las comunidades acuáticas, en particular para el zooplancton que es más sensible.

Por otra parte, en las últimas décadas, las agencias evaluadoras oficiales aceptan cladóceros de agua dulce para la mayoría de los bioensayos sobre toxicidad. De hecho, las pruebas de toxicidad aguda y crónica con los dáfnidos están formalmente aprobados por muchas agencias internacionales (Snell y Jansen, 1995). En México, para evaluaciones toxicológicas de las descargas industriales se utiliza al cladóceros *Daphnia magna* (Martínez-Jerónimo y García, 1994). Sin embargo, en atención a las enormes ventajas que tiene el uso de rotíferos como indicadores de deterioro ambiental por contaminantes, algunos países como los Estados Unidos, han incorporado algunas especies del género *Brachionus* en pruebas oficiales (ASTM, 1991).

Para México, en referencia a los indicadores, esto no es de uso común y sólo recientemente se han iniciado estudios con rotíferos para la evaluación de ecotoxicidad en el laboratorio (Sarma *et al.*, 1998; Rico-Martínez *et al.*, 1999; Sarma *et al.*, 2000 entre otros), por lo que es necesario continuar con estas investigaciones, integrando otras especies muy comunes en los cuerpos de agua nacionales y evaluando el efecto de pesticidas de uso frecuente.

Utilizando rotíferos como organismos de prueba y con el fin de aportar información sobre las respuestas a plaguicidas de uso frecuente en los cuerpos de agua en el Valle de México y áreas cercanas, se supone que:

- La sensibilidad al paratión metílico es diferente entre las especies de rotíferos
- La limitación alimenticia aumenta la sensibilidad a los tóxicos
- La toxicidad del paratión metílico, dependiente de la densidad de alimento, interfiere en el crecimiento de las poblaciones

Para intentar esclarecer estas interrogantes, se diseñaron los siguientes objetivos.

#### OBJETIVO GENERAL

- Evaluar el efecto conjunto de la toxicidad del paratión metílico y de la densidad de alimento en el crecimiento poblacional de tres especies de rotíferos

#### OBJETIVOS PARTICULARES

- Determinar la concentración letal media ( $CL_{50}$ ) del paratión metílico de las especies, *Brachionus calyciflorus*, *Brachionus patulus* y *Euchlanis dilatata*.
- Estudiar el efecto de concentraciones subletales (crónicas) del paratión metílico para cada especie sobre el crecimiento poblacional a distintos niveles de densidad alimenticia con la microalga, *Chlorella vulgaris*.
- Establecer el efecto conjunto de los niveles alimenticios y de toxicidad crónica del pesticida sobre la tasa de crecimiento poblacional de los rotíferos en estudio
- Comparar las tasas de crecimiento poblacional bajo condiciones normales y experimentales
- Calcular la concentración efectiva media ( $CE_{50}$ ) del paratión metílico en las especies de rotíferos mantenidos con diferentes niveles alimenticios
- Comparar las sensibilidades relativas de dichos organismos al tóxico.

## MATERIALES Y METODOS

### Substancia química

El paratión metílico es un compuesto fosforado, 0,0-dimetil-0-(p-nitrofenil) fosforotioato. Dicho compuesto es un plaguicida dirigido al control de insectos; presenta un principio activo que inhibe la acción de la enzima colinesterasa, la cual es responsable de la transmisión nerviosa. Su forma de acción parece ocurrir como consecuencia de la alteración del transporte iónico en la membrana de excitación (De Fernicola, 1985).

En general, el paratión metílico es menos persistente y bioacumulable que otros plaguicidas organoclorados; dependiendo de las condiciones puede persistir durante 1 a 3 meses, en su forma original o en compuestos nitrofenólicos, entre otros (Megharaj *et al.*, 1994; Mok *et al.*, 1994).

El desarrollo y el estudio del paratión metílico y otros órgano fosforados, se inició con la investigación de "gases nerviosos" empleados en la segunda guerra mundial. A la fecha se encuentra entre los plaguicidas más ampliamente utilizados en el mundo, y se aplican a muchos cultivos alimenticios y textiles para su protección contra una amplia gama de insectos. Su uso aumentó dramáticamente como respuesta al reconocimiento de la resistencia de las plagas. La cantidad que se produce es difícil de establecer ya que no existen fuentes disponibles con datos oficiales por una parte y por otra, debido a que el mismo producto se comercializa bajo diversas presentaciones (más de 25), algunas de las cuales son Arethion, Folidol, Metacide, Paratox, Technathion, Viticarb y Wofatox (Restrepo, 1988).

**Toxicidad Aguda:** La organización mundial de la salud (OMS) clasifica al paratión metílico como extremadamente tóxico con base en su toxicidad aguda. El compuesto químico es altamente tóxico para muchos mamíferos por todas las rutas de exposición, ingestión, absorción por la piel o inhalación. Para la primera, Gallo y Lawryk (1991) y Smith (1993) estimaron  $CL_{50}$  con valores de 6 a 50 mg/kg en ratas, 14.5 a 19.5 mg/kg en ratones, 420 mg/kg en conejos, 1270 mg/kg en puercos de Guinea y 90 mg/kg en perros. Por vía dérmica los valores de  $CL_{50}$  encontrados fueron de 67 mg/kg en ratas, 1200 mg/kg en ratones, y 300 mg/kg en conejos. Para la vía respiratoria, las estimaciones de  $CL_{50}$  en 1-hora de inhalación del paratión metílico en ratas fue 0.24 mg/l (Gallo y Lawryk, *op cit*). Los efectos de las exposiciones agudas relacionados al paratión metílico son semejantes a las de otros tóxicos órgano fosforados (U.S, 1995)

**Toxicidad Crónica :** Los estudios en voluntarios humanos han demostrado que 1 a 22 mg/persona x día no tienen efecto en la actividad de la colinesterasa. Sin embargo, se observó cierta inhibición de dicha enzima cuando se administraron dosis de 22, 24, 26, 28 or 30 mg/persona x día de paratión metílico a grupos de voluntarios durante un mes. Los grupos fueron los de dosis de 24, 26 y 28 mg/persona x día. En el tratamiento de 30 mg/persona x día (aproximadamente 0.43 mg/kg x día), la actividad de la enzima se deprimió casi en un 37%. Cuando se administró el tóxico en perros a niveles de 1.25 mg/kg durante tres meses, se encontró una disminución significativa de la colinesterasa en células sanguíneas y en el plasma. A dosis de 0.125 mg/kg no produjo efecto (Gallo y Lawryk, *op cit*).

## Efectos ambientales en el medio acuático

El paratión metílico es altamente tóxico para los vertebrados e invertebrados acuáticos y para las aves y otros organismos que se alimentan de la fauna acuática, y moderadamente tóxico para otros organismos a los que no estaba dirigido el control. Los estudios de campo indican que el paratión metílico puede afectar la reproducción de una gran cantidad de organismos, entre ellos *Daphnia* spp. y anfípodos (U.S, 1995; Kidd y James, 1991)

**Regulación.** El paratión metílico es uno de los 35 productos químicos considerados como peligrosos cuya venta o comercialización está severamente restringida en varias partes del mundo (U.S, 1995) y en México oficialmente está fuertemente regulado (Restrepo, 1988) lo mismo que otros países latinoamericanos.

## Degradación

El paratión metílico se degrada rápidamente en agua de mar y en agua dulce, ocurriendo el 100 % de la degradación en un lapso entre 15 días y 30 días aproximadamente. La degradación es más rápida en aguas dulces y en presencia de sedimentos. La degradación completa se realiza a una tasa del 5 al 11 % en aguas dulces y es más lenta en las salinas. En el agua, el paratión metílico sujeto a fotólisis, presenta una vida media de 8 días durante el verano y de 38 durante el invierno (Howard, 1991). Su consumo y metabolismo por algunas plantas pueden ser muy rápidos; 4 días en hojas de maíz (Howard, *op cit*). En microalgas, existen datos de adsorción a la superficie celular (coeficiente con valor de 5100), y de su metabolismo pero sólo cuando se utiliza como fuente alternativa de fosfatos en la solución nutritiva para crecimiento (Smith, 1993; Johnson y Finley, 1980).

## Organismos

### Alga.

*Chlorella vulgaris* es una microalga, unicelular de aproximadamente 5  $\mu\text{m}$ , usualmente de forma esférica, casi siempre simétrica. Es muy común en los cuerpos de agua del Valle de México, pero también en el medio atmosférico, en la ENEP Iztacala (Vega-Quintero, 1997). Taxonómicamente se ubica en la división Chlorophyta, clase Chlorophyceae, orden Chlorococcales, familia Chlorococcaceae. *Chlorella* fue de las primeras algas en ser aisladas y desarrolladas en cultivo puro; Beijerinck lo hizo en la última década del siglo XIX (Hama y Miyachi, 1988). A partir de esas observaciones, numerosos trabajos han demostrado que algunas algas unicelulares son relativamente fáciles de cultivar y tienen múltiples aplicaciones. En acuicultura, sirven como excelente fuente de alimento vivo para los cultivos de apoyo y las larvas de muchos organismos acuáticos (De Pauw y Persoone, 1988).

*Chlorella vulgaris* en particular, es una especie que ha sido sujeto de mucha investigación no sólo como modelo de desarrollo o metabólico (Richmond, 1986) sino también con relación a la toxicidad por pesticidas en el ambiente (Fargasova, 1994; Kent y Currie, 1995; Jay, 1996). El alga fue originalmente recolectada del ambiente atmosférico del entorno de las instalaciones de la ENEP-I (Vega Quintero, 1997).

## Rotíferos

El phylum Rotifera es un grupo de invertebrados microscópicos, acuáticos o semiacuáticos, que comprende aproximadamente unas 2000 especies de organismos no segmentados, bilateralmente simétricos y pseudo celomados (Nogrady *et al.*, 1992). Los rotíferos en general poseen dos características distintivas: una región ciliada en la parte apical llamada "corona" la cual usan para su locomoción y para la recolección de su alimento, y la otra es una faringe muscular llamada "mastax", constituida por un complejo conjunto de mandíbulas endurecidas llamadas "trofi". El tamaño de los rotíferos oscila entre 40 y 1000  $\mu\text{m}$  de longitud, aunque las especies más grandes pueden sobrepasar las 2000  $\mu\text{m}$  (Pennak, 1989). Unas especies son parásitas pero la mayoría se alimenta de partículas vivas en suspensión como microalgas, bacterias o incluso de detritus. Otros son depredadores ocasionales u obligados. El cuerpo es alargado o de forma de saco, en ocasiones cilíndrico o de apariencia de gusano. Típicamente, el cuerpo está constituido por tres regiones, cabeza, tronco y pie. La cabeza que incluye la corona, la boca y varios órganos sensores y apéndices. El tronco incluye los aparatos digestivos, excretores y de reproducción. Los rotíferos poseen un integumento o pared celular de distintos espesores que en algunas especies es muy gruesa y los organismos que la presentan se le conoce como rotíferos *loricados*, en oposición a los *iloricados*. El pie se puede presentar en posición ventral o terminal y normalmente consiste de dos dedos pero podría variar desde cero hasta cuatro. En los pies pueden existir glándulas que secretan un pegamento pegajoso que les permite una adherencia temporal a ciertos sustratos.

Con respecto a la reproducción los rotíferos son, puramente partenogénéticos o producen machos por un período muy breve, en ocasiones unos cuantos días de la estación o del año. Se reproducen asexualmente la mayor parte de su ciclo de vida, produciendo sólo hembras (partenogénesis). Estas producen un huevo con cubierta delgada que no es fecundado y que sólo produce hembras amícticas hasta que cambios en los factores ambientales disparan la producción de hembras míticas. La presencia de huevos míticos originados por este tipo de hembras es muy importante con relación a su fecundación: en caso de no ser fecundados, los huevos míticos presentan una cubierta delgada y producen individuos machos. Cuando los huevos míticos son fecundados, se secreta un cascarón resistente que le permite al huevo soportar restricciones ambientales. Estos huevos se conocen como "huevos de resistencia o de latencia" y facultan a las poblaciones de rotíferos para sobrevivir los drásticos cambios del entorno (Ruttner-Kolisko, 1974, Ricci, 2001). Cuando las condiciones se tornan favorables, estos huevos eclosionan en hembras amícticas y se repite el ciclo. La fase amíctica y la mítica comprenden lo que se conoce como partenogénesis cíclica. Sus tasas de reproducción son más altas que las de cualquier otro metazoa. Además, tienen uno de los tiempos generacionales más cortos dentro del reino



animal (de 4-7 días) por lo que sus crecimientos poblacionales pueden medirse en muy pocos de días (Snell y Janssen, 1997).

Los factores fisicoquímicos y biológicos con mayor influencia en la distribución, abundancia y de los límites de los nichos en los rotíferos son la temperatura, el pH, la concentración de oxígeno además de la depredación y los niveles de alimento, respectivamente (Nogrady *et al.*, 1993). Muchas especies viven en un amplio intervalo de temperatura que oscila desde condiciones frías hasta muy cálidas si bien en el rango de 15 y 30°C incluye un grupo numeroso de especies. La ocurrencia de los rotíferos con relación al pH se halla entre valores de 4-10 aunque en el intervalo de 6.5-8.5 es donde existe el mayor número de especies. La mayor cantidad de especies de rotíferos se desarrolla mejor en aguas con concentraciones de oxígeno > 2.0 mg/l, pero también es posible encontrar organismos permanentemente asociados a condiciones de escasa oxigenación. En general, las hembras amícticas se reproducen en un intervalo más amplio de temperatura, salinidad, pH y niveles de alimentación del que lo hacen las formas mícticas (Nogrady *et al.*, 1993).

La mayoría de los rotíferos son de medios dulceacuícolas, y algunos géneros son propios de medios salobres y marinos. En los primeros ambientes, los rotíferos son extremadamente importantes ya que pueden poblar nichos vacíos con rapidez extrema, por su oportunismo, gran capacidad de adaptación y por convertir la producción primaria de algas y bacterias en formas más accesibles para los consumidores secundarios como larvas de distintos organismos, por ejemplo (Castellanos-Páez *et al.*, 1999). Consumen varias veces lo equivalente a su peso corporal por día, asimilando y alcanzando eficiencias de biomasa planctónica total hasta del 30 % (Nogrady *et al.*, *op cit*). En este tipo de sistemas, los rotíferos presentan una amplia distribución alcanzando densidades que oscilan desde 1,000 hasta de 5,000 ind./l e incluso de 50,000/l en algunos medios de aguas naturales en Australia (citado en Sarma, 1991), razón por la que aportan cantidades notables de biomasa disponible para los niveles tróficos superiores.

Se les puede encontrar en distintos hábitats como formas planctónicas, como litorales-bénticas o como formas bénticas. Las primeras son libremente nadadoras y suelen alimentarse de partículas en suspensión, las segundas son formas semiplanctónicas que se alimentan de vegetación, algas filamentosas y detritus. Las especies bénticas se caracterizan por ser reptantes y toman su alimento succionándolo del fondo del sistema. Los distintos hábitats reflejan la autoecología de las especies. Se reconocen por lo común, tres clases de rotíferos: Seisonidea, Bdelloidea y Monogononta. En este último, se encuentra aproximadamente el 80 % de las especies y se subdivide en tres ordenes, Collothecacea, Flosculariacea y Ploimida, respectivamente. El orden más diverso de los tres es Ploimida, en el cual se encuentran algunas de las familias con especies muy comunes (Nogrady *et al.*, *op cit*).

a) *Brachionus calyciflorus* es una especie planctónica muy propia de sistemas dulceacuícolas y es considerada como cosmopolita por su amplia distribución (Koste, 1978). Las condiciones ambientales en las que se distribuye comúnmente, incluyen temperaturas subcálidas y cálidas, pH ligeramente alcalinos, oxigenados y meso o eutróficos en relación a la materia orgánica particulada en suspensión (Rutter-Kolisko, 1974). Debido a estos aspectos, ha sido reconocida como especie de bioensayo por la

Sociedad Norteamericana de Pruebas y Materiales (American Society of Testing and Materials (ASTM), 1991). Al respecto, de esta especie existe disponible amplia información sobre pruebas de toxicidad, no obstante, muchos de los datos se relacionan con evaluaciones de toxicidad aguda o crónicas que involucran metales pesados (Snell y Janssen, 1995).

En virtud de que *B. calyciflorus* también se localiza en muchos de los cuerpos de agua de México, es importante estudiar los efectos subletales del paratión metílico en esta especie. Este rotífero crece comúnmente dentro de un amplio intervalo de densidad de alga,  $0.5 \times 10^6 - 40 \times 10^6$  cel./ml sí bien su óptimo oscila en torno de  $6.0 \times 10^6$  cél./ml (Sarma *et al.* 1996). Las poblaciones utilizadas en este estudio provienen de una cepa desarrollada en nuestro laboratorio y cuyos progenitores fueron colectados y aislados del lago de Chapultepec. El tamaño medio de los individuos utilizados fue de  $175 \pm 18 \mu\text{m}$ .

b) *Brachionus patulus* (sinonimia. *Platyonus patulus*) es también una especie cosmopolita. Se menciona entre las primeras especies conocidas de la familia Brachionidae. Si bien se le encuentra con mucha frecuencia en recolectas planctónicas, por lo general se le considera como ticopláncico (pseudoplancton) (Ruttner-Kolisko, 1974). El hecho anterior significa que esta especie es capaz de alimentarse de alga planctónica así como de detritus (Nogrady *et al.*, *op cit*; Sarma *et al.*, 2000). Se encuentra por lo general en cuerpos de agua con vegetación de plantas superiores (macrofitas), cerca de ellas y en aguas con temperaturas cálidas y de condiciones alcalinas (Koste, 1978). Esta especie ha sido utilizada como alimento vivo para larvas de peces (Khadka y Rao, 1986), y estrategias de historia de vida (Pavón-Meza, 2000) incluyendo la competencia con otros rotíferos (Sarma y Rao, 1991; Sarma *et al.*, 1999). Previo a esta investigación, el único pesticida cuyos efectos habían sido evaluados sobre esta especie, era el DDT (Rao y Sarma, 1986). Los individuos de esta especie fueron inicialmente recolectados y aislados para su cultivo intenso, de la Presa Santa Elena, Estado de México (Sarma *et al.*, 1999). La longitud media de los individuos en cultivo fue de  $100 \pm 2 \mu\text{m}$

c) *Euchlanis dilatata* es una especie de rotífero cosmopolita. Se le designa como de litoral-béntica o perifítica de cuerpos de agua dulce. En general, la especie es capaz de ingerir algas verdes perifíticas y detritus (Koste, 1978). Así es importante en la cadena trófica debido a la transferencia de energía de las algas hasta una producción secundaria (Hutchinson, 1967). En la naturaleza, los especímenes de *E. dilatata*, suelen tener gran variabilidad corporal, de 100 a 350  $\mu\text{m}$  (Koste, 1978). Algunos aspectos sobre crecimiento somático y dinámica poblacional de esta especie han sido estudiado por King (1967). Sin embargo, esta especie no ha sido utilizada en estudios ecotoxicológicos en condiciones de laboratorio. La especie se recolectó y aisló para su reproducción masiva del cuerpo de agua, Tezozomoc, delegación Atzacapozalco, hacia el NW de la misma. En este trabajo, los animales en cultivo presentaron tamaños de  $204 \pm 16 \mu\text{m}$ .

Por otra parte, un balance global sobre pruebas de toxicidad con rotíferos permite apreciar que las pruebas se concentran con taxa planctónicas. Sin embargo, los taxa litoral bénticos también son importantes porque las sustancias se pueden sedimentar en el lecho o cerca de la vegetación de los cuerpos de agua y en consecuencia pueden afectar a los organismos que ahí moran o tienen contacto con el sedimento. Frecuentemente se ha sugerido que los taxa litorales son más resistentes que los planctónicos (Pérez-Legaspi y Rico-Martínez,

1998) no obstante, existe una clara necesidad de obtener mayor información para dilucidar dicha especulación por lo que el presente trabajo se enfocó en dicho análisis, entre otros.

### **Procedimientos**

Los rotíferos utilizados en este trabajo se cultivaron masivamente usando una solución fisiológica estandarizada conocida como " agua reconstituida o medio EPA". Este medio se preparó disolviendo 96 mg de NaHCO<sub>3</sub>, 60 mg de MgSO<sub>4</sub>, 60 mg de CaSO<sub>4</sub> y 4 mg de KCl por litro de agua (Anonymous, 1985). Las características de la solución fisiológica fueron de 27-28 °C, pH de 7.5, y aireación constante que permiten el buen desarrollo de muchas especies de *Brachionidae* y otras familias de rotíferos (Snell *et al.*, 1987). Los rotíferos se mantuvieron en condiciones de iluminación difusa, y se les alimentó *ad libitum*, con la microalga *Chlorella vulgaris* Beijerinck.

El alga se cultivó en forma masiva, en condiciones asépticas, en botellas de plástico de 2000 ml, con iluminación artificial continua (aproximadamente 1000-2000 lux), con aireación constante, a temperatura de 25-26°C en el medio de crecimiento basal de Bold (Borowitzka y Borowitzka, 1988). Como fuente de carbono adicional al medio de cultivo, se utilizó bicarbonato de sodio. Referente a la cosecha de la microalga, esto se hizo cuando el alga se encontraba en fase de crecimiento logarítmico y se centrifugó a 1000 g durante 3-5 min con el fin de concentrarlas para su uso experimental.

Para los ensayos experimentales con el paratión metílico (grado reactivo, Bayer), se preparó una solución madre (stock) de 500 mg/l y se almacenó en botella ámbar a 4 °C durante el periodo experimental. Las soluciones de ensayo particulares para cada especie (Tabla 1) se prepararon diluyendo volúmenes específicos de la solución stock en medio sintético EPA y se llevaron hasta las concentraciones tóxicas utilizadas.

Las densidades algales se eligieron mediante bioensayos previos en los cuales se detectó las concentraciones mínimas y máximas de este alimento donde las poblaciones de rotíferos crecieron con ausencia de síntomas de deterioro del medio. Los rotíferos son un grupo de invertebrados que exhiben una reproducción partenogenética bajo condiciones ambientales favorables y suelen reproducirse sexualmente cuando las condiciones del medio se tornan adversas. Así, la aparición de machos de una especie parece un síntoma de cambio ambiental (Nogrady *et al.*, 1993). Las densidades de la microalga (x 10 cél./ml) se cuantificaron con la ayuda de un hemocitómetro.

### **Pruebas de Toxicidad**

Para analizar la influencia del plaguicida sobre la dinámica de la población de las especies de rotíferos, se siguieron protocolos estándares oficiales de ASTM (1991) que se detallan a continuación.

- a) Toxicidad aguda. La prueba de toxicidad aguda más común se basa en la mortalidad de los individuos a tiempos de exposición fijos y distintas concentraciones del tóxico, y se estima la concentración letal a la cual muere el 50 % de la población experimental (CL<sub>50</sub>). La CL<sub>50</sub>-24 h se calculó con el Método Probit o Método de las Unidades

Probabilísticas (Finney, 1971). El bioensayo de toxicidad aguda consistió en exponer en viales de 50 ml de 100 individuos en 25 ml de medio EPA a seis concentraciones del pesticida, incluido el ensayo testigo durante un período de 24 h (adecuado para rotíferos) y se observó la mortandad al final de dicho tiempo. Para cada tratamiento se efectuaron tres repeticiones. Todos los experimentos se realizaron con alimento en el medio, sin embargo, se optó también por llevar a cabo un ensayo sin alimento. El criterio de muerte en los individuos fue la ausencia de movimiento durante 15 segundos.

- b) Toxicidad crónica. Para seleccionar las concentraciones crónicas o subletales del tóxico, se tomaron como referencias, valores de concentraciones letales medias mencionadas en la literatura (Fernández-Casalderrey *et al.*, 1992; Snell y Janssen, 1995) para distintas condiciones experimentales para el mismo tóxico (mg/l para 24 h) y rotíferos *Brachionidae*, así como  $CL_{50}$  de bioensayos personales previos que evidenciaron los intervalos de los niveles del tóxico que permitieron crecimientos poblacionales en esas condiciones. Todas las concentraciones del pesticida fueron nominales. Individuos de todas las edades de las especies seleccionadas, se expusieron al tóxico y se observaron sus respuestas a intervalos regulares, cada 24 h, durante sus ciclos de vida. En virtud de que la primera edad reproductiva de los rotíferos es antes de las 24 h, la inclusión de neonatos o juveniles no pueden afectar los patrones de crecimiento poblacional (Ruttner-Kolisko, 1974).

Los experimentos se llevaron a cabo en viales de plástico de 50 ml con 25 ml del medio. Se consideraron de 4-7 concentraciones del contaminante y 3-4 concentraciones de algas dependiendo de la especie (Tabla 1). Los ensayos se iniciaron con densidades de 10 ind./ml, en cada una de las concentraciones. Los viales se mantuvieron en baño María con temperaturas controladas de 26-27°C e iluminación fluorescente difusa y constante. A intervalos regulares de 24 h se cuantificaron las densidades de los individuos sobrevivientes de cada uno de los tratamientos usando alícuotas de 1-3 ml del total o bien analizando todo el volumen y se les cambió de medio experimental diariamente. Cada tratamiento tuvo 3-5 repeticiones con el fin de obtener mayor reproducibilidad y exactitud en los ensayos.

Las distintas concentraciones experimentales tanto de alga como las del tóxico en el medio de ensayo, se obtuvieron por dilución con medio EPA. Para los recambios de cada día, se mezclaron el doble de las concentraciones requeridas tanto de tóxico como del alga en proporciones iguales antes de usar el medio con el fin de evitar una posible pérdida del pesticida por el alga en ausencia de los individuos experimentales. El tiempo del ensayo se estableció hasta que la mayoría de los organismos cumplieron un ciclo poblacional o declinaron su crecimiento de forma evidente.

Para calcular la tasa de crecimiento poblacional ( $r$ ) se usó la ecuación exponencial de Krebs (1985):  $r = (\ln N_t - \ln N_0)/t$ , donde  $N_0$  = densidad inicial;  $N_t$  = densidad final (ind./ml) durante el tiempo ( $t$ ) en días.

Con base en los datos anteriores, se calculó el valor de la concentración efectiva media que reduce la tasa de crecimiento de la especie al 50% de la del testigo ( $CE_{50}$ ) de cada especie. Esto se realizó, graficando la concentración de alimento en el eje de las

abscisas y los valores de CE<sub>50</sub> en el de las ordenadas y luego se obtuvo el valor mediante regresiones lineales (Janssen *et al.*, 1994; Sarma *et al.*, 1999). Cabe destacar, que la CE<sub>50</sub> sólo se calculó para la tasa de crecimiento poblacional diario (r) en virtud de que esta variable fue muy sensible a todas las concentraciones tóxicas ya que toma en consideración la densidad, la abundancia máxima y el crecimiento de la población por día así como el factor tiempo (un ejemplo del proceso se anexa en el apéndice).

Para establecer la significancia de los efectos tanto de las concentraciones del tóxico como de los niveles alimenticios se utilizó un análisis de varianza (ANVA) de dos factores (Sokal y Rohlf, 1981). La diferencia significativa entre los grupos se estableció por la prueba de Duncan.

Tabla 1. Características de los tratamientos experimentales realizados en las pruebas con toxicidad aguda y crónica del paratión metílico (mg/l) y del alga *Chlorella vulgaris* ( $\times 10^6$  cél./ml) en las especies de rotíferos seleccionadas.

Tratamientos	<i>Brachionus calyciflorus</i> Pallas	<i>Brachionus patulus</i> Müller	<i>Euchlanis dilatata</i> Ehrenberg
<b>Toxicidad Aguda</b>			
a) Concentración de Paratión metílico (mg/l)	0.0, 2.5, 5.0, 10, 20, 30	0.0, 1.25, 2.5, 5.0, 7.5, 10, 12.5, 15	0.0, 0.625, 1.25, 2.5, 5.0, 10
b) Densidades de alga ( $\times 10^6$ cél./ml) usada para la CL <sub>50</sub> 24 h	(0.5)**	0.0, 1.5 y 3.0	1.0
Número de repeticiones	Tres por cada tratamiento	tres por cada tratamiento	tres por cada tratamiento
<b>Toxicidad crónica</b>			
a) Concentración de Paratión metílico (mg/l)	0.0, 5.0, 10.0, 20.0, 30.0	0.0, 0.16, 0.31, 0.62, 1.25, 2.5, 5.0, 10.0	0.0, 0.0625, 0.125, 0.250
b) Densidades de <i>Chlorella vulgaris</i> ( $\times 10^6$ cél./ml)	0.75, 1.5, 3.0, 6.0	0.75, 1.5, 3.0, 6.0	0.50, 1.0, 2.0
Número de repeticiones	cinco por cada tratamiento	tres por cada tratamiento	tres por cada tratamiento

\*\* Tomada de referencia de Sarma *et al.*, 1998

## RESULTADOS

Al comparar la toxicidad de paratión metílico en las especies de rotíferos resaltan los siguientes puntos: las respuestas de los organismos a las distintas condiciones experimentales fueron especie específicas. Las tres especies tuvieron dinámicas poblacionales cuyas densidades y tasas de crecimiento se manifestaron en intervalos alimenticios y de toxicidad particulares. Esto indujo a describir las respuestas independientemente. Sin embargo, cuando fue posible, se realizaron descripciones globales.

### Toxicidad aguda

En los resultados de la exposición aguda (Tabla 2), se detectó un aumento significativo (alrededor del 80%) en el valor de la CL<sub>50</sub> cuando el ensayo se condujo con alimento disponible para los individuos, contrario a cuando se realizó sin él (esto último sólo se evaluó para *B. patulus* y fue con la intención de separar el efecto del tóxico de aquél del alimento (Tabla 2). En las poblaciones con alimento en el medio, el valor de la CL<sub>50</sub> aumentó conforme se incremento el nivel alimenticio. La diferencia del valor de la CL<sub>50</sub> entre los niveles de alimento fue de 17 %, tomando como referencia a *B. patulus*. La diferencia del estrés tóxico entre los braquiiónidos oscila entre 2 y 12 veces de incremento, según las distintas cantidades de alimento disponible. En los datos también se observó que *Euchlanis dilatata* fue más sensible al estrés agudo que las especies de *Brachionus*. Se observó una tolerancia diferente entre las especies (Tabla 2); la tolerancia es mayor en *B. calyciflorus* y *B. patulus* que en *E. dilatata*. Si bien sólo se realizaron valoraciones de toxicidad aguda bajo diferentes niveles alimenticios para *B. patulus*, fue evidente en los resultados que las estimaciones de la CL<sub>50</sub> dependieron de la densidad de alimento disponible. Así, cuando se administró un nivel alimenticio de  $1.5 \times 10^6$  cél./ml, la concentración de paratión metílico necesaria para causar la muerte del 50% de los individuos en experimentación fue de aproximadamente 9 mg/l. Al duplicar la concentración disponible de *Chlorella*, la CL<sub>50</sub> cambió a un valor superior de 11 mg/l indicando un efecto positivo de la densidad del alimento en la reducción de la toxicidad del pesticida. La magnitud del efecto se puede visualizar al comparar estos valores de toxicidad aguda con los observados en ausencia de alimentación; la tolerancia de los organismos en estas últimas condiciones es aproximadamente de sólo un 20% de aquella cuando los individuos están desarrollados en presencia de alimento.

Tabla 2. Valores de CL<sub>50</sub> de las tres especies de rotíferos y las distintas concentraciones de alga a las cuales se obtuvieron. Valores con promedio  $\pm$  error estándar.

ESPECIES	Densidad alimenticia ( $\times 10^6$ cél./ml)	CL <sub>50</sub> - 24 h (mg/l)
<i>Brachionus calyciflorus</i> Pallas	0.5 **	9.01 $\pm$ 0.18
<i>Brachionus patulus</i> Müller	0.0	1.94 $\pm$ 0.17
	1.5	8.85 $\pm$ 0.07
	3.0	10.66 $\pm$ 0.13
<i>Euchlanis dilatata</i> Ehrenberg	1.0	0.88 $\pm$ 0.02

\*\* Tomado de Sarma *et al.*, 1998

## Toxicidad crónica

En general, la tendencia de las curvas de crecimiento de las tres especies testigos (Figuras 1 - 6) muestra que los organismos crecieron poblacionalmente más con relación al incremento de la cantidad de alga disponible. Lo anterior fue muy notorio en la densidad, abundancia máxima así como las tasas de crecimiento por día. De las especies, *B. patulus* y *B. calyciflorus* mostraron respuestas de mayor abundancia a densidades de alimento de  $6.0 \times 10^6$  cél./ml en tanto que *E. dilatata* la alcanzó a los  $2.0 \times 10^6$  cél./ml.

La toxicidad del paratión metílico en todos los tratamientos considerados tuvo un impacto dependiente de la abundancia de la microalga. El factor común es que a mayor densidad de alimentación, hubo una disminución del efecto tóxico. Es decir, que el alimento ejerció en general, un efecto reductor a la concentración del tóxico. Los taxa estudiados mostraron sensibilidad variable al estrés experimental, aunque las concentraciones umbral que indujeron efectos en la mayoría de los taxa se relacionaron con niveles de alimentación bajos y concentraciones de pesticida de cantidades medias a altas. Las poblaciones originales no duraron más de seis días en condiciones de niveles alimenticios bajos y concentraciones altas de paratión metílico (Figuras 1-6). La toxicidad del paratión metílico en todos los tratamientos considerados tuvo un impacto dependiente de la abundancia de la microalga. El factor común es que a mayor densidad de alimentación, hubo una disminución del efecto tóxico. Es decir, que el alimento ejerció en general, un efecto reductor a la concentración del tóxico. Los taxa estudiados mostraron sensibilidad variable al estrés experimental, aunque las concentraciones umbral que indujeron efectos en la mayoría de los taxa se relacionaron con niveles de alimentación bajos y concentraciones de pesticida de cantidades medias a altas. Las poblaciones originales no duraron más de seis días en condiciones de niveles alimenticios bajos y concentraciones altas de paratión metílico (Figuras 1-6).

Llama la atención que si bien *B. patulus* logró la máxima densidad de las tres especies, es *B. calyciflorus* la que tuvo la máxima tasa de crecimiento diario observado tanto en los ensayos de toxicidad aguda ( $CL_{50}$ ) así como en los crónicos (crecimiento poblacional máximo (figuras 7-9) y tasa de crecimiento por día (Figuras 10 - 12). La tasa de crecimiento por día fue el parámetro más sensible para las tres especies.

Por otra parte, en este trabajo, debido a que los valores de  $CE_{50}$  para la tasa de crecimiento diario de los rotíferos se obtuvieron a distintos niveles de *Chlorella*, no fue posible comparar esos valores entre las distintas especies de rotíferos. De la curva de regresión resultante, se calculó la concentración efectiva ( $CE_{50}$ ) para una concentración de *Chlorella* de  $2.0 \times 10^6$  cél./ml. La información se presenta en la Tabla 3.

Los resultados señalan que existe tolerancia distinta al pesticida entre los rotíferos. La especie más sensible fue *E. dilata*, seguida de *B. patulus* la que mostró una sensibilidad similar a la especie anterior y la más tolerante fue *B. calyciflorus*. Es notorio que *B. calyciflorus* fue aproximadamente 10 veces más tolerante que *B. patulus* y más de 20 veces más que *E. dilatata*.

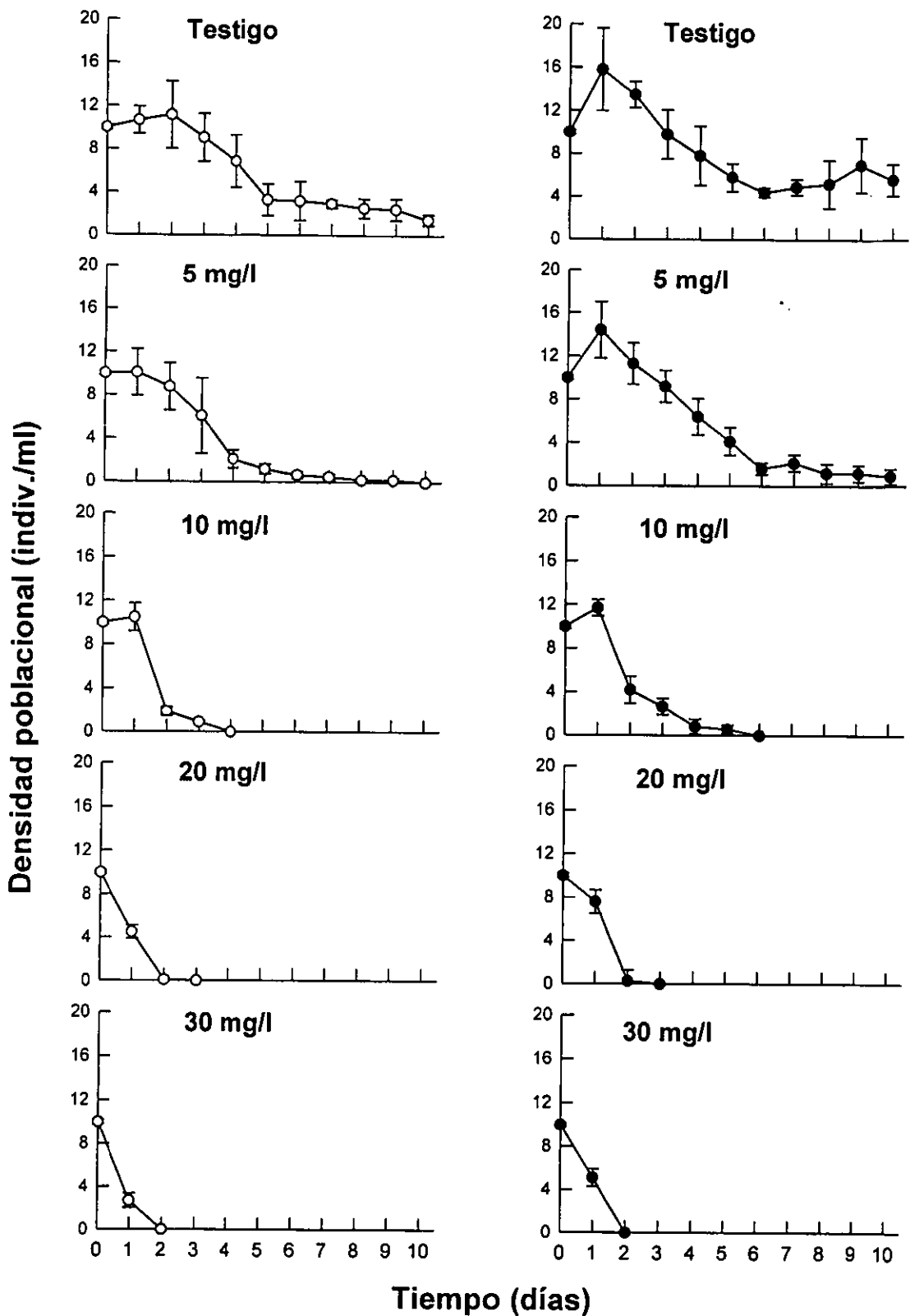


Figura 1. Relación entre la concentración de paratión metílico (mg/l) y el crecimiento poblacional de *B. calyciflorus* a  $0.75 \times 10^6$  (círculos claros) y  $1.5 \times 10^6$  (círculos oscuros) cél./ml de *Chlorella vulgaris* en función del tiempo. Valores promedio y error estándar.



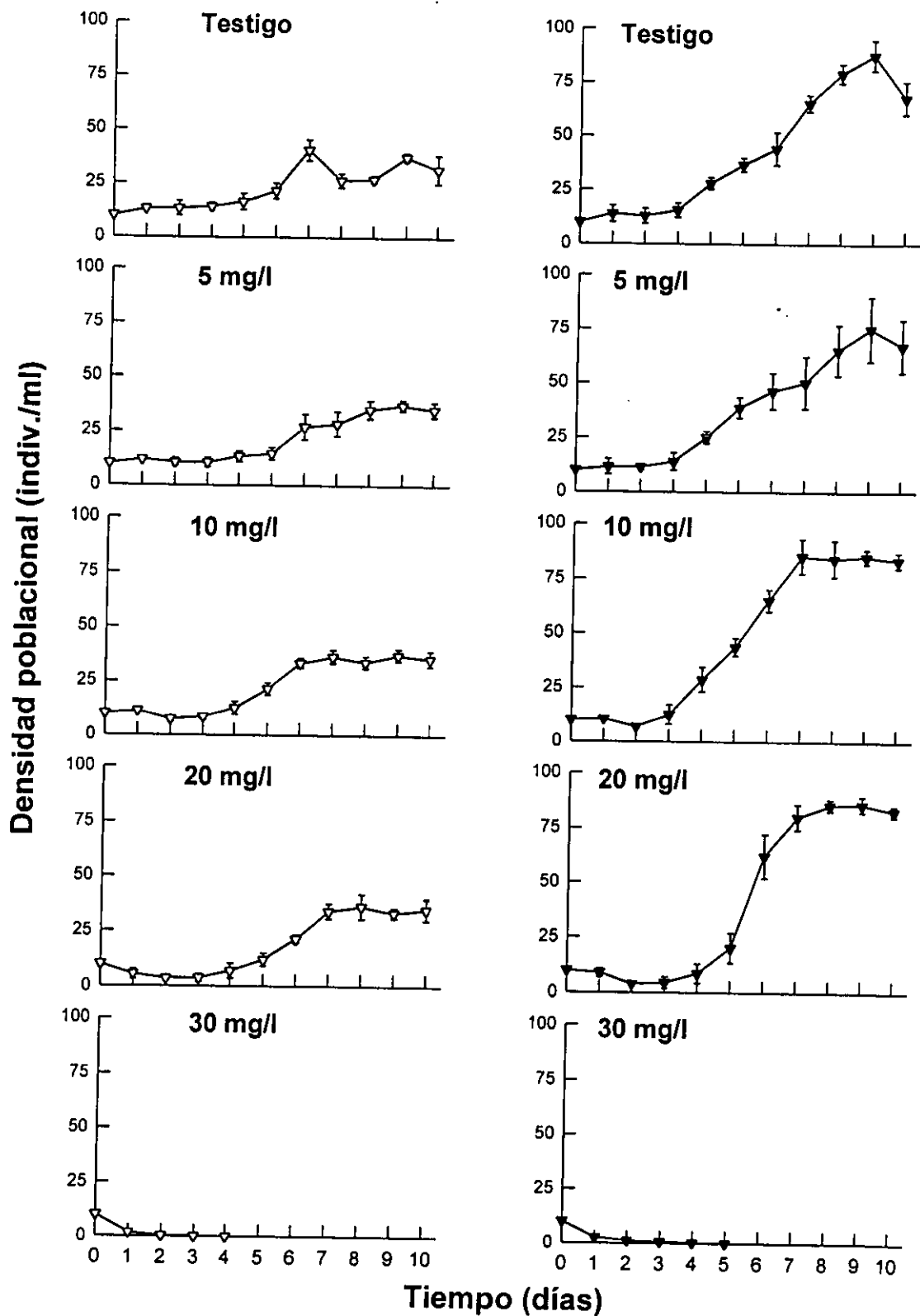


Figura 2. Relación entre concentración de paratión metílico (mg/l) y el crecimiento poblacional de *B. calyciflorus* a densidad de  $3.0 \times 10^6$  (círculos claros) y de  $6.0 \times 10^6$  (círculos oscuros) de cél./ml de *Chlorella vulgaris* en función del tiempo. Valores promedio y error estándar..

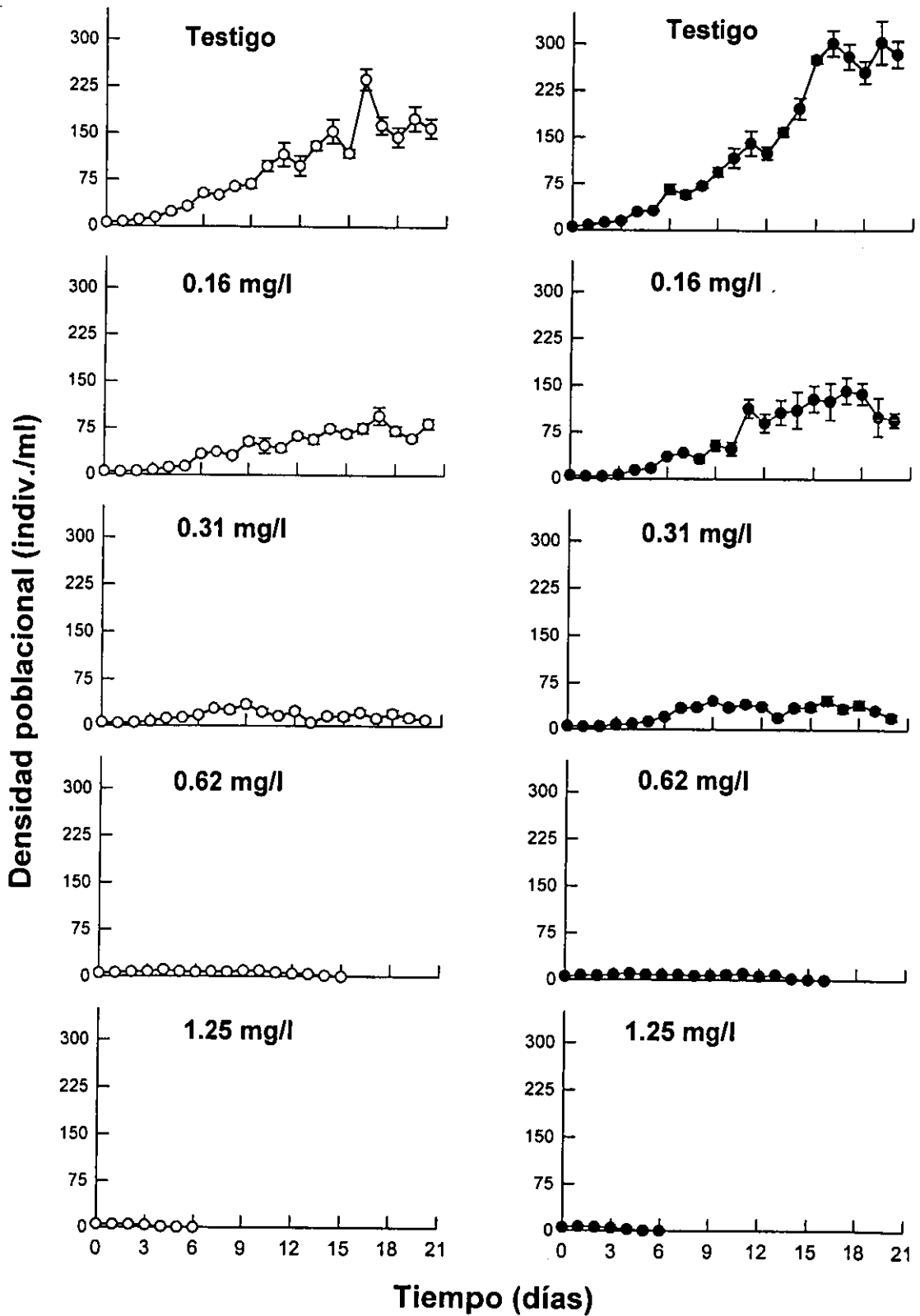


Figura 3. Relación entre la concentración de paratión metílico (mg/l) y el crecimiento poblacional de *B. patulus* a  $0.75 \times 10^6$  (círculos claros) y  $1.5 \times 10^6$  (círculos oscuros) cél./ml de *Chlorella vulgaris* en función del tiempo. Valores promedio y error estándar.

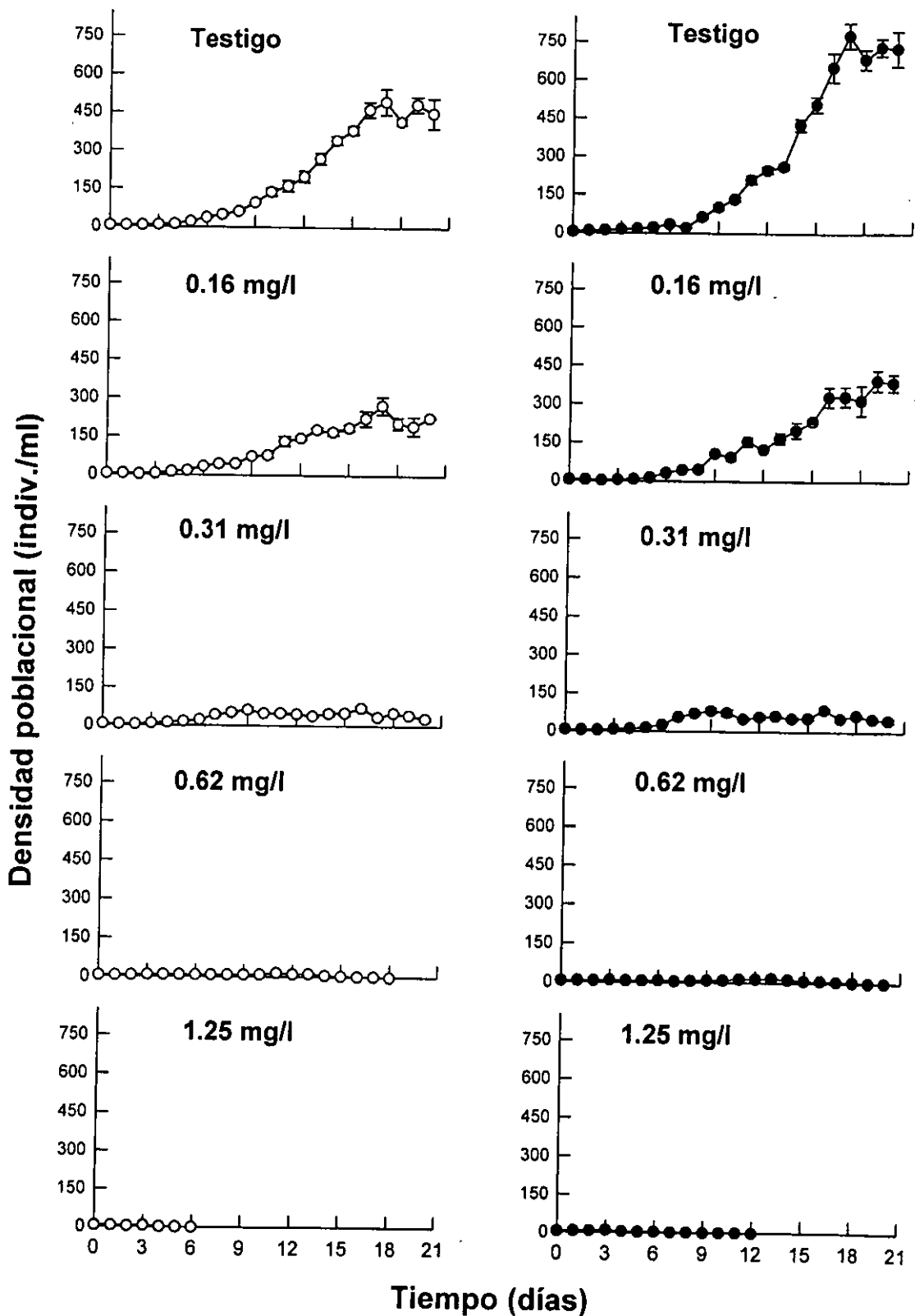


Figura 4. Relación entre la concentración de paratión metílico (mg/l) y el crecimiento poblacional de *B. patulus* a  $3.0 \times 10^6$  (círculos claros) y  $6.0 \times 10^6$  (círculos oscuros) cél./ml de *Chlorella vulgaris* en función del tiempo. Valores promedio y error estándar.

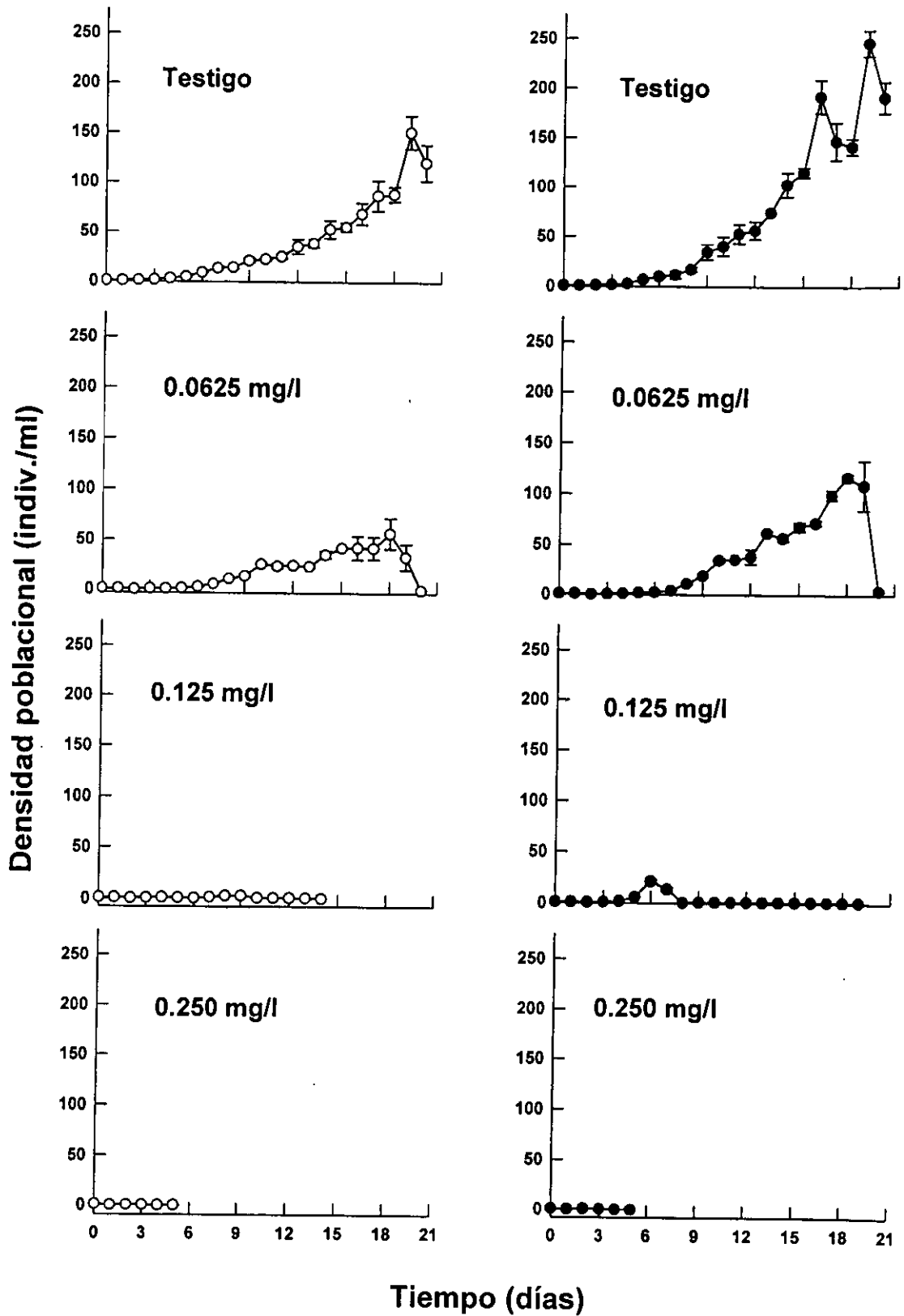


Figura 5. Relación entre la concentración de paratión metílico (mg/l) y el crecimiento poblacional de *E. dilatata* a  $0.5 \times 10^6$  (círculos claros) y  $1.0 \times 10^6$  (círculos oscuros) cél./ml de *Chlorella vulgaris* en función del tiempo. Valores promedio y error estándar.

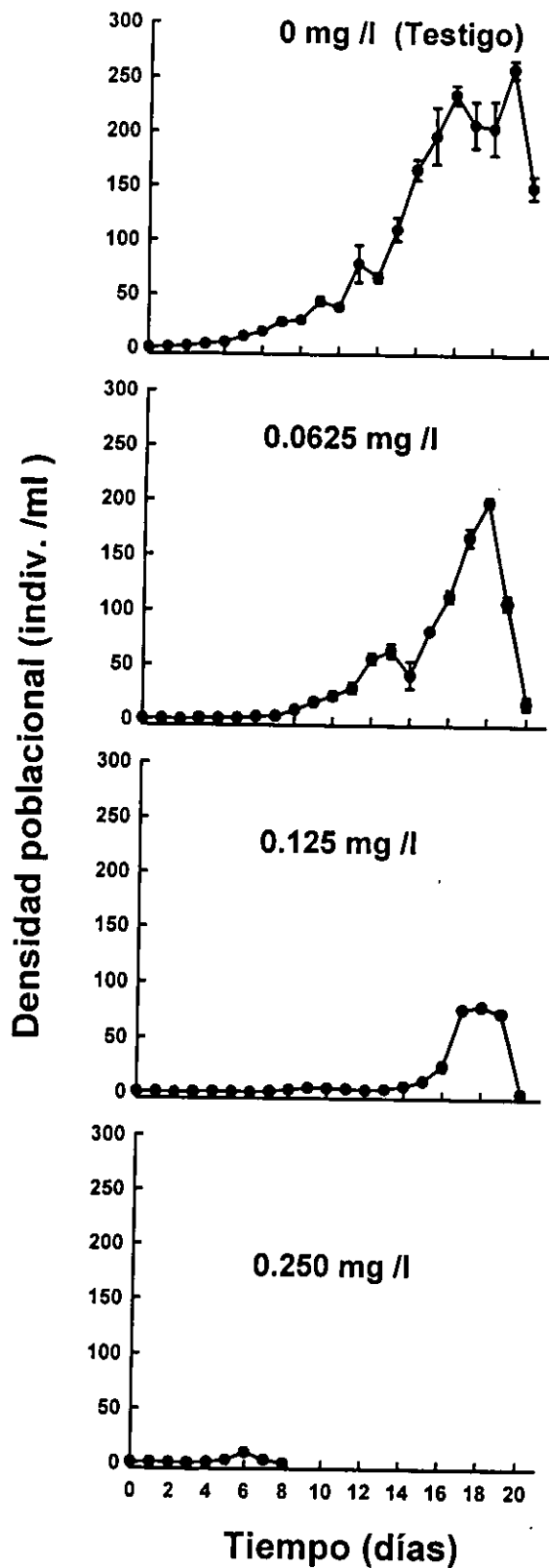


Figura 6. Relación entre concentración de paratión metílico (mg/l) y el crecimiento poblacional de *E. dilatata* a densidad de  $2.0 \times 10^6$  cél./ml de *Chlorella vulgaris*. Valores promedio y error estándar.

Tabla 3. Comparación de valores de  $CE_{50}$  a una densidad fija de *Chlorella* ( $2.0 \times 10^6$  cél./ml) para las tres especies de rotíferos. La  $CE_{50}$  de paratión metílico a la cual puede ocurrir un 50 % de reducción de la tasa de crecimiento diario de la población testigo

Concentración de alga ( $\times 10^6$ cél./ml)	Especies	Valores esperados de $CE_{50}$ para r (mg/l)
2.0	<i>Brachionus calyciflorus</i>	3.5
2.0	<i>Brachionus patulus</i>	0.37
2.0	<i>Euchlanis dilatata</i>	0.16

La tasa de crecimiento diario fue afectada de manera más sensible en *E. dilatata* y *B. patulus* que en *B. calyciflorus*. La  $CE_{50}$  necesaria para inducir cambios en la tasa relacionados con los niveles alimenticios en las dos primeras especies fue del orden de décimas de mg/l mientras que en la última ocurrió con mg/l (Tabla 4). La  $CE_{50}$  necesaria para producir cambios en la tasa de crecimiento diario entre los niveles alimenticios en *E. dilatata* osciló en torno del 31%. Esta respuesta fue de una magnitud ligeramente menor en *B. patulus* (25%). Comportamiento diferente exhibió *B. calyciflorus*. Su sensibilidad fue dependiente de la densidad de alimento en el medio; a mayor cantidad de alga, mayor tolerancia.

Tabla 4. Valores de  $CE_{50}$  calculados que alteran el crecimiento diario en los rotíferos estudiados para los distintos niveles de alimento y la diferencia en % entre ellos.

<i>B calyciflorus</i>	Nivel de alimento	$CE_{50}$	Niveles comparados	Diferencia entre niveles (%)
	0.75	A = 0.5	A vs B	54.94
	1.5	B = 0.91	A vs C	6.13
	3.0	C = 8.15	A vs D	4.25
	6.0	D = 11.75	B vs C	11.16
			B vs D	7.74
			C vs D	69.39
<i>B patulus</i>				
	0.75	A = 0.303	A vs B	82.56
	1.5	B = 0.367	A vs C	72.83
	3.0	C = 0.416	A vs D	63.12
	6.0	D = 0.48	B vs C	88.22
			B vs D	76.46
			C vs D	86.66
<i>E dilatata</i>				
	0.5	A = 0.085	A vs B	84.16
	1.0	B = 0.101	A vs C	52.79
	2.0	C = 0.161	B vs C	62.73

A continuación se describen los resultados obtenidos con cada especie en las diferentes condiciones experimentales.

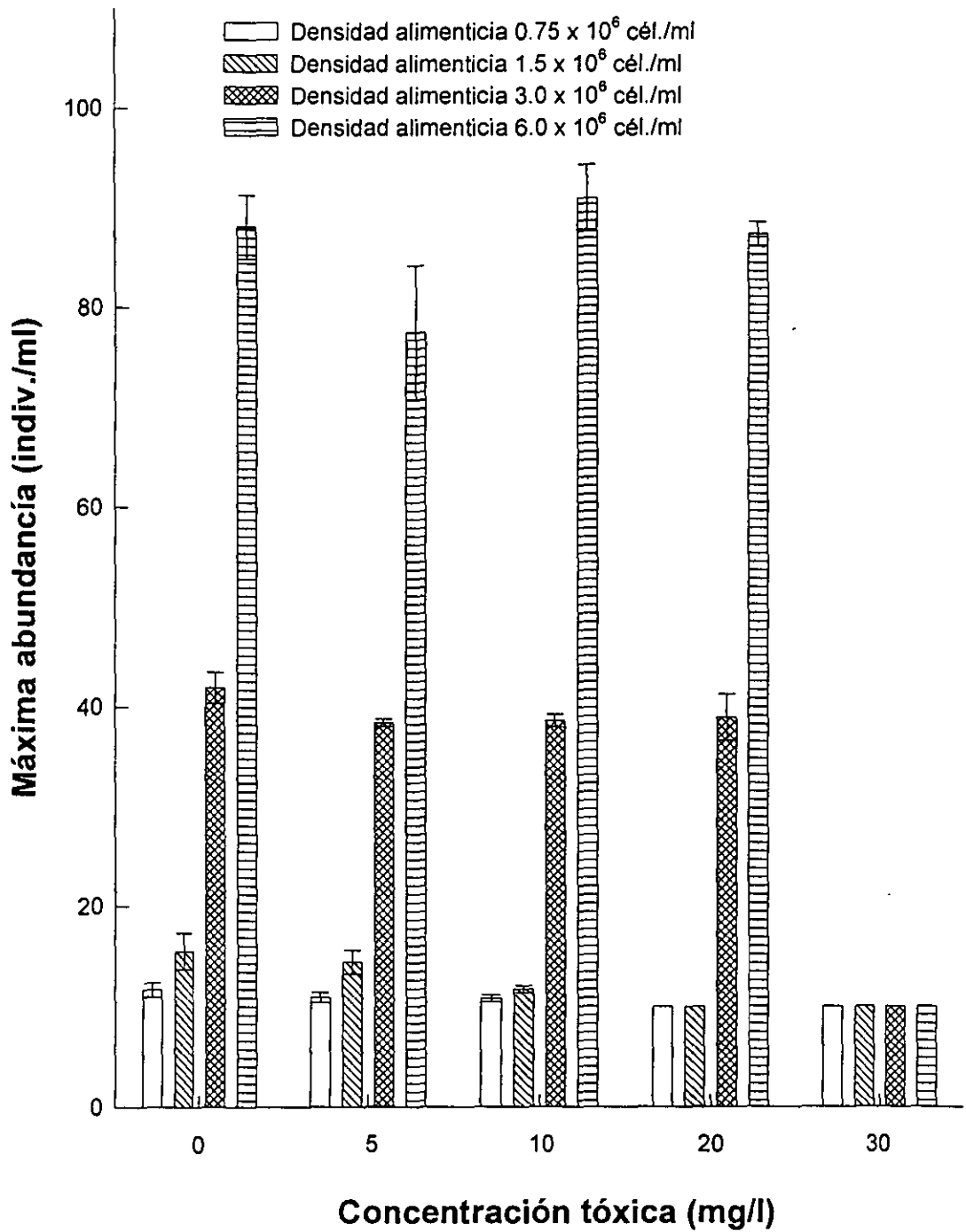


Figura 7. Máxima densidad poblacional (ind./ml) de *B. calyciflorus* a diferentes combinaciones de niveles del tóxico (mg/l) y de alimento (cél./ml). Valores promedio y error estándar.

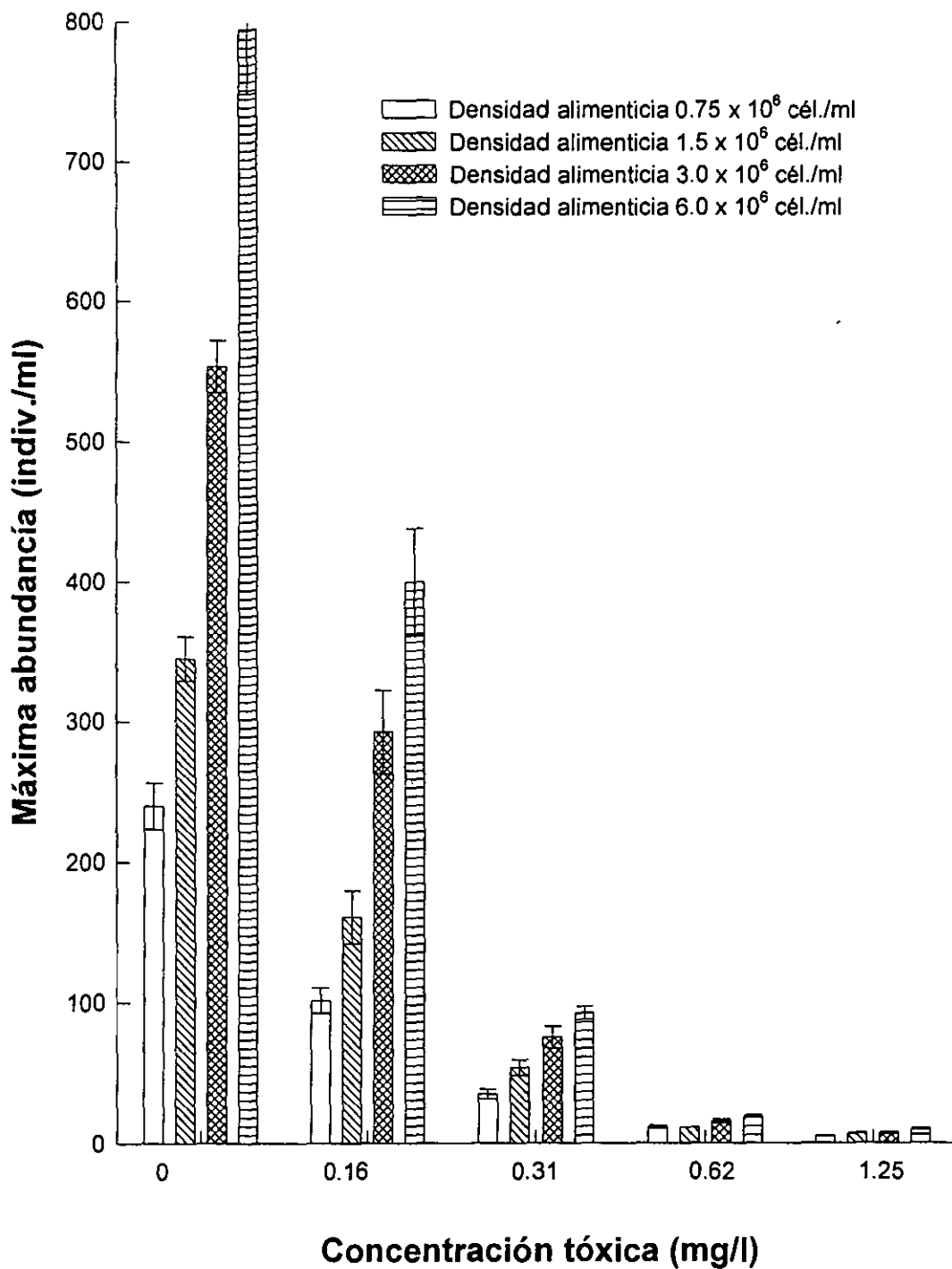


Figura 8. Máxima densidad poblacional de *B. patulus* a diferentes combinaciones de niveles del tóxico y de alimento. Valores promedio y error estándar.



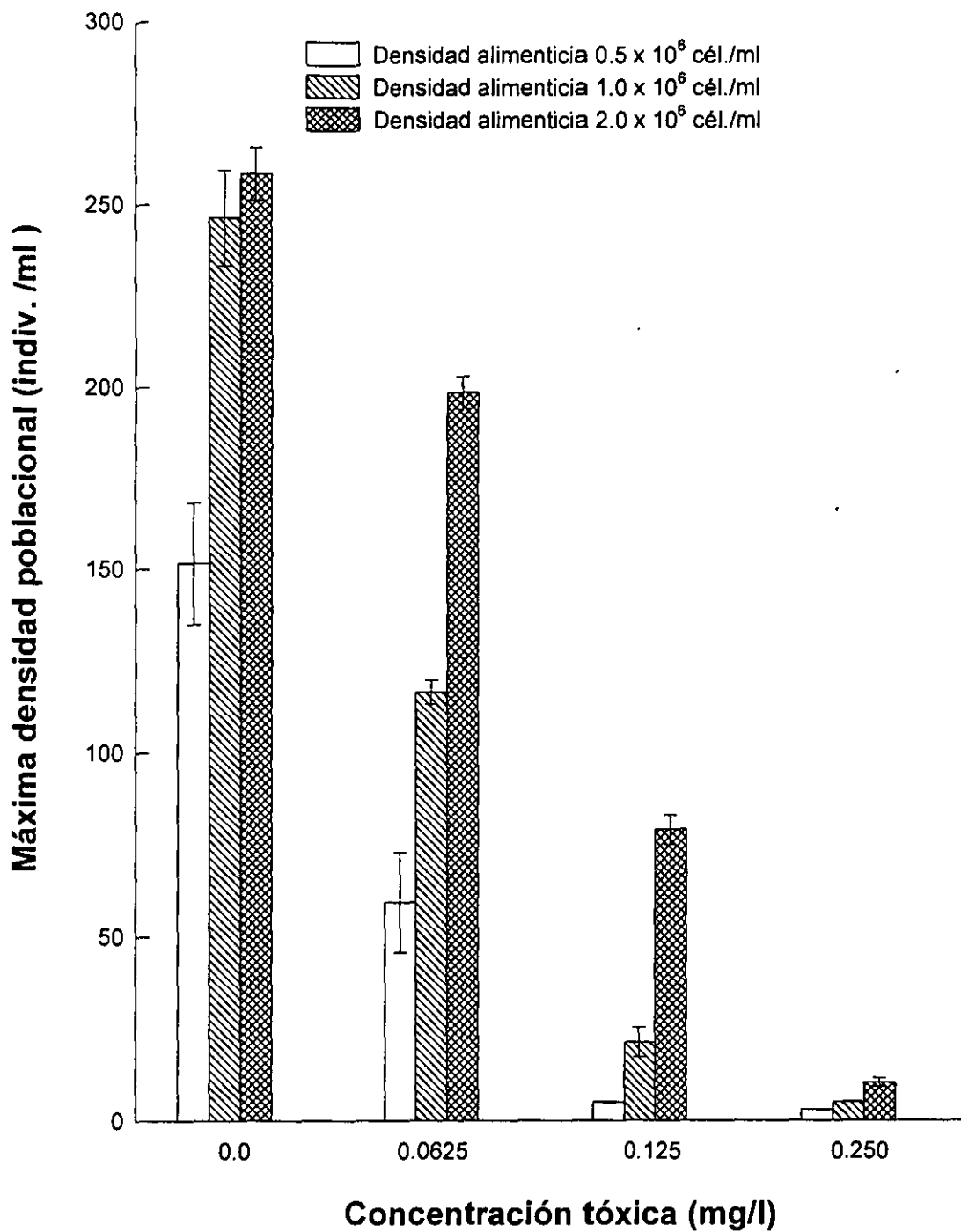


Figura 9. Máxima densidad poblacional (ind./ml) de *E. dilatata* a diferentes combinaciones de niveles del tóxico (mg/l) y de alimento (cél./ml). Valores promedio y error estándar.

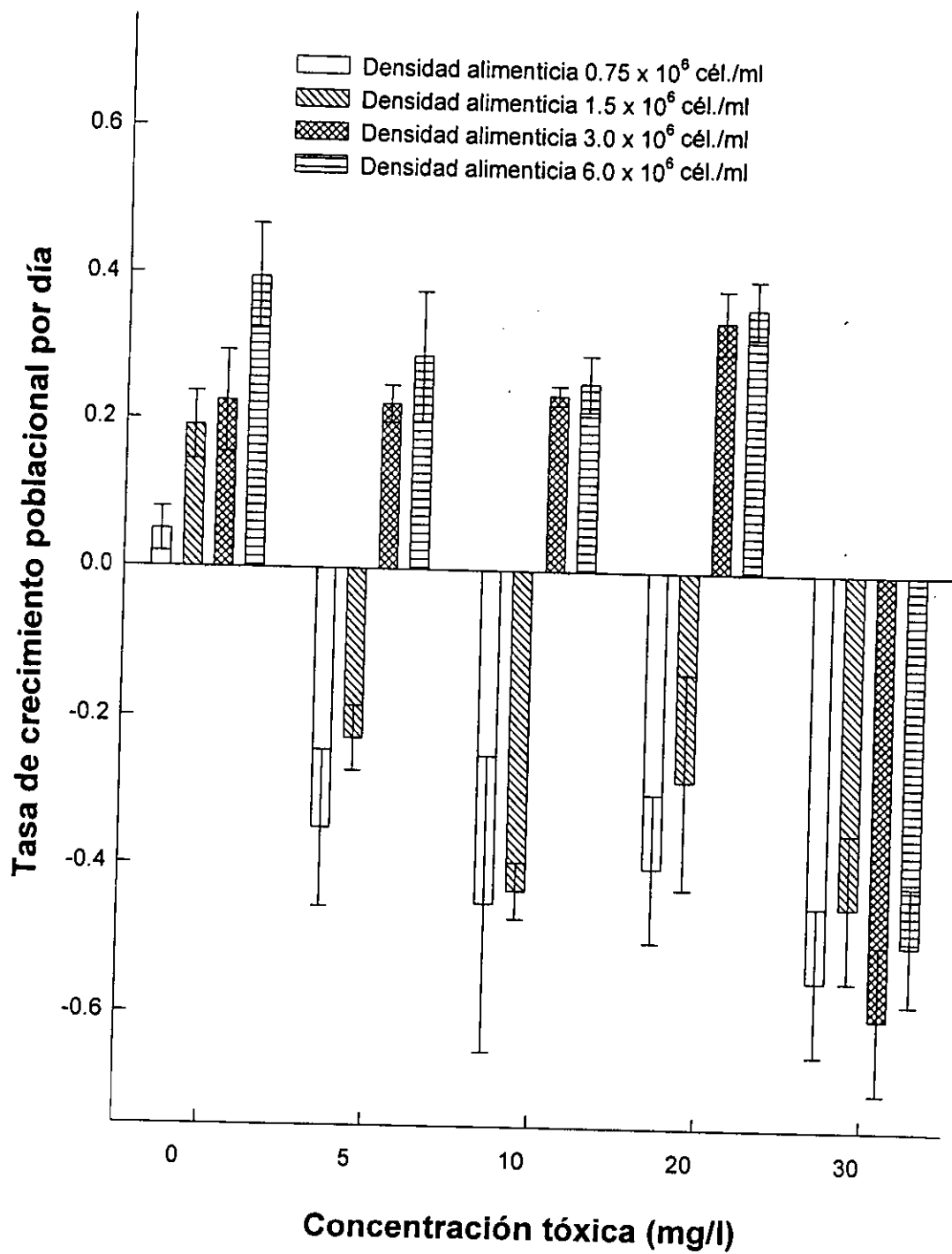


Figura 10. Tasa de crecimiento poblacional por día ( $r$ ) de *B. calyciflorus* a diferentes combinaciones de niveles del tóxico y de alimento. Valores promedio y error estándar.

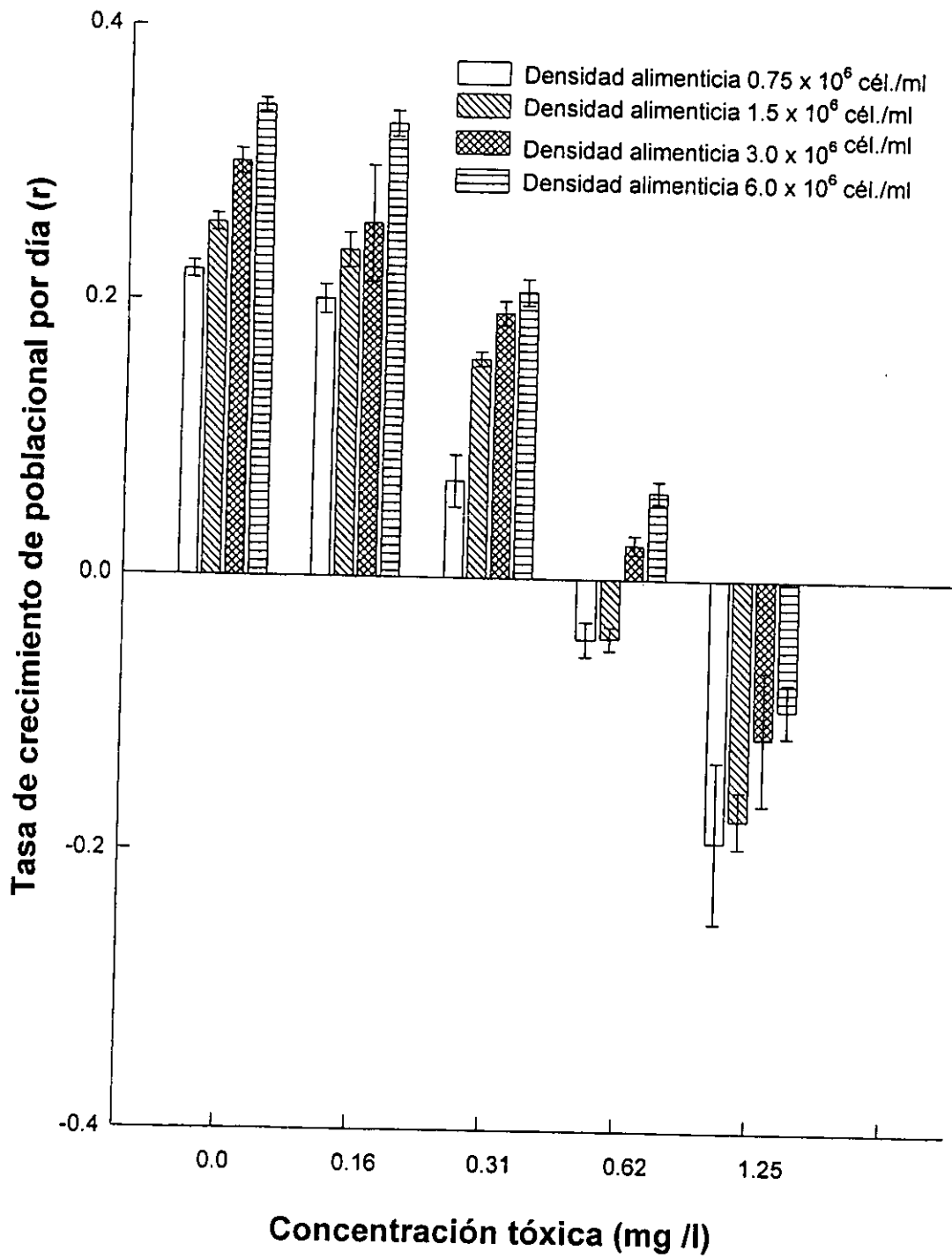


Figura 11. Tasa de crecimiento poblacional por día ( $r$ ) de *B. patulus* en relación a diferentes concentraciones de paratión metílico y densidades de *Chlorella vulgaris*. Valores promedio y error estándar.

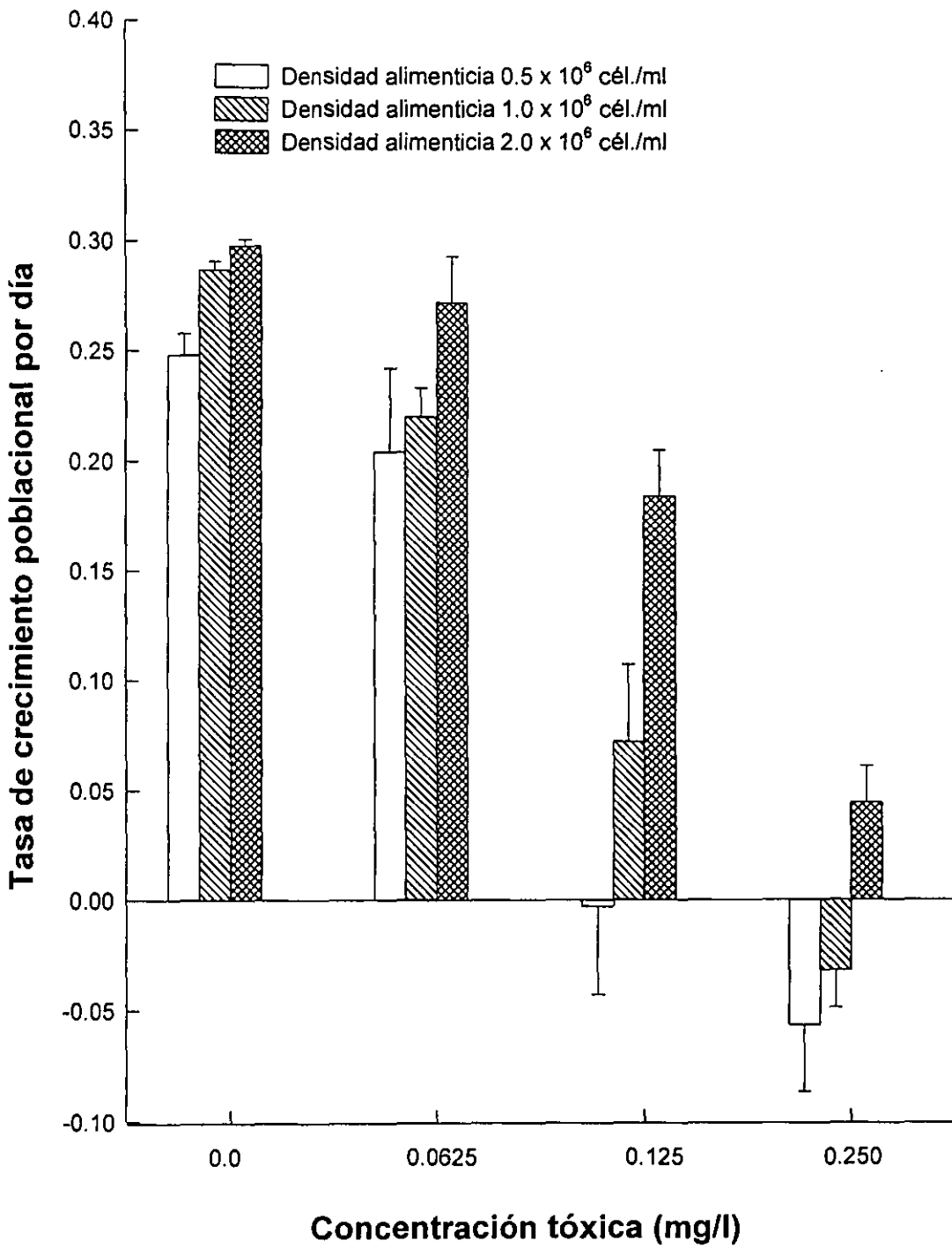


Figura 12. Tasa de crecimiento poblacional por día de *Euchlanis dilatata* en relación a niveles tóxicos y alimenticios. Los valores son el promedio y error estándar.

*Brachionus calyciflorus*

La máxima densidad poblacional (ind./ml) de esta especie fue afectada notoriamente por la densidad alimenticia, por la concentración de paratión metílico así como por la interacción de ambos factores (ANVA,  $p < 0.001$ , Tabla 5). Aumentos de los niveles de alimentación disponible produjeron incrementos de la población de *B. calyciflorus*. Por otra parte, el aumento en la concentración de tóxico provocó una disminución en la densidad poblacional del rotífero. Hubo una interacción positiva entre el nivel del tóxico y la cantidad de alimento; aumentos de la cantidad de algas redujeron el efecto del paratión metílico (hasta los 20 mg/l) en el crecimiento poblacional de *B. calyciflorus* (Figuras 1 y 2). En los experimentos control (sin tóxico) cuando se administró una cantidad de algas de  $0.75 \times 10^6$  cél./ml, los rotíferos mantuvieron una densidad promedio de 4 ind./ml, mientras que aquellos con el mismo nivel alimenticio pero con 5 mg/l del plaguicida en el medio, decayeron completamente al décimo día (Figura 1). Además, no hubo crecimiento alguno de la población del rotífero a concentraciones de 30 mg/l del tóxico a ningún nivel alimenticio.

Tabla 5. Análisis de varianza (ANVA) de la máxima densidad, máxima abundancia y tasa de crecimiento poblacional en *B. calyciflorus* en relación con la densidad alimenticia y la concentración del tóxico.

Fuente de Variación	Df	Ss	Ms	F	P
<b>Día de Máxima densidad poblacional</b>					
Nivel alimenticio de alga (A)	3	203985.81	67995.27	210.77***	0.001
Concentración del Tóxico (B)	4	56689.72	14172.43	43.93***	0.001
Interacción (A x B)	12	59687.46	4973.95	15.42***	0.001
Error	1080	348404.14	322.59		
<b>Máxima Abundancia Poblacional</b>					
Nivel alimenticio de alga (A)	3	59705.54	19901.85	1640.77***	0.001
Concentración del Tóxico (B)	4	12149.90	3037.48	256.84***	0.001
Interacción (A x B)	12	15076.22	1256.35	95.61***	0.001
Error					
<b>Tasa de Crecimiento poblacional</b>					
Nivel alimenticio de alga (A)	3	25.60	6.40	218.51***	0.001
Concentración del Tóxico (B)	4	6.78	2.26	77.11***	0.001
Interacción (A x B)	12	7.82	0.65	22.31***	0.001
Error					

Los picos de abundancia de la población de rotíferos en los tratamientos control oscilaron desde 11 hasta 91 ind./ml y aumentaron de forma lineal como respuesta a incrementos en la densidad de *Chlorella*. Aquellas poblaciones expuestas al tóxico desde valores mínimos hasta concentraciones de 20 mg/l se comportaron de manera semejante en todos los niveles de microalga (Figura 7).

La duración del periodo de crecimiento también se relacionó con el nivel de alimentación y el nivel del tóxico en el sistema; concentraciones alimenticias altas y con bajas concentraciones del contaminante en el medio mantuvieron el crecimiento de la población durante mayor tiempo. Otro rasgo fue que en tratamientos donde se expuso a los rotíferos a los mayores niveles del tóxico y de alimentación, la población no creció inicialmente pero se recuperó después de una semana.

Obviamente, el efecto del tóxico y del alimento así como su interacción, se reflejó significativamente en la tasa de crecimiento poblacional ( $r$ ) por día, (Tabla 5, Figura 10). El intervalo de crecimiento poblacional varió desde  $-1.46$  hasta  $+0.396$  dependiendo de las condiciones del experimento. En la figura 10 se observa que los valores de la tasa de crecimiento diario ( $r$ ) fueron negativos en todas las concentraciones del tóxico cuando se mantuvieron niveles alimenticios de  $0.75$  y  $1.5 \times 10^6$  cél./ml. Por otra parte, se observaron tasas de crecimiento diario positivas cuando se administraron densidades de alimento algal mayores para todos los niveles tóxicos excepto para la concentración de  $30$  mg/l de paratión metílico en el medio.

La concentración efectiva media (mg/l) de paratión metílico sobre la tasa de crecimiento poblacional por día de *B. calyciflorus* en distintos niveles alimenticios se presenta en la Tabla 6. Basado en la misma, se derivó una matriz en la que se detecta las unidades de concentración que existen para las distintas condiciones experimentales (Tabla 7). Se puede observar que a menor nivel alimenticio, la cantidad efectiva fue menor y que a densidades alimenticias mayores, dicha cantidad aumentó sustancialmente. La diferencia entre las distintas concentraciones osciló de aproximadamente dos hasta más de 23 veces (Tabla 7).

Tabla 6. Concentración efectiva de paratión metílico (mg/l) a la cual se reduce al 50 % la tasa de crecimiento poblacional de *B. calyciflorus* en el control ( $CE_{50}$ ) a varias densidades de alga. Estos valores se calcularon usando una ecuación de regresión con valores de las tasas de crecimiento en los distintos tratamientos tóxicos.

Densidad de alga ( $\times 10^6$ cél./ml)	$CE_{50}$ (mg/l)
0.75	0.50
1.5	0.91
3.0	8.15
6.0	11.75

Tabla 7. Matriz de valores derivados de la  $CE_{50}$  (mg/l) de paratión metílico sobre la tasa de crecimiento poblacional por día de *B. calyciflorus* a las distintas concentraciones de alimento (derivada de Tabla 6).

	$CE_{50} = 0.5$	$CE_{50} = 0.91$	$CE_{50} = 8.15$	$CE_{50} = 11.75$
$CE_{50} = 0.5$	-			
$CE_{50} = 0.91$	1.82	-		
$CE_{50} = 8.1$	16.2	8.9	-	
$CE_{50} = 11.75$	23.5	12.9	1.25	-

*B. patulus*

En la Tabla 2 se observan los resultados de toxicidad aguda de 24 h para el plaguicida teniendo distintos niveles de alimento disponible en el medio; desde cero hasta  $3.0 \times 10^6$  cél./ml. Se observa que los valores dependieron del nivel alimenticio de alga, mostrando una tendencia a incrementar conforme aumentaba la densidad de alga. Los datos del crecimiento de la población revelaron un efecto significativo ( $p < 0.001$ , ANVA Tabla 8) tanto de la densidad de alimento así como de la concentración de tóxico en su abundancia máxima, día en que se alcanzó dicha abundancia y sobre la tasa de crecimiento por día. Las curvas de crecimiento de la población de *B. patulus* indicaron un aumento en la abundancia del rotífero como respuesta a mayor disponibilidad de alimento, pero un efecto inverso al incremento en la concentración del paratión metílico (Figuras 3 y 4).

Tabla 8. Resultados del análisis de varianza (ANVA) realizado con la máxima densidad y la tasa de crecimiento poblacional en *B. patulus* en relación con la densidad alimenticia y la concentración del tóxico.

Fuente de Variación	Df	Ss	Ms	F	P
Día de máxima densidad poblacional					
Nivel alimenticio de alga (A)	3	87.33	29.11	11.93***	0.001
Concentración del tóxico (B)	7	6379.7	911.38	254.05***	0.001
Interacción (A x B)	21	163.72	7.8	2.80***	0.001
Error					
Máxima abundancia poblacional					
Nivel alimenticio de alga (A)	3	$24.1 \times 10^4$	$8.0 \times 10^4$	96.5***	0.001
Concentración del Tóxico (B)	7	$32.4 \times 10^5$	$46.4 \times 10^4$	526.1***	0.001
Interacción (A x B)	21	$67.5 \times 10^4$	$3.2 \times 10^4$	33.7***	0.001
Error	96	$8.0 \times 10^4$	834.7		
Tasa de crecimiento poblacional					
Nivel alimenticio de alga (A)	3	0.253	0.08	11.08***	0.001
Concentración del Tóxico (B)	6	7.516	1.25	164.58***	0.001
Interacción (A x B)	18	0.092	0.01	0.58 <sup>ns</sup>	> 0.05
Error	84	0.639	0.01		

A cualquier concentración del tóxico, un aumento de la densidad del alga redujo la toxicidad del paratión metílico al rotífero. Así, los rotíferos expuestos a concentraciones bajas de 0.16 mg/l del pesticida y a la densidad alimenticia más baja usada en este experimento, la población máxima fue (media  $\pm$  error estándar) de  $101 \pm 9$  ind./ml la cual aumentó hasta  $400 \pm 38$  ind./ml en la densidad de  $6 \times 10^6$  cél./ml de algas. En los grupos testigo, la máxima densidad del rotífero en el máximo nivel alimenticio ( $6 \times 10^6$  cél./ml) fue de  $795 \pm 46$  ind./ml (Figura 8), lo que significó casi el doble de densidad entre esos tratamientos. En los tratamientos con poblaciones expuestas a niveles de 0.16-0.62 mg/l del

tóxico se detectó un crecimiento mínimo aunque constante y hubo crecimientos nulos o negativos en los tratamientos con mayor cantidad de paratión metílico en el medio independientemente del nivel de alga disponible.

La tasa de crecimiento de la población por día ( $r$ ) en los tratamientos control varió de  $0.22 \pm 0.01$  a  $0.34 \pm 0.01$  dependiendo del nivel alimenticio. Indistintamente de la concentración del tóxico, un aumento de densidad alimenticia produjo una ampliación en los valores de  $r$  (Figura 11). Por otra parte, independientemente de la densidad de *Chlorella*, concentraciones de paratión metílico de 1.25 mg/l no permitieron ningún crecimiento del rotífero y por ende los valores de  $r$  fueron negativos. Como consecuencia del efecto mitigante del aumento de la densidad del alga en la toxicidad del pesticida, la interacción de estos dos factores en los valores de la tasa de crecimiento diario no fue significativa (Tabla 8).

Por otra parte, en la Tabla 9 se puede observar que a menor nivel alimenticio, la concentración efectiva fue menor y a densidades alimenticias mayores aumentó. La diferencia entre ambos grupos de concentraciones es del orden de décimas de mg/l como se observa a través de la matriz (Tabla 10).

Tabla 9. Concentración efectiva de paratión metílico (mg/l) a la cual se reduce al 50 % la tasa de crecimiento poblacional de *B. patulus* en el control ( $CE_{50}$ ) a varias densidades de alga. Estos valores se calcularon usando una ecuación de regresión con valores de las tasas de crecimiento en los distintos tratamientos tóxicos.

Densidad de alga ( $\times 10^6$ cél./ml)	$CE_{50}$ (mg/l)
0.75	0.303
1.5	0.367
3.0	0.416
6.0	0.480

Tabla 10. Matriz de valores derivados de  $CE_{50}$  (mg/l) de paratión metílico sobre la tasa de crecimiento poblacional por día de *B. patulus* a las distintas concentraciones de alimento (derivada de Tabla 9).

	$CE_{50} = 0.303$	$CE_{50} = 0.367$	$CE_{50} = 0.416$	$CE_{50} = 0.48$
$CE_{50} = 0.303$	-			
$CE_{50} = 0.367$	1.21	-		
$CE_{50} = 0.416$	1.37	1.13	-	
$CE_{50} = 0.48$	1.58	1.48	1.15	-

#### *E. dilatata*

Los datos de concentración letal media ( $CL_{50}$ ) del paratión metílico sobre esta especie se presentan en la Tabla 2. La respuesta numérica de los rotíferos tuvo una tendencia al aumento de la abundancia a medida que aumentaba la densidad de alimento, la cual fue sin embargo reducida en presencia del paratión metílico (Figuras 5 y 6). La



máxima densidad de población que se obtuvo en este estudio fue de  $259 \pm 7$  ind./ml en condiciones de máximo nivel de alimento en el control (Figura 9). Se puede observar que densidades altas de alga y concentración del tóxico mínima permitieron crecimientos cercanos al 50 % del alcanzado en los ensayos testigo. No obstante, en la concentración alta del pesticida e independiente del nivel de alimento en el medio, la población no tuvo crecimiento. La interacción tanto del nivel alimenticio de *Chlorella* como de la concentración de tóxico tuvo igualmente un efecto significativo sobre estas variables (Tabla 11).

Tanto la densidad del alimento como la concentración del tóxico, tuvieron un efecto significativo en la máxima abundancia de la población ( $p < 0.05$ , ANVA, Tabla 11) y por lo tanto, en la tasa de crecimiento poblacional diaria. La tasa de crecimiento de la población en los controles varió entre 0.248 - 0.298 y dependió del nivel de alimento de alga (Figura 12).

Tabla 11. Resultados del análisis de varianza (ANVA) realizado con el la máxima densidad y el día que se alcanza además de la tasa de crecimiento poblacional de *E. dilatata* en relación a la densidad alimenticia y la concentración del tóxico.

Fuente de Variación	Df	Ss	Ms	F	P
Día de máxima densidad poblacional					
Nivel alimenticio de alga (A)	2	98.167	49.08	103.94***	0.001
Concentración del Tóxico (B)	3	1332.08	444.03	940.28***	0.001
Interacción (A x B)	6	173.167	28.86	61.12***	0.001
Error					
Máxima Abundancia Poblacional					
Nivel alimenticio de alga (A)	2	41078	20539	111.8***	0.001
Concentración del Tóxico (B)	3	253558.9	84519.64	460.2***	0.001
Interacción (A x B)	6	18451.06	3075.18	16.74***	0.001
Error					
Tasa de Crecimiento poblacional					
Nivel alimenticio de alga (A)	2	0.091	0.05	29.41***	0.001
Concentración del Tóxico (B)	3	0.579	0.193	113.5***	0.001
Interacción (A x B)	6	0.027	0.0045	2.64*	0.05
Error					

Tabla 12. Concentración efectiva de paratión metílico (mg/l) a la cual se reduce al 50 % la tasa de crecimiento poblacional de *E. dilatata* en el grupo testigo ( $CE_{50}$ ) a varias densidades de alga. Estos valores se calcularon usando una ecuación de regresión con valores de las tasas de crecimiento en los distintos tratamientos tóxicos.

Densidad de alga ( $\times 10^6$ cél./ml)	$CE_{50}$ (mg/l)
0.5	0.085
1.0	0.101
2.0	0.161

Por otra parte, en la Tabla 12 se puede observar que a menor nivel alimenticio, la cantidad efectiva fue menor y a densidades alimenticias mayores aumentó. La diferencia entre ambos grupos de concentraciones es del orden de centésimas de mg/l (Tabla 13).

Tabla 13. Matriz de valores derivados de  $CE_{50}$  (mg/l) de paratión metílico sobre la tasa de crecimiento poblacional por día de *E. dilatata* a las distintas concentraciones de alimento (derivada de Tabla 12).

	$CE_{50} = 0.085$	$CE_{50} = 0.101$	$CE_{50} = 0.161$
$CE_{50} = 0.085$	-		
$CE_{50} = 0.101$	1.189	-	
$CE_{50} = 0.161$	1.89	1.59	-

## DISCUSIÓN

### TOXICIDAD DEL PARATION METILICO.

#### Toxicidad aguda.

De experimentos previos sobre el efecto de este pesticida en las especies de rotíferos, se obtuvieron resultados de  $CL_{50}$  dependientes de la densidad de alimento disponible. Por ejemplo en *B. patulus*, cuando se administró un nivel de  $1.5 \times 10^6$  cél./ml, la concentración de paratión metílico necesaria para causar la muerte del 50% de los individuos fue de aproximadamente 9 mg/l. Al duplicar la concentración disponible de *Chlorella*, la  $CL_{50}$  se elevó a casi 11 mg/l (Tabla 2) indicando un efecto protector de la densidad del alimento sobre la toxicidad del pesticida

Se ha documentado la toxicidad del paratión metílico para varias especies de rotíferos, por ejemplo, *Brachionus calyciflorus* (Fernández-Casalderrey *et al.*, 1993 a-b), *B. plicatilis* (Compilado por Snell y Janssen, 1995) y *Asplanchna sieboldi* (Sarma *et al.*, 1998). Las concentraciones letales medias (en 24 h) para estas especies oscilan entre 9-29 mg/l. En este intervalo se hallaron los valores para las especies de *Brachionus* en este estudio y estuvieron muy cercanos entre si y al valor mínimo (Tabla 2), lo cual coincide con otras investigaciones (Snell y Janssen, *op. cit.*). Cabe señalar que para *B. patulus* no existe, hasta el momento, información sobre la toxicidad aguda de ningún tóxico. Los valores de  $CL_{50}$  para esta especie expuesta al paratión metílico estimados en este trabajo están muy cercanos (diferencia menor al 2%) a los de *B. calyciflorus* para el mismo tóxico (Tabla 2; Sarma *et al.*, 1998). Los estudios comparativos de  $LC_{50}$  entre especies muy cercanas (del mismo género) son muy raros. Al respecto, las observaciones de este estudio son muy similares a los encontrados por Pérez-Legaspi y Rico-Martínez (2001).

Lo contrario ocurrió con *E. dilatata* cuyo  $CL_{50}$  fue menor a 1 mg/l. Valores tan bajos, de especies muy sensibles a este pesticida, han sido evaluados para otra especie también bentónica como el crustáceo misido, *Neomysis mercedis* por Brandt *et al.* (1993),

Por otra parte, en la Tabla 12 se puede observar que a menor nivel alimenticio, la cantidad efectiva fue menor y a densidades alimenticias mayores aumentó. La diferencia entre ambos grupos de concentraciones es del orden de centésimas de mg/l (Tabla 13).

Tabla 13. Matriz de valores derivados de  $CE_{50}$  (mg/l) de paratión metílico sobre la tasa de crecimiento poblacional por día de *E. dilatata* a las distintas concentraciones de alimento (derivada de Tabla 12).

	$CE_{50} = 0.085$	$CE_{50} = 0.101$	$CE_{50} = 0.161$
$CE_{50} = 0.085$	-		
$CE_{50} = 0.101$	1.189	-	
$CE_{50} = 0.161$	1.89	1.59	-

## DISCUSIÓN

### TOXICIDAD DEL PARATION METILICO.

#### Toxicidad aguda.

De experimentos previos sobre el efecto de este pesticida en las especies de rotíferos, se obtuvieron resultados de  $CL_{50}$  dependientes de la densidad de alimento disponible. Por ejemplo en *B. patulus*, cuando se administró un nivel de  $1.5 \times 10^6$  cél./ml, la concentración de paratión metílico necesaria para causar la muerte del 50% de los individuos fue de aproximadamente 9 mg/l. Al duplicar la concentración disponible de *Chlorella*, la  $CL_{50}$  se elevó a casi 11 mg/l (Tabla 2) indicando un efecto protector de la densidad del alimento sobre la toxicidad del pesticida

Se ha documentado la toxicidad del paratión metílico para varias especies de rotíferos, por ejemplo, *Brachionus calyciflorus* (Fernández-Casalderrey *et al.*, 1993 a-b), *B. plicatilis* (Compilado por Snell y Janssen, 1995) y *Asplanchna sieboldi* (Sarma *et al.*, 1998). Las concentraciones letales medias (en 24 h) para estas especies oscilan entre 9-29 mg/l. En este intervalo se hallaron los valores para las especies de *Brachionus* en este estudio y estuvieron muy cercanos entre si y al valor mínimo (Tabla 2), lo cual coincide con otras investigaciones (Snell y Janssen, *op. cit.*). Cabe señalar que para *B. patulus* no existe, hasta el momento, información sobre la toxicidad aguda de ningún tóxico. Los valores de  $CL_{50}$  para esta especie expuesta al paratión metílico estimados en este trabajo están muy cercanos (diferencia menor al 2%) a los de *B. calyciflorus* para el mismo tóxico (Tabla 2; Sarma *et al.*, 1998). Los estudios comparativos de  $LC_{50}$  entre especies muy cercanas (del mismo género) son muy raros. Al respecto, las observaciones de este estudio son muy similares a los encontrados por Pérez-Legaspi y Rico-Martínez (2001).

Lo contrario ocurrió con *E. dilatata* cuyo  $CL_{50}$  fue menor a 1 mg/l. Valores tan bajos, de especies muy sensibles a este pesticida, han sido evaluados para otra especie también bentónica como el crustáceo misido, *Neomysis mercedis* por Brandt *et al.* (1993),

quienes utilizando también el paratión metílico obtuvieron una  $CL_{50}$ -96 h con un valor todavía menor, de 0.20  $\mu\text{g/l}$ .

### Toxicidad crónica.

*En las condiciones de los grupos testigo*, la especie de mayor talla de las especies estudiadas es *E. dilatata*. La máxima densidad de población (núm. ind./ml) observada en este estudio fue de  $259 \pm 7$  individuos en el grupo testigo con el nivel de alimentación más alto (Figura 9) lo cual se asemeja a lo referido por King (1967) quien fue de los primeros en trabajar con esta especie, aspectos de crecimiento poblacional con distintos niveles de alimentación. Fue también la especie que presentó la tasa de crecimiento más baja (0.29 ind./día Figura 12) y el menor valor de densidad máxima. Este valor no difirió mucho entre niveles alimenticios medios y altos (Figuras 5 y 6) indicando una posible constancia en la tasa de consumo de alimento.

Contrastante fue en cambio la respuesta de *B. patulus*, especie de talla mínima que alcanzó la mayor abundancia y una  $r$  con valor ligeramente superior al euclánido; *B. calyciflorus* (talla intermedia de las tres), logró la tasa de crecimiento con el mayor valor (0.39 ind./día Figura 7). Con frecuencia las especies con tasas de crecimiento diario ( $r$ ) mayores, dominan a las que tienen tasas inferiores (Walz, 1995). Cabe mencionar que en general, el tamaño de partícula alimenticia preferido por la mayoría de géneros de rotíferos es de 10 a 25  $\mu\text{m}$ . No obstante, algunas especies son capaces de consumir partículas sobre y bajo de dicho intervalo y en consecuencia, sus poblaciones alcanzan densidades superiores (Walz, *op cit.*). En particular, *Chlorella vulgaris* presenta un diámetro en torno de los 5  $\mu\text{m}$ , lo que significaría que es una partícula alimenticia muy pequeña para un rotífero grande (*E. dilatata*), pero más apropiada para los braquiúridos, lo que explicaría parcialmente el desempeño poblacional inferior de esta especie en comparación a los otros organismos estudiados.

En estas condiciones, las tendencias de crecimiento de *Brachionus* en los experimentos testigo fueron comparables a los de otros miembros del de la familia Brachionidae de los cuales existe información disponible (Walz, 1995). No obstante las densidades máximas registradas para *B. patulus* (795 ind./ml) en este estudio a la mayor concentración de alimento no había sido documentada anteriormente. Tales densidades no son, sin embargo, raras para muchas especies del género con tamaños corporales similares. Groeneweg y Schlueter (1981) observaron densidades tan altas como de 580 ind./ml para *B. rubens*.

Además, numerosos estudios de crecimiento poblacional sobre rotíferos planctónicos muestran un aumento de la abundancia poblacional como respuesta a una mayor disponibilidad de alimento (Halbach, 1979). Por ejemplo, Dumont *et al.* (1995) mostraron una relación directa y lineal entre la densidad de la población del rotífero *Amuraeopsis fissa* y las concentraciones de *Scenedesmus* como alimento. Este es también el caso de rotíferos depredadores como *Asplanchna* (Dumont y Sarma, 1995), y que coincide con los resultados observados con las tres especies de este estudio, aunque no todas presenten los hábitos planctónicos (Koste, 1978).

Entre las especies plantónicas, los valores de crecimiento diario ( $r$ ) están significativamente correlacionados con el tamaño corporal (Stemberger y Gilbert, 1985). El mayor valor de  $r$  de *B calyciflorus* con respecto a *B patulus* concuerdan con lo señalado por Bennet y Boraas (1989). En este contexto, las tasas de crecimiento diario observadas en esta investigación para los organismos del género *Brachionus* son similares a las referidas en literatura (Miracle y Serra, 1989; Sarma y Rao, 1991; Sarma *et al.*, 1996).

En una revisión reciente sobre ecotoxicología de rotíferos, Snell y Jansen (1995) mencionan numerosas variables ecológicas en las que están incluidos caracteres del crecimiento poblacional, como indicadores sensibles de xenobioticos en el medio. Las poblaciones de rotíferos en este estudio respondieron rápidamente no sólo en relación a la disponibilidad de alimento sino también a las concentraciones tóxicas como ya se ha mencionan en otras investigaciones (Halbach *et al.* 1983).

Halbach *et al.* (1983; 1984) fueron de los primeros en recomendar el uso de la dinámica poblacional para detectar y cuantificar los efectos nocivos de pesticidas en los rotíferos. Siguiendo a estos pioneros, en tiempos recientes se han efectuado numerosos trabajos que utilizan el crecimiento poblacional de rotíferos para detectar efectos subletales de los pesticidas (Janssen *et al.*, 1994). En la mayoría de estas investigaciones no se consideró el efecto protector de la densidad de alimento al disminuir el estrés de los tóxicos en los rotíferos. En este estudio, las poblaciones cultivadas en presencia de mayores densidades de *Chlorella* tuvieron un mejor desarrollo que sus contrapartes cultivadas a niveles menores. Este tipo de datos no son muy comunes y se presentan muy ocasionalmente. Por ejemplo, Rao y Sarma (1986 ; 1990) señalaron que cuando la densidad de alimento se incrementó de  $1.5 \times 10^6$  cél./ml a  $3 \times 10^6$  cél./ml de *Chlorella*, las poblaciones de *B. patulus* fueron capaces de tolerar y reproducirse a concentraciones de DDT casi el doble de aquellas mantenidas a bajas densidades de alimento. Kluegg *et al.* (1996) encontraron también que la toxicidad del 3,4-dichloroanilina para los cladóceros *Daphnia magna* y *Ceriodaphnia quadrangula* fue afectada de manera significativa por el alga verde *Scenedesmus subspicatus*.

Por otra parte, al aumentar en la disponibilidad alimenticia se observó una mayor abundancia de los rotíferos independientemente de la concentración de paratión metílico, con excepción de los niveles más altos (Figuras 7 - 9). Al respecto, Fernández-Casalderrey *et al.* (1991) documentaron una tendencia similar para *Brachionus calyciflorus* utilizando endosulfan.

Existe consenso entre los investigadores que las pruebas de toxicidad en laboratorio se conducen a niveles alimenticios mucho mayores que los encontrados en ambientes naturales (Rao y Sarma 1986; Jansen *et al.*, 1994). Esto sugiere que las pruebas de toxicidad realizadas a niveles de alimentación menores podrían producir un menor valor de la concentración de tóxico máxima aceptable. Esto concuerda con los resultados obtenidos en este trabajo ya que los niveles de alimento seleccionados incluyeron desde los que mantuvieron escasamente a la población hasta los que indujeron aumentos en la abundancia. Así, el intervalo de densidad de alimento considerado, está dentro de los niveles probados previamente para las especies seleccionadas (Sarma *et al.*, 1996).

De las observaciones de sensibilidad de los rotíferos seleccionados al paratión metílico, se encontró que *B. calyciflorus*, aún a concentraciones tan bajas como 5 mg/l fueron suficientes para inducir efectos negativos en la densidad poblacional en el nivel de alimentación más bajo (Figura 1). Lo anterior concuerda con datos de Fernández-Casalderrey *et al.* (1992) quienes estimaron un valor cercano a 1 mg/l de paratión metílico como la concentración mínima con efecto observable para esta especie.

*B. patulus* fue susceptible a concentraciones tan bajas como 1.25 mg/l mientras que *E. dilatata*, fue afectado por tan sólo un décimo de esta concentración (Figs, 3 y 4 vs 5 y 6), y su crecimiento estuvo muy restringido, en algunas condiciones, incluso por valores más de 100 veces mayores a los *B. calyciflorus* expuesto a la mayor densidad alimenticia y 20 mg/l de paratión metílico. Por otra parte, *Euchlanis* muy raramente se utiliza para pruebas de toxicidad, debido probablemente a que en otras especies el cultivo está bien establecido. Sin embargo, existe información sobre biología general del género con estudios de laboratorio (Walsh, 1989; Ejsmont-Karabin *et al.*, 1993). En esta investigación, en los tratamientos con el tóxico se encontraron cantidades notables de individuos de tamaño pequeño y de huevos acumulados en las paredes y en el fondo de los vasos de ensayo lo cual dificultó la tarea de recuperación para cambiar las condiciones diariamente.

Independientemente de los niveles alimenticios, los individuos expuestos a concentraciones de tóxico mayores a las de  $CL_{50}$  o cercanos a este valor, no sobrevivieron más allá de una semana. Esto coincide con Halbach *et al.* (1983) que el efecto de larga duración de los pesticidas sería más apropiado para estimar concentraciones seguras.

Es importante destacar la interacción estadísticamente significativa del efecto combinado del tóxico y la densidad de alimento a valores altos (en este estudio) de ambos parámetros en la sensibilidad de los rotíferos; mayor tolerancia al tóxico en el individuo desarrollado con mayores niveles de alimento disponible. La sensibilidad al estresor por los rotíferos fue superior cuando las poblaciones estuvieron expuestas al tóxico y a densidades alimenticias bajas que cuando se les mantuvo a cantidades altas de alga disponible. Comportamiento similar presentó *B. calyciflorus* expuesto a toxicidad por mercurio y pentaclorofenol y niveles alimenticios bajos y altos de *Nannochloris oculata* (Cecchine y Snell, 1999). Obviamente hubo concentraciones del tóxico a las cuales no se observó crecimiento alguno en los organismos independientemente del nivel de alimento en el medio (Figuras 2, 4 y 6) lo que indica que se rebasó todo nivel de tolerancia de los rotíferos y del efecto mitigador del alga.

Las tasas de crecimiento diario de la población registradas, estuvieron dentro del intervalo de lo esperado (0-2-0.8 ind./día) en el género *Brachionus* (Walz, 1993). Cabe resaltar no obstante, que los valores fueron menores que los de *B. patulus*, probablemente debido a las diferentes densidades de inoculación inicial usadas en este trabajo y las consideradas por otros autores (Sarma y Rao, 1990). La relación entre los valores de la  $CL_{50}$  y la tasa de crecimiento de la población por día ( $r$ ) concuerdan con Roex *et al.* (2000). Ya Foster *et al.* (1994) concluían que los efectos con mayor impacto eran la inhibición reproductiva y el retraso del crecimiento.

Generalmente, el paratión metílico se considera relativamente más tóxico para el zooplankton que para el fitoplancton, y afecta con mayor intensidad al bentos que al plancton (Schaefer *et al.*, 1994; Kungolos *et al.*, 1999). En el presente estudio esto pareció confirmarse cabalmente. *Brachionus calyciflorus*, especie planctónica resultó ser la población más tolerante al paratión metílico. *Brachionus patulus* exhibió un desempeño semejante a *B calyciflorus*, mientras *Euchlanis dilatata* especie béntica mostró ser el rotífero más sensible. Hoekstra *et al.* (1994) refieren que la sensibilidad entre especies cercanas entre si (con base filogenética) las hace compartir características relevantes para ello ya que provienen de un origen común. Añaden que algunas de esas propiedades serían superficie y volumen corporal, composición del ectodermo, y mecanismos de consumo, metabolismo y excreción. Por su parte, Slooff *et al.* (1986) indican que la sensibilidad interespecífica depende de la posición taxonómica y del tipo de sustancia química de que se trate. En este trabajo, las especies del género *Brachionus* mostraron una sensibilidad (estimada en base a la CL<sub>50</sub> y a los valores de la tasa de crecimiento diario, básicamente) más parecida entre sí que en relación a la observada para el euclánido, hecho que concuerda con lo señalado por dichos autores y por Pérez-Legaspi y Rico-Martínez (2001). Estos últimos autores encontraron que las especies bénticas *Lecane hamata*, *L luna* y *L quadridentata* presentaron susceptibilidad semejante a ciertos tóxicos y dichas especies fueron más sensibles al amparárselas con *B calyciflorus*. Estos resultados parecen indicar que existe mayor sensibilidad en las especies bénticas que las planctónicas, hecho que sería importante verificar en estudios futuros.

La distribución del pesticida en el sistema no es homogénea, puede ser mayor en el lecho del sistema por el acúmulo de alga sedimentada con el tóxico adsorbido a ella. Esta distribución es asimétrica al interior de la columna de agua del sistema según (Moriarty, 1983) y confirmada por Angelidis *et al.* (1996) y De la Vega-Zalazar *et al.* (1997). Dichos autores encontraron cantidades significativas de paratión metílico en sedimentos mayores a las presentes en el medio planctónico. Esto implica que los organismos bentónicos están más expuestos al paratión metílico, lo que justifica la inclusión de especies bénticas en este estudio.

La detoxificación o reducción de la toxicidad de los estresores tóxicos en este caso, es un aspecto biológico o fisicoquímico?. Rao y Sarma (1986) atribuyen una mayor resistencia al tóxico por el mayor consumo alimenticio de *Chlorella* en individuos mantenidos en condiciones de mayor disponibilidad. Otros autores mencionan que el aumento de la tolerancia se podría deber a una posible detoxificación del pesticida. Es muy conocida la inestabilidad ambiental del paratión metílico por su alta susceptibilidad a la hidrólisis (Megharaj *et al.*, 1994). Los factores físico químicos que mayor influencia ejercen en la degradación y aparente pérdida de la toxicidad del paratión metílico son la fotólisis, termólisis y la cantidad de oxígeno en el medio (Sharmilla *et al.*, 1989; Lépine, 1991; Coulibaly y Smith, 1993). Con base en lo anterior, en este trabajo se empleó iluminación sólo para desarrollar el alga.

La detoxificación del ambiente por el alga, en particular, es un hecho comprobado (Megharaj, *et al.*, *op cit.*) aunque falta establecer si se debe a la adsorción en la superficie de la microalga o por su capacidad para metabolizar el pesticida. Kent y Currie (1995, en su investigación para predecir la sensibilidad de algas unicelulares dulceacuícolas al estrés

tóxico de un insecticida órgano fosforado, encontraron que en *Chlorella vulgaris*, lo mismo que en otras clorofitas, una fuerte correlación entre la superficie celular y la bioconcentración del pesticida. Concluyeron que el tamaño celular del alga era un factor significativo en la interacción alga y pesticida. Así, la concentración está relacionada con la adsorción a la pared celular y a la cantidad y tipo de sustancias lipídicas en ella. En *Chlorella*, dada la frecuencia de cambio de las condiciones experimentales, y el poco tiempo disponible, el metabolismo de la sustancia tóxica es poco factible (Megharaj *et al.*, 1994). En consecuencia, se supone que las concentraciones nominales del tóxico en este ensayo experimental no cambiaron sustancialmente. El medio de reacción tenía sólo las condiciones de solución fisiológica más no las de crecimiento para el alga por lo que queda descartada la posibilidad de que el alga metabolizara el insecticida. En última instancia, la detoxificación sería vía la adsorción.

La magnitud máxima de detoxificación por las razones expuestas, sólo se esperaría en torno de un 20 %, según se muestra en la Tabla 2. Lo anterior sería válido en algunas de las condiciones de ensayo, concretamente en las de niveles tóxicos mínimos y concentraciones de alimento máximo en las que fue posible observar valores no tan diferentes de los registrados en las poblaciones testigo. En consecuencia, en las poblaciones con las concentraciones del tóxico medias y altas (Figuras 2, 4 y 6), disminuyó significativamente el crecimiento de los rotíferos (Tablas 5, 8 y 11), lo cual se atribuye al pesticida *per se*, mientras a niveles mínimos del estresor la disminución del crecimiento se debería a la combinación de la cantidad de alimento disponible y el contaminante.

Barik (1984) menciona que aunque el paratión metílico es poco persistente, los productos de la hidrólisis son más tóxicos que el compuesto primario. Una explicación plausible a esto es que el paratión metílico es uno de los varios pesticidas causantes de mortalidad a muchos organismos mediante la inhibición de la enzima colinesterasa. Nogrady y Keshmirian (1986a) encontraron que insecticidas inhibidores de la colinesterasa provocaron la retención de huevos en el rotífero bdelloideo, *Philodina acuticornis* y que éste explotaba por la acumulación de los mismos. Dichos autores sugieren que la retención de los huevos es causada por un espasmo o tono aumentado del esfínter cloacal más que una parálisis del músculo necesario en la expulsión peristáltica del huevo. Estos mismos autores más tarde (1986b), proponen sitios específicos del ionóforo aceptor de la colina en el rotífero. Esto influye de manera directa sobre la tasa de reproducción de los individuos. Adicionalmente, un efecto indirecto es mediante la limitación alimenticia ya que según Fernández-Casalderrey *et al.* (1993), en condiciones de estrés por xenobióticos (sobre todo a niveles altos), suele afectarse las tasas de filtración y su capacidad de ingestión. Adams (1990) y Chapin *et al.* (1987) postulan que dependiendo la forma como afecta un estresor al organismo, existen de dos tipos: los de efecto directo y los que lo hacen indirectamente. Los primeros provocan daño fisiológico metabólico directo y los segundos impiden alcanzar la máxima densidad, y ocasionan daños o alteraciones morfológicas. Estos últimos actúan vía alimenticia. Como se observa, dependiendo de la concentración del paratión metílico en los tratamientos crónicos, el efecto del estresor sería muy posiblemente indirecto cuando el estresor está poco concentrado en el medio o directo que sería en cantidades cercanas al efecto agudo. También podría hacerlo simultáneamente. Esto puede explicar la significancia estadística de la interacción de las variables nivel de alimento-concentración del tóxico, en esta investigación.



En este estudio, la tasa de crecimiento ( $r$ ) de *E. dilatata* fue la más afectada por el paratión metílico, en tanto que la  $r$  de *B. calyciflorus* fue la menos afectada de las tres. Otro detalle evidente también, fue el efecto mitigante de los niveles alimenticios, indicando la importancia del estado fisiológico de los individuos expuestos a los tratamientos tóxicos; mayor sensibilidad en estado de inanición que cuando disponen de alimento a distintas cantidades en el medio de crecimiento, hecho ya observado por Kirk (2001). Los valores  $CE_{50}$  mostraron interacciones potencialmente complejas de la interacción niveles de alimento y concentraciones de tóxico que permitieron visualizar mediciones más relevantes de impacto ecológico, como lo mencionan otras investigaciones (Ferrando *et al.*, 1993; Forbes y Calow, 1999; Cecchine y Snell, 1999).

Cabe destacar que especies taxonómicamente semejantes (braquiiónidos) no siempre responden de forma similar a un tóxico, tal vez debido a diferencias interespecíficas (Forbes y Forbes 1993) como puede ser los distintos nichos. Por su parte, Foster *et al.* (1994) concluyeron que los efectos con mayor impacto eran la inhibición reproductiva y el retraso del crecimiento, por estrés tóxico, como se encontró en este estudio para las especies de rotíferos mencionadas.

## CONCLUSIONES

Salvo para *B. calyciflorus*, los rangos tanto alimenticios como tóxicos fueron apropiados ya que permitieron evidenciar desde efectos ligeros que denotaron densidades y tasas de crecimiento positivas la mayoría del tiempo experimental, hasta los efectos drásticos con densidades y crecimientos mínimos o nulos en tratamientos y en el tiempo.

Existen distintas estrategias de respuesta poblacional al tóxico. La toxicidad del paratión metílico en todos los tratamientos considerados tuvo una influencia e intensidad dependiente de la abundancia de la microalga tanto en los ensayos de toxicidad aguda ( $CL_{50}$ ) así como en los subletales (crecimiento poblacional máximo y tasa de crecimiento por día). Es decir, el alga modificó los efectos tóxicos del pesticida en los rotíferos estudiados y la intensidad ( $CE_{50}$ ) es especie-específica.

Existe una posible interacción entre el alga viva (*Chlorella vulgaris*) y el paratión metílico que modifica el comportamiento poblacional de cada especie y es más notable en *E. dilatata*, especie béntica perifítica.

Los resultados obtenidos hasta este momento, sugieren una sensibilidad de los rotíferos al paratión metílico decreciente, de acuerdo al siguiente orden; *E. dilatata*, *B. patulus* y *B. calyciflorus*, respectivamente.

Para establecer concentraciones máximas permisibles de pesticidas, es importante considerar la sensibilidad relativa tanto de los rotíferos planctónicos como de los perifíticos.

En este estudio, la tasa de crecimiento ( $r$ ) de *E. dilatata* fue la más afectada por el paratión metílico, en tanto que la  $r$  de *B. calyciflorus* fue la menos afectada de las tres. Otro detalle evidente también, fue el efecto mitigante de los niveles alimenticios, indicando la importancia del estado fisiológico de los individuos expuestos a los tratamientos tóxicos; mayor sensibilidad en estado de inanición que cuando disponen de alimento a distintas cantidades en el medio de crecimiento, hecho ya observado por Kirk (2001). Los valores  $CE_{50}$  mostraron interacciones potencialmente complejas de la interacción niveles de alimento y concentraciones de tóxico que permitieron visualizar mediciones más relevantes de impacto ecológico, como lo mencionan otras investigaciones (Ferrando *et al.*, 1993; Forbes y Calow, 1999; Cecchine y Snell, 1999).

Cabe destacar que especies taxonómicamente semejantes (braquiúridos) no siempre responden de forma similar a un tóxico, tal vez debido a diferencias interespecíficas (Forbes y Forbes 1993) como puede ser los distintos nichos. Por su parte, Foster *et al.* (1994) concluyeron que los efectos con mayor impacto eran la inhibición reproductiva y el retraso del crecimiento, por estrés tóxico, como se encontró en este estudio para las especies de rotíferos mencionadas.

## CONCLUSIONES

Salvo para *B. calyciflorus*, los rangos tanto alimenticios como tóxicos fueron apropiados ya que permitieron evidenciar desde efectos ligeros que denotaron densidades y tasas de crecimiento positivas la mayoría del tiempo experimental, hasta los efectos drásticos con densidades y crecimientos mínimos o nulos en tratamientos y en el tiempo.

Existen distintas estrategias de respuesta poblacional al tóxico. La toxicidad del paratión metílico en todos los tratamientos considerados tuvo una influencia e intensidad dependiente de la abundancia de la microalga tanto en los ensayos de toxicidad aguda ( $CL_{50}$ ) así como en los subletales (crecimiento poblacional máximo y tasa de crecimiento por día). Es decir, el alga modificó los efectos tóxicos del pesticida en los rotíferos estudiados y la intensidad ( $CE_{50}$ ) es especie-específica.

Existe una posible interacción entre el alga viva (*Chlorella vulgaris*) y el paratión metílico que modifica el comportamiento poblacional de cada especie y es más notable en *E. dilatata*, especie béntica perifítica.

Los resultados obtenidos hasta este momento, sugieren una sensibilidad de los rotíferos al paratión metílico decreciente, de acuerdo al siguiente orden; *E. dilatata*, *B. patulus* y *B. calyciflorus*, respectivamente.

Para establecer concentraciones máximas permisibles de pesticidas, es importante considerar la sensibilidad relativa tanto de los rotíferos planctónicos como de los perifíticos.

## REFERENCIAS

- Angelidis, M.O; Markantonatos, P.G; Bacalis, N.C y Albanis, T.A. 1996. Seasonal fluctuations of nutrients and pesticides in the basin of Evrotas River, Greece. J. Environ.-Sci.-Health. A31: 1523-1534
- Anonimous. (U.S. Public Health Service), 1995. Hazardous Substance Data Bank. Washington, DC, 5-9.
- Comisión Nacional de Ecología (CONADE). Informe de la Situación General en Materia de Equilibrio Ecológico y Protección al Ambiente 1989-1990. Comisión Nacional de Ecología (CONADE), México, D.F. 1991.
- Anonimous, 1985. Methods of measuring the acute toxicity of effluents to freshwater and marine organisms. US Environment Protection Agency EPA/600/4-85/013
- Arévalo-Stevenson, R.A; Sarma, S.S.S. y Nandini, S. 1998. Population dynamics of *Brachionus calyciflorus* Pallas:(Monogononta: Brachionidae) in waste water from food processing industry in México. Rev. Biol. Trop. 43: 595-600
- ASTM 1991. American Society of Testing and Materials. Standard guide for acute toxicity tests with the rotifer *Brachionus*. Annual Book of ASTM Standards. Vol. 11.04, E 1440, Philadelphia, USA.
- Barik, S. 1984. Metabolism of insecticides by microorganisms. In Lal, R (ed). Insecticide microbiology. Springer-Verlag, Berlin, pp 87-130
- Bazzaz, F.A; Nona, R; Chiarello, N.R Coley, P.D y Pitelka, L.F |987. Allocating resources to reproduction and defense. Bioscience 37: 58-67
- Bennett, W.N y Boraas, M.E. 1989. A demographic profile of the fastest growing metazoan: a strain of *Brachionus calyciflorus* (Rotifera). Oikos 55: 365-369.
- Biddinger, G.R y Gloss, S.P. 1984. The importance of trophic transfer in the bioaccumulation of chemical contaminants in aquatic ecosystems. Residue Reviews, 91: 103-145
- Bowman, B.P; Snell, T.W. y Cochrane, B.J. 1990. Isolation and purification of glutathione S-transferases from *Brachionus plicatilis* and *B. calyciflorus* (Rotifera). Comp. Biochem. Physiol. B. 95: 619-624.
- Borowitzka M.A. y Borowitzka L.J. 1988. Micro-algal biotechnology. Cambridge University Press, London.
- Brandt, O.M., Fujimura, R.W. y Finlayson, B.J. 1993. Use of *Neomysis Mercedis* (Crustacea: Mysidacea) for estuarine toxicity tests. Transactions of the American Fisheries Society. 122: 279-288.
- Calleja, M.C; Geladi, P. y Persoone, G. 1994. Modelling of human acute toxicity from physicochemical properties and non-vertebrate acute toxicity of the 38 organic chemicals of the MEIC priority list by PLS regression and neural network. Food Chem. Toxicol. 32: 923-941.
- Castellanos-Páez, M; Garza-Mouriño, G. y Marañón-Herrera, S. 1999. Aislamiento, caracterización, biología y cultivo del rotífero *Brachionus plicatilis* (O.F. Müller). U. A. M. Xochimilco, Mexico. pp.113
- Cecchine, G y Snell, T. 1999. Toxicant exposure increases threshold food levels in freshwater rotifer populations. Environ. Toxicol. 14: 523-530
- Centeno, M.C; Brendock, L y Persoone, G. 1993. Cyst-based toxicity tests. III. Development and standardization of an acute toxicity test with the freshwater anostracan crustacean *Streptocephalus proboscideus*. In Soares, A.M.V and Calow,

- P (eds) Progress in standardization of aquatic toxicity tests. Lewis Publishers. Boca ratón, Florida. p 37-55.
- Chapin, F.S. 1991 Integrated Responses of Plants to Stress. A centralized system of physiological responses. *Bioscience*. 41; 29-36
- CONADE 1991. Informe de la situación general en materia de equilibrio ecológico y protección al ambiente 1989-1990. Comisión Nacional de Ecología, México.
- Colulibaly, K y Smith, J.C. 1993. Thermostability of organophosphate pesticide and some of their major metabolites in water and beef muscle. *J. Agric. Food Chem.* 41: 1719-1723
- Dave, G. 1993. Replicability, repeatability and reproducibility of embryo-larval toxicity tests with fish. In Soares, A.M.V and Calow, P (eds) Progress in standardization of aquatic toxicity tests. Lewis Publishers. Boca ratón, Florida. P 37-55
- De Fernicola, N.A. 1985. Toxicología de los insecticidas organoclorados. *Bol. of Sanit Panam.* 98: 10-19
- De Pauw, N y Persoone, G. 1988. Micro-algae for aquaculture. En, Borowitzka M.A. y Borowitzka L.J. (eds). *Micro-algal biotechnology*. Cambridge University Press, London. pp 197-221
- De la Vega-Zalazar, M.Y; Martínez-Tabche, L y Macias-García, C. 1997. Bioaccumulation of methyl parathion and its toxicology in several species of the freshwater community in Ignacio Ramírez dam in México. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 38: 53-62
- Dumont, H.J. 1977. Biotic factors in the population dynamics of rotifers. *Arch. Hydrobiol. Beih.* 8: 98 - 112.
- Dumont, H.J. y Sarma, S.S.S. 1995. Demography and Population Growth of *Asplanchna girodi* (Rotifera) as a Function of Prey (*Anuraeopsis fissa*) Density. *Hydrobiologia* 306: 97-107.
- Dumont, H.J; Sarma, S.S.S. y Ali, A.J. 1995. Laboratory studies on the population dynamics of *Anuraeopsis fissa* (Rotifera) in relation to food density. *Freshwater Biol.* 33: 39-46.
- Duncan, A. 1989. Food limitation and body size in the life cycles of planktonic rotifers and cladocerans. *Hydrobiologia*, 186/187: 11-28.
- Ejsmont-Karabin, J; Siewertsen, K y Gulati, R.D. 1993. Changes in size, biomass and production of *Euchlanis dilatata* Lucksiana Hauer during its lifespan. *Hydrobiologia*: 255/256: 77-80.
- El Jay, A 1996. Toxic effects of organic solvents on the growth of *Chlorella vulgaris* and *Selenastrum capricornutum*. *Bull. Environ contam toxicol* 57: 191-198
- Fargasova, A 1994. Comparative toxicity of five metals on various biological subjects. *Bull. Environ Contam Toxicol* 53: 317-324
- Faust, M; Altenburger, R; Boedeker, W y Grimme, L.H. 1994. Algal toxicity of binary combinations of pesticides. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 53: 134-141
- Fernández-Casalderrey, A; Ferrando, M.D, y Andreu-Moliner, E. 1991. Demographic parameters of *Brachionus calyciflorus* Pallas (Rotifera) exposed to sublethal endosulfan concentrations. *Hydrobiologia* 226: 103-110
- Fernández-Casalderrey, A; Ferrando, M.D, y Andreu-Moliner, E. 1992. Acute toxicity of several pesticides to the rotifer *Brachionus calyciflorus*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 48: 14-17

- Fernández-Casalderrey, A; Ferrando, M.D. y Andreu-Moliner, E. 1993a. Chronic toxicity of methylparathion to the rotifer *Brachionus Calyciflorus* fed on *Nannochloris Oculata* and *Chlorella Pyrenoidosa*. *Hydrobiologia*. 255/256: 41-49.
- Fernández-Casalderrey, A; Ferrando, M.D. y Andreu-Moliner, E. 1993b. Effect of the insecticide methylparathion on filtration and ingestion rates of *Brachionus calyciflorus* and *Daphnia magna*. *Sci. Total. Environ., Suppl. 1-2*: 867-876.
- Ferrando, M.D; Janssen, C; Andreu-Moliner, E y Persoone, G. 1993. Ecotoxicological studies with the freshwater rotifer *B. calyciflorus*.: the effects of chemicals on the feeding behavior. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 26: 1-9
- Finney, D.J. 1971. Probit analysis. 3rd ed. Cambridge Univ. Press, London
- Flores-Burgos, J. 1997. Estudio Sobre los rotíferos como indicadores de calidad de agua. Tesis Biol. ENEP-I UNAM, Méx.
- Forbes, V.E y Forbes, T.L. 1994. *Ecotoxicology in theory and practice*. Chapman and Hall, London
- Forbes, V.E. y Calow, P. 1999. Is the per capita rate of increase a good measure of population-level effects in ecotoxicology? *Environ. Toxicol. Chem.* 18: 1544-1556.
- Foster, S.C; Burk, S.L; Fort, D.J; Stover, E.L y Matlock, M.D. 1994. Development and evaluation of a non destructive measure of fish growth for sublethal toxicity assessment. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 53: 85-90
- Gallo, M. A. y Lawryk, N. J. Organic phosphorus pesticides. In *Handbook of Pesticide Toxicology*. Hayes, W. J., Jr. and Laws, E. R., Jr., Eds. Academic Press, New York, NY, 1991.5-3
- Gilbert, J.J. y Bogdan, K.G. 1984. Rotifer grazing: in situ studies on selectivity and rates. In: Meyers, D.G, Strickler, J.R (eds) *Trophic interactions within aquatic ecosystems*. Am Assoc Adv Sci Selected Symp 85: 97-133
- Groeneweg, J. y Schlueter, M. 1981. Mass production of freshwater rotifers on liquid wastes: Mass production of *Brachionus rubens* in the effluent of high-rate algal ponds used for the treatment of piggery waste. *Aquaculture* 25 : 25-34
- Halbach, U. 1979. Introductory remarks: Strategies in population research exemplified by rotifer population dynamics. *Fortschr. Zool.* 25: 1-27
- Halbach, U; Sieber, M; Westermayer, W. y Wissel, C. 1983. Population ecology of rotifers as a bioassay tool for ecotoxicological tests in aquatic environments. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 7: 484 - 513.
- Halbach, U. 1984. Population dynamics of rotifers and its consequences for ecotoxicology. *Hydrobiologia* 109: 79-96
- Hama, T.O y Miyachi, S. 1988. *Chlorella* En, Borowitzka, M.A. y Borowitzka L.J. (eds) *Micro-algal biotechnology*. Cambridge University Press, London. pp 3-26
- Hanazato, T y Yasuno, M. 1987. Effects of a carbamate, carbaryl, on the summer phytoplankton and zooplankton communities in ponds. *Env. Poll.* 48: 145-159
- Hellawell, J.N. 1986. *Biological indicators of freshwater pollution and environmental management*. Elsevier, London.
- Henao, H.S y Corey, G. 1986. *Plaguicidas organofosfatados y carbámicos*. Centro Panamericano de Ecología Humana. Metepec, Edo. de Méx. México
- Hoekstra, J.A; Vaal, M.A; Notenboom, J y Slooff, W. 1994. Variation in the sensitivity of aquatic species to toxicants. *Bull. Environ Contam Toxicol* 53: 98-105
- Hoffmann, A.A y Parsons, P.A.1997. *Extreme environmental change and evolution*. Cambridge University Press U.K

- Hutchinson, G.E. 1967. A treatise on limnology. Vol. II. Introduction to lake biology and limnoplankton. Wiley and Sons, N.Y.
- Howard, P. H., Ed. Handbook of Environmental Fate and Exposure Data for Organic Chemicals. Vol 3: Pesticides. Lewis Publishers, Chelsea, MI, 1991.5-13
- Janssen, C.R; Ferrando, M.D y Persoone, G. 1994. Ecotoxicological studies with the freshwater rotifer *Brachionus calyciflorus*. Ecotoxicol. Environ. Saf. 28 : 244-255
- Johnson, W. W. y Finley, M. T. Handbook of Acute Toxicity of Chemicals to Fish and Aquatic Invertebrates. Resource Publication 137. U.S. Department of Interior, Fish and Wildlife Service, Washington, DC, 1980.5-17.
- Kaur, K y Ansal, M.D. 1996. Sensitivity of selected zooplankton exposed to phosphamidon, fenitrothion and fenthion. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 57: 199-203
- Kent, R.A y Currie, D. 1995. Predicting algal sensitivity to a pesticide stress. Environ. Toxicol. Chem. 14: 983-991
- Khadka, R.B y Rao, T.R. 1986. Prey selection by common carp (*Cyprinus carpio* var. *Communis*) larvae in relation to age and prey density. Aquaculture 54: 89-96
- Kidd, H. y James, D. R., Eds. The Agrochemicals Handbook, Third Edition. Royal Society of Chemistry Information Services, Cambridge, UK, 1991 (as updated).5-14
- King, C.E. 1967. Food, age and the dynamics of a laboratory population of rotifers. Ecology. 48: 111-128.
- Kirk KL 2001 Dietary restriction and aging: Comparative tests of evolutionary hypotheses. Journals of Gerontology Series A-Biological Sciences and Medical Sciences 56: B123-B129.
- Kluettgen, B; Kuntz, N y Ratte, H.T. 1996. Combined effects of 3,4-dichloroaniline and food concentration on life-table data of two related cladocerans, *Daphnia magna* and *Ceriodaphnia quadrangula*. Chemosphere. 32: 2015-2028
- Kooijmann, S.A y Metz, A.J. 1984. On the dynamics of chemically stressed populations: The deduction of population consequences from effects on individuals. Ecotoxicol. Envir. Safety 8: 254-274
- Koste, W. Rotatoria. Die Rädertiere Mitteleuropas. Ein Bestimmungswerk begründet von Max Voigt. Borntträger, Stuttgart, Vol. 1: Textband 673 pp., Vol. 2: Tafelband 1978. 234 pp.
- Krebs, C.J. 1985. Ecology. The experimental analysis of distribution and abundance. Harper and Row, New York
- Kungolos, A; Samaras, P; Kipopoulo, A.M; Zoumboulis, A.y Sakellaropoulos, G.P. 1999. Waste management problems in agro-industries 1998. Water Sc. Tech. 40: 357-364.
- Liber, K. y Solomon, K. R. 1995. Acute and chronic toxicity of 2,3,4,6-tetrachlorophenol and pentachlorophenol to *Daphnia* and rotifers. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 26: 212-221
- Lépine, F.L. 1991. Effects of ionizing radiation on pesticides in a food irradiation perspective: A bibliographic review. J. Agric. Food Chem., vol 39 (12): 212-218
- Martínez-Jeronimo F y Garcia-González, B. 1994. Effect of food concentration on the chronic toxicity of sodium dodecyl sulphate to *Daphnia magna*. J Aquat Ecosyst Health 3: 247-253
- McGeoch, M.A. 1998. The selection, testing and applications of terrestrial insects as bioindicators. Biological Reviews. 73: 181-201

- Merriman J.L y Kirk, K. 2000. Temporal patterns of resource limitation in natural populations. *Ecology*, 81: 141-149
- Megharaj, M; Madhavi, D.R; Sreenivasulu, C y Umamaheswari, A. 1994. Biodegradation of methyl parathion by soil isolates of microalgae and cyanobacteria. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 53: 292-297
- Meza-Pavón, E.L. 2000. Efecto de *Chlorella vulgaris* viva y muerta sobre el crecimiento poblacional de *Brachionus calyciflorus* Pallas y *Brachionus patulus* Muller (Rotifera: Brachionidae) en laboratorio. Tesis Maestría, ICMYL-UNAM, Méx., D.F.
- Miracle, M.R. y Serra, M. 1989. Salinity and temperature influence in rotifer life history characteristics. *Hydrobiologia* 186/187: 81-102
- Mok, C.Y; Marriot, P; Ong, K.L y Yeo, G.N. 1987. Photodegradation of parathion. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 38: 820-826
- Moriarty, F. 1983. *Ecotoxicology. The study of pollutants in ecosystems.* Academic Press, London: 233 pp.
- Neilson, A. 1994. *Organic chemicals in the aquatic environment. Distribution, persistence and toxicity.* Lewis publishers. Boca, Raton Florida.
- Nogrady, T y Keshmirian, J. (1986 a). Rotifer neuropharmacology: I. Cholinergy drug effects on oviposition of *Philodina acuticornis* (Rotifera, Aschelminthes). *Comp. Biochem. Physiol.* Vol 83 (2); 335-338
- Nogrady, T y Keshmirian, J. (1986 b). Rotifer neuropharmacology: II. Synergistic effect of acetylcholine on local anesthetic activity in *Brachionus calyciflorus* (Rotifera, Aschelminthes). *Comp. Biochem. Physiol.* Vol 83 (2); 339-344
- Nogrady, T; Wallace, R. L. y Snell, T.W. *Rotifera*; SBP Academic Publishers bv; The Hague, 1993; 142 pp.
- Patin, S.A. 1982. *Pollution and the biological resources of the oceans.* Butterworth Scientific, London, pp 287
- Pennak, R.W. 1989. *Fresh-Water invertebrates of the United States.* 3ª ed. Wiley, N.Y.
- Pérez-Legaspi, I.A. y R. Rico-Martínez, 1998. Effect of temperature and food concentration on two species of littoral rotifers. *Hydrobiologia* 387/388: 341-348.
- Pérez-Legaspi, I.A y Rico-Martínez, R. 2001. Acute toxicity tests on three species of the genus *Lecane* (Rotifera: Monogononta). *Hydrobiologia* 446/447 : 375-381
- Persoone, G. 1991. Cyst-based toxicity test. I. A promising new tool for rapid and cost-effective toxicity screening of chemicals and effluents. *Z angew Zool* 78: 235-241
- Osmond, C.B; Austin, M.P; Berry, J.A; Billings, W; Boyer, J; Dacey, J.W; Nobel, P; Smith, S. And Winner, W. 1987. Stress physiology and the distribution of plants. *Bioscience*, vol 37 (1) 38-47
- Rabin, B.S. 1999. *Stress, immune function and Health. The connection.* Wiley-Lis, USA
- Rao. T.R. y Sarma, S.S.S. 1986. Demographic parameters of *Brachionus patulus* Muller (Rotifera) exposed to sublethal DDT concentrations at low and high food levels. *Hydrobiologia* 139: 193-200.
- Rao, T.R y Sarma, S.S.S. 1990. Interaction of *Chlorella* density and DDT concentration on the population dynamics of the rotifer, *Brachionus patulus* (Rotifera). *Indian J Environ Hlth* 32 : 157-160
- Restrepo, I. 1988. *Naturaleza Muerta. Los plaguicidas en México.* Andrómeda. México.
- Ricci, C. 2001. Dormancy patterns in rotifers. *Hydrobiologia* 446/447: 1-11
- Richmond, A. 1986. *Handbook of micro algal mass culture.* C.R.C. Press, Boca Ratón, Flo.

- Rico-Martínez, R; Jiménez-Rodríguez, A.M; Velásquez-Rojas, C.A y Pérez-Legaspi, I.A. 1997. Desarrollo de bioensayos toxicológicos y su aplicación en programas de monitoreo de la calidad de pozos y tomas de agua del Municipio de Aguascalientes. Memorias del Cuarto Simposio Estatal: La investigación y el desarrollo tecnológico en Aguascalientes, Aguascalientes, México: 150-154
- Rico-Martínez, R; Pérez-Legaspi, I.A y Quintero-Díaz, G.E; Rodríguez-Martínez, M.G; Hernández-Rodríguez, M.A y Zaragoza-Almaraz, J.E. 1998. Effects of copper addition to laboratory maintained microcosms of Presidente Calles reservoir organisms (Aguascalientes, México). *Aquat. Ecosyst. Health Manage.* Vol. 1(3-4): 323-332
- Roex, E. W. M; Van Gestel, C. A. M; Van Wezel, A. P. y Van Straalen, N. 2000. Ratios between acute aquatic toxicity and effects on population growth rates in relation to toxicant mode of action. *M., Env. Toxicol. Chem.* 19: 685-693.
- Ruttner-Kolisko, A. 1974. Plankton rotifers: Biology and taxonomy. E. Schweizerbart'sche Velagsbuchhandlung (Nägeleu Obermiller) Stuttgart, Alemania
- Sarma, SSS 1991 Rotifers and aquaculture (Review). *Environ. Ecol.* 9: 414-428
- Sarma, SSS y Rao, TR (1991) The combined effects of food and temperature on the life history parameters of *Brachionus patulus* Muller (Rotifera) *Int. Revue ges. Hydrobiol.* 76: 225-239.
- Sarma, S.S.S; Iyer, N y Dumont, H.J. 1996. Competitive interactions between herbivorous rotifers: importance of food concentration and initial population density. *Hydrobiologia* 331 : 1-7
- Sarma, S.S.S. y Nandini, S. 1999. Rotifer ecotoxicology. Laboratory manual. UNAM Campus Iztacala. 181 pp
- Sarma, S.S.S. y Martínez-Figueroa, J. 2000. Morfometría de *Filinia cornuta* (Weisse, 1847) (Rotifera: Filiniidae) en el lago del parque Tezozomoc (México). *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas* 3(2): 69-72.
- Sarma, S.S.S; Nandini, S y Araiza, M.A.F. 1998. Effect of methyl parathion-treated prey (*Brachionus calyciflorus*) on the population growth of the predator *Asplanchna sieboldi* (Rotifera). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 61: 135-142
- Sarma, S.S.S; Ramires-Pérez, T y Nandini, S. 2000 a. Comparison of the sensitivity of *Brachionus calyciflorus* and *Brachionus patulus* (Rotifera) to selected heavy metals under low and high food (*Chlorella vulgaris*) levels. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 64: 735-739
- Sarma, S.S.S; S. Nandini y Gama-Flores, J.L 2000 b. Effect of methyl parathion on the population growth of the rotifer *Brachionus patulus* (O.F. Müller) under different algal food (*Chlorella vulgaris*) densities. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 48 : 190-195
- Schaefer, H; Hettler, H; Fritsche, U; Pitzen, G; Roederer, G. y Wenzel, A. 1994 Biotests using unicellular algae and ciliates for predicting long-term effects of toxicants. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 27: 64-81.
- Sharmilla, M; Ramanad, K y Sethunathan, N. 1984. Hydrolysis of methyl parathion in a flooded soil. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 43: 45-51
- Seale, D.B; Boraas, M.E y Buchholz, L.E. 1993. Application of rotifer continuous cultures to ecotoxicology. In Walz, N (ed). *Plankton regulation dynamics. Experiments and models in rotifer continuous cultures.* Springer Verlag. N.Y. Ecological studies 98: p 243-252
- Sladeczek, V. 1983. Rotifers as indicators of water quality. *Hydrobiologia* 100: 169 – 201.



- Slooff, W; Van oers, J.A y De Zwart, D. 1986. Margins of uncertainty in ecotoxicological hazard assesment. *Environ. Toxicol. Chem.* 5: 841-852
- Smith, G. J. 1993. Toxicology and pesticide use in relation to wildlife: In: C. K. Smoley, ed. *Organophosphorus and carbamate compounds*. Boca Raton, FL, 5-7
- Snell, T.W; Childress, M. J; Boyer, E. M. y Hoff, F.H. 1987. Assessing the status of rotifer mass cultures. *J. World. Aquacult. Soc.* 18: 270-277.
- Snell, T.W. y Persoone, G. 1989. Acute toxicity bioassays using rotifers 2. The freshwater test with *rubens*. *Aquat. Toxicol.* 14: 81-92
- Snell, T.W. y Janssen, C.R. 1995. Rotifers in ecotoxicology. *Hydrobiologia* 313/314: 231-247.
- Sokal, R.R. & F.J. Rohlf, 1981. *Biometry* (2nd edn). W.H. Freeman and Company, San Francisco. 859 pp
- Sprague, J.B. 1969. Measurement of pollutant toxicity to fish. I. Bioassay methods for acute toxicity. *Water Res.* 3: 793-821
- Stemberger, R.S. y Gilbert, J.J. 1984. Spine development in the rotifer *Keratella cochlearis* induction by cyclopoid copepods and *Asplanchna*. *Freshwat. Biol.* 14: 639-648.
- Tadros, M.G; Philips, J; Patel, H y Pandiripally, V. 1994. Differential response of green algal species to solvents. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 52: 333-337
- Toledo, V.M; Carabias, J; Toledo, C y Gonzalez-Pacheco, C. 1989. La producción rural en México: Alternativas ecológicas. Prensa de Ciencias, UNAM y Fundación Universo Veintiuno. Colección Medio Ambiente 6, México
- Van-Wijk, R.J y Kraaij, R. 1994. The use of model parameter estimations from standard fish toxicity test to indicate toxic mechanisms. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 53: 171-178
- Vega-Quintero, S.M. 1996. Caracterización y análisis bromatológico de una cepa mono algal : *Chlorella vulgaris* Beijerinck colectada de la atmósfera con posible uso en acuicultura. Tesis Biol. ENEP-I UNAM, Méx. 46 pp
- Versteeg, D.J; Stalmans, M; Dyer, S.D y Janssen, C. 1997. *Ceriodaphnia* and *Daphnia*: A comparison of their sensitivity to xenobiotics and utility as a test species. *Chemosphere*, 34: 869-892
- Vilaclara, G y Sladeczek, V. 1989. Mexican rotifers as indicators of water quality with description of *Collotheca riverai* n. Sp. *Arch Hydrobiol.* 115: 257-263
- Walsh, E.J. 1989. Oviposition behavior of the littoral rotifer *Euchlanis dilatata*. *Hydrobiologia.* 186/187: 157-161.
- Walz, W. 1995. Plankton regulation dynamics. In "Ecological studies 98." Springer-Verlag, Berlin.

## APENDICE

Procedimiento para calcular la  $CE_{50}$ . El ejemplo fue con los datos de *E dilatata*.

Utilizando los datos originales del valor de la tasa de crecimiento diario ( $r$ ) de esta especie, se realizó una regresión lineal de cada nivel de alimento, separadamente y se obtuvo la ecuación de la misma. Con la mitad del valor de la tasa de crecimiento del grupo testigo ( $=Y$  en la ecuación) se derivó la concentración teórica de paratión metílico ( $=X$ ) requerida para reducir a la mitad el valor de ( $r$ ) para cada concentración de alimento, según se ilustra a continuación.

El valor de  $r$  en el grupo testigo crecido a densidad de  $0.5 \times 10^6$  cél./ml fue de 0.248 ind./día (Figura 12). La mitad ( $r/2$ ) de dicho valor es entonces  $= 0.124$ . Sustituyendo este valor en la ecuación de la regresión (Figura A) se tiene:

$$Y = - 0.344 - 0.436 \log_{10} X$$

$$0.124 = - 0.344 - 0.436 \log_{10} X$$

$$0.124 + 0.344 = - 0.436 \log_{10} X$$

$$0.468 = - 0.436 \log_{10} X$$

$$0.468 / - 0.436 = \log_{10} X$$

$$\mathbf{0.085 \text{ mg/l} *}$$

De manera análoga, el valor de  $r$  del grupo testigo con  $1.0 \times 10^6$  cél./ml de alga en el medio fue de 0.2866 y el de  $r/2 = 0.1433$ . Sustituyendo este valor en la ecuación de la regresión (Figura B) se tiene:

$$Y = - 0.291 - 0.436 \log_{10} X$$

$$0.1433 = - 0.291 - 0.436 \log_{10} X$$

$$0.1433 + 0.291 = - 0.436 \log_{10} X$$

$$0.4343 = - 0.436 \log_{10} X$$

$$0.4343 / - 0.436 = \log_{10} X$$

$$-0.996 = \log_{10} X$$

$$= \mathbf{0.101 \text{ mg/l} *} \text{ (Tabla 12).}$$

De igual forma, cuando el valor de r del grupo testigo con  $2.0 \times 10^6$  cél./ml de alga en el medio fue de 0.2975 y el de  $r/2 = 0.1487$ . Sustituyendo este valor en la ecuación de la regresión (Figura C) se tiene:

$$Y = -0.175 - 0.409 \log_{10} X$$

$$0.1487 = -0.175 - 0.409 \log_{10} X$$

$$0.1487 + 0.175 = -0.409 \log_{10} X$$

$$0.3237 = -0.409 \log_{10} X$$

$$0.3237 / -0.409 = \log_{10} X$$

$$-0.791 = \log_{10} X$$

$$0.1618 \text{ mg/l} *$$

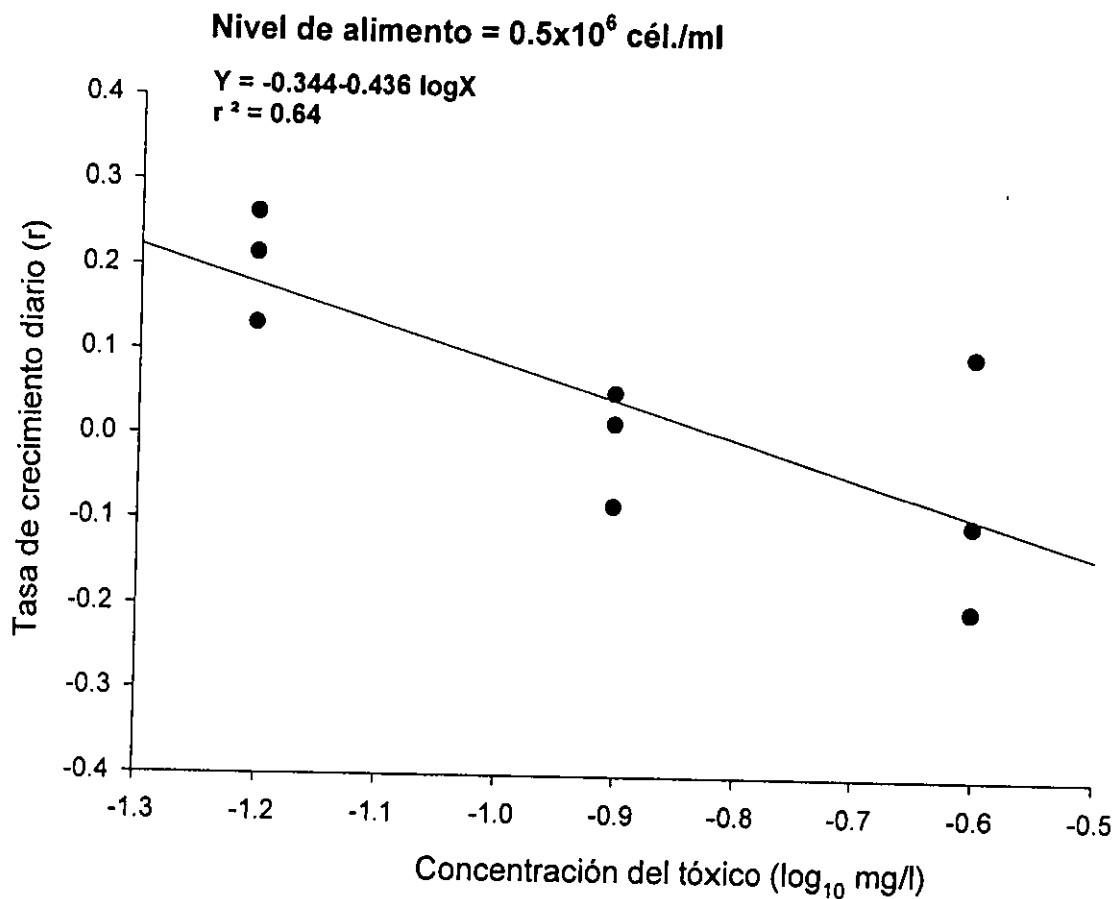


Figura A. Relación entre la tasa de crecimiento diario (r) de *E. dilatata* y la concentración de paratión metílico a una densidad de  $0.5 \times 10^6$  cél./ml de *Chlorella vulgaris*

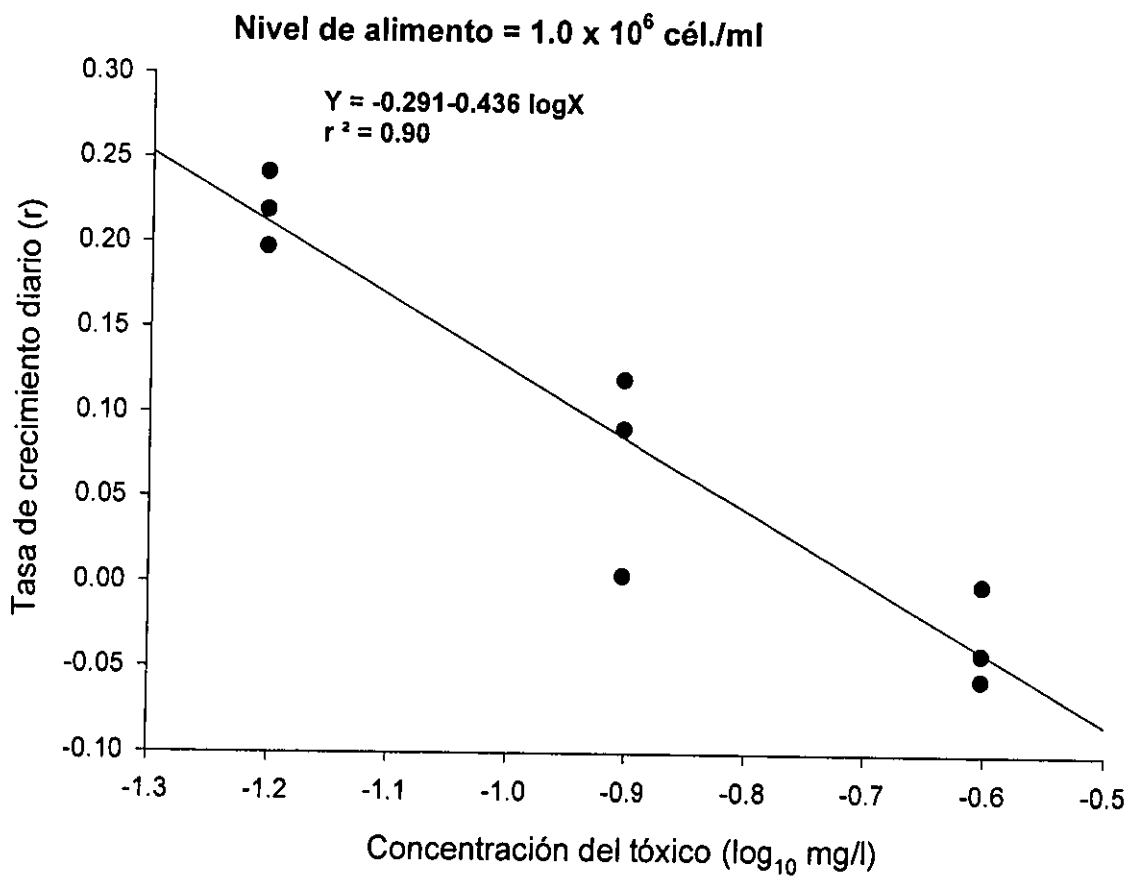


Figura B. Relación entre la tasa de crecimiento diario de *E. dilatata* y la concentración de paratión metílico a una densidad de  $1.0 \times 10^6$  cél./ml de *Chlorella vulgaris*.

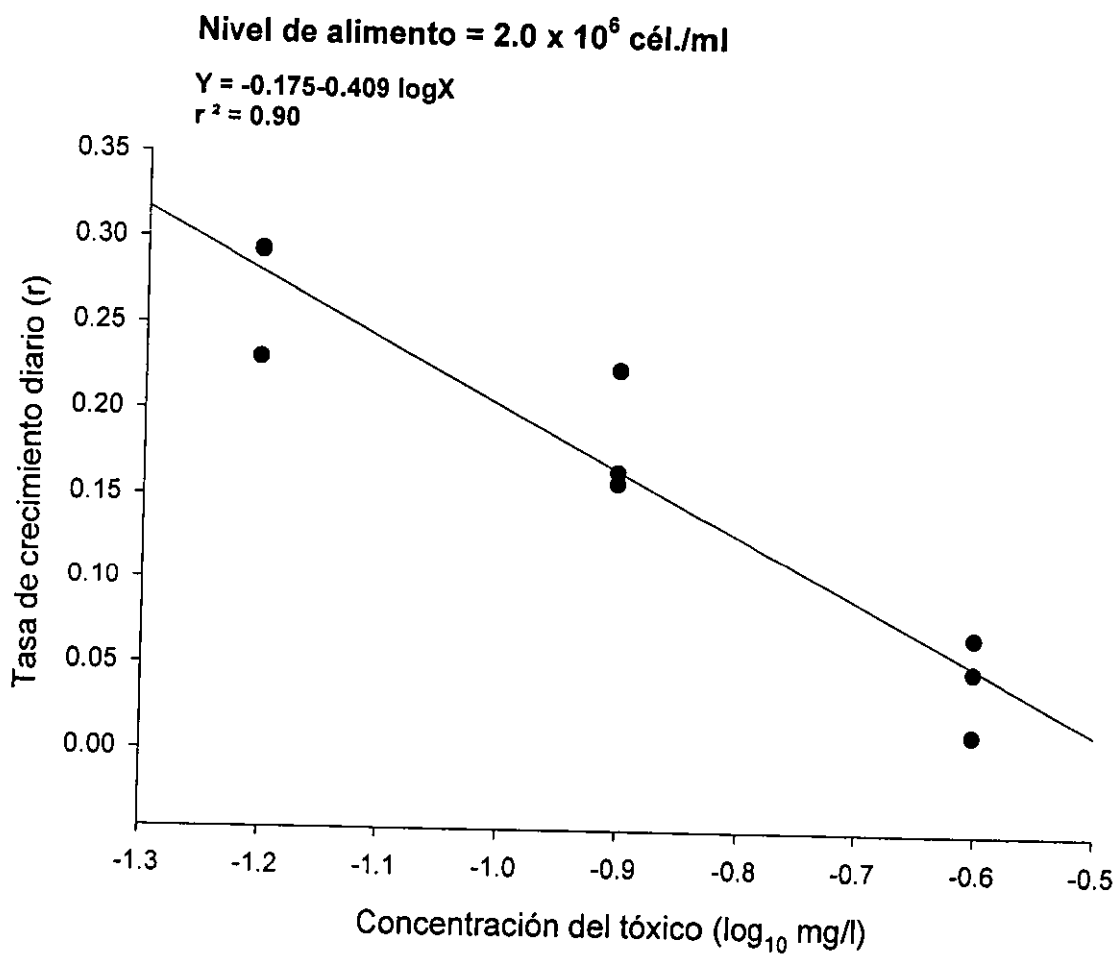


Figura C. Relación entre la la tasa de crecimiento diario (r) de *E. dilatata* y la concentración de paratión metílico a una densidad de  $2.0 \times 10^6$  cél./ml de *Chlorella vulgaris*.

## Combined Effects of *Chlorella* Density and Methyl Parathion Concentration on the Population Growth of *Brachionus calyciflorus* (Rotifera)

J. L. Gama Flores, S. S. S. Sarma, M. A. Fernández Araiza

Biology Career, National Autonomous University of Mexico, Campus Iztacala, AP 314, CP 54000, Los Reyes, Tlalnepantla, State of Mexico, Mexico

Received: 17 November 1998/Accepted: 24 March 1999

In aquatic ecosystems, rotifers play a major role in several important ecological processes. Particularly in freshwater, they exert heavy grazing pressure on phytoplankton abundances (Gilbert and Bogdan 1984). They are also known to feed on detritus-bacterial clumps (Dumont 1977). Their contribution to the secondary production as food source for many predatory invertebrates including larval crustaceans, as well as for larval fish and adult ornamental fish species is well documented. Thus, in aquacultural operations rotifers are widely used as ideal first food for rearing a variety of fish and crustaceans (Lubzens 1987). Additionally, rotifers are considered as sensitive indicators of the health of their environment (Sladeczek 1983). They have therefore been used as excellent bioassay organisms in water pollution studies in order to detect toxic levels of industrial and agricultural wastes in Europe and USA (Halbach 1984; ASTM 1991).

Currently in Mexico, the use of the exotic zooplankton *Daphnia magna* is in force for toxicological evaluation of industrial effluents (Martinez-Jeronimo and Garcia-Gonzalez 1994). Since this is not a native species, its use for national testing of toxic materials does not seem relevant. In this connection, some attempts have been made in Mexico for the application of other zooplankton, particularly rotifers, in aquatic toxicology as indicators of the water quality (Vilaclara and Sladeczek 1989). In Mexico, there has been an increase in the use of different pesticides including methyl parathion by the agricultural sector (CONADE 1991). Sarma et al. (1998) observed that at 24 hr, the  $LC_{50}$  for the laboratory-grown rotifer *Brachionus calyciflorus* was about 9 mg/L for methyl parathion. However, this value is three times higher for the same species when the test individuals were obtained by hatching the resting eggs (Fernandez-Casalderrey et al. 1992). Food density is known to influence the toxicity of pesticides on rotifers (Rao and Sarma 1986). The aim of the present study is to investigate the effect of methyl parathion on population growth of the rotifer *B. calyciflorus* under different algal food concentrations.

### MATERIALS AND METHODS

The rotifer *Brachionus calyciflorus* was originally collected in Chapultepec Lake (Mexico City) and mass cultured using reconstituted water (EPA) as medium. The EPA medium was prepared by dissolving 96 mg  $NaHCO_3$ , 60 mg  $MgSO_4$ , 60 mg  $CaSO_4 \cdot 2H_2O$  and 4 mg KCl in one litre of distilled water (Anon. 1985). In routine cultures, we were able to obtain rotifer densities higher than 100 ind./mL at 25° C using green alga *Chlorella vulgaris* as exclusive food. *Chlorella* was mass cultured using Bold-Basal medium (Borowitzka and Borowitzka 1988).

Correspondence to: S. S. S. Sarma

For the experiments we used log phase algae, harvested by centrifugation at 800 g for 5 minutes, washed twice with distilled water and resuspended in EPA medium. The algal density was estimated using haemocytometer. *B. calyciflorus* grows on a wide range of algal density ( $5 \times 10^5 - 40 \times 10^6$  cells/mL), but the optimum is around  $6 \times 10^6$  cells/mL (Sarma et al. 1996). Thus, four final algal levels viz 0.75, 1.5, 3.0 and  $6.0 \times 10^6$  cells/mL were prepared by serial dilution using EPA medium. We used methyl parathion (commercial grade) as the toxicant. In order to choose the toxicant concentrations, we used the previously reported  $LC_{50}$  values obtained under different assay conditions (9-29 mg/L for 24 hr) for this chemical for the same rotifer species from the literature (Fernandez-Casalderrey et al., 1992; Sarma et al. 1998). Accordingly, we selected five toxicant concentrations viz. 0 (control), 5, 10, 20, and 30 mg/L. For obtaining the desired final algal concentration and toxicant level, we followed Rao and Sarma (1986). In this procedure, every day, twice the required concentrations of both the toxicant and the food were mixed in equal proportions, just before using as medium to avoid possible detoxification of methyl parathion by algae in the absence of rotifers.

The experiments were conducted in 25 mL transparent vials. Into each of 100 test vials (5 toxicant levels  $\times$  4 algal concentrations  $\times$  5 replicates = 100) containing 20 mL medium of desired algal-toxicant combination, we introduced rotifers at an initial density of 10 ind./mL of mixed age group from a growing culture. The vials were kept in a thermostatically controlled waterbath set at  $27 \pm 1^\circ\text{C}$  under diffuse and continuous fluorescent illumination. At each  $24 \pm 2$  hr interval, the population density of rotifers was estimated under a stereo microscope from all test vessels using at least two aliquot samples of 1-3 ml each or the whole replicate-counting. Following counting, the rotifers were transferred using 50 $\mu\text{m}$  mesh to fresh medium containing appropriate food level-toxicant combinations. For estimating the densities of rotifers, only live individuals (females) were considered. The experiment was terminated after ten days when most populations completed one population cycle or completely declined. From the data, the rate of population growth ( $r$ ) was calculated using the exponential equation (Krebs 1985):

$$r = (\ln N_t - \ln N_0)/t$$

where,  $N_0$  = the initial density of rotifers,  $N_t$  = the final density and  $t$  = time in days.

## RESULTS AND DISCUSSION

The maximum population density of *B. calyciflorus* was strongly influenced not only by both algal density and the concentration of methyl parathion but also their interaction ( $P < 0.001$ , ANOVA, Table 1). An increase in food availability resulted in an increase in population of *B. calyciflorus*. On the other hand, an increase in toxicant level reduced the rotifer density. There was a positive interaction between toxicant level and food density in that increasing food concentration reduced the effect of methyl parathion (up to 20 mg/L) on the population growth of the tested rotifers (Figures 1a, 1b). In control (without toxicant) when food density was  $0.75 \times 10^6$  cells/mL, the rotifers maintained an average density of  $4 \pm 1$  ind./mL, while those at the same food level but under 5 mg/L of the toxicant, declined completely on the day 10.

Methyl parathion at a concentration of 30 mg/L did not support rotifer growth in any food density. The rate of population growth ( $r$ ) per day was also strongly influenced by food density, toxicant level and their interaction (Table 1, Figure 2). The  $r$  values were negative in all toxicant levels at lower food concentrations ( $0.75 \times 10^6$  and  $1.5 \times 10^6$  cells/mL). On the other hand, positive  $r$  values were recorded for higher food levels (3-6



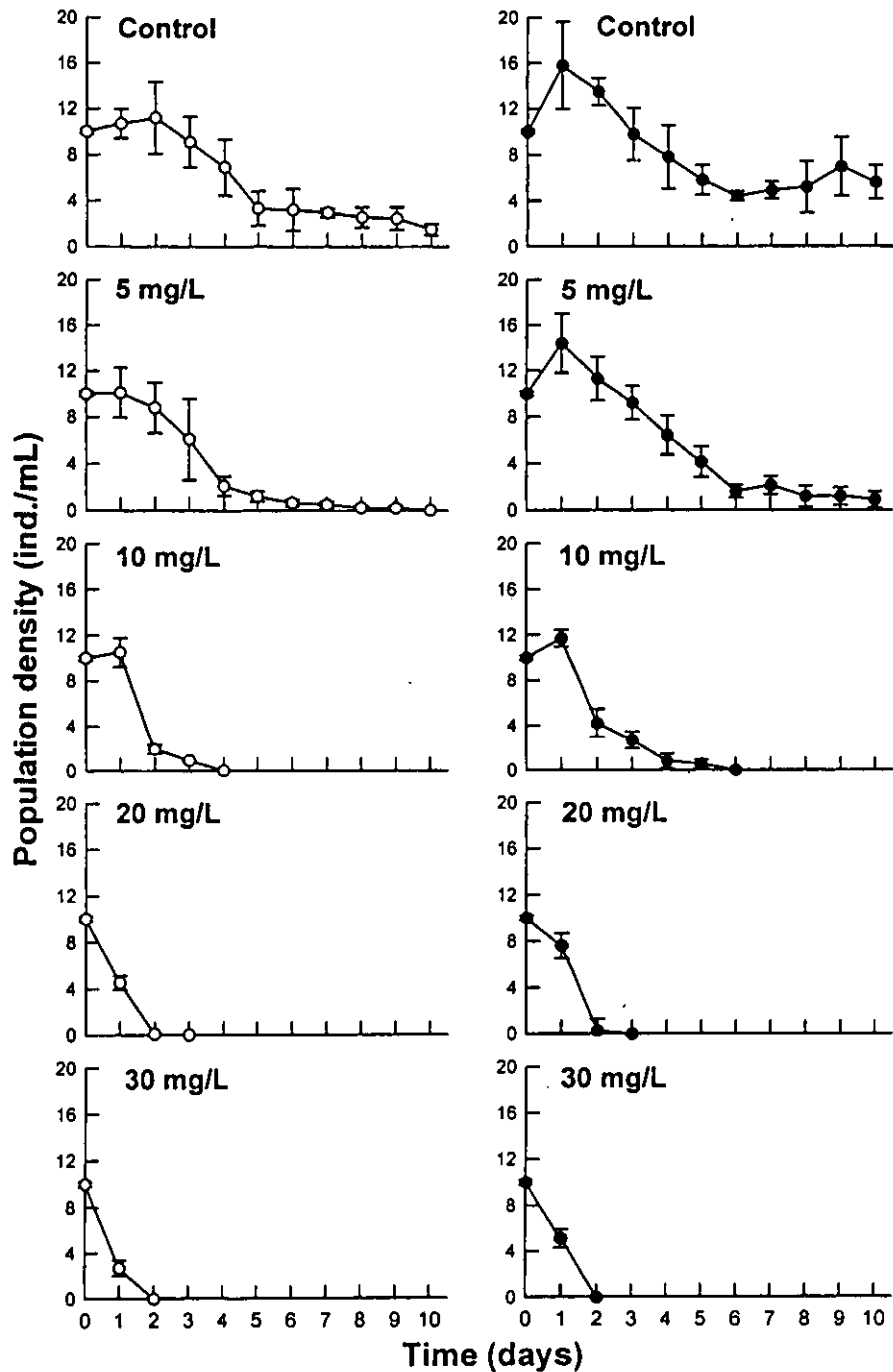


Figure 1a. Relationship between concentration of methyl parathion (mg/L) and the population growth of *Brachionus calyciflorus* under  $0.75 \times 10^6$  (open circle) and  $1.5 \times 10^6$  (closed circle) cells/mL of *Chlorella* as a function of time. Shown are the values (mean  $\pm$  s.d.) based on five replicates.

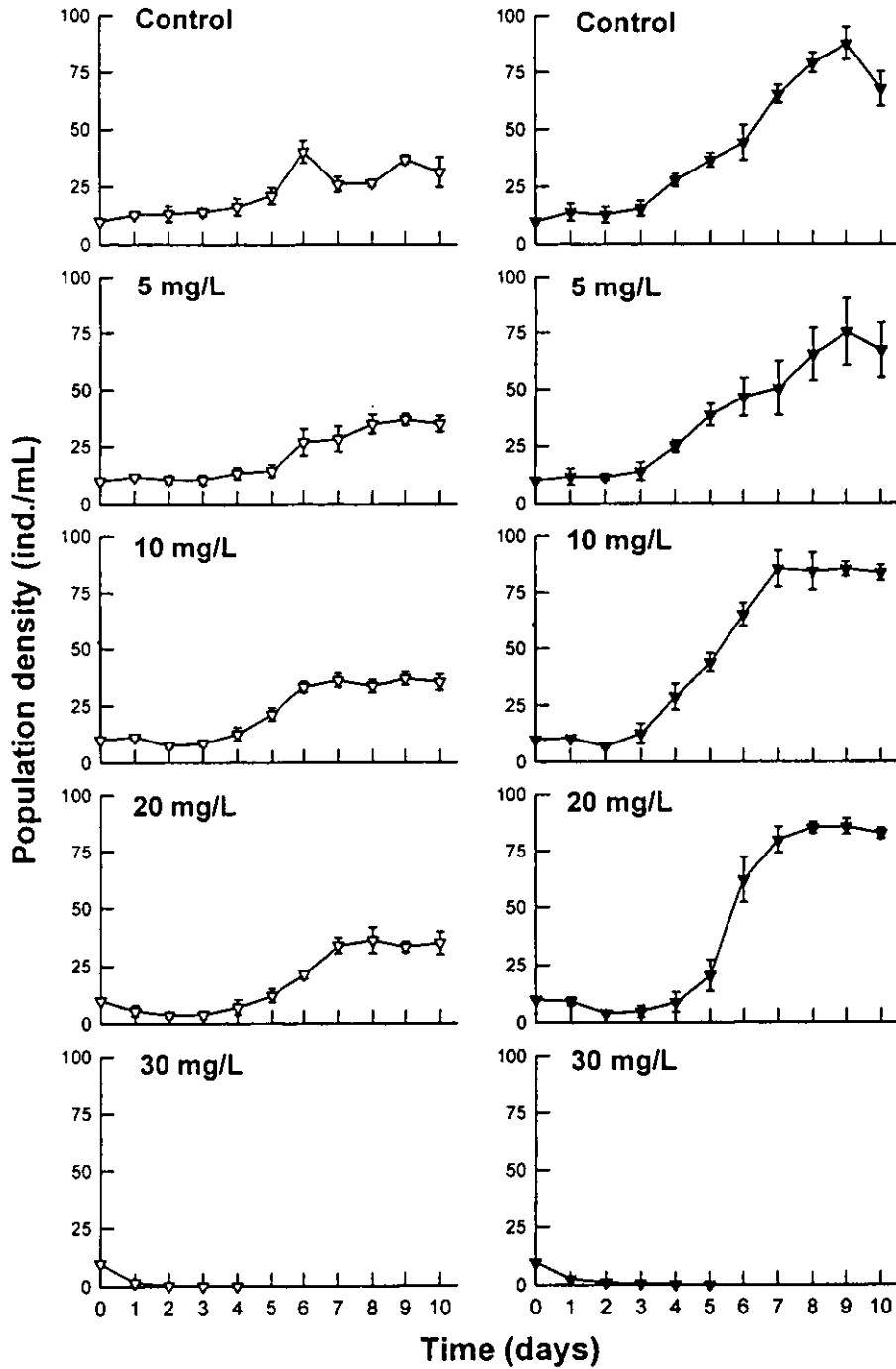


Figure 1b. Relationship between concentration of methyl parathion (mg/L) and the population growth of *Brachionus calyciflorus* under  $3.0 \times 10^6$  (open triangle) and  $6.0 \times 10^6$  (closed triangle) cells/mL of *Chlorella* as a function of time. Shown are the values (mean  $\pm$  s.d.) based on five replicates.

$\times 10^6$  cells/mL) in all methyl parathion levels except for the highest toxicant concentration (30 mg/L).

**Table 1.** Two-way ANOVA of effect of methyl parathion on mean population density and rate of population growth under four different food concentrations.

Source	Sum-of-Squares	DF	Mean-Square	F-Ratio	P
<i>Maximum population density</i>					
Food	203985.81	3	67995.27	210.77	0.001
Toxicant	56689.72	4	14172.43	43.93	0.001
Food x toxicant interaction	59687.46	12	4973.95	15.42	0.001
Error	348404.14	1080	322.59	-	-
<i>Rate of population growth</i>					
Food	25.60	3	6.40	218.51	0.001
Toxicant	6.78	4	2.26	77.11	0.001
Food x toxicant interaction	7.84	12	0.65	22.31	0.001
Error	2.34	80	0.029	-	-

In a recent review of rotifer ecotoxicology, Snell and Janssen (1995) mentioned many ecological variables including population growth characters as sensitive indicators of toxicants in the medium. Rotifer populations in the present study responded rapidly not only to the food availability but also to the toxicant concentrations as found in many other investigations (Halbach et al. 1983). Even the toxicant level as low as 5 mg/L was sufficient to have a negative effect on rotifer density in the lowest food level. This is in agreement with the data of Fernandez-Casalderrey et al. (1992) who derived a no-observed effect concentration (NOEC) for this species close to 1 mg/L of methyl parathion. For rotifers exposed to higher toxicant levels and higher food levels, the population initially did not increase but recovered afterwards. The range of rate of population increase per day ( $r$ ) in the present investigation also varied strongly from -1.46 to +0.396 depending on the test conditions (Figure 2). In general, the positive  $r$  values recorded here for this species are within the range expected for the genus *Brachionus* (Miracle and Serra 1989).

The peak population abundances of rotifers in controls varied between 11 to 100 ind./mL and increased linearly with increasing food density. Those exposed to methyl parathion up to 20 mg/L behaved in a similar way (Figure 3).

That the increase in algal concentration had a positive effect on the toxicant-stressed rotifer populations as observed here has been recorded in earlier studies. For example, *Brachionus patulus* when grown under  $1-3 \times 10^6$  cells/mL of *Chlorella*, the toxic effect of DDT was reduced with increasing algal-food density (Rao and Sarma 1986; 1990). There is some agreement among the investigators that laboratory toxicity tests are conducted at much higher food levels than those encountered by rotifers in natural environments (Rao and Sarma 1986; Janssen et al. 1994). This suggests that toxicity tests conducted in lower food levels could yield a lower maximum acceptable toxicant concentration. This trend is clearly visible in the present study since the food levels

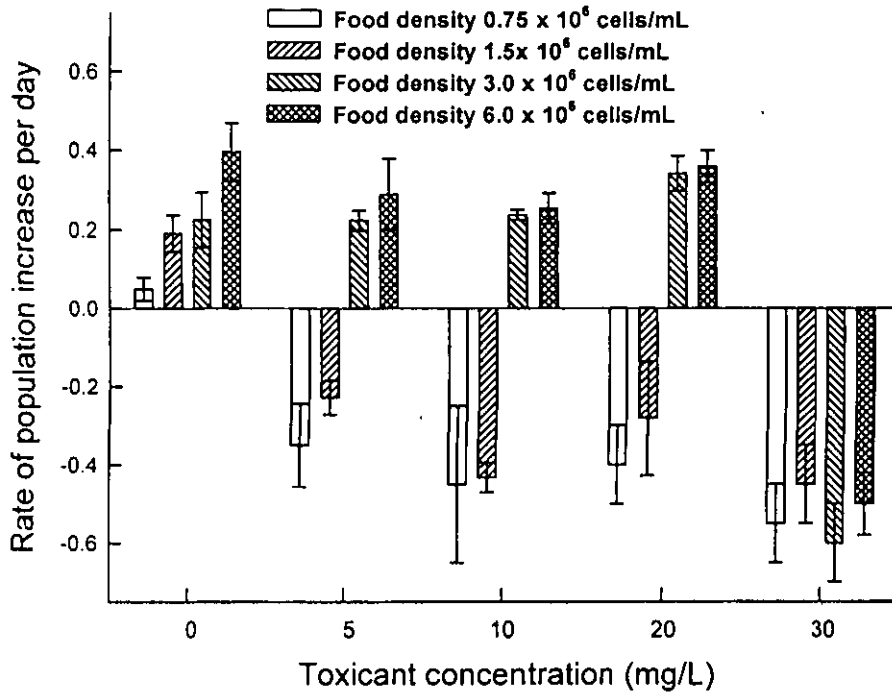


Figure 2. Rate of population increase in *Brachionus calyciflorus* under various toxicant-food level combinations. Shown are mean  $\pm$  s.d. values based on five replicates.

chosen here range from those barely supporting the population to optimum levels resulting in a rapid increase in their abundance. Thus the range of food density used here is within the levels tested for this species earlier (Sarma et al. 1996). In conclusion, our results demonstrate the importance of algal food density in modifying the toxic effects of methyl parathion on rotifers.

*Acknowledgments.* We thank Prof. Ignacio Peñalosa Castro, Head of Biology Career, UNAM Campus Iztacala for facilities. SSSS also thanks the National System of Investigators (SNI Ref. No. 18723) for financial support.

## REFERENCES

- Anonymous (1985) Methods of measuring the acute toxicity of effluents to freshwater and marine organisms. US Environment Protection Agency EPA/600/4-85/013
- ASTM (1991) Standard guide for acute toxicity tests with the rotifer *Brachionus* Annual Book of ASTM Standards. Vol 11.04 E1440 American Society for Testing and Materials, Philadelphia, PA, USA
- Borowitzka MA, Borowitzka LJ (1988) Micro-algal biotechnology. Cambridge University Press, London
- CONADE (1991) Informe de la situación general en materia de equilibrio ecológico y protección al ambiente 1989-1990. Comisión Nacional de Ecología, México

- Dumont HJ (1977) Biotic factors in the population dynamics of rotifers. *Arch Hydrobiol Beih* 8: 98-122
- Fernandez-Casalderrey A, Ferrando MD, Andreu-Moliner E (1992) Acute toxicity of several pesticides to the rotifer *Brachionus calyciflorus*. *Bull Environ Contam Toxicol* 48: 14-17
- Gilbert JJ, Bogdan KG (1984) Rotifer grazing: in situ studies on selectivity and rates. In: Meyers DG, Strickler JR (eds) *Trophic interactions within aquatic ecosystems*. Am Assoc Adv Sci Selected Symp 85: 97-133
- Halbach U (1984) Population dynamics of rotifers and its consequences for ecotoxicology. *Hydrobiologia* 109: 79-96
- Halbach U, Sievert M, Westermayer M, Wiessel C (1983) Population ecology of rotifers as a bioassay tool for ecotoxicological tests in aquatic environments. *Ecotoxicol Environ Saf* 7: 484-513
- Janssen CR, Ferrando MD, Persoone G (1994) Ecotoxicological studies with the freshwater rotifer *Brachionus calyciflorus*. *Ecotoxicol Environ Saf* 28: 244-255
- Krebs C J, (1985) *Ecology. The experimental analysis of distribution and abundance*. Harper and Row, New York
- Lubzens E. (1987) Raising rotifers for use in aquaculture. *Hydrobiologia* 147: 245-255
- Martínez-Jeronimo F, García-González B (1994) Effect of food concentration on the chronic toxicity of sodium dodecyl sulphate to *Daphnia magna*. *J Aquat Ecosyst Health* 3: 247-253
- Miracle MR, Serra M (1989) Salinity and temperature influence in rotifer life history characteristics. *Hydrobiologia* 186/187: 81-102
- Rao TR, Sarma SSS (1986) Demographic parameters of *Brachionus patulus* Muller (Rotifera) exposed to sublethal DDT concentrations at low and high food levels. *Hydrobiologia* 139: 193-200
- Rao TR, Sarma, SSS (1990) Interaction of *Chlorella* density and DDT concentration on the population dynamics of the rotifer, *Brachionus patulus* (Rotifera). *Indian J Environ Hlth* 32: 157-160
- Sarma SSS, Iyer N, Dumont HJ (1996). Competitive interactions between herbivorous rotifers: importance of food concentration and initial population density. *Hydrobiologia* 331: 1-7
- Sarma SSS, Nandini S, Fernández-Araiza MA (1998). Effect of methyl parathion-treated prey (*Brachionus calyciflorus*) on the population growth of the predator *Asplanchna sieboldi* (Rotifera). *Bull Environ Contam Toxicol* 61: 135-142
- Sladeczek V (1983) Rotifers as indicators of water quality. *Hydrobiologia* 100: 169-201
- Snell TW, Janssen CR (1995) Rotifers in ecotoxicology: a review. *Hydrobiologia* 313/314: 231-247
- Vilaclara G, Sladeczek V (1989) Mexican rotifers as indicators of water quality with description of *Collotheca riverai* n. sp. *Arch Hydrobiol* 115: 257-263

## Effect of Methyl Parathion on the Population Growth of the Rotifer *Brachionus patulus* (O. F. Müller) under Different Algal Food (*Chlorella vulgaris*) Densities

S. S. S. Sarma,\*<sup>1</sup> S. Nandini,<sup>†</sup> and José Luis Gama Flores\*

\*Division of Biology, National Autonomous University of Mexico, Campus Iztacala, Av. de los Barrios s/n, Los Reyes, AP 314, CP 54090, Tlalnepantla, State of Mexico, Mexico; and <sup>†</sup>CyMA Project Division, National Autonomous University of Mexico, Campus Iztacala, Av. de los Barrios s/n, Los Reyes, AP 314, CP 54090, Tlalnepantla, State of Mexico, Mexico

Received March 28, 2000

The population growth of the rotifer *Brachionus patulus* was studied under a combination of different concentrations of *Chlorella vulgaris* and methyl parathion. To obtain sublethal concentrations of the pesticide a 24-h LC<sub>50</sub> bioassay was performed under two food densities (1.5 and 3.0 × 10<sup>6</sup> cells ml<sup>-1</sup>) using neonate rotifers. For the population growth experiments, seven toxicant concentrations were used ranging from 0.16 to 10.0 mg L<sup>-1</sup> and four food densities (0.75, 1.5, 3.0, and 6.0 × 10<sup>6</sup> cells ml<sup>-1</sup>), each with four replicates and thus in all, 128 test jars. A medium with *Chlorella* alone and without toxicant acted as control. The initial density of the rotifers in each replicate were 5 individual ml<sup>-1</sup>. Experiments were conducted for 20 days. The LC<sub>50</sub> values of *B. patulus* were 8.8 and 10.7 mg L<sup>-1</sup> at low and high algal food density, respectively. Data on the population growth studies revealed a significant effect of both food density and toxicant concentration on the maximum abundance, day at which maximum abundance was reached, and rate of population increase per day. At any toxicant concentration, an increase in food density reduced the toxicity of methyl parathion to rotifers. In controls the maximum rotifer density under the highest food level (6 × 10<sup>6</sup> cells ml<sup>-1</sup>) was 795 ± 46 individuals ml<sup>-1</sup>. The rate of population increase per day (*r*) in controls varied from 0.22 ± 0.01 to 0.34 ± 0.01 depending on food density. Algal food density had a significant influence in reducing the toxicity of methyl parathion to *B. patulus* under both acute and chronic toxicity test conditions. © 2001 Academic Press

**Key Words:** methyl parathion; population growth; rotifers; food density; toxicity.

### INTRODUCTION

There is an increasing trend in the use of rotifers as bioassay organisms for ecotoxicological studies in recent years. These include determination of LC<sub>50</sub> values using

various toxicants (Snell and Janssen, 1995), life table demographic studies (Janssen *et al.*, 1994; Ferrando *et al.*, 1996), feeding studies (Juchelka and Snell, 1994), behavioral studies including swimming speed (Charoy *et al.*, 1995; Preston *et al.*, 1999), population growth aspects (Halbach *et al.*, 1983), prey-predator interactions (Rogerson *et al.*, 1982; Sarma *et al.*, 1998), biochemical studies such as biomarkers (Burbank and Snell, 1994), and trophic level studies (Dobbs *et al.*, 1996) using mesocosm and microcosm (Giddings *et al.*, 1996; Jak *et al.*, 1996; Del Valls *et al.*, 1997).

Life table demographic studies provide valuable data on the effect of a toxicant with respect to lifespan and reproductive rate, but cannot give information on the effect of growing population density on the toxicity of a substance to a species. Population growth studies can provide data on this aspect. The toxicity of a substance to rotifers at the population level can be influenced by a number of factors particularly food concentration (Rao and Sarma, 1986; Gilbert, 1996). In general, an increase in the available food reduces the effect of toxicants. This has earlier been demonstrated in some rotifer species such as *Brachionus patulus* (Rao and Sarma, 1990) and *B. calyciflorus* (Gilbert, 1996; Gama-Flores *et al.*, 1999). However, it is not known whether other toxic substances, especially commonly used pesticides, exhibit similar trends under varying food densities.

Methyl parathion is an important agricultural and domestic pesticide widely used in Mexico to eliminate insects (Anonymous, 1991). Its toxic effects on nontarget organisms, especially zooplankton, have been reported, based on field collections and laboratory studies (Snell and Janssen, 1995). Median lethal concentration at 24 h of methyl parathion for the rotifer *B. calyciflorus* has been found to vary from 29 mg L<sup>-1</sup> (Fernandez-Casalderey *et al.*, 1992) to 9 mg L<sup>-1</sup> (Sarma *et al.*, 1998) depending on the source of test individuals. It has also been reported that the population growth of this species was improved at 6 × 10<sup>6</sup> cells

<sup>1</sup>To whom correspondence should be addressed. Fax: + 52 5 390 2918; + 52 5 623 1155. E-mail: [sarma@servidor.unam.mx](mailto:sarma@servidor.unam.mx).

ml<sup>-1</sup> of *Chlorella* when exposed to sublethal concentrations of methyl parathion compared to  $0.75 \times 10^6$  cells ml<sup>-1</sup> (Gama-Flores *et al.*, 1999). It is not known whether the cosmopolitan rotifer species *B. patulus* would behave in a similar way when exposed to methyl parathion.

The aim of the present work was to study the population growth of *B. patulus* exposed to different concentrations of methyl parathion under varying densities of the microalga *Chlorella vulgaris*.

## MATERIALS AND METHODS

The cosmopolitan rotifer *B. patulus* (O. F. Müller) was used as the test species. This species was isolated from a local pond and mass-cultured in 40-L glass aquaria using the green alga *C. vulgaris* as the exclusive food at a density of about  $2 \times 10^6$  cells ml<sup>-1</sup>. Every alternate day, the rotifers from the aquaria were transferred to fresh containers and fed the green alga at the same density. For mass cultures as well as for experiments, reconstituted hardwater was used as the medium (EPA medium) (Anonymous, 1985). The EPA medium was prepared by dissolving 96 mg NaHCO<sub>3</sub>, 60 mg CaSO<sub>4</sub>, 60 mg MgSO<sub>4</sub>, and 4 mg KCl in 1 L of distilled water. *C. vulgaris* was mass-cultured using Bold Basal medium (Borowitzka and Borowitzka, 1988). For routine maintenance and for experiments, alga harvested during the log phase, centrifuged at 3000 rpm for 5 min, and resuspended in EPA medium was used.

The pesticide methyl parathion (commercial grade, Bayer's product) was used as the toxicant. A stock solution of 1000 mg L<sup>-1</sup> was prepared using distilled water. In order to choose appropriate toxicant concentrations for population growth experiments, it became necessary to obtain median lethal concentration at 24 h of assay. For this, five concentrations of methyl parathion (2.5, 5.0, 10.0, 20.0, and 40.0 mg L<sup>-1</sup>) were prepared through serial dilution from the stock solution using EPA medium. Since alga is essential for population growth studies, LC<sub>50</sub> tests were conducted at two food densities ( $1.5$  and  $3.0 \times 10^6$  cells ml<sup>-1</sup>), which were within the range selected for final experiments. LC<sub>50</sub> tests were conducted in 50-ml volume of the medium in 100-ml containers. For each food density-toxicant combination, three replicates were used. Thus, into each of the 36 test jars (= 2 food levels  $\times$  6 toxicant concentrations (including control, with 0 mg L<sup>-1</sup> of methyl parathion)  $\times$  3 replicates) containing 50 ml medium with specified algal density and toxicant concentration, 100 neonates of *B. patulus* were introduced using a finely drawn Pasteur pipette under a stereomicroscope at 30 $\times$  magnification. After  $24 \pm 2$  h, the number of rotifers alive in each test jar was counted. The LC<sub>50</sub> values were derived following the probit method (Finley, 1971).

Based on LC<sub>50</sub> values, for population growth studies we selected seven toxicant concentrations viz. 0.16, 0.31, 0.62,

1.25, 2.5, 5.0, and 10 mg l<sup>-1</sup>. A medium with *Chlorella* alone and without toxicant acted as control. In order to avoid possible detoxification of the pesticide by the alga in the absence of rotifers, every day just before the experiment, equal volumes of both the toxicant and *Chlorella* were mixed, following Rao and Sarma (1986).

The rotifer population growth experiments were conducted in 50-ml transparent jars containing 20 ml EPA medium. Four algal food densities were used, viz. 0.75, 1.5, 3.0, and  $6.0 \times 10^6$  cells ml<sup>-1</sup>. For each food density and toxicant concentration, 4 replicates were maintained. Thus, in all, 128 test jars were used (= 4 food levels  $\times$  8 toxicant concentrations including control  $\times$  4 replicates). Into each of these containers, *B. patulus* individuals were introduced (mixed age group) at an initial density of 5 individuals ml<sup>-1</sup>. The experiments were conducted in a static-renewal system, at 25°C with continuous but diffused fluorescent illumination. The initial pH of the medium was 7.2. Following inoculation, at every 24-h interval, the number of live rotifers was estimated using whole count or two to three aliquots of 0.5–5 ml each. The test individuals were then filtered through a 40- $\mu$ m mesh and transferred to fresh EPA medium containing the appropriate toxicant-alga combination. The experiments were terminated after 20 days when most test populations began to decline.

From the data, the rate of population growth was calculated using the following exponential equation:

$$r = (\ln N_t - \ln N_0)/t,$$

where  $N_0$  and  $N_t$  are the initial and final population densities respectively, and  $t$  is time in days.

Varying data points were used along the growth curve to calculate the mean per replicate. In general, 4–6 data points were taken during the exponential phase of the population as documented in Dumont *et al.* (1995).

## RESULTS

Based on a 24-h acute toxicity assay for methyl parathion, the LC<sub>50</sub> values of *B. patulus* were 8.8 and 10.7 mg L<sup>-1</sup> depending on the algal food density (Table 1). Data on the population growth studies revealed a significant effect ( $P < 0.001$ , ANOVA) of both food density and toxicant concentration on the maximum abundance, day at which maximum abundance was reached, and the rate of population increase per day (Table 2). Population growth curves of *B. patulus* exhibited increasing abundance of rotifers with increasing food availability but decreasing abundance with increasing concentration of methyl parathion (Figs. 1–4). At any toxicant concentration, an increase in food density reduced the toxicity of methyl parathion to rotifers. For example, in rotifers exposed to as low as 0.16 mg L<sup>-1</sup> of

TABLE 1

Values of Median Lethal Concentration of Methyl Parathion for *B. patulus* for 24 h Assay under Two Different Algal Food Densities

<i>Chlorella</i> density ( $\times 10^6$ cells $\text{ml}^{-1}$ )	LC <sub>50</sub> 24 h (mean $\pm$ standard error)
1.5	8.85 $\pm$ 0.07
3.0	10.66 $\pm$ 0.13

methyl parathion, at the lowest food density the maximum population was (mean  $\pm$  standard error) 101  $\pm$  9 individuals  $\text{ml}^{-1}$ , which was increased to 400  $\pm$  38 individuals  $\text{ml}^{-1}$  at  $6 \times 10^6$  cells  $\text{ml}^{-1}$  algal density. In controls the maximum rotifer density under the highest food level ( $6 \times 10^6$  cells  $\text{ml}^{-1}$ ) was 795  $\pm$  46 individuals  $\text{ml}^{-1}$  (Fig. 5).

The rate of population increase per day ( $r$ ) in controls varied from 0.22  $\pm$  0.01 to 0.34  $\pm$  0.01 depending on food density. Regardless of toxicant concentration, an increase in food density resulted in an increase in the  $r$  values (Fig. 6). Regardless of *Chlorella* density, methyl parathion at concentrations of 1.25  $\text{mg L}^{-1}$  and above did not support rotifer growth and thus  $r$  values became negative. Because of the mitigating effect of increasing food density on the toxicity of methyl parathion, the interaction of food density and toxicant concentration on  $r$  values was not significant ( $P > 0.05$ ) (Table 2).

TABLE 2

Results of Analysis of Variance (ANOVA) Performed on Selected Population Variables of *B. patulus* Exposed to Different Concentrations of Methyl Parathion and *Chlorella vulgaris*

Source	DF	SS	MS	F
Maximum population density				
Food density (A)	3	24.1 $\times 10^4$	8.0 $\times 10^4$	96.5***
Toxicant level (B)	7	32.4 $\times 10^5$	46.4 $\times 10^4$	526.1***
Interaction (A $\times$ B)	21	67.5 $\times 10^4$	3.2 $\times 10^4$	33.7***
Error	96	8.0 $\times 10^4$	834.7	—
Day at maximum population density				
Food density (A)	3	87.33	29.11	11.93***
Toxicant level (B)	7	6379.7	911.38	254.05***
Interaction (A $\times$ B)	21	163.72	7.8	2.80***
Error	96	234.25	2.44	—
Rate of population increase				
Food density (A)	3	0.253	0.08	11.08***
Toxicant level (B)	6	7.516	1.25	164.58***
Interaction (A $\times$ B)	18	0.092	0.01	0.58**
Error	84	0.639	0.01	—

Note. DF, degrees of freedom; SS, sum of squares; MS, mean square; F, F ratio. Highly significant \*\*\*  $P < 0.001$ ; ns, nonsignificant.

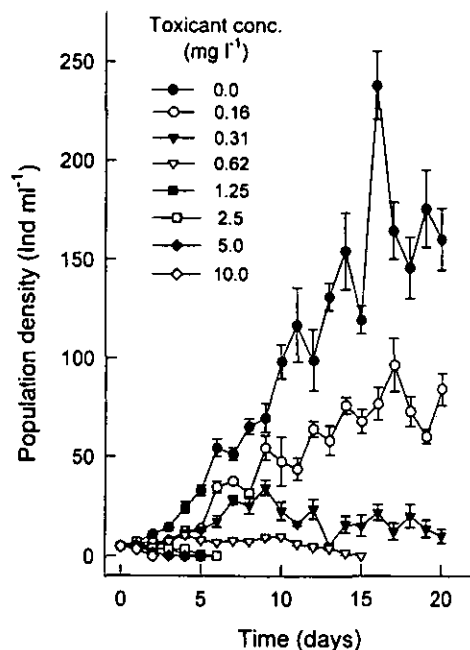


FIG. 1. Population growth of *Brachionus patulus* in relation to different concentrations of methyl parathion under *Chlorella* density of  $0.75 \times 10^6$  cells  $\text{ml}^{-1}$ . Presented are mean  $\pm$  standard error based on four replicate recordings.

## DISCUSSION

An LC<sub>50</sub> value of *B. patulus* for any toxicant has not been published so far. The LC<sub>50</sub> values of *B. patulus* for methyl

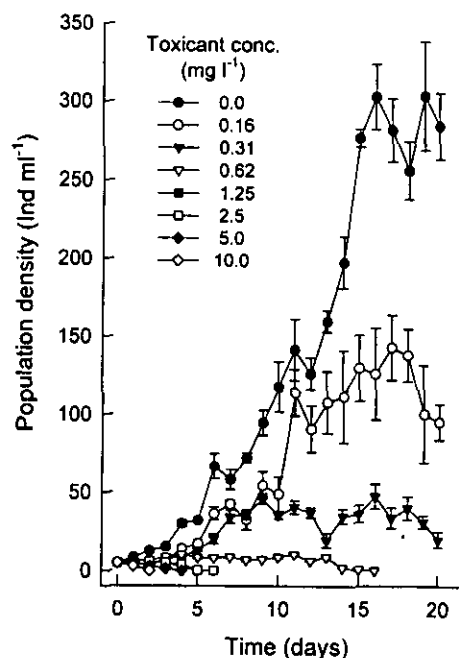


FIG. 2. Population growth of *B. patulus* in relation to different concentrations of methyl parathion under *Chlorella* density of  $1.5 \times 10^6$  cells  $\text{ml}^{-1}$ . Presented are mean  $\pm$  standard error based on four replicate recordings.



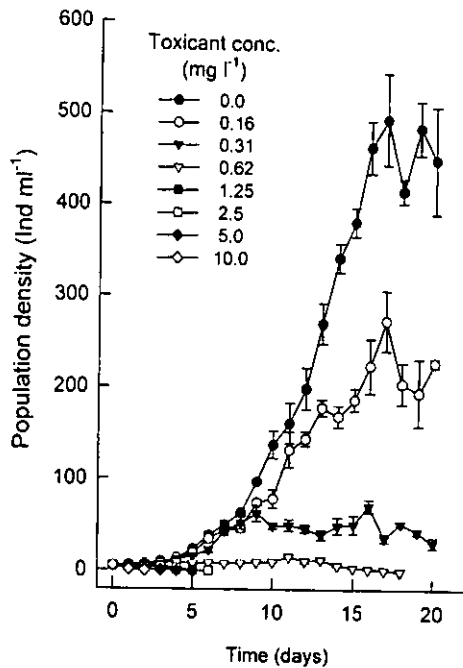


FIG. 3. Population growth of *B. patulus* in relation to different concentrations of methyl parathion under *Chlorella* density of  $3.0 \times 10^6$  cells  $\text{ml}^{-1}$ . Presented are mean  $\pm$  standard error based on four replicate recordings.

parathion (8.8–10.7  $\text{mg L}^{-1}$ ) recorded here were close to those of *B. calyciflorus* for the same toxicant (Sarma *et al.*, 1998). Halbach *et al.* (1983) were among the earliest to

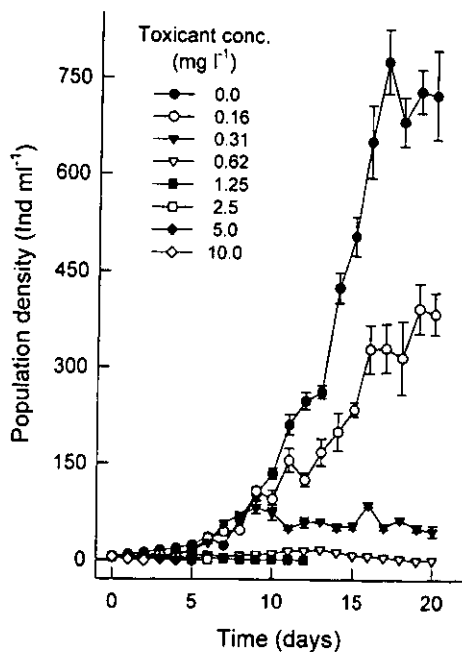


FIG. 4. Population growth of *B. patulus* in relation to different concentrations of methyl parathion under *Chlorella* density of  $6.0 \times 10^6$  cells  $\text{ml}^{-1}$ . Presented are mean  $\pm$  standard error based on four replicate recordings.

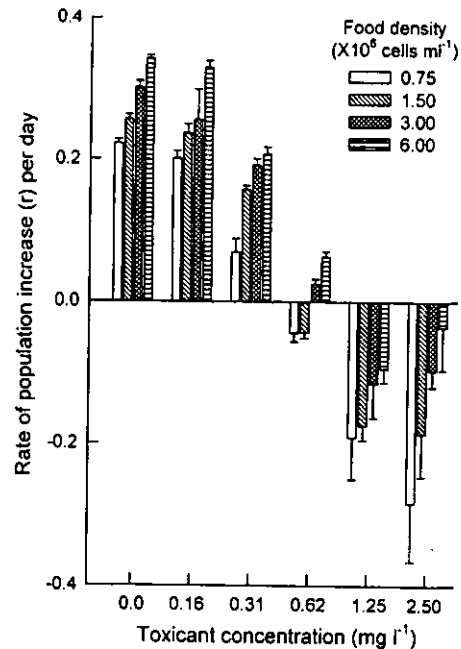


FIG. 5. Rate of population increase per day ( $r$ ) of *B. patulus* in relation to different concentrations of methyl parathion and *Chlorella* densities. Presented are mean  $\pm$  standard error based on four replicate recordings. The  $r$  values using 5 and 10  $\text{mg L}^{-1}$  of the toxicant have not been included since there was no population growth.

advocate the use of population dynamics to detect and quantify harmful effects of pesticides to rotifers. Following them, in recent times a number of works using rotifer population growth to detect the sublethal effects of pesticides have appeared (e.g., Janssen *et al.*, 1994). Most of these studies, however, did not consider the positive effect of food density in reducing the effect of toxicants on rotifers. Only in rare cases such data were presented. For example, Rao and Sarma (1990) have found that when food density was enhanced from  $1.5 \times 10^6$  cells  $\text{ml}^{-1}$  to  $3 \times 10^6$  cells  $\text{ml}^{-1}$ , the rotifers were able to tolerate and reproduce at DDT concentrations nearly double those at which the rotifers under low food density could. In the present study, if the increased food density had no effect on the toxicity of methyl parathion, then at any tested toxicant concentration, the population density of rotifers should have been similar regardless of food availability. But this did not happen. On the other hand, increase in the availability of food resulted in correspondingly higher abundance of rotifers at any given concentration of methyl parathion. This trend has also been demonstrated for *B. calyciflorus* using endosulfan as the toxicant (Fernandez-Casalderrey *et al.*, 1991).

In this study, it was evident that  $\text{LC}_{50}$  values were also dependent on the available food density. Thus, when the food density was  $1.5 \times 10^6$  cells  $\text{ml}^{-1}$ , the concentration of methyl parathion required to produce a 50% kill of the test

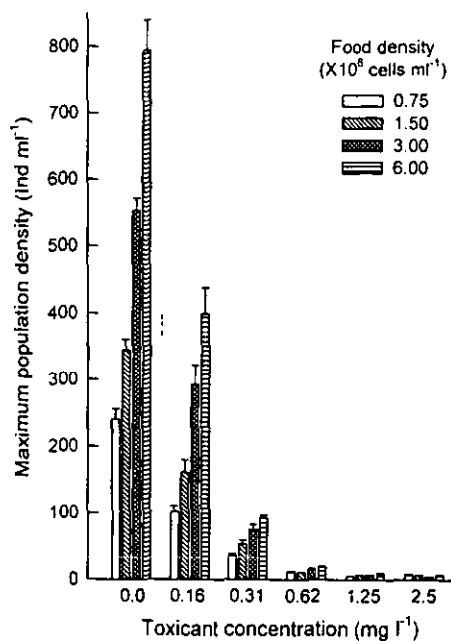


FIG. 6. Maximum population density (individuals ml<sup>-1</sup>) of *B. patulus* in relation to different concentrations of methyl parathion and *Chlorella* densities. Presented are mean  $\pm$  standard error based on four replicate recordings. The maximum population density values using 5 and 10 mg L<sup>-1</sup> of the toxicant have not been included since there was no growth.

rotifers was about 9-mg L<sup>-1</sup>. With doubling of the available *Chlorella* level, the LC<sub>50</sub> shifted to a higher level (about 11 mg L<sup>-1</sup>), indicating a positive role of food density in reducing the toxicity of methyl parathion. Since long-term tests of population level effects of toxicants were more pronounced than acute toxicity tests, population growth experiments were conducted using more food levels and toxicant concentrations.

From Figs. 1–4, it is obvious that population growth of *B. patulus* exposed to methyl parathion, was significantly reduced compared to controls. However, within the toxicant-stressed populations, those offered higher *Chlorella* densities had a better performance than those under lower food levels. This may be due to possible detoxification of methyl parathion and/or higher availability food leading to increased consumption and thus better resistance to the toxicant (Rao and Sarma, 1986). Independent of food levels, rotifers exposed to methyl parathion at concentrations higher than half the LC<sub>50</sub> values did not survive beyond 1 week. This is in agreement with Halbach *et al.* (1983), who found that long-term studies of pesticide effects on population growth were more appropriate for determining safe concentrations.

The growth trends of *B. patulus* in controls were comparable to those of the other members of the genus *Brachionus* for which data were available (see Walz, 1993). The maximum density (ca. 800 individuals ml<sup>-1</sup>) of *B. patulus* ob-

served in this study at the highest food concentration has not been documented earlier. However, this density was not uncommon for many species of *Brachionus* with similar body size. Groeneweg and Schlueter (1981) have reported densities as high as 580 individuals ml<sup>-1</sup> for *B. rubens*. The rates of population increase per day recorded here were within the range expected for *Brachionus* (Walz, 1993). They were, however, on the lower range for *B. patulus*, probably because of the differences in the initial inoculation densities used in this study and those of the others (Sarma and Rao, 1990). The relation between the LC<sub>50</sub> values and the rate of population increase has been documented for a wide spectrum of species (Roex *et al.*, 2000). The current results are in agreement with this.

## CONCLUSION

The toxicity of methyl parathion to *B. patulus* was dependent on the density of algal food in both acute and chronic toxicity tests. The maximal concentration of methyl parathion that produced population growth rates similar to controls was 0.16 mg l<sup>-1</sup>, which was nearly one-hundredth of the LC<sub>50</sub> value.

## ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank authorities of the UNAM, Campus Iztacala, for providing facilities, S.S.S. and S.N. also thank the National System of Investigators (Mexico-SNI-18723 and 20520) for support.

## REFERENCES

- Anonymous (1985). "Methods of Measuring the Acute Toxicity of Effluents to Freshwater and Marine Organisms." U.S. Environment Protection Agency EPA/600/4-85/013, Washington, DC.
- Anonymous (1991). "Informe de la situación general en materia de equilibrio ecológico y protección al ambiente 1989–1990." Comisión Nacional de Ecología (CONADE), Mexico, D.F.
- Borowitzka, M. A., and Borowitzka, L. J. (1988). "Micro-algal Biotechnology." Cambridge Univ. Press, London.
- Burbank, S. E., and Snell, T. W. (1994). Rapid toxicity assessment using esterase biomarkers in *Brachionus calyciflorus* (Rotifera). *Environ. Toxicol. Water Qual.* 9, 171–178.
- Charoy, C. P., Janssen, C. R., Persoone, G., and Clement, P. (1995). The swimming behaviour of *Brachionus calyciflorus* (rotifer) under toxic stress. I. The use of automated trajectometry for determining sublethal effects of chemicals, *Aquat. Toxicol.* 32, 271–282.
- Del Valls, T. A., Lubian, L. M., Forja, J. M., and Gomez-Parra, A. (1997). Comparative ecotoxicity of interstitial waters in littoral ecosystems using Microtox and the rotifer *Brachionus plicatilis*. *Environ. Toxicol. Chem.* 16, 2323–2332.
- Dobbs, M. G., Cherry, D. S., and Cairns, J., Jr. (1996). Toxicity and bioaccumulation of selenium to a three-trophic level food chain. *Environ. Toxicol. Chem.* 15, 340–347.
- Dumont, H. J., Sarma, S. S. S., and Ali, A. J. (1995). Laboratory studies on the population dynamics of *Anuraeopsis fissa* (Rotifera) in relation to food density. *Freshwater Biol.* 33, 39–46.

- Fernandez-Casalderrey, A., Ferrando, M. D., and Andreu-Moliner, E. (1991). Demographic parameters of *Brachionus calyciflorus* Pallas (Rotifera) exposed to sublethal endosulfan concentrations. *Hydrobiologia* **226**, 103-110.
- Fernandez-Casalderrey, A., Ferrando, M. D., and Andreu-Moliner, E. (1992). Acute toxicity of several pesticides to the rotifer *Brachionus calyciflorus*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **48**, 14-17.
- Ferrando, M. D., Sancho, E., and Andreu-Moliner, E. (1996). Chronic toxicity of fenitrothion to an algae (*Nannochloris oculata*), a rotifer (*Brachionus calyciflorus*), and the cladoceran (*Daphnia magna*). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **35**, 112-120.
- Finley, D. J. (1971). "Probit Analysis," 3rd ed. Cambridge Univ. Press, London.
- Gama-Flores, J. L., Sarma, S. S. S., and Araiza, M. A. F. (1999). Combined effects of *Chlorella* density and methyl parathion concentration on the population growth of *Brachionus calyciflorus* (Rotifera). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **62**, 769-775.
- Giddings, J. M., Biever, R. C., Annuziati, M. E., and Hosmer, A. J. (1996). Effects of diazinon on large outdoor pond microcosms. *Environ. Toxicol. Chem.* **15**, 618-629.
- Gilbert, J. J. (1996). Effect of food availability on the response of planktonic rotifers to a toxic strain of the cyanobacterium *Anabaena flos-aquae*. *Limnol. Oceanogr.* **41**, 1565-1572.
- Groeneweg, J., and Schlueter, M. (1981). Mass production of freshwater rotifers on liquid wastes: 2. Mass production of *Brachionus rubens* in the effluent of high-rate algal ponds used for the treatment of piggy waste. *Aquaculture* **25**, 25-34.
- Halbach, U., Siebert, M., Westermayer, M., and Wissel, C. (1983). Population dynamics of rotifers as a bioassay tool for ecotoxicological tests in aquatic environments. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **7**, 484-513.
- Jak, R. G., Maas, J. L., and Scholten, M. C. T. (1996). Evaluation of laboratory derived toxic effect concentrations of a mixture of metals by testing freshwater plankton communities in enclosures. *Water Res.* **30**, 1215-1227.
- Janssen, C. R., Persoone, G., and Snell, T. W. (1994). Cyst-base toxicity tests: VIII: Shortchronic toxicity tests with the freshwater rotifer *Brachionus calyciflorus*. *Aquat. Toxicol.* **28**, 243-258.
- Juchelka, C. M., and Snell, T. W. (1994). Rapid toxicity assessment using rotifer ingestion rate. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **26**, 549-554.
- Preston, B. L., Cecchine, G., and Snell, T. W. (1999). Effects of pentachlorophenol on predator avoidance behavior of the rotifer *Brachionus calyciflorus*. *Aquat. Toxicol.* **44**, 201-212.
- Rao, T. R., and Sarma, S. S. S. (1986). Demographic parameters of *Brachionus patulus* Müller (Rotifera) exposed to sublethal DDT concentrations at low and high food levels. *Hydrobiologia* **139**, 193-200.
- Rao, T. R., and Sarma, S. S. S. (1990). Interaction of *Chlorella* density and DDT concentration on the population dynamics of the rotifer, *Brachionus patulus* (Rotifera). *Indian J. Environ. Health* **32**, 157-160.
- Roex, E. W. M., Van Gestel, C. A. M., Van Wezel, A. P., and Van Straalen, N. M. (2000). Ratios between acute aquatic toxicity and effects on population growth rates in relation to toxicant mode of action. *Env. Toxicol. Chem.* **19**, 685-693.
- Rogerson, A., Berger, J., and Grosso, C. M. (1982). Acute toxicity of 10 crude oils on the survival of the rotifer *Asplanchna sieboldi* and sublethal effects on rates of prey consumption and neonate production. *Environ. Pollut. Ser. A Ecol. Biol.* **29**, 179-188.
- Sarma, S. S. S., Nandini, S., and Araiza, M. A. F. (1998). Effect of methyl parathion-treated prey (*Brachionus calyciflorus*) on the population growth of the predator *Asplanchna sieboldi* (Rotifera). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **61**, 135-142.
- Sarma, S. S. S., and Rao, T. R. (1990). Population dynamics of *Brachionus patulus* Müller (Rotifera) in relation to food and temperature. *Proc. Indian Acad. Sci. (Anim. Sci.)* **99**, 335-343.
- Snell, T. W., and Janssen, C. R. (1995). Rotifers in ecotoxicology: A review. *Hydrobiologia* **313/314**, 231-247.
- Walz, W. (Ed.) (1993). Plankton regulation dynamics. In "Ecological Studies 98." Springer-Verlag, Berlin.

## POPULATION GROWTH OF *EUCHLANIS DILATATA* (ROTIFERA): COMBINED EFFECTS OF METHYL PARATHION AND FOOD (*CHLORELLA VULGARIS*)

S. S. S. Sarma,<sup>1,\*</sup> S. Nandini,<sup>2</sup> José L. Gama-Flores,<sup>1</sup>  
and M. A. Fernandez-Araiza<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Division of Biology, National Autonomous University of Mexico,  
Campus Iztacala, Av. de los Barrios s/n, Los Reyes, AP 314, CP 54090,  
Tlalnepantla, State of Mexico, Mexico

<sup>2</sup>Division of Investigation, CyMA Project, National Autonomous  
University of Mexico, Campus Iztacala, Av. de los Barrios s/n, Los  
Reyes, AP 314 CP 54090, Tlalnepantla, State of Mexico, Mexico

### ABSTRACT

In the present work, the combined impact of four concentrations (0, 0.0625, 0.125, and 0.25 mg/L) of methyl parathion and three densities ( $0.5 \times 10^6$ ,  $1.0 \times 10^6$ , and  $2.0 \times 10^6$  cells/mL) of the green alga *Chlorella vulgaris* on the population growth of *Euchlanis dilatata* was studied. In general, regardless of the food level, an increase in the concentration of methyl parathion resulted in a significant reduction of the maximal population density and rate of population increase. The population growth rate in the controls ranged from 0.248 to 0.298; rates were lower in the presence of the pesticide. At any toxicant concentration, rotifers fed higher algal density showed significantly higher population growth compared with those at lower food levels. An interaction between toxicant and food level was evident on the population growth of *E. dilatata*. Results have been discussed in light of the protective role of algal density on the toxic effects of insecticides on rotifers and the differences in susceptibility to toxicants between planktonic and littoral rotifers.

---

\*Corresponding author. E-mail: sarma@servidor.unam.mx

*Key Words:* Toxicity; Population growth; Rotifera; Food level; Methyl parathion

## INTRODUCTION

Pesticides are important in crop protection and management. However, indiscriminate and excessive use may affect nontarget organisms. From the agricultural sector, due to runoff, a certain portion of the insecticides applied reach waterbodies and affect aquatic organisms mainly plankton, which are important in fisheries management (1-3). Rotifers are one of the dominant groups in freshwater zooplankton and their role in transferring energy from lower (phytoplankton, bacteria, etc.) to higher (fish larvae) trophic levels is widely appreciated (4).

Among pesticides, methyl parathion is used extensively in the agricultural sector in Mexico (5). Its toxicity to rotifers of the genera *Brachionus* and *Asplanchna* has been documented with reference to median lethal concentration (LC50 24 h bioassay) (6), life table demography (7), prey-predator interactions (8), and population growth (9). However, these studies have dealt with planktonic species. Nearly 90% (total known rotifer species = 2000) of rotifer species are nonplanktonic (i.e., epiphytic, benthic or even epizoic) (10). These species could be more adversely affected than planktonic species if toxicants have a tendency to settle. Therefore, responses of planktonic rotifers to toxicants, methyl parathion for instance, cannot be extrapolated to nonplanktonic taxa. In general, there are few studies concerning the effect of toxicants on periphytic and benthic rotifers compared to planktonic species (11). Studies on the effects of toxicants to nonplanktonic rotifers are, thus, equally important to assess the health of aquatic ecosystems.

Planktonic and nonplanktonic rotifers have different modes of reproduction. Planktonic rotifers carry eggs at the posterior end of the body, whereas benthic and epiphytic taxa deposit their eggs on a substratum (4). *Euchlanis dilatata* has been studied earlier with respect to its life table demography, population growth, physiological functions, and egg deposition behavior (12-14). Due to their high sensitivity, in general, rotifers are widely used in ecotoxicological studies. They have also been included as bioassay organisms in aquatic toxicity tests by the American Society for Testing and Materials (15). Data on the rotifer toxicity tests are primarily confined to the establishment of median lethal concentrations for a variety of substances, such as heavy metals, pesticides, and herbicides. These studies are necessary but not sufficient for formulating no observed effect concentration (NOEC), aimed at protecting aquatic ecosystems (16). In general, the NOEC is derived by multiplying the LC50 values by a factor that may vary from 0.1 to 0.01 and in rare cases up to 0.001 (17). This procedure is generally followed when no data based on the chronic toxicity tests are available. Because the NOEC is of derivative nature, in this process, the recommended safe concentration for a given toxicant is sometimes extremely low (although a much higher concentration may in fact have no effect on a given sensitive species) and may cause to shut down an industry producing the effluents. On the contrary, higher concentrations of toxicants are permitted freely

to pass into the water bodies from the industrial and agricultural sectors due to lack of data from the chronic toxicity tests. Thus, it is not surprising that most investigators recommend carrying out bioassays under chronic toxicity tests rather than using a derivative value (18). Under chronic toxicity bioassays, a variety of tests could be conducted, but the most commonly used approaches for which end points are statistically testable are the numerical responses involving population growth studies and the life table demographic approaches (19). Population growth studies are relatively easy to execute and only through this approach can we assess the possible adaptation of test population to the toxicants because at any time all age groups, ranging from just hatched neonates to postreproductive and senescent individuals occur simultaneously. It is also from the population growth studies that we can assess variables, such as maximal density reached by a species and the time needed to reach this abundance (9). The aim of the present work was to study the effect of different concentrations of methyl parathion on the population growth of the periphytic rotifer *E. dilatata* in relation to different levels of the green alga *Chlorella vulgaris*.

## MATERIAL AND METHODS

The rotifer *E. dilatata* was isolated from a local freshwater pond and was cultured in 1-L beakers, using the green alga *C. vulgaris* as the exclusive food at a density of approximately  $1 \times 10^6$  cells/mL. For mass culture as well as for experiments, moderate hardwater as the medium ether-isopentane-ethanol (EPA) was used (20). The EPA medium was prepared by dissolving 96 mg  $\text{NaHCO}_3$ , 60 mg  $\text{CaSO}_4$ , 60 mg  $\text{MgSO}_4$ , and 4 mg KCl in 1 L of distilled water. Rotifers were changed every alternate day and a fresh quantity of *C. vulgaris* was added. *Chlorella* was mass cultured in 2 l-capacity transparent bottles using Bold's basal medium (21). Algae in the log phase of their growth was concentrated by centrifuging at 3000 rpm for 5 min and was later resuspended in EPA medium. The density of algae was estimated using a haemocytometer. Based on preliminary experiments for population growth studies, we selected four toxicant concentrations including control: viz. 0 (control), 0.0625, 0.125, and 0.25 mg/L. To avoid possible interaction of algae with pesticides in the absence of rotifers, every day just before the experiment, we mixed equal volumes of both the toxicant and *Chlorella* following Rao and Sarma (22).

The experiments were conducted in 50-mL transparent jars containing 20 mL EPA medium. Three algal food densities viz.,  $0.5 \times 10^6$ ,  $1.0 \times 10^6$ ,  $2.0 \times 10^6$  cells/mL were used. At each food density and toxicant concentration, 3 replicates were maintained. Thus, in all, 36 test jars (i.e., 3 food levels  $\times$  4 toxicant concentrations, including control  $\times$  3 replicates) were used. Into each of these containers, were introduced 5 ind./mL of *E. dilatata* of a mixed age group. The experiments were conducted in a static renewal system, at 25°C with continuous but diffused fluorescent illumination. The initial pH of the medium was 7.2. After inoculation,

at every 24-h interval, the number of live rotifers were estimated using whole count or two to three aliquots of 0.5–2 mL each. The test individuals (including eggs) were then filtered through a 50- $\mu$ m mesh and transferred to fresh EPA medium containing appropriate pesticide–alga combination. The experiments were terminated after 20 days by which time most test populations began to decline.

From the data, the rate of population growth was calculated using the exponential equation:

$$r = (\ln N_t - \ln N_0)/t \quad (1)$$

where  $N_0$  and  $N_t$  are the initial and final population densities respectively, and  $t$  is the time in days.

Varying data points along the growth curve were used to calculate the mean per replicate. In general, 4–6 data points were taken during the exponential phase of the population.

## RESULTS AND DISCUSSION

The numerical response of rotifers followed an expected trend of increasing abundance with increasing food density, which was, however, reduced in the presence of methyl parathion (Figs. 1–3). Thus, food density and methyl parathion concentration had a significant effect ( $p < 0.05$ , analysis of variance) on the maximal population abundance and also the rate of population increase. The interaction of *Chlorella* level  $\times$  toxicant concentration was also a significant effect on these variables (Tab. 1). The maximum population density obtained during this study was  $259 \pm 7$  ind./mL under the highest algal food level in control (Fig. 4). The rate of population increase in controls varied from 0.248 to 0.298 depending on the algal food level (Fig. 5).

Numerous studies on the population growth of planktonic rotifers have indicated an increased population abundance with increasing food availability. For example, Dumont et al. (23) have shown a direct and linear relation between population density of the rotifer *Anuraeopsis fissa* and *Scenedesmus* concentrations. This is also the case with predatory rotifers such as *Asplanchna* (24). In the present study, we used an epiphytic rotifer. Our data in controls broadly resemble those of King (12) who was among the earliest to study the population growth of *E. dilatata* using different algal food densities. *Euchlanis* in general is rarely used in toxicity tests mainly due to lack of culture stability and nonplanktonic nature where eggs are deposited on the bottom. However, a good set of information is available on the general biology of this genus based on the laboratory studies (13). For example, Ejsmont-Karabin et al. (14) have shown that *E. dilatata* continues to grow beyond age at maturity. This implies that they continue to accumulate reserve energy despite fairly high costs of investment for reproduction through production of a large number of clustered eggs (25). In our experimental containers, we noticed a large number of smaller-size individuals under toxicant treatment.

POPULATION GROWTH OF *EUCHLANIS DILATATA*

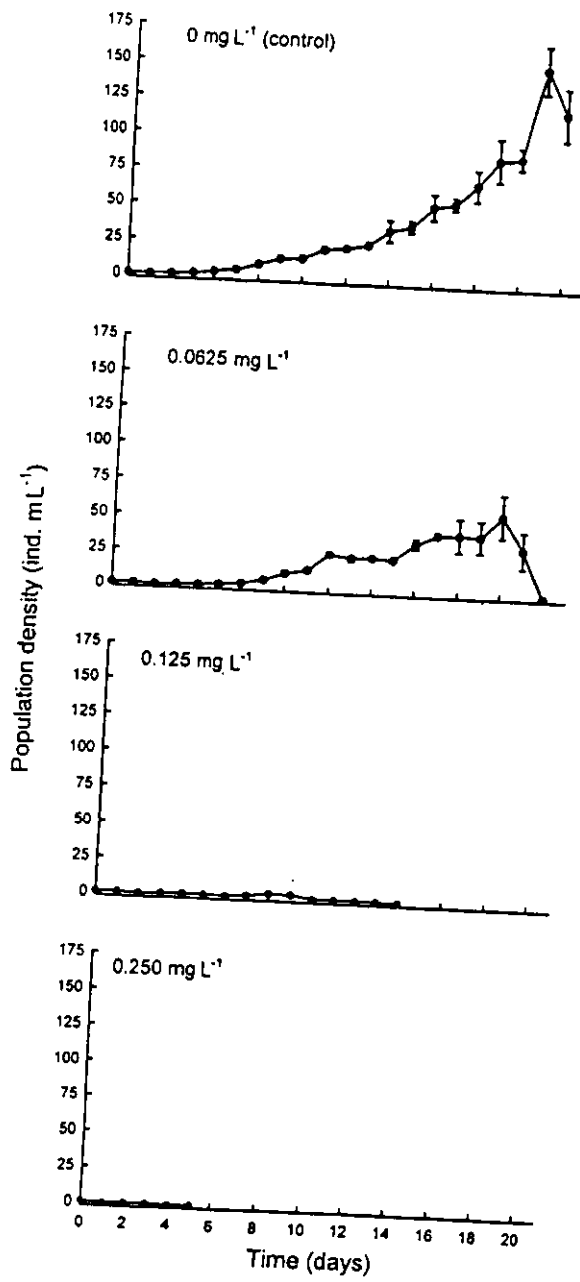


Figure 1. Population growth of *E. dilatata* in relation to different concentrations of methyl parathion at  $0.5 \times 10^6$  cells/mL of *C. vulgaris*. Shown are the mean  $\pm$  standard error based on three replicate recordings.



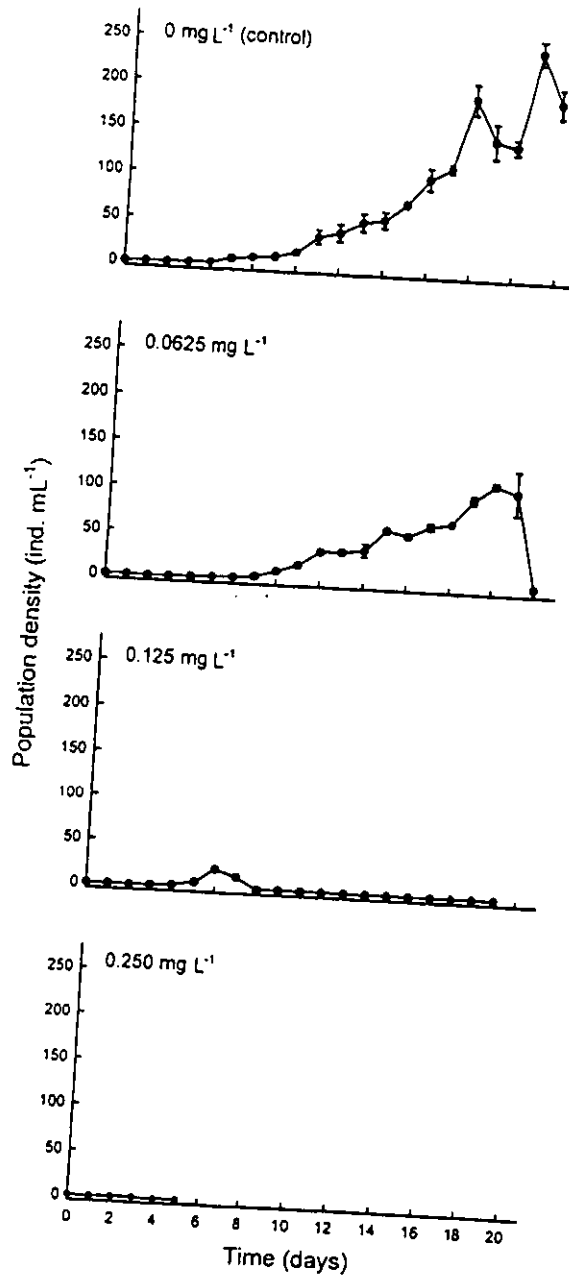


Figure 2. Population growth of *E. dilatata* in relation to different concentrations of methyl parathion at  $1.0 \times 10^6$  cells/mL of *C. vulgaris*. Shown are the mean  $\pm$  standard error based on three replicate recordings.

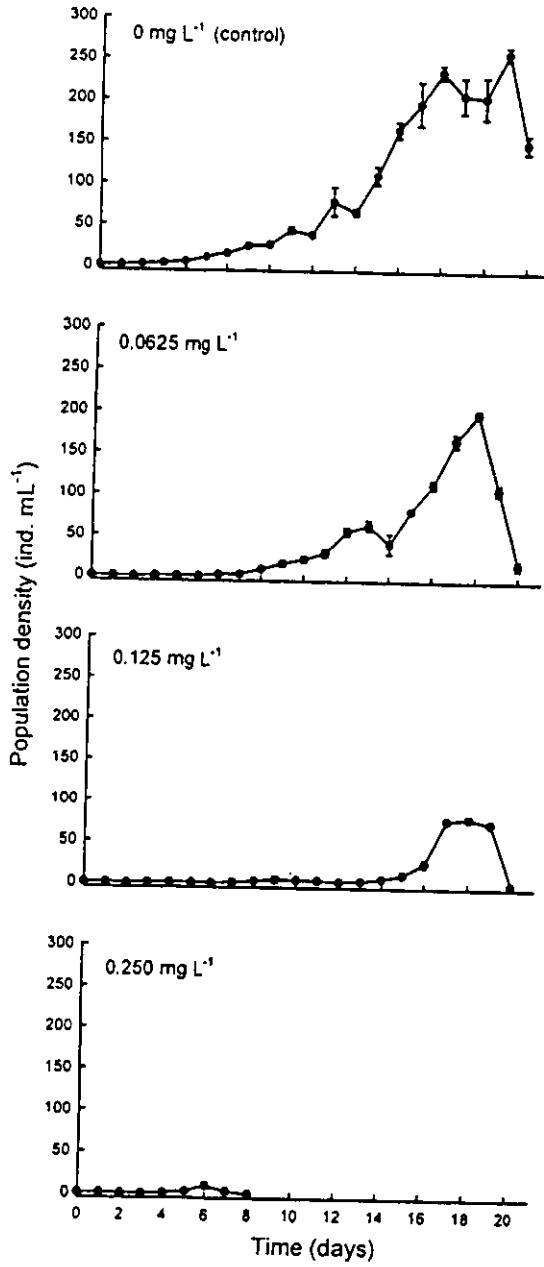


Figure 3. Population growth of *E. dilatata* in relation to different concentrations of methyl parathion at  $2.0 \times 10^6$  cells/mL of *C. vulgaris*. Shown are the mean  $\pm$  standard error based on three replicate recordings.

Table 1. Results of Analysis of Variance Performed on the Rate of Population Increase and Maximal Population Density in *E. dilatata* in Relation to *Chlorella* Density and Methyl Parathion Concentration

Source of Variation	df	SS	MS	F
Rate of population increase				
Algal food level (A)	2	0.091	0.05	29.41 <sup>a</sup>
Toxicant concentration (B)	3	0.579	0.193	113.5 <sup>a</sup>
Interaction (A × B)	6	0.027	0.0045	2.64 <sup>b</sup>
Error	24	0.041	0.0017	
Maximum population abundance				
Algal food level (A)	2	41078	20539	111.8 <sup>a</sup>
Toxicant concentration (B)	3	253558.9	84519.64	460.2 <sup>a</sup>
Interaction (A × B)	6	18451.06	3075.18	16.74 <sup>a</sup>
Error	24	4407.88	183.66	

<sup>a</sup>  $p < 0.001$ .

<sup>b</sup>  $p < 0.05$ .

From the data available in literature, methyl parathion is considered to be relatively more toxic to zooplankton than to phytoplankton (26,27). Its toxicity to a variety of rotifers has also been documented [e.g., *Brachionus calyciflorus* (7,28) *B. plicatilis* (29), *Asplanchna sieboldi* (8), and *B. patulus* (30)]. The median lethal concentration for these species varied from 9 to 29 mg/L. Brandt et al. (31), also using methyl parathion, have shown a much less LC50 (96 h bioassay) value for the mysid *Neomysis mercedis* (0.20  $\mu\text{g/L}$ ). From our previous experiments on the

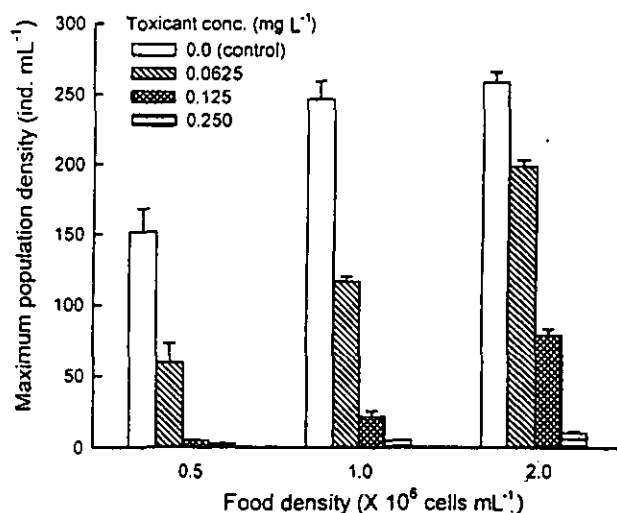


Figure 4. Maximum population density of *E. dilatata* in relation to different concentrations of methyl parathion and three levels of *C. vulgaris*. Shown are the mean  $\pm$  standard error based on three replicate recordings.

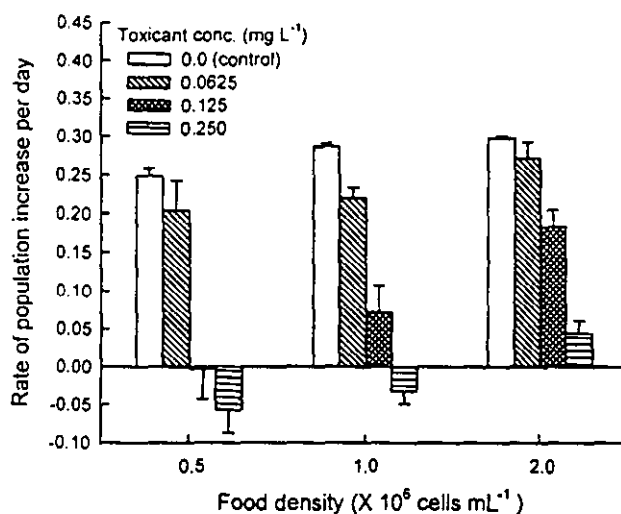


Figure 5. Rate of population increase per day of *E. dilatata* in relation to different concentrations of methyl parathion and three levels of *C. vulgaris*. Shown are the mean  $\pm$  standard error based on three replicate recordings.

effect of this pesticide to planktonic rotifers, *B. calyciflorus* and *B. patulus* (9,30), we found that although the former could tolerate levels as high as 5 mg/L, the latter was susceptible to levels as low as 1.25 mg/L. From this study we find that *E. dilatata* is susceptible to levels even lower, in the range of 0.125–0.25 mg/L of methyl parathion. This warrants the use of several rotifer species in toxicity testing in order to determine the MATC levels for pesticides finally reaching aquatic systems.

Based on the life table demography of *B. patulus*, Rao and Sarma (22) have shown that the toxicity of DDT could be reduced by the presence of algal food. Kluegg et al. (32) have also shown that the toxicity of 3,4-dichloroaniline to the cladocerans *Daphnia magna* and *Ceriodaphnia quadrangula* was significantly influenced by the green algae *Scenedesmus subspicatus*. In the present study too, an increase in the food density resulted in a reduction of the toxic effect on the population abundance of *E. dilatata*. Thus, under 0.125 mg/L concentration of methyl parathion and  $0.5 \times 10^6$  cells/mL of food density, rotifers were able to reach only  $5 \pm 1$  ind./mL. Under similar toxicant concentration when the algal food density offered was  $2.0 \times 10^6$  cells/mL, rotifers reached a peak density of  $79 \pm 4$  ind./mL (Fig. 4). Similar trends were also evident for the rate of population increase (Fig. 5). The positive role of algae in reducing the effects of toxicants to rotifers has been interpreted variously. Some have attributed this to changes in the filtration rates (28), whereas others have explained it on the basis of the detoxification tendency of live algae on methyl parathion (33). In this study the observed positive role of algae in mitigating the toxic effects of methyl parathion could be a result of these factors.

## CONCLUSION

The data suggest that the periphytic rotifer *E. dilatata* is more sensitive to methyl parathion than the planktonic rotifers studied so far. There exists a possible interaction of live *Chlorella* with methyl parathion in influencing the population growth of *E. dilatata*. For establishing maximum acceptable pesticide levels, it is important to consider the relative sensitivities of both planktonic and periphytic rotifer species.

## ACKNOWLEDGMENTS

S. S. S. Sarma thanks the National Council for Science and Technology for Grant CONACYT Ref. 32521-T. S. Nandini thanks the National System of Investigators, Grant SNI Ref. 20520, for their support.

## REFERENCES

1. Smith, C.N.; Carsel, R.F. Foliar Washoff of Pesticides (FWOP) Model: Development and Evaluation. *J. Environ. Sci. Health, Part B.* 1984, 19B, 323-342.
2. Norberg-King, T.J.; Durhan, E.J.; Ankley, G.T.; Robert, E. Application of Toxicity Identification Evaluation Procedures to the Ambient Waters of the Colusa Basin Drain, California. *Environ. Toxicol. Chem.* 1991, 10, 891-900.
3. Pinel-Alloul, B.; Mazumder, A.; Lacroix, G.; Lazzaro, X. Lake Trophic Food Webs: Structure, Function, Interactions and Spatio-Temporal Variations. *J. Water Sci.* 1998, 11, 163-197.
4. Nogrady, T.; Wallace, R.L.; Snell, T.W. *Rotifera*; SBP Academic Publishers: The Hague, The Netherlands, 1993; 142 pp.
5. Anonymous. *Informe de la Situación General en Materia de Equilibrio Ecológico y Protección al Ambiente 1989-1990*; Comisión Nacional de Ecología (CONADE): México, D.F. 1991; 264 pp.
6. Fernandez-Casalderrey, A.; Ferrando, M.D.; Andreu-Moliner, E. Acute Toxicity of Several Pesticides to Rotifer (*Brachionus calyciflorus*). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 1992, 48, 14-17.
7. Fernandez-Casalderrey, A.; Ferrando, M.D.; Andreu-Moliner, E. Chronic Toxicity of Methylparathion to the Rotifer *Brachionus calyciflorus* Fed on *Nannochloris Oculata* and *Chlorella pyrenoidosa*. *Hydrobiologia* 1993, 255/256, 41-49.
8. Sarma, S.S.S.; Nandini, S.; Araiza, M.A.F. Effect of Methyl Parathion Treated Prey (*Brachionus Calyciflus*) on the Population Growth of the Predator *Asplanchna Sieboldi* Rotifera). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 1998, 61, 135-142.
9. Gama-Flores, J.L.; Sarma, S.S.S.; Araiza, M.A.F. Combined Effects of Chlorella Density and Methyl Parathion Concentration on the Population Growth of *Brachionus calyciflorus* (Rotifera). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 1999, 62, 769-755.
10. Koste, W. *Rotatoria. Die Rädertiere Mitteleuropas. Ein Bestimmungswerk begründet von Max Voigt. Bornträger, Stuttgart; Tafelband, 1978; Vol. 1, Textband 673, Vol. 2, 234 pp.*

11. Liber, K.; Knuth, M.L.; Stay, F.S. An Integrated Evaluation of the Persistence and Effects of 4-nonylphenol in an Experimental Littoral Ecosystem. *Environ. Toxicol. Chem.* **1999**, *18*, 357–362.
12. King, C.E. Food, Age and the Dynamics of a Laboratory Population of Rotifers. *Ecology* **1967**, *48*, 111–128.
13. Walsh, E.J. Oviposition Behavior of the Littoral Rotifer *Euchlanis dilatata*. *Hydrobiologia* **1989**, *186/187*, 157–161.
14. Ejsmont-Karabin, J.; Siewertsen, K.; Gulati, R.D. Changes in Size, Biomass and Production of *Euchlanis Dilatata* Lucksiana Hauer During Its Lifespan. *Hydrobiologia* **1993**, *255/256*, 77–80.
15. American Society of Testing and Materials. *Standard Guide for Acute Toxicity Tests with the Rotifer Brachionus: Annual Book of ASTM Standards*; American Society of Testing and Materials: Philadelphia, PA, 1991; Vol. 11.04, E1440.
16. Van der Hoeven, N. Power Analysis for the NOEC: What is the Probability of Detecting Small Toxic Effects on Three Different Species Using the Appropriate Standardized Test Protocols. *Ecotoxicology* **1998**, *7*, 355–361.
17. Roex, E.W.M.; Van Gestel, C.A.M.; Van Wezel, A.P.; Van Straalen, N. Ratios between Acute Aquatic Toxicity and Effects on Population Growth Rates in Relation to Toxicant Mode of Action. *M. Environ. Toxicol. Chem.* **2000**, *19*, 685–693.
18. Girling, A.E.; Pascoe, D.; Janssen, C.R.; Peither, A.; Wenzel, A.; Schäfer, H.; Neumeier, B.; Mitchell, G.C.; Taylor, E.J.; Maund, S.J.; Lay, J.P.; Jüttner, I.; Crossland, N.O.; Stephenson, R.R.; Persoone, G. Development of Methods for Evaluating Toxicity to Freshwater Ecosystems. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **2000**, *45*, 148–176.
19. Fernandez-Casalderrey, A.; Ferrando, M.D.; Andreu-Moliner, E. Chronic Toxicity of Methylparathion to *Daphnia Magna*: Effects on Survival, Reproduction, and Growth. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **1995**, *54*, 43–49.
20. Anonymous. *Methods of Measuring the Acute Toxicity of Effluents to Freshwater and Marine Organisms*; U.S. Environmental Protection Agency: Washington, DC, 1985; EPA/600/4-85/013.
21. Borowitzka, M.A.; Borowitzka, L.J. *Micro-algal Biotechnology*; Cambridge University Press: London, 1988; 480 pp.
22. Rao, T.R.; Sarma, S.S.S. Demographic Parameters of *Brachionus patulus* Muller (Rotifera) Exposed to Sublethal DDT Concentrations at Low and High Food Levels. *Hydrobiologia* **1986**, *139*, 193–200.
23. Dumont, H.J.; Sarma, S.S.S.; Ali, A.J. Laboratory Studies on the Population Dynamics of *Anuraeopsis fissa* (Rotifera) in Relation to Food Density. *Freshwater Biol.* **1995**, *33*, 39–46.
24. Dumont, H.J.; Sarma, S.S.S. Demography and Population Growth of *Asplanchna girodi* (Rotifera) as a Function of Prey (*Anuraeopsis fissa*) Density. *Hydrobiologia* **1995**, *306*, 97–107.
25. Duncan, A. Food Limitation and Body Size in the Life Cycles of Planktonic Rotifers and Cladocerans. *Hydrobiologia* **1989**, *186/187*, 11–28.
26. Schaefer, H.; Hettler, H.; Fritsche, U.; Pitzen, G.; Roederer, G.; Wenzel, A. Biotests Using Unicellular Algae and Ciliates for Predicting Long-Term Effects of Toxicants. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **1994**, *27*, 64–81.
27. Kungolos, A.; Samaras, P.; Kipopoulo, A.M.; Zoumboulis, A.; Sakellaropoulos, G.P. Waste Management Problems in Agro-Industries 1998. *Water Sci. Technol.* **1999**, *40*, 357–364.

28. Fernandez-Casalderrey, A.; Ferrando, M.D.; Andreu-Moliner, E. Effect of the Insecticide Methylparathion on Filtration and Ingestion Rates of *Brachionus calyciflorus* and *Daphnia magna*. *Sci. Total. Environ.* **1993**, 1-2 (Suppl.), 867-876.
29. Snell, T.W.; Janssen, C.R. Rotifers in Ecotoxicology: A Review. *Hydrobiologia* **1995**, 313/314, 231-247.
30. Sarma, S.S.S.; Nandini, S.; Gama-Flores, J.L. Effect of Methyl Parathion on the Population Growth of the Rotifer *Brachionus patulus* (O.F. Müller) under Different Algal Food (*Chlorella Vulgaris*) Densities. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, *in press*.
31. Brandt, O.M.; Fujimura, R.W.; Finlayson, B.J. Use of *Neomysis Mercedis* (Crustacea: Mysidacea) for Estuarine Toxicity Tests. *Trans. Amer. Fisheries Soc.* **1993**, 122 (2), 279-288.
32. Kluettgen, B.; Kuntz, N.; Ratte, H.T. Combined Effects of 3,4-Dichloroaniline and Food Concentration on Life-Table Data of Two Related Cladocerans, *Daphnia magna* and *Ceriodaphnia quadrangula*. *Chemosphere* **1996**, 32 (10), 2015-2028.
33. Megharaj, M.; Madhavi, D.R.; Sreenivasulu, C.; Umamaheswari, A.; Venkateswarlu, K. Biodegradation of Methyl Parathion by Soil Isolates of Microalgae and Cyanobacteria. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **1994**, 53, 292-297.

Received July 15, 2000