

03098
1

Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología
Universidad Nacional Autónoma de México



U.N.A.M

EFFECTO DEL AMONIO EN LOS PARAMETROS
DEMOGRAFICOS DE *Ceriodaphnia dubia*, *Moina macrocopa* Y
Daphnia pulex (CRUSTACEA : CLADOCERA) BAJO
DIFERENTES CONCENTRACIONES DE MICROALGAS
MEDIANTE PRUEBAS DE TOXICIDAD .

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE
DR. EN CIENCIAS
(Limnología)

PRESENTA:

M. en C. ERNESTO MANGAS RAMÍREZ

DIRECTOR DE TESIS: Dr. SINGARAJU SRI SUBRAHAMANYA SARMA.

Comité tutorial:

Dr. Javier Alcocer Durand
Dra. Guillermina Alcaráz Zubeldia
Dr. Miroslav Macek
Dra. Nandini Sarma
Dra. Ma. Esther de la Rosa Duque
Dra. Ruth Cecilia Vanegas Pérez

En la Dirección de Posgrado de la Universidad Nacional Autónoma de México, se declara en forma pública y solemne que el presente documento es el resultado de la investigación realizada por el doctor en ciencias Ernesto Mangas Ramírez, quien declara haber sido autor de la misma y haberse comprometido a defenderla en la forma que se indica en el presente documento.
México, D.F., a los 11 días del mes de octubre del 2003.
Ernesto Mangas Ramírez
Ramsirec
11 Oct / 03

México, Ciudad de México, 2003.

CON
EXCEN



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.

PAGINACIÓN DISCONTINUA

AGRADECIMIENTOS:

Con mi más profundo agradecimiento al Dr. Singaraju Sri Subrahamanya Sarma, mi Director de tesis, por que con su guía, sugerencias y amistad, a lo largo de todo este tiempo, contribuyeron a la feliz conclusión del presente estudio, el cual me ha permitido ampliar enormemente mis perspectivas en relación al planteamiento de hipótesis de trabajo a partir de observaciones previas y a establecer los pasos metodológicos para obtener respuestas a las mismas a través de estudios en ecotoxicología.

Al Dr. Manuel Elías Gutiérrez, a quien agradezco su guía y amistad de años, y quien sugirió la continuación de un estudio limnológico en experimentos que dieran respuestas a las preguntas planteadas en campo y que derivo en el presente trabajo de tesis de doctorado.

A la comisión revisora asignada por el Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología, Dr. Javier Alcocer, Dra. Guillermina Alcaraz, Dr. Miroslav Macek, Dra. Nandini Sarma Dra. Ma. Esther de la Rosa y Dra. Cecilia Vanegas, por su ayuda invaluable, sus atinadas observaciones, comentarios y las enseñanzas que algunos de ellos en diferentes momentos y a su tiempo han formado parte de mi identidad.

Este trabajo de tesis se realizó con el apoyo de la beca escolar de CONACYT No. Ref. 144644.

GRACIAS.



A mis compañeros de laboratorio de Zoología Acuática de la FES-Iztacala, por los momentos compartidos.

A Germán, Maria Eugenia, Itzel, Lania, Lili, Jaime chico, Jaime grande, Joselito, abuelita María, abuelito Alfredo, Alfredo, Arturo, Oscar, Marco, abuelita Chave y resto de la banda.

Para todos mis alumnos y tesisistas, pasados y futuros y para todo aquel, que junto con ellos encuentren en el presente trabajo una motivación para iniciar una nueva búsqueda.

A mis padre Eduardo de quien conservo el recuerdo, ejemplo, sus bromas y su voz a través de mis sueños, o en los recuerdos de mi familia. Como él decía, ¡misión cumplida!, ahora me permito decirle a su recuerdo que en este momento mi encomienda apenas comienza. Gracias papá.

A mi Mamá Alejandra, quien siempre será mi mamacita chula y la abuelita Ale para todos sus nietos, y que en sus momentos ha sido una mujer a la que he admirado por tener una gran fortaleza y tenacidad. Con todo el cariño de su hijo que la adora.

A mis hermanas Teresa, Irma y María a quienes quiero y respeto mucho y quienes sufrieron un pedacito en la elaboración de este trabajo. Gracias hermanitas.

A Juan y Carlos, mis hermanos mayores.

A la siguiente generación, Joao, Edson, Juan,, Brenda, Yobana, Luis, Lalo, Ale chica, Diana y Aída.

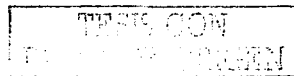
A mis abuelos, Rafael, Elvira Y Ernesto, de quienes he heredado parte de mi identidad.



A Mayeli, mi esposa adorada a quien admiro por su enorme dedicación a visualizar y lograr sus sueños, con admiración y con todo mi amor, gracias por enseñarme a cabalgar en el lomo de la luna.

A mi hijo Germán a quien pertenece gran parte de este trabajo y porque sacrificó sus fines de semana para acompañarnos durante largas jornadas en el laboratorio, por lo que estas pequeñas líneas tratan de ser un pequeño reconocimiento al gran esfuerzo que realizaste y queriendo compensarte un poquito me permito dedicarte también a ti este trabajo que igualmente es un poquito tuyo. Con amor para ti bebe Oso.

Para mis hijos José Antonio (Toño) y Ernesto Siddharta (Ernestito), de un padre que nunca los olvida deseando que alcancen cada día la felicidad logrando las metas de sus sueños y por que un día, "un abrazo nos restituya todos los tiempos robados".



INDICE .

| | |
|---|----|
| Resumen..... | 1 |
| I. Introducción..... | 3 |
| II. Hipótesis..... | 5 |
| III. Antecedentes..... | 6 |
| 3.1. Fundamento del presente estudio..... | 6 |
| 3.2. Pruebas de ecotoxicología con zooplancton..... | 7 |
| IV. Objetivos..... | 9 |
| 4.1. Objetivo general..... | 9 |
| 4.2. Objetivos particulares..... | 9 |
| V. Area de colecta..... | 10 |
| 5.1. Localización geográfica..... | 10 |
| VI. Concentración letal media..... | 12 |
| 6.1. Materiales y métodos..... | 12 |
| 6.1.1. obtención de muestras biológicas..... | 12 |
| 6.1.2. Obtención del cultivo de Cladóceros..... | 12 |
| 6.1.3. Cultivo de <i>Chlorella vulgaris</i> como alimento vivo..... | 13 |
| 6.1.4. Pruebas de concentración letal media para amonio..... | 13 |
| 6.2. Resultados..... | 15 |
| 6.2.1. Concentración letal media..... | 15 |
| VII. Pruebas de toxicidad crónica..... | 22 |
| 7.1. Crecimiento poblacional..... | 22 |
| 7.1.1. Materiales y métodos..... | 22 |
| 7.1.2. Resultados..... | 23 |
| 7.2. Tabla de vida demográfica..... | 36 |
| 7.2.1 Materiales y métodos..... | 36 |
| 7.2.2. Resultados..... | 38 |

| | |
|----------------------------------|----|
| 7.3. Competencia..... | 50 |
| 7.3.1. materiales y métodos..... | 50 |
| 7.3.2. Resultados..... | 51 |
| Conclusiones..... | 62 |
| Apéndice 1..... | 64 |
| Apéndice 2..... | 65 |
| Bibliografía..... | 66 |

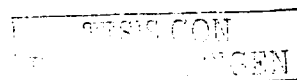
RESUMEN

En estudios previos realizados en el embalse Manuel A. Camacho del Estado de Puebla, se determinó una sucesión en la dominancia entre *Ceriodaphnia dubia* por *Moina macrocopa* (Crustacea:Cladocera), promovida al parecer por un incremento de amonio en el sistema y un cambio en la densidad del alimento. Una tercera especie (*Daphnia pulex*) se vio poco afectada.

Con el objeto de determinar el efecto del amonio en los parámetros demográficos de estas poblaciones, se cultivaron en laboratorio cepas de las mismas a partir de organismos silvestres provenientes del embalse Manuel A. Camacho. Se determinó la concentración letal media a 24 horas para cada una de ellas a tres concentraciones de alimento. A partir de estos resultados se realizaron pruebas de toxicidad crónica utilizando 0, 0.035, 0.07, 0.14, 0.28, y 0.32 mg L⁻¹ N-NH₃. Se prepararon dos densidades de microalga como alimento para cada una de las soluciones resultantes (0.5 x 10⁸ y 1.5 x 10⁶ cél. mL⁻¹ de *Chlorella vulgaris*) con el fin de determinar el efecto de estas dos variables en la sobrevivencia, reproducción, esperanza de vida, tasa de reproducción bruta, tasa de reproducción neta, tiempo de generación y tasa de crecimiento poblacional a pH constante de 7.24.

Se determinó para *Ceriodaphnia dubia* una CL₅₀ (24 h) de 0.395 ± 0.023 mg L⁻¹ de N-NH₃, mientras que *Daphnia pulex* mostró mayor resistencia con una CL₅₀ (24 h) de 0.861 ± 0.029 mg L⁻¹ de N-NH₃ seguida de *Moina macrocopa* con una CL₅₀ (24 h) de 0.808 ± 0.017 mg L⁻¹ de N-NH₃. Se determinó que dentro de los recipientes de prueba la disminución del amonio debido a la presencia de las microalgas utilizadas como alimento no fue significativa.

En general, para todas las especies, tanto en las pruebas de toxicidad aguda como en las crónicas, se observó que el aumento en las concentraciones de alimento reduce el efecto tóxico del amonio ya que los resultados indicaron



un mayor efecto de este cuando se tiene una concentración de alimento de 0.5×10^6 cél. mL⁻¹ de microalgas. Para el caso exclusivo de *C. dubia* se estableció un mayor crecimiento poblacional a densidades bajas de microalga. Los resultados de la competencia indican que la presencia de *D. pulex* permite un mejor desarrollo de *M. macrocopa* mientras que desfavorece el crecimiento poblacional de *C. dubia*.

I. INTRODUCCIÓN

Los cladóceros son generalmente el grupo dominante del zooplancton de agua dulce y pueden contribuir con el 80 % de la productividad secundaria. En cuerpos de agua naturales están sujetos a grandes variaciones de parámetros ambientales físicos y químicos así como a la depredación por parte de peces y otros invertebrados (Downing & Rigler, 1984; Smirnov, 1996). La disponibilidad de alimento algal es otro factor que controla a las poblaciones de cladóceros y zooplancton herbívoro en general, ya que debido al tamaño de estos y a que presentan un tiempo de generación corto, responden rápidamente a cambios en la densidad de las microalgas que utilizan como alimento (Dodson & Frey, 1991). Incluido en las variables ambientales, el amonio es muy importante, ya que, junto con el fósforo, afecta directamente las densidades de microalgas influyendo de esta manera en la biomasa zooplanctónica (Hutchinson, 1967). En cuerpos de agua naturales el amonio alcanza concentraciones hasta de 5 mg L^{-1} de N-NH_4^+ a causa de la excreción del zooplancton, peces y otros animales acuáticos (Hargreaves, 1998). Sin embargo, con aportes derivados de la agricultura las concentraciones se incrementan, por lo que puede ser extremadamente tóxico para las comunidades acuáticas teniendo un efecto negativo en las especies de cladóceros (U.S. EPA, 1985, Thurston & Russo, 1983).

En el agua el amonio se encuentra en forma de dos especies químicas, la más común es la forma ionizada (N-NH_4^+), mientras que la menos frecuente es la forma no ionizada (N-NH_3). Las proporciones entre N-NH_4^+ y N-NH_3 dependen de la dinámica de disociación regidas por el pH, la temperatura y la composición iónica del agua. (Thurston & Meyn 1986., Wetzel, 1981). La toxicidad del amonio es principalmente atribuida a la forma no ionizada (N-NH_3). Esta se debe en parte a que interfiere con la hemoglobina para transportar oxígeno (Spotte, 1979). En

los grupos de crustáceos inferiores incluidas algunas especies de cladóceros, la hemoglobina se encuentra disuelta en la hemolinfa, como una característica evolutiva primitiva (Vázquez *et al.*, 1986). En general, de acuerdo a Martínez-Jerónimo (1991), la toxicidad de un compuesto depende tanto de la concentración y de la forma química en la que se encuentra la sustancia. El tiempo de exposición es importante, aunque el efecto de un contaminante depende también de la sensibilidad del organismo de prueba, así como del estadio del ciclo de vida en que se encuentren, a esto deben considerarse también sus hábitos de vida, ya que la liberación e incremento de amonio en el sedimento según Besser *et al.*, (1998) y Van Sprang & Janssen (1997) somete a mayores niveles de estrés a los organismos bentónicos quienes resienten los efectos acumulativos antes que los planctónicos

Una fracción del amonio puede ser utilizada como nutrimento por el fitoplancton (Hansen *et al.*, 1997), y el aumento en las densidades de los productores primarios favorece el desarrollo de las comunidades de zooplancton herbívoro (Downing & Rigler, 1984); Sin embargo, en la época del año en que la concentración de alimento es baja, las poblaciones de cladóceros se someten a un estrés debido a la inanición. Aunado a esto la fracción de amonio no utilizada, dependiendo de sus concentraciones, puede resultar toxica para el zooplancton en general, por lo que funciona como una presión adicional. Por tal razón, el objetivo de este trabajo es determinar el efecto combinado de las densidades de alimento y las concentraciones de amonio.

II. HIPOTESIS:

- Debido a que de forma natural las especies del género *Moina* y *Daphnia* se ha reportado con mayor frecuencia en los lagos y embalses que presentan un mayor grado de eutrofización (Vázquez *et. al.*, 1986; Elías-Gutiérrez, 1994; Mangas-Ramírez, 2000), es muy probable que el amonio tendrá un efecto negativo de mayor magnitud en los parámetros demográficos de *Ceriodaphnia dubia* que los que se registren para *Moina macrocopa* y *Daphnia pulex*.
- La relación de coexistencia en el campo de *Moina macrocopa* y *Daphnia pulex* puede permitir un menor grado de inhibición competitiva entre ellas que entre las combinaciones con *Ceriodaphnia dubia*.
- En algunos estudios se ha observado que el aumento en la densidad de alimento disminuye el efecto de diversos tóxicos (Gama-Flores *et al.*, 1999; Mangas-Ramírez *et al.*, 2001). Debido a ello, esperamos que el incremento en la densidad de *Chlorella vulgaris* en los recipientes de prueba propiciará la reducción del efecto toxico del amonio.

III. ANTECEDENTES

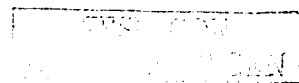
3.1. Fundamento del presente estudio:

Desde hace treinta y siete años (1965) la superficie del embalse Manuel Ávila Camacho, un sistema ubicado 5 km al sur de la ciudad de Puebla, fue invadida por malezas acuáticas, en el que el lirio acuático (*Eichhornia crassipes*) constituyó el principal problema, ya que cubrió el 65 % del total de la superficie del espejo de agua. El embalse se encuentra enclavado en la zona central del Estado de Puebla y es el más importante del mismo, ya que contiene el 52% del total de agua de almacenamiento del Estado. Por causa de la invasión de las malezas acuáticas, la Comisión Nacional del Agua, dentro del "Proyecto Estatal Angelópolis", empleo trece trituradoras para limpiar cerca de mil seiscientas hectáreas de lirio, concluyendo los trabajos el 20 de febrero de 1997.

Debido a que se realizaron estudios con una periodicidad mensual entre 1994 y 1995 en el mismo embalse –antes del proceso de erradicación de malezas flotantes–, se procedió a evaluar el impacto ambiental que tuvo la trituración del lirio acuático en las poblaciones planctónicas, ícticas y variables físicas y químicas en el embalse.

La determinación de cada variable se realizó mensualmente durante un año completo antes de la trituración del lirio acuático y se continuó durante un año después de la misma. En el trabajo de campo, se colectaron microalgas y zooplancton, así como peces por medio de técnicas convencionales

En los resultados y conclusiones que se obtuvieron de este trabajo se determinó que las concentraciones promedio del amonio se incrementaron en un 702 % a las concentraciones existentes antes de la trituración del lirio. Las tres especies de peces que se encontraban habitando la zona desaparecieron. La



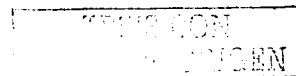
comunidad zooplanctónica antes de la trituración presentaba como especie dominante a *Ceriodaphnia dubia* que representaba el 51 % de la abundancia total del zooplancton, sin embargo después de la trituración redujo sus densidades al 3 % siendo desplazada por *Moina macrocopa* que alcanzó para el segundo periodo el 59 % del total de la abundancia de la comunidad zooplanctónica. Así mismo *Daphnia pulex* mantuvo sus poblaciones antes y después de la trituración registrando de un 40 % a un 35 % de las densidades para ambos ciclos respectivamente (Mangas-Ramírez, 2000).

Por esta razón se decidió evaluar el efecto que tiene amonio sobre los parámetros demográficos de *Ceriodaphnia dubia*, *Moina macrocopa* y *Daphnia pulex*.

3.2. Pruebas de ecotoxicología con zooplancton.

Dentro de los trabajos relacionados con la toxicidad del amonio, investigaciones de crecimiento demográfico y la construcción de tablas de vida con cladóceros se tiene un estudio sobre la toxicidad del amonio realizados por Cairns *et al.*, (1990), quienes, utilizaron comunidades perifíticas de protozoarios sobre sustratos artificiales. Ellos observaron una clara relación entre el aumento en las concentraciones de amonio y el decremento de la densidad biológica. Los resultados indicaron que la densidad se reduce un 20 % en concentraciones de $15.4 \mu\text{g L}^{-1}$ de N-NH_3 .

En relación al amonio, Yuxin & Zhihui (1996) determinaron para el cladóceros *Moina mongolica* una CL_{50} de 9.84 mg L^{-1} de N-NH_3 . Andersen & Buckley (1998) determinaron la CL_{50} para *Ceriodaphnia dubia* en una concentración de $1.73 \pm 0.19 \text{ mg L}^{-1}$ de N-NH_3 , mientras que para el rotífero *Brachionus plicatilis*, se han determinado diferentes datos de CL_{50} que van de



17.7 mg L⁻¹ de N-NH₃ (Snell, & Persoone, 1989) a 38 mg L⁻¹ de N-NH₃ (Snell *et al.*, 1998).

En estudios referentes a la fisiología del plancton se encuentra el realizado por Gyore *et al.*, (1982) quienes investigaron el efecto del amonio sobre la respiración de *Daphnia magna*. Ellos detectaron, utilizando un respirómetro de flujo continuo, una disminución en el consumo de oxígeno, causado por una toxemia aguda de amonio.

Kaniewska-Prus (1982) determinó el efecto de diferentes concentraciones de amonio sobre *D. magna* comparando con *Simocephalus vetulus* y *Asellus aquaticus* en el cual establece que estas especies tienen diferente grado de sensibilidad a las soluciones de prueba siendo más resistente *D. magna* y más sensible *A. acuaticus*.

McDonald *et al.*, (1995a) y Gulyas & Fleit (1990), determinaron una CL₅₀ (48h) para *D. magna* entre 0.08 y 0.12 mg L⁻¹ de N-NH₃, para agua con baja y alta alcalinidad respectivamente, mientras que la USEPAA (1985) establece rangos entre 0.53 a 2.5 mg L⁻¹ de N-NH₃ para la misma especie en agua con baja y alta alcalinidad ("blanda y dura").

En cuanto a los estudios en donde se han determinado las tablas de vida de cladóceros en México y en los que una variable importante ha sido la densidad del alimento se tienen los referentes a las especies *Ceriodaphnia cornuta*, *Moina macrocopa*, *Pleuroxus aduncus*, *Simocephalus vetulus* y *Ceriodaphnia dubia*, (Nandini & Sarma, 1998, Nandini & Sarma, 2000b), también existen estudios de interacción competitiva entre *Moina macrocopa* y el rotífero *Brachionus patulus* en el cual *B. patulus* se ve afectado por la presencia del cladóceros, lo cual propicia una disminución en sus densidades (Hurtado-Bocanegra *et al.*, 2000).



IV. OBJETIVOS DEL PROYECTO

4.1. Objetivo general

Determinar el efecto que el amonio ejerce en los parámetros demográficos de *Ceriodaphnia dubia*, *Moina macrocopa* y *Daphnia pulex* (Crustacea : Cladocera)

4.2. Objetivos particulares:

1. Determinar la concentración letal media del amonio a 24 horas en *Ceriodaphnia dubia*, *Moina macrocopa* y *Daphnia pulex* (Crustacea : Cladocera) a diferentes densidades de alimento.
2. Determinar los efectos del amonio en los parámetros demográficos de *C. dubia*, *M. macrocopa* y *D. pulex* a diferentes densidades de alimento mediante pruebas de toxicidad crónica.
3. Establecer los efectos de la interacción entre *C. dubia*, *M. macrocopa* y *D. pulex* a diferentes concentraciones de amonio.

V. AREA DE COLECTA.

5.1. Localización geográfica.

El Estado de Puebla se encuentra dividido en cuatro Regiones Hidrológicas (R.H.) denominadas Río Balsas (R.H. 18), Río Pánuco (R.H. 26), Tuxpan-Nautla (R.H. 27) y Papaloapan (R.H. 28). En la presente investigación, las colectas del material biológico se realizaron en el embalse Manuel Ávila Camacho, que forma parte de la Región Hidrológica 18. Esta región comprende la mayor parte del Estado (20,328. 17 km²) y tiene como cuenca principal la del río Zahuapan-Atoyac que es la corriente formadora más importante del río Balsas (INEGI, 1987b).

El embalse Manuel Avila Camacho está localizado a 5 kilómetros al sur de la ciudad de Puebla. Este sistema se construyó en el período 1941-1946 por la Comisión Nacional de Irrigación. Tiene una capacidad de almacenamiento de 405 X 10⁶ m³. Actualmente irriga una superficie de 33 820 hectáreas de cultivo y se ubica entre los 18° 53' y los 18°57' de latitud Norte y 98° 06' con 98° 15' longitud Oeste, a una altitud de 2100 msnm. La cuenca pertenece al eje neovolcánico transversal, a la subprovincia de lagos y volcanes del Anáhuac, presentándose lomeríos suaves de sedimentos con cañadas en gran parte de la zona de estudio.

Las aguas que escurren hacia el embalse Manuel Ávila Camacho por la parte norte son de los ríos Atoyac con un flujo continuo y las del Aiseséca que presenta un flujo intermitente. El río Atoyac se forma a partir de los deshielos que descienden desde altitudes superiores a los 5 000 msnm, del flanco oriental del volcán Iztaccíhuatl, en los límites de los Estados de México y Puebla. En su recorrido se une con el río Aiseséca dentro de la cuenca del embalse. (INEGI, 1987a). Estos ríos y sus tributarios como el Zahuapan que se une al Atoyac antes que desemboque al embalse, acarrear productos de los drenajes de las



poblaciones por las que atraviesan sus aguas, por lo que llevan desechos urbanos, así como industriales y agrícolas. El agua de estos ríos con esta carga de contaminantes se vierte sin mayor tratamiento directamente en el embalse (INEGI, 1987a).

El clima predominante de la zona según Köppen modificado por García (1973) es templado subhúmedo con lluvias en verano, C (w1) (w), con porcentaje de precipitación invernal inferior a los 5 mm. La temperatura promedio máxima y mínima durante el año es aproximadamente de 34° y 2° C respectivamente. La vegetación predominante es chaparral en el sureste y pastizal inducido en el resto de la región. Estos dos tipos de vegetación sucedieron a una vegetación original representada por bosque de pino y selva baja caducifolia (INEGI, 1987b).

La geología está representada por rocas volcánicas del Cenozoico pertenecientes al Pleistoceno. Dos tipos de rocas, las ígneas extrusivas y suelos vulcano-sedimentarios con rocas sedimentarias del cuaternario, dominan la geología de la cuenca. (aproximadamente el 87.6 %). Les siguen en superficie las rocas ígneas extrusivas del terciario que cubren el 10.4 % de la cuenca y las rocas sedimentarias y vulcano-sedimentarias calizas del cretácico superior, las cuales cubren aproximadamente el 2 % de la cuenca (INEGI, 1987a).

VI. CONCENTRACIÓN LETAL MEDIA

6.1. MATERIALES Y MÉTODOS.

6.1.1. Obtención de muestras biológicas:

La colecta de las muestras biológicas se realizó entre las 9 y las 11 de la mañana a una profundidad entre el nivel superficial y 0.30 m, en donde se filtraron 100 litros de agua del embalse utilizando una red de zooplancton de 60 μm de apertura de malla para obtener a las especies de prueba. Los organismos colectados se colocaron en frascos de vidrio de cuatro litros de capacidad los cuales fueron trasladados al laboratorio.

6.1.2. Obtención del cultivo de Cladóceros:

El zooplancton se distribuyó en 2 acuarios de 30 litros de capacidad los cuales se llenaron con agua del embalse previamente filtrada. De este grupo se determinaron y separaron las especies de *Ceriodaphnia dubia*, *Moina macrocopa* y *Daphnia pulex* de acuerdo a los criterios propuestos por Elías-Gutiérrez (1996). Posteriormente se aislaron a hembras adultas en recipientes de 100 ml conteniendo 50 ml de EPA (por las siglas en inglés Environmental Protection Agency) el cual es utilizado en la mayoría de los estudios con zooplancton de agua dulce en el mundo y se prepara disolviendo 96 mg NaHCO_3 , 60 mg CaSO_4 , 60 mg MgSO_4 y 4 mg KCl por cada litro de agua destilada (Snell & Janssen, 1995). Como alimento se suministró la microalga clorofícea *Chlorella vulgaris* en concentración de 0.5×10^6 cél. mL^{-1} . Se implementó una rutina de mantenimiento diario, con recambio de medio de cultivo y alimento cada dos días: el fotoperíodo fue de 16:8 horas (luz: oscuridad), a temperatura de 23°C (Martínez *et al.*, 1997; Sarma, 1996; Pardian & Marian, 1991).

6.1.3. Cultivo de *Chlorella vulgaris* como alimento vivo.

En el presente trabajo, se utilizó *Chlorella vulgaris* Beijerinck, 1890 como alimento para obtener un nivel nutricional elevado, libre de toxinas, ya que se tiene la ventaja de que esta microalga presenta un crecimiento poblacional rápido, además de que su tamaño es accesible para los cladóceros.

El cultivo de *C. vulgaris* se realizó, inoculando el alga en recipientes de plástico transparente de dos litros de capacidad con medio Bold (Borowitzka & Borowitzka, 1988), la aireación y el foto período con iluminación fluorescente difusa fueron continuos. Como fuente de carbono se adicionó un gramo de bicarbonato de sodio por recipiente cada 48 horas. Después de aproximadamente 10 días se refrigeraron las botellas para sedimentar el alga. Posteriormente se procedió a decantar el medio Bold debido a que los nutrimentos que lo forman no sirven para apoyar el crecimiento de los cladóceros, por lo cual se sustituye con medio EPA.

6.1.4. Pruebas de concentración letal media para amonio

Una vez cumplido lo anterior y para realizar las pruebas de toxicidad aguda a 24 horas para cada especie, se separaron los neonatos de un día de edad en recipientes con 50 mL de medio colocando diez individuos por recipiente los cuales se distribuyeron en 1 lote testigo y cuatro experimentales, cada uno de los cuales tuvo tres replicas. Se consideraron tres densidades de alimento de 0, 0.5×10^6 y 1.5×10^6 cél. mL⁻¹ de *Chlorella vulgaris* en cada ensayo. Las concentraciones de N-NH₃ de los lotes experimentales se obtuvieron utilizando una solución madre a partir de la dilución de 1g de NH₄Cl en un litro de agua destilada. El pH se mantuvo estable a 7.24 debido a la presencia de las sales que constituyen el medio EPA. Así mismo, la temperatura se mantuvo en 23° C.

En cada caso y para cada especie, excepto en los lotes testigo, a partir de experimentos previos de tipo biobúsqueda, se consideraron concentraciones con variaciones en las concentraciones de amonio que fueron entre 0.279 a 2.786 mg L⁻¹ de N-NH₃ para *Moina macrocopa*, de 0.139 a 1.074 mg L⁻¹ de N-NH₃ para *Ceriodaphnia dubia* y de 0.697 a 1.219 mg L⁻¹ de N-NH₃ para *Daphnia pulex*.

Se contabilizaron el numero de organismos muertos a las 24 horas (Martínez *et al.*, 1997; Sarma, 1996). La prueba es de tipo estático, sin recambios El criterio de muerte fue la sedimentación y falta de movilidad. (Quadri *et al.*, 1994; UNEP, 1986; Sarma & Nandini, 1999). El valor de la concentración letal media se obtuvo con el método de regresión Empírica probit descrito en el anexo 1 (Finney, 1971).

En el presente estudio para descartar la posibilidad de que la adición de microalgas este removiendo parte del amonio disminuyendo la toxicidad del mismo, se realizó la cuantificación del amonio total por espectrofotometría mediante la técnica de azul-indol para lo cual se prepararon las soluciones de acuerdo al método descrito anteriormente con sus respectivas repeticiones. Se adicionaron posteriormente a diez individuos por lote, se dejaron durante 24 horas El amonio total se cuantificó al inicio y al final del experimento. Se comparó por medio de un análisis de varianza para determinar si se presentaron diferencias significativas en relación a la concentración de amonio en los recipientes de prueba.

6.2. RESULTADOS

6.2.1. CONCENTRACION LETAL MEDIA

Se determinó la concentración letal media para cada especie a tres densidades de alimento, las cuales fueron 0, 0.5 y 1.5 x 10⁶ cél. mL⁻¹ de *Chlorella vulgaris*. Los resultados obtenidos para la primera de estas establecen para *Ceriodaphnia dubia* una CL₅₀ de 0.395 ± 0.023 mg L⁻¹ de N-NH₃ (tabla 1). Se observó un aumento significativo en la concentración letal media de acuerdo al incremento de la densidad de alimento, ya que la CL₅₀ para la densidades de 0.5 y 1.5 x 10⁶ cél. mL⁻¹ fueron 0.955 ± 0.008 y 0.917 ± 0.024 mg L⁻¹ de N-NH₃ respectivamente (ANDEVA, P < 0.001), por lo que la densidad de microalgas, en los experimentos realizados, tiene efectos atenuantes sobre la toxicidad del cloruro de amonio (tabla 2)

Tabla 1. Concentración letal media al N-NH₃ para cada una de las especies de prueba a diferentes densidades de microalga.

| | CL ₅₀ en mg L ⁻¹ de N-NH ₃ | | |
|---|---|---------------------------|------------------------|
| Concentración de alga No. de Células x 10 ⁶ | <i>Daphnia pulex</i> | <i>Ceriodaphnia dubia</i> | <i>Moina macrocopa</i> |
| 0 | 0.861 ± 0.029 | 0.395 ± 0.023 | 0.808 ± 0.017 |
| 0.5 | 0.946 ± 0.005 | 0.955 ± 0.008 | 1.328 ± 0.09 |
| 1.5 | 0.965 ± 0.0001 | 0.917 ± 0.024 | 1.714 ± 0.02 |

Tabla 2. Análisis de varianza para cada una de las especies de prueba comparando la diferencia entre las CL₅₀ obtenidas para cada densidad de alimento.

ANÁLISIS DE VARIANZA *Daphnia pulex*

| | sc | gl | pc | F | p |
|-----------------------------|--------|----|-------|-------|--------|
| Entre replicados | 1519.4 | 2 | 759.7 | 10.75 | 0.0104 |
| Dentro de los replicados | 423.8 | 6 | 70.6 | | |

Tabla 2...cont
ANÁLISIS DE VARIANZA *Ceriodaphnia dubia*

| | sc | gl | pc | F | p |
|--------------------------|---------|----|---------|--------|--------|
| Entre replicados | 35531.3 | 2 | 17765.6 | 192.55 | 0.0007 |
| Dentro de los replicados | 276.8 | 3 | 92.3 | | |

Tabla 2...cont.
ANÁLISIS DE VARIANZA *Moina macrocopa*

| | sc | gl | pc | F | p |
|--------------------------|---------|----|---------|--------|--------|
| Entre replicados | 68647.7 | 2 | 34323.8 | 128.12 | 0.0013 |
| Dentro de los replicados | 803.7 | 3 | 267.9 | | |

Para el caso de *Daphnia pulex* se determinó una CL_{50} de 0.861 ± 0.029 mg L^{-1} de $N-NH_3$ para el experimento sin alimento, mientras que para las concentraciones de 0.5 y 1.5×10^6 cél. mL^{-1} de *Chlorella vulgaris* se obtuvieron 0.946 ± 0.005 y 0.965 ± 0.0001 mg L^{-1} de $N-NH_3$ respectivamente. Se determinó que existe diferencia significativa entre estos valores por lo que la adición de las microalgas disminuye el efecto tóxico del amonio (ANDEVA, $P < 0.05$).

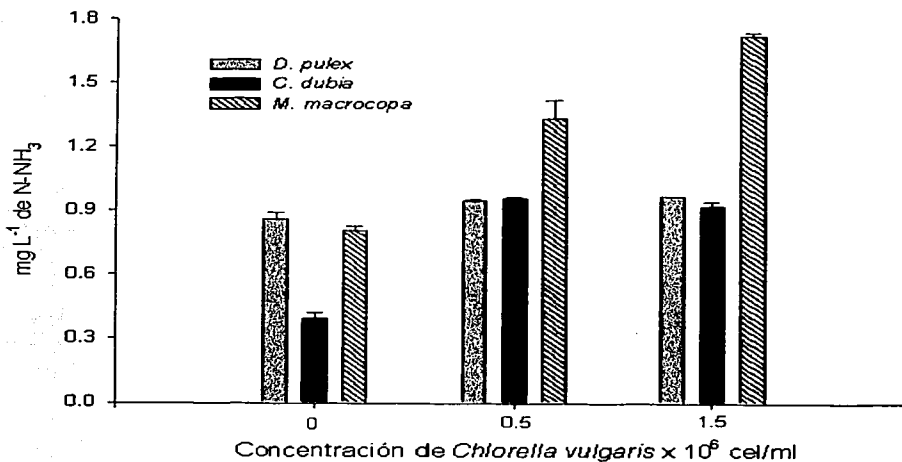
Moina macrocopa registró una concentración letal media de 0.808 ± 0.017 mg L^{-1} de $N-NH_3$ en el experimento sin alimento, 1.328 ± 0.09 a 0.5×10^6 cél. mL^{-1} y 1.714 ± 0.02 1.5×10^6 cél. mL^{-1} de microalgas, por lo que no solo la presencia, sino el incremento en las concentraciones de microalga tienen un efecto atenuante hacia la toxicidad del amonio para esta especie. Dicho efecto es estadísticamente significativo (ANDEVA, $P < 0.05$).

La representación gráfica de la concentración letal media que se obtuvo para cada especie en cada densidad de alimento puede observarse en la figura 1.

Discusión:

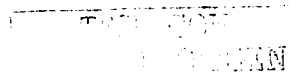
Se han reportado diferentes trabajos con relación a la toxicidad del amonio en relación a los cladóceros, de acuerdo a los trabajos de Andersen y Buckley (1998), La toxicidad aguda al amonio libre no ionizado de *Ceriodaphnia dubia* es de $1.73 \pm 0.19 \text{ mg L}^{-1} \text{ N-NH}_3$. Tomando en cuenta la CL_{50} obtenida para *C. dubia* en este experimento sin alimento fue de 0.395 ± 0.023 de NH_3 , Las Variaciones

Figura 1. Concentración letal media de N-NH_3 (24 h) para las tres especies de cladoceros de acuerdo a la densidad de alimento.



las variaciones en estos valores de CL_{50} están dadas por diversos factores como, el tipo de alimento utilizado, el origen de la cepa, la variabilidad genética de la misma entre otros factores (Martínez-Jerónimo, 1991). Respecto a en estos valores de la CL_{50} en la misma especie, Snell y Persoone (1989) determinaron una CL_{50} (24 h) para *Brachionus plicatilis* de 17.7 mg L^{-1} de N-NH_3 . Sin embargo Snell y colaboradores (1991) le dan a esta misma especie, bajo las mismas condiciones una CL_{50} (24 h) de 38 mg L^{-1} de N-NH_3 . Así mismo, McDonald *et al.*, (1995a) y Gulyas & Fleit (1990), determinaron la CL_{50} (48 h) para *D. magna* en valores de 0.08 y 0.12 mg L^{-1} de N-NH_3 , para agua con baja y alta alcalinidad respectivamente, mientras que la USEPA (1985) estableció rangos de 0.53 y 2.5 mg L^{-1} de N-NH_3 (48 h) para la misma especie en agua de baja y alta alcalinidad ("blanda y dura").

Con respecto a la disminución de la toxicidad del amonio debido al aumento de las concentraciones de alimento, se sabe que *Chlorella vulgaris* puede disminuir de forma significativa el efecto de concentraciones bajas del ácido 2-4 Diclorofenoxyacético en *Brachionus patulus* (Sarma *et al.*, 2001a), así como de Metil Parathion en *Brachionus patulus* y *Euchlanis dilatata* (Gama *et al.*, 1999; Sarma *et al.*, 2001b) debido a que el incremento en la densidad de alimento, disminuye el esfuerzo de ingestión y proporciona un estado nutricional más elevado el los individuos de prueba. Sin embargo, existen trabajos en los que el aumento de microalgas tiene un efecto de sinergismo en lugar de uno antagónico con respecto al uso de un tóxico en cuestión como lo es el caso de *Selenastrum capricornatum*, un alga verde utilizada como alimento para cladóceros en pruebas de toxicidad. Cuando esta alga se utiliza en conjunto con el plaguicida Organoclorinato de Endosulfan se observa que el metabolismo de *Daphnia carinata* se incrementa al aumentar la concentración de la microalga. Esto hace que la absorción del plaguicida aumente al adicionar una concentración



de microalga mayor, también Barry *et al.* (1995) encontraron que este plaguicida se mantiene más tiempo en suspensión a elevadas concentraciones de esta microalga.

En el presente estudio los resultados obtenidos para descartar la posibilidad de que la adición de microalgas este removiendo parte la concentración del tóxico (figuras 2 y 3, tabla 3), los resultados indican que no hay diferencia significativa entre las concentraciones iniciales con respecto a las finales ($P > 0.05$, tabla 4), lo que indica que *Chlorella vulgaris* no está retirando amonio en cantidades significativas, por lo que es posible que la resistencia al efecto tóxico del amonio por parte de los cladóceros esté dada por un mejor estado nutricional y/o un menor esfuerzo para alimentarse en los lotes con mayor densidad de microalga.

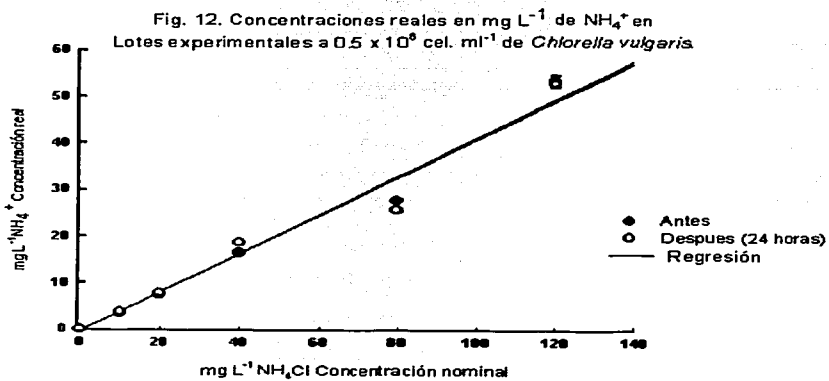
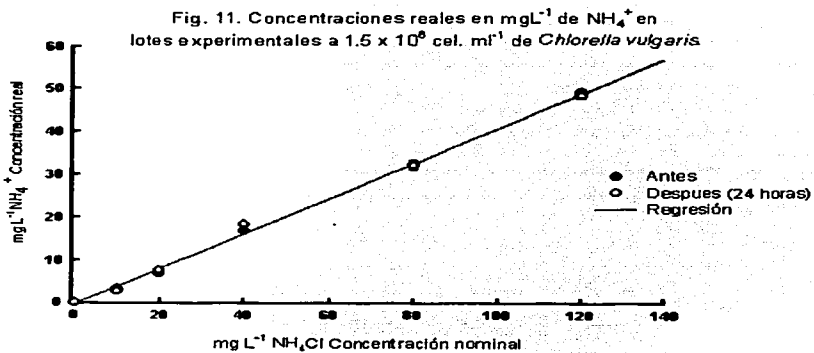


Tabla 3. Concentraciones reales y nominales de $N-NH_4^+$ (mgL^{-1}) por cada lote a las 0 y 24 horas

| 0 hrs | mgL^{-1} NH_4 nominal | NH_4 real | ES | 24 hrs | mgL^{-1} NH_4 nominal | NH_4 real | ES |
|---------------|------------------------------|-------------|-------|---------------|------------------------------|-------------|------|
| 1.5 Chlorella | 0 | 0 | 0 | 1.5 Chlorella | 0 | 0 | 0 |
| | 3.365 | 3.36 | 0.102 | | 3.365 | 2.68 | 0.1 |
| | 6.73 | 6.92 | 0.17 | | 6.73 | 7.44 | 0.21 |
| | 13.46 | 16.72 | 0.32 | | 13.46 | 18.36 | 0.2 |
| | 26.92 | 32.46 | 0.92 | | 26.92 | 32.22 | 1.01 |
| | 40.38 | 49.1 | 0.86 | | 40.38 | 48.44 | 0.65 |
| 0.5 Chlorella | 0 | 0 | 0 | 0.5 Chlorella | 0 | 0 | 0 |
| | 3.365 | 3.56 | 0.17 | | 3.365 | 3.78 | 0.09 |
| | 6.73 | 7.34 | 0.12 | | 6.73 | 7.48 | 0 |
| | 13.46 | 16.48 | 0.01 | | 13.46 | 18.72 | 0.53 |
| | 26.92 | 27.7 | 2.31 | | 26.92 | 25.72 | 0.33 |
| | 40.38 | 53.38 | 1.15 | | 40.38 | 52.8 | 0.67 |

ES = error estandar

Tabla 4. Análisis de varianza para entre las concentraciones de amonio real inicial y final (24 h).

ANOVA a 1.5×10^8 de *Chlorella*

| | sc | gl | pc | F | p |
|----------------------|-------|----|-------|-------|----------|
| Entre grupos | 1.169 | 1 | 1.169 | 0.293 | 0.600148 |
| Dentro de los grupos | 39.88 | 10 | 3.988 | | |

ANOVA 0.5×10^8 de *Chlorella*

| | sc | gl | pc | F | p |
|----------------------|--------|----|-------|-------|----------|
| Entre grupos | 1.565 | 1 | 1.565 | 0.329 | 0.578904 |
| Dentro de los grupos | 47.545 | 10 | 4.755 | | |

VII. PRUEBAS DE TOXICIDAD CRONICA:

7.1 CRECIMIENTO POBLACIONAL

7.1.1. MATERIALES Y MÉTODOS.

Las concentraciones del tóxico se establecieron tomando un valor cercano al obtenido en la CL_{50} dependiendo de la especie y el cual se considerará como la concentración más alta y a partir del cual se reducirá a la mitad para obtener la siguiente concentración y así sucesivamente, tomando en cuenta que la concentración mínima será de 0.035 mg L^{-1} de N-NH_3 . Para el caso de *Ceriodaphnia dubia* las concentraciones utilizadas fueron de 0 (testigo), 0.035 , 0.07 y 0.14 mg L^{-1} de N-NH_3 , mientras que para *Daphnia pulex* y *Moina macrocopa* fueron de 0 (testigo), 0.07 , 0.14 , 0.28 y 0.42 mg L^{-1} de N-NH_3 , debido a que los resultados obtenidos en la CL_{50} para estas especies fueron más altos. Cada lote se preparó con dos densidades de alimento (0.5 y $1.5 \times 10^6 \text{ cél. mL}^{-1}$ de *Chlorella vulgaris*). Se utilizaron vasos con 50 mL de medio en donde se colocaron 10 individuos en una mezcla del grupo por edades establecida de manera aleatoria, con tres réplicas por lote, todo esto para cada especie.

Los recipientes de prueba se mantuvieron en estantes con foto período con lámparas de luz fluorescente a $16:8$ horas luz:oscuridad. Después de cada período de 24 horas se estimó la densidad poblacional de los organismos por medio del conteo directo en todas las réplicas. En seguida de cada conteo se transfiriendo a todos los organismos vivos a recipientes en los que previamente se renovaron los medios con el alimento y la concentración de tóxico apropiados. De esta manera se continuó el proceso hasta que decrecieron las curvas de todos los lotes. A partir de ello se determinó la abundancia máxima y el día de abundancia máxima (Sarma & Nandini, 1999); y la tasa de incremento poblacional se determinó a partir de la formula:

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

donde t = tiempo en días.

N_0 = densidad de población inicial

N_t = densidad de población después del tiempo t (Krebs, 1985).

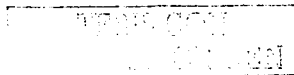
r = tasa de incremento poblacional (d^{-1}).

El registro de los datos se realiza en los días en que la curva de crecimiento presenta un incremento hasta alcanzar la abundancia máxima. Para el presente caso, el cálculo de la tasa de crecimiento equivale a calcular la pendiente de la curva de crecimiento graficada en escala logarítmica.

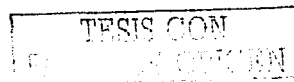
7.1.2. RESULTADOS.

Las curvas de crecimiento poblacional de *Ceriodaphnia dubia*, *M. macrocopa* y *D. pulex* en relación a diferentes concentraciones de amonio con 0.5×10^6 y 1.5×10^6 células mL^{-1} de *C. vulgaris* se presentan en la figura 4. Con respecto a las densidades de alimento, *M. macrocopa* muestra un incremento en la abundancia poblacional cuando aumentamos el nivel de *C. vulgaris*, mientras que *C. dubia* presenta una elevada abundancia poblacional con bajos niveles de alimento en el lote testigo ($= 0 \text{ mg } L^{-1}$) y con $0.035 \text{ mg } L^{-1}$ de concentración de $N-NH_3$. Un ligero incremento en las concentraciones de amonio causa una abundancia ligeramente superior en presencia de altas densidades de microalga.

La densidad máxima de población se ve claramente afectada por la densidad de alimento. Para *Moina macrocopa* (Fig. 5), al aumentar las densidades de *Chlorella* de 0.5 a 1.5×10^6 células. mL^{-1} se incrementa la densidad máxima en



el lote testigo de 4.7 ± 0.2 a 16.4 ± 1.2 ind. mL^{-1} , mientras que para *Ceriodaphnia dubia* ocurre el efecto contrario disminuyendo de 7.9 ± 0.6 a 5.0 ± 1.0 ind. mL^{-1} respectivamente. Con respecto a las concentraciones de amonio, *M. macrocopa* alcanzó una mayor abundancia numérica que la obtenida por *C. dubia*. El pico de las densidades de población de ambas especies de cladóceros fue significativamente afectado por la densidad de alimento, la concentración de amonio así como la interacción entre ellos ($p < 0.01$, ANDEVA).



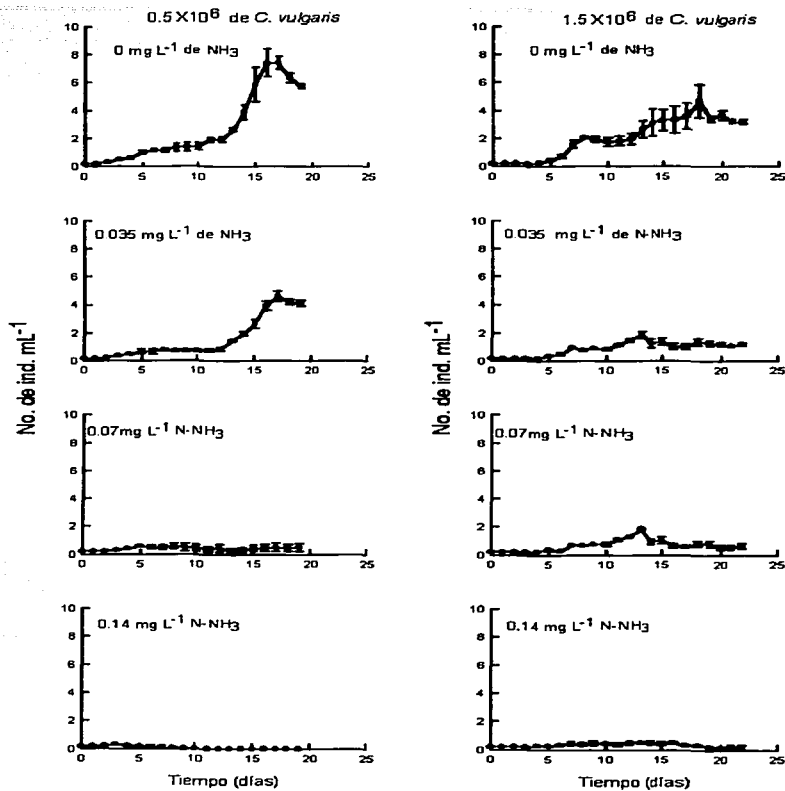


Figura 4. Crecimiento poblacional de *Ceriodaphnia dubia* a diferentes densidades de microalga.

TESIS CON
FALSA ORIGEN

Los datos de la tasa de incremento poblacional (r) de *C. dubia* y *M. macrocopa* con relación a las diferentes concentraciones de amonio con 0.5×10^6 y 1.5×10^6 células mL^{-1} de *Chlorella* se presentan en la figura 6. *M. macrocopa* en los lotes testigo presenta valores de r de $0.21 \pm 0.001 \text{ d}^{-1}$ y $0.25 \pm 0.02 \text{ d}^{-1}$ en 0.5 y 1.5×10^6 células mL^{-1} de *Chlorella*, respectivamente. Los valores correspondientes de *C. dubia* en lotes testigo fueron $0.21 \pm 0.004 \text{ d}^{-1}$ y $0.18 \pm 0.01 \text{ d}^{-1}$. El efecto de la concentración de amonio fue significativo ($p < 0.001$) afectando r para ambas especies de cladóceros. Sin embargo, el nivel de alimento tuvo efecto significativo únicamente en el caso de *M. macrocopa* mientras que la interacción entre el nivel de alimento y la concentración del toxicante fue significativa para *C. dubia* (Tabla 5).

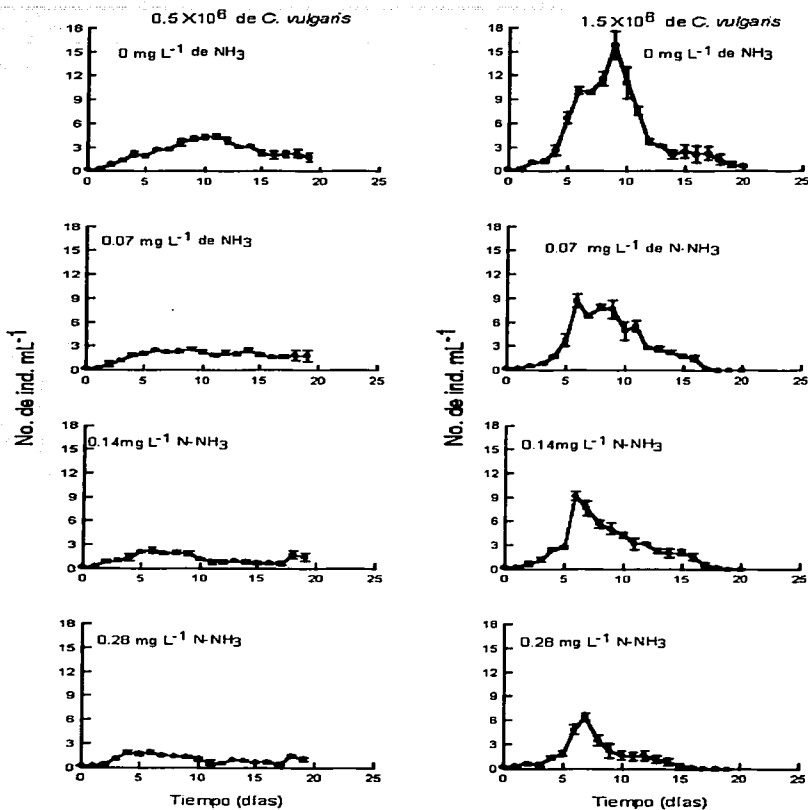


Figura 5. Crecimiento poblacional de *Moina macrocopa* a diferentes densidades de microalga.

IMPRESOS CON
MATERIAL DE ORIGEN

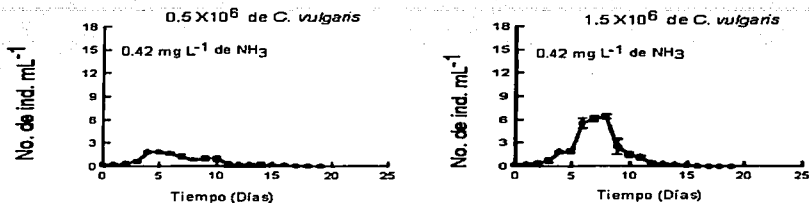


Figura 5 (cont). Crecimiento poblacional de *Moina macrocopa* a diferentes densidades de microalga.

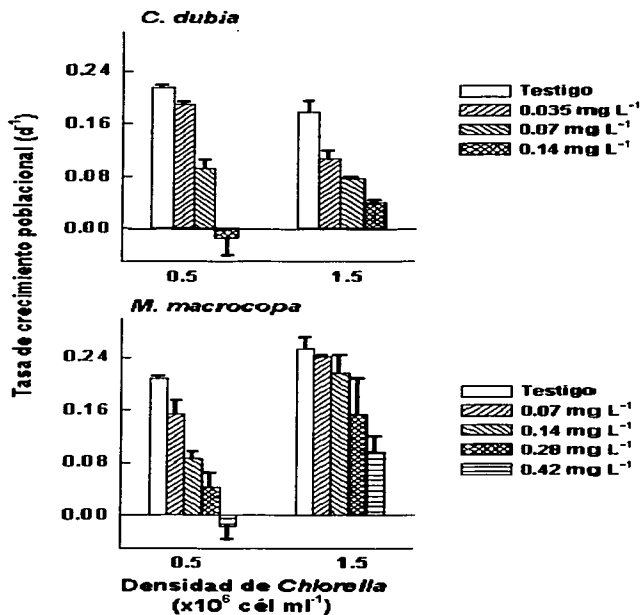
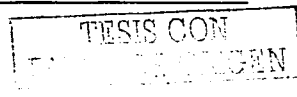


Fig. 6. Tasa de incremento poblacional para *C. dubia* y *M. macrocopa* a diferentes concentraciones de amonio y densidad de microalga.

En los resultados se aprecia que el lote testigo presentan la tendencia hacia un crecimiento poblacional más acelerado que el de todos los lotes experimentales. El lote testigo alcanza en el día 18 su mayor densidad promedio con 4.667 ind.mL⁻¹, mientras que en los lotes experimentales de 0.035 mg L⁻¹ de N-NH₃ se alcanza la mayor abundancia el día 13 con 1.83 ind.mL⁻¹. Para las concentraciones de 0.07 mg L⁻¹ de N-NH₃ y 0.14 mg L⁻¹ de N-NH₃ se determinó que las mayores abundancias ocurrieron para el día 13 con 1.873 y 0.533 ind.mL⁻¹ respectivamente.

Tabla 5. Resultados del análisis de varianza de dos vías (ANOVA) para la densidad poblacional máxima y la tasa de crecimiento poblacional de *C. dubia* y *M. macrocopa*. DF = grados de libertad; SS = suma de cuadrados; MS = media de los cuadrados; F = razón - F; * = p < 0.05; ** = p > 0.01; *** = p < 0.001; ns = no significativo (p > 0.05).

| Source | DF | SS | MS | F |
|--|----|--------|--------|-----------|
| <i>C. dubia</i> | | | | |
| Densidad poblacional máxima | | | | |
| Tóxico (A) | 3 | 125 | 41.72 | 67.16*** |
| Nivel de alimento (B) | 1 | 7.5 | 7.50 | 12.88** |
| Interacción A x B | 3 | 20.34 | 6.78 | 10.91*** |
| Error | 16 | 9.32 | 0.58 | |
| Tasa de crecimiento poblacional | | | | |
| Tóxico (A) | 3 | 0.114 | 0.04 | 64.11*** |
| Nivel de alimento (B) | 1 | 0.002 | 0.002 | 4.39 ns |
| Interacción A x B | 3 | 0.014 | 0.004 | 7.89** |
| Error | 16 | 0.009 | 0.0006 | |
| <i>M. macrocopa</i> | | | | |
| Densidad poblacional máxima | | | | |
| Tóxico (A) | 4 | 157.58 | 39.40 | 63.47*** |
| Nivel de alimento (B) | 1 | 351.58 | 351.6 | 566.40*** |
| Interacción A x B | 4 | 50.78 | 12.69 | 20.45*** |
| Error | 20 | 12.41 | 0.62 | |
| Tasa de crecimiento poblacional | | | | |
| Tóxico (A) | 4 | 0.109 | 0.03 | 15.80*** |
| Nivel de alimento (B) | 1 | 0.053 | 0.05 | 31.05*** |
| Interacción A x B | 4 | 0.004 | 0.001 | 0.58 ns |
| Error | 20 | 0.034 | 0.0017 | |



Para la concentración de 1.5×10^6 cél.mL⁻¹, se observa que el lote testigo presentan el mayor crecimiento con respecto al los lotes experimentales. El lote testigo alcanza en el día 17 su mayor densidad con 7.4 ind.mL⁻¹, mientras que los lotes experimentales de 0.035 mg L⁻¹ de N-NH₃ se alcanza la mayor abundancia el día 17 con 4.7 ind.mL⁻¹. Para las concentraciones de 0.07 mg L⁻¹ de N-NH₃ y 0.14 mg L⁻¹ de N-NH₃ se determinó que las mayores abundancias se presentaron para los días 4 y 5 con 0.59 y 0.21 ind.mL⁻¹ respectivamente.

Los datos del incremento poblacional de *Daphnia pulex* pueden verse en las figuras 7 y 8. Los niveles de cloruro de amonio y los incrementos de *Chlorella* de 0.5 y 1.5×10^6 cél.mL⁻¹ afectan notablemente el crecimiento poblacional. Un menor nivel de alimento y un incremento en la concentración del tóxico resulta en un decrecimiento de la población de *D. pulex* (figura 7). Al incrementar el nivel de alimento y disminuir la concentración de amonio, resulta en un aumento en la abundancia el rango de crecimiento fue estadísticamente significativo ($p < 0.001$).

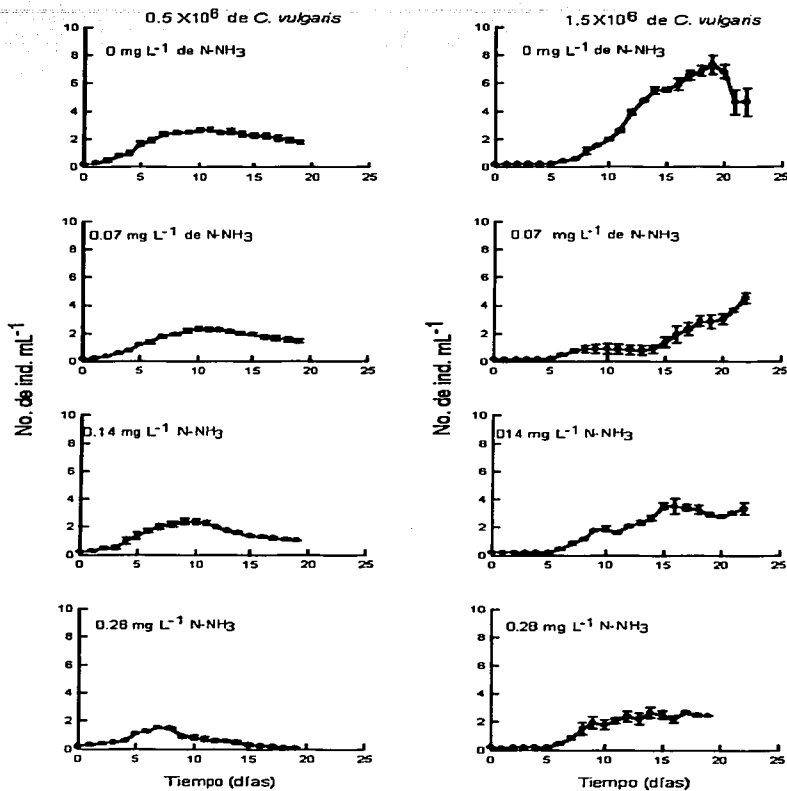


Figura 7. Crecimiento poblacional de *Daphnia pulex* a diferentes densidades de microalga.

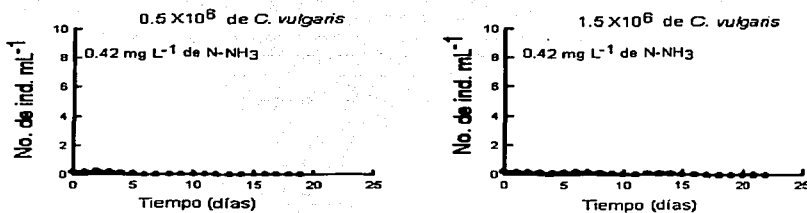


Figura 7 (cont.). Crecimiento poblacional de *Daphnia pulex* a diferentes densidades de microalga.

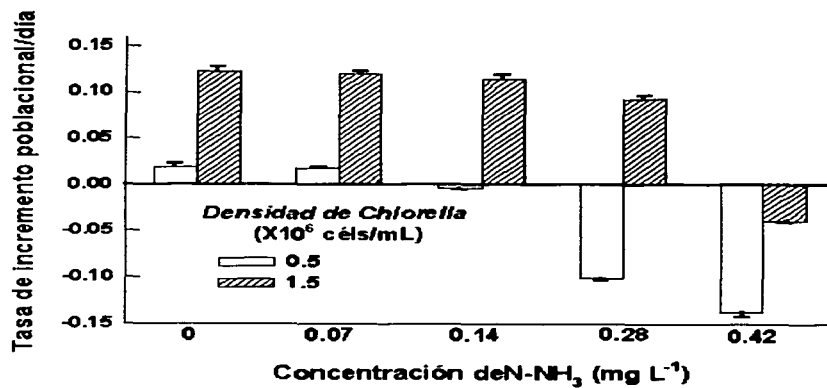


Figura 8. Tasa de incremento poblacional por día para *D. pulex* a diferentes concentraciones de amonio y densidades de microalga.

Discusión

El amonio existe en dos formas o estados, ionizado (NH_4^+) y no ionizado (NH_3). Existe un equilibrio entre las formas que varía dependiendo del pH y la temperatura del medio (Steffens, 1981). Para organismos acuáticos el amonio libre es múltiples veces más tóxico que el estado disuelto (Manning *et al.* 1996; Andersen & Buckley 1998). Sin embargo, esto dificulta detectar por separado el efecto de estas dos formas sobre el zooplancton y por lo tanto la interacción en una vía combinada- (Fontenot *et al.*, 1998). En el presente trabajo también, la concentración nominal de cloruro de amonio posiblemente tuvo efectos combinados de formas libre y disuelta sobre *C. dubia*, *D. pulex* y *M. macrocopa*. Datos publicados sobre la toxicidad aguda del amonio en animales acuáticos varía de múltiples formas dependiendo de los taxa y de las condiciones de prueba. Por ejemplo, Fontenot *et al.* (1998) encontró una LC_{50} de 96h en bioensayos de larvas de esturión fué aproximadamente de 150 mg L^{-1} , mientras que formas larvales de jaiba *Eriocheir sinensis* tuvieron LC_{50} de 24h valores que variaron de 33 a 90 mg L^{-1} (Zhao *et al.*, 1998). Aunque los datos la toxicidad aguda del amonio de cladóceros se encuentra disponible (Andersen & Buckley, 1998), la información basada en exposiciones crónicas es mucho más limitada (Mangas-Ramírez *et al.*, 2001).

Halbach *et al.* (1983) estuvo entre los primeros en abogar por el uso de la dinámica de poblaciones del zooplancton para comprender el efecto de los toxicantes más allá de los niveles individuales debido a sus implicaciones en el funcionamiento del ecosistema. En las especies de prueba, los picos de abundancia poblacional y la tasa de incremento poblacional son generalmente variables importantes a ser consideradas (Sarma *et al.*, 1999). Los datos sobre el pico de abundancia poblacional alcanzado por una población en relación a los niveles de comida y toxicante eventualmente serán utilizados para predecir la capacidad de carga. Puesto que los picos de las densidades de población se deriva independientemente del tiempo, estos no son fuertemente afectados por

las variaciones entre replicados considerando el tiempo requerido para alcanzar altas densidades. Además, dependiendo de los niveles de alimento, dos especies pueden tener tasas de crecimiento similar pero distintos picos de abundancia. Por ejemplo, los valores de r de *C. dubia* y *M. macrocopa* a 0.5×10^6 células mL^{-1} de *Chlorella* tienen casi el mismo, Pero los picos sobre la densidad de población varían mucho (figuras 4 y 5). Desde este punto de vista, los valores de los picos de densidad de población a veces son más importantes que la tasa de incremento poblacional. En el presente estudio, por ejemplo, el pico de densidad de población fue afectado fuertemente de manera negativa por el nivel de alimento, la concentración de amonio así como la interacción entre ellos, aunque este no es el caso para los valores de r (Figs. 6 y 8). Así mismo, para la obtención de datos en los picos de densidad de población, el crecimiento del zooplancton en los experimentos mostró ser continuo hasta que el decline de la tendencia fue visible, lo cual en ciertos casos puede llevarse diferentes tiempos. En el presente estudio, los picos de densidad de población alcanzados por *C. dubia*, *D. pulex* y *M. macrocopa* en lotes testigo estuvo dentro del rango reportado para cladóceros considerando el tamaño del cuerpo (Alva-Martínez *et al.* 2001).

La tasa de incremento poblacional ha recibido mucha atención de ecotoxicólogos porque es más sensible a cortos periodos y "sustituye variables" en donde la mortalidad es semejante (Forbes & Calow, 1999; Sarma *et al.* 2001). Se encontró una reducción en los valores de r cuando se incrementan los niveles de amonio. El presente estudio estuvo documentado por varias exposiciones crónicas de especies zooplanctónicas expuestas a diferentes toxicantes: rotíferos (Gama-Flores *et al.* 1999) y cladóceros (Roex *et al.* 2000). En general el zooplancton expuesto incrementó los valores de r al aumentar los niveles de alimento (Nandini & Sarma, 2000b), una tendencia también observada en *M. macrocopa* (Fig. 6). Así mismo, algunas especies de rotíferos y cladóceros están bien adaptadas a bajos niveles de alimento y en algunos casos el incremento en las densidades de algas puede causar una reducción en ambos picos de densidad de población y valores de r : Rotífera (*Brachionus variabilis* y *Lepadella patella*:



Sarma & Nandini 2001; Nandini & Sarma, 2001) y Cladocera (*Daphnia magna*: Martínez-Jerónimo y García-González, 1994; *Ceriodaphnia dubia*: Nandini & Sarma, 2000b). En lo referente a los efectos del tóxico y el toxicante, *M. macrocopa* tiene generalmente tasas de crecimiento más elevadas que muchas especies de cladóceros incluida *C. dubia*. Muchos cladóceros tienen valores de r que van de 0.1 a 0.5 (Nandini & Sarma, 2000b; Alva-Martínez *et al.* 2001) y nuestros datos presentan descenso dentro de este rango.

El papel de la densidad del alimento algal tiene influencia en la toxicidad de una sustancia sobre el zooplancton de agua dulce es de considerable interés, donde el punto de vista del cambio en las densidades del fitoplancton en cuerpos de agua naturales. Ha sido extensamente documentado el que las concentraciones del incremento algal reduce la toxicidad de herbicidas, plaguicidas, metales pesados y el amonio sobre el zooplancton (Barry *et al.* 1995). Varios mecanismos, incluyendo la destoxificación algal tienen propuestas sobre el papel positivo del alga en la reducción del efecto tóxico del amonio en cladóceros (Mangas-Ramírez *et al.* 2001). Por otra parte, cuando se incrementan los niveles de alimento algal en realidad aumenta la toxicidad de la sustancia sobre los cladóceros, Han sido propuestas como explicaciones alternativas semejantes la inhibición de la filtración, peculiaridades biológicas de los organismos de prueba o la naturaleza química del toxicante. (Martínez-Jerónimo y García-González, 1994; Barry *et al.* 1995). En el presente estudio un incremento en la densidad algal tuvo un papel positivo en la sobre vivencia de las poblaciones de *C. dubia*, *D. pulex* y *M. macrocopa*. Esto fue evidente únicamente cuando los niveles de amonio fueron altos (0.07 y 0.14 mg L⁻¹), cuando los cladóceros expuestos a bajos niveles de alimento no sobrevivieron más de una semana o tienen una tasa baja de crecimiento.

7.2. TABLA DE VIDA DEMOGRAFICA

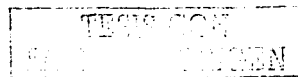
7.2.1. MATERIAL Y METODO.

Para realizar la tabla de vida (Sarma, 1996; Sarma & Nandini, 1999) fue necesario seguir una cohorte (grupos de individuos de la misma edad reclutados en una población al mismo tiempo) de individuos hasta su muerte. Este experimento se realizó tomando la decisión de los intervalos del tóxico con respecto a la concentración letal media que se determinada con anterioridad y por separado para cada especie.

El experimento se realizo utilizando dos densidades de alimento (0.5×10^6 y 1.5×10^6 cél. mL⁻¹ de *Chlorella vulgaris*) para cada especie de cladóceros. Así mismo se utilizaron 5 niveles de amonio para *Daphnia pulex* y *Moina macrocopa* (0 (testigo), 0.07, 0.14, 0.28 y 0.42 mg L⁻¹ de N-NH₃) y cuatro para *Ceriodaphnia dubia* (0 (testigo), 0.035, 0.07 y 0.14 mg L⁻¹ de N-NH₃) cada uno con tres replicados, contabilizando un total de 30 recipientes para *Daphnia pulex* y *Moina macrocopa* y 24 para *Ceriodaphnia dubia*.

Para realizar la prueba de toxicidad crónica, se separaron individuos neonatos de 24 horas de las especies en recipientes con 50 mL de medio colocando a diez individuos por recipiente. El conteo se realizó cada 24 horas determinando el número de adultos vivos y el número de neonatos producido para cada replicado. se contaron y eliminaron a los adultos muertos y a los neonatos producidos.

Después de cada conteo se renovaron los medios con el alimento y la concentración de tóxico apropiados transfiriendo a los adultos y se continuó el proceso hasta la muerte de cada individuo adulto de cada lote experimental.



El foto período fue de 16:8 horas luz-oscuridad a temperatura de $22 \pm 1.5^\circ \text{C}$ (Martínez-Jerónimo, *et al*, 1997).

Se obtuvieron las tablas de vida para cada especie a partir de la estimación de los siguientes parámetros (Krebs, 1985; Sarma, 1996; y Sarma & Nandini, 1999):

l_x = Proporción de sobrevivientes por unidad de tiempo.

Tasa reproductiva bruta:

$$R_0 = \sum_0^{\alpha} m_x$$

Donde m_x = Número de descendientes por unidad de tiempo por hembra.
 R_0 = Sumatoria del num. de descendientes por unidad de tiempo por hembra.

Tasa reproductiva neta:

$$R_0 = \sum_0^{\alpha} l_x m_x$$

R_0 = Sumatoria del num. de descendientes por unidad de tiempo por hembra sobreviviente en cada unidad de tiempo.

Esperanza de vida :

$$e_x = \frac{T_x}{n_x}$$

Donde T_x = Número de individuos por unidad de tiempo.

n_x = Número de sobrevivientes al comienzo del intervalo de la edad x .

e_x = esperanza o expectativa de vida en días. (d^{-1}).

Tiempo de generación (d^{-1}):

$$T = \frac{\sum l_x m_x x}{R_0}$$

Donde X = días

Tasa de incremento poblacional (Num. de individuos d^{-1})

$$\sum_{x=0}^n e^{-rx} l_x m_x = 1$$

Donde r = Índice de crecimiento poblacional d^{-1} .

Distribución de edad estable:

$$C_x = \frac{\lambda^{-x} l_x}{\sum_{i=0} \lambda^{-i} l_i}$$

Donde λ = Índice finito de crecimiento.

7.2.2. RESULTADOS TABLA DE VIDA DEMOGRÁFICA.

Ceriodaphnia dubia

El promedio de vida y la esperanza de vida para *Ceriodaphnia dubia* (Figs. 9 y 10) muestran un mayor tiempo de vida significativo ($P < 0.05$) de 15.6 ± 0.4 días en los tratamientos de 0.5×10^6 de *Chlorella vulgaris* en los lotes testigo. Se observó una disminución de estas variables al incrementar la concentración de amonio, sin embargo el aumento en las densidades de *C. vulgaris* a medida que se incrementa la concentración de amonio tiene efectos atenuantes sobre la toxicidad del mismo

debido a que tiende a aumentar el tiempo de vida comparado con el tratamiento con bajas densidades de microalga.

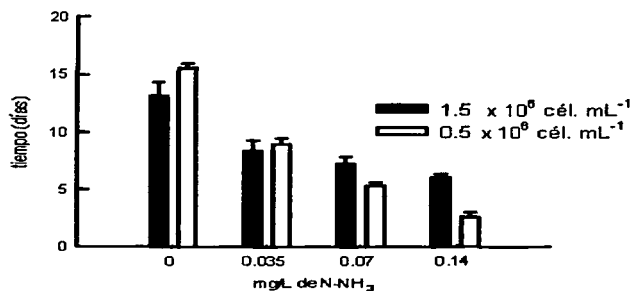


Fig. 9. Promedio de vida Para *C. dubia* a diferentes concentraciones de amonio y densidades de microalga

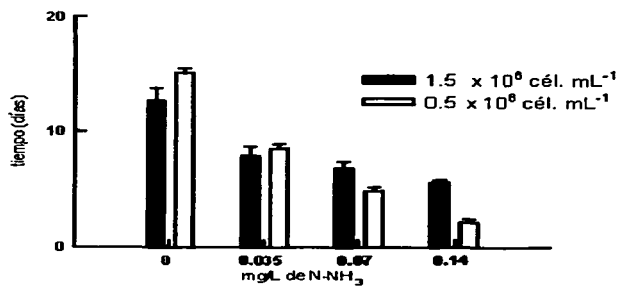


Fig. 10. Expectancia de vida para *C. dubia* a diferentes concentraciones de amonio y densidades de microalga

La tasa reproductiva bruta y neta para *C. dubia* (Figs. 11 y 12) mostró valores más altos a bajas densidades de microalga, lo que permite un mayor incremento poblacional en pruebas de crecimiento demográfico (figs. 4 y 5 pajs. 24 y 26), se observa de igual forma que un aumento ligero en las concentraciones de amonio promueve el incremento en la tasa reproductiva bruta lo que se refleja en un incremento poblacional. El efecto de la concentración del amonio, la densidad de la microalga, así como la interacción de ambos fue significativo. ($p < 0.01$).

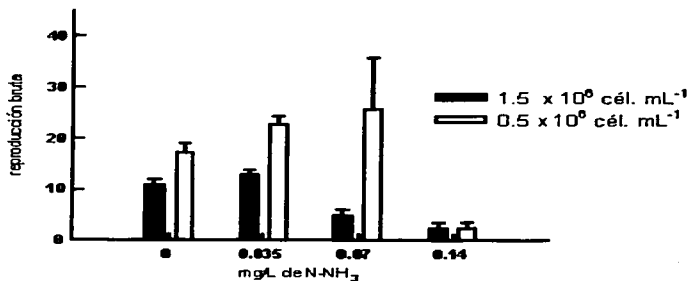


Fig. 11. Tasa reproductiva bruta de *C. dubia* a diferentes concentraciones de amonio y microalga.

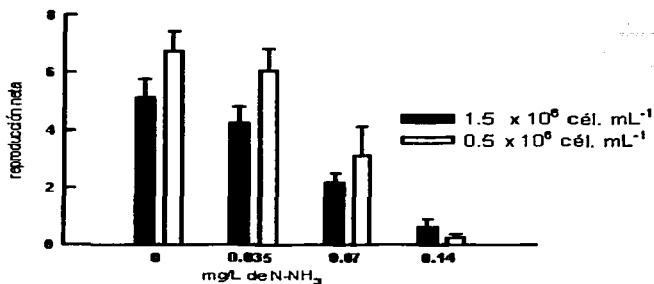


Fig. 12. Tasa reproductiva neta de *C. dubia* a diferentes concentraciones de amonio y densidades de microalga

El tiempo de generación para *C. dubia* (Fig. 13) mostró un efecto significativo del amonio a densidades altas de microalga ($p < 0.001$). sin embargo a bajas densidades de esta no se observo un claro efecto a concentraciones de 0.035 y 0.07 mg L⁻¹ de amonio.

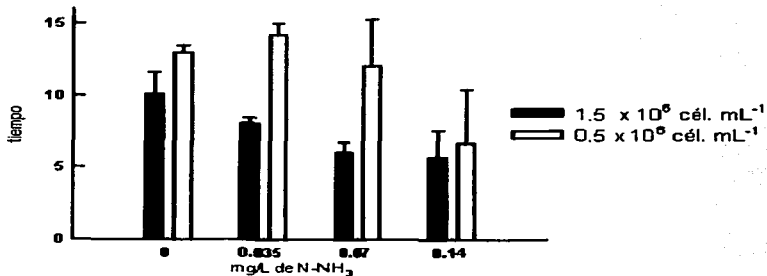


Fig. 13. Tiempo de generación de *C. dubia* a diferentes concentraciones de amonio y densidades de microalga

La tasa de crecimiento poblacional de *C. dubia* (Fig. 14) presentó una clara disminución significativa ($p < 0.01$), al incrementar las concentraciones de amonio, la densidad de alimento no tuvo un efecto significativo.

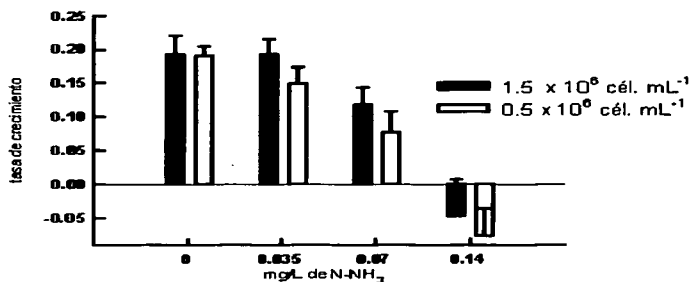


Fig. 14. Tasa de crecimiento poblacional de *C. dubia* a diferentes concentraciones de amonio y densidades de microalga

Moina macrocopa:

El promedio de vida de *M. macrocopa* (Fig. 15) mostró un claro decremento significativo ($p < 0.01$) al aumentar las concentraciones de amonio, para esta especie, la densidad de microalgas no tuvo efecto en esta variable

En la tasa reproductiva bruta de *M. macrocopa* el amonio solo tuvo efecto en la concentración más alta (0.42 mg L^{-1}) en el lote con densidades bajas de *C. vulgaris*, para el caso de los tratamientos con altas densidades de microalga el amonio no tuvo efecto significativo (Fig.16).

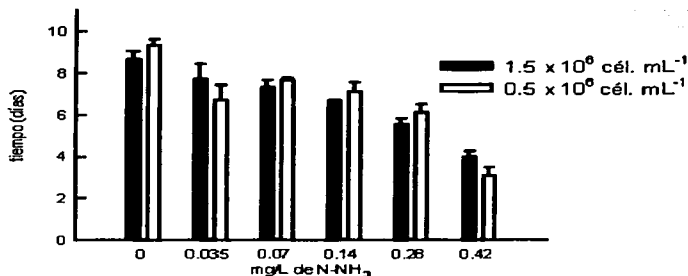


Fig. 15. Promedio de vida para *M. macrocopa* a diferentes concentraciones de amonio y densidades de microalga

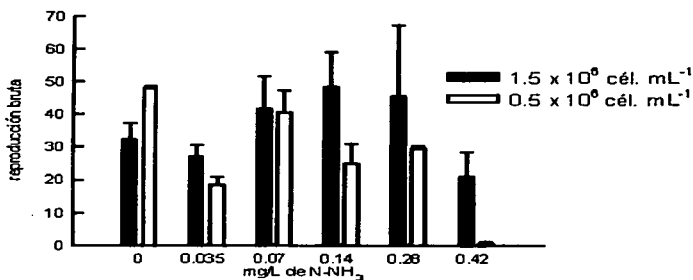


Fig. 16. Tasa reproductiva bruta para *M. macrocopa* a diferentes concentraciones de amonio y densidades de microalga

En la tasa reproductiva neta (Fig. 17) la densidad de alimento no tuvo efectos significativos sobre la toxicidad del amonio ni sobre la tasa reproductiva ya que ambos tratamientos presentaron comportamientos similares. En el caso de las

concentraciones de amonio, el aumento de estas tuvo un claro efecto sobre el número de neonatos por hembra ($p < 0.001$).

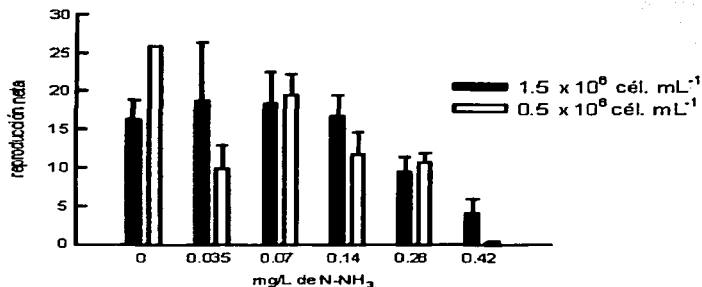


Fig. 17. Tasa reproductiva neta para *M. macrocopa* a diferentes concentraciones de amonio y densidades de microalga

El tiempo de generación tiene un comportamiento similar a la tasa reproductiva bruta en donde el amonio solo tuvo efecto en la concentración más alta (0.42 mg L⁻¹) en el lote con densidades bajas de *Chlorella vulgaris*. Para el caso de los tratamientos con altas densidades de microalga el amonio no tuvo efecto significativo (Fig. 18).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

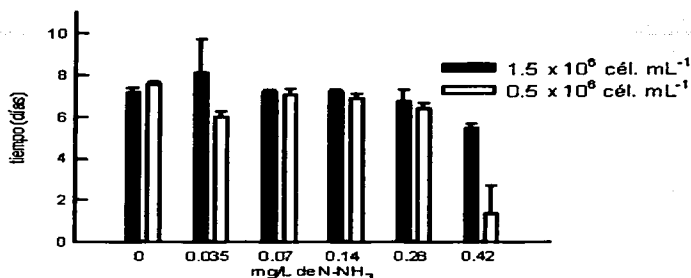


Fig. 18. Tiempo de generación para *M. macrocopa* a diferentes concentraciones de amonio y densidades de microalga

La tasa de crecimiento poblacional con altas densidades de microalgas fueron positivas en todas las concentraciones de amonio, no así en el caso de los tratamientos con bajas densidades de microalgas en donde la concentración de amonio más bajo tuvo valores negativos (-0.076) (Fig. 19).

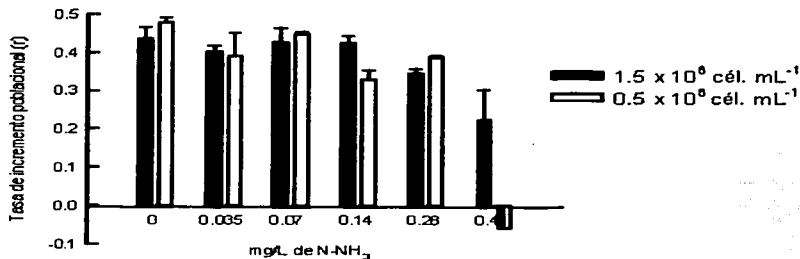


Fig. 19. Tasa de incremento poblacional (r) para *M. macrocopa* a diferentes concentraciones de amonio y densidades de microalga

Daphnia pulex:

El promedio de vida y la esperanza de vida de *D. pulex* disminuyen al incrementar las concentraciones de amonio, ($p < 0.001$). Puede observarse que la densidad de alimento no tuvo efectos significativos (Figs. 20 y 21).

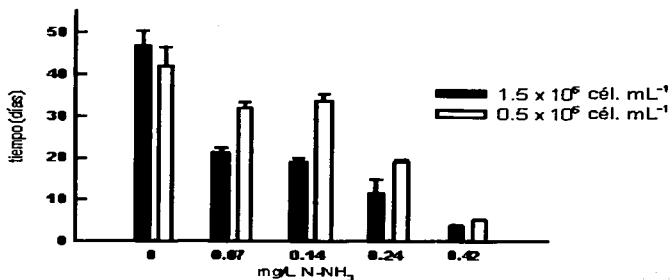


Fig. 20. Promedio de vida para *D. pulex* a diferentes concentraciones de amonio y densidades de microalga.

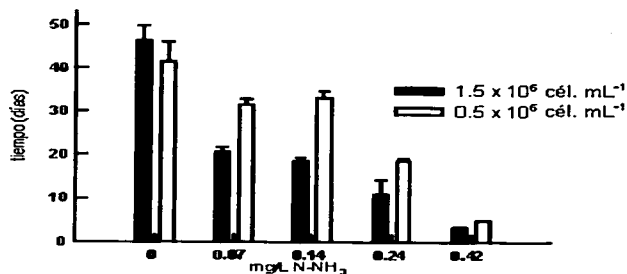


Fig. 21. Expectancia de vida para *D. pulex* a diferentes concentraciones de amonio y densidades de microalga.

La tasa reproductiva bruta y neta de *D. pulex* (Figs. 22 y 23) mostraron decrementos a elevadas concentraciones de amonio. Una mayor densidad de alimento eleva la tasa reproductiva bruta a bajas concentraciones de amonio:

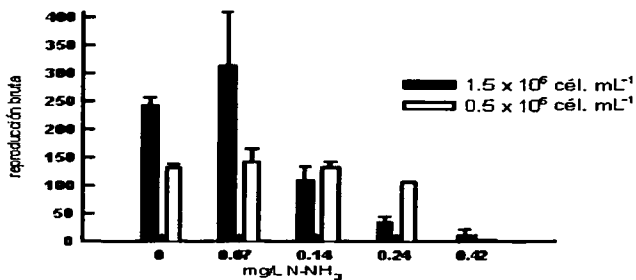


Fig. 22. Tasa reproductiva bruta de *D. pulex* a diferentes concentraciones de amonio y microalga.

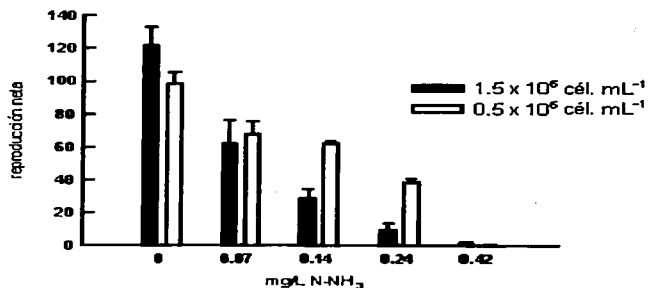


Fig. 23. Tasa reproductiva neta de *D. pulex* a diferentes concentraciones de amonio y densidades de microalga.

El tiempo de generación (Fig. 24) y la tasa de crecimiento poblacional (Fig. 25) disminuyen al incrementar el amonio en los recipientes de prueba ($p < 0.001$), la densidad de alimento no tuvo efectos significativos.

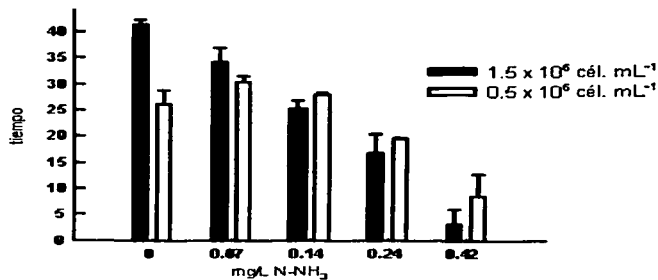


Fig. 24. Tiempo de generación de *D. pullex* a diferentes concentraciones de amonio y densidades de microalga.

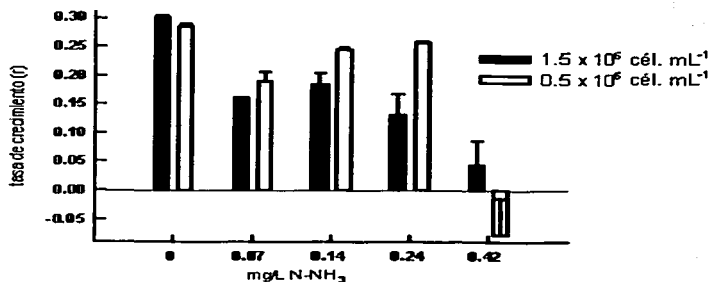


Fig. 25. Tasa de crecimiento poblacional de *D. pullex* a diferentes concentraciones de amonio y densidades de microalga.

Discusión

Entre las variables de la historia de vida de los cladóceros, los parámetros que relatan la sobrevivencia son usualmente poco sensibles a los cambios en la densidad de alimento, (Nandini & Sarma, 2000), aunque algunas variables reproductivas han sido más vulnerables en trabajos particulares (Feniova, 1983). El efecto de la densidad del alimento sobre las características de la historia de vida de los cladóceros difiere mucho dependiendo de algunos factores, por ejemplo, algunas especies se adaptan bien a elevadas densidades de alimento cuando aumenta la supervivencia y el crecimiento poblacional se incrementa con los niveles del alga. (Muro-Cruz, *et al.* 2002). Además al eliminar diariamente a los neonatos producidos en los recipientes de prueba se descarta la competencia intra específica. Las variables de la historia de vida de los cladóceros de los lotes testigo en el presente estudio se encuentran dentro del rango reportado para otros cladóceros (Gliwicz, 1990; Nandini & Sarma, 2000; Nandini, 2000 y Muro-Cruz, *et al.*, 2002).

Se encontró una reducción en los valores de r cuando se incrementan los niveles de amonio. Al parecer la densidad de alimento no tiene influencia en los lotes de baja a media concentración de amonio, El presente estudio estuvo documentado por varias exposiciones crónicas de especies zooplanctónicas expuestas a diferentes toxicantes: rotíferos (Gama-Flores *et al.* 1999) y cladóceros (Roëx *et al.* 2000). En general el zooplancton expuesto incrementó los valores de r al aumentar los niveles de alimento (Nandini & Sarma, 2000b), en este caso, la densidad de alimento solo tuvo una influencia directa cuando se tuvieron concentraciones muy altas de amonio.

Moina macrocopa tiene tasas de crecimiento más elevadas que muchas especies de cladóceros incluida *C. dubia*. Muchos cladóceros tienen valores de r que van de 0.1 a 0.5 (Nandini & Sarma, 2000b; Alva-Martínez *et al.* 2001) y nuestros datos presentan perfecta concordancia dentro de este rango.

7.3. COMPETENCIA.

7.3.1 Material y Método.

Se realizó un experimento de crecimiento poblacional en condiciones de competencia. Este tuvo una densidad de alimento intermedio entre todos los experimentos anteriores (1×10^6 cél. mL⁻¹ de *C. vulgaris*). Se utilizaron 3 concentraciones de amonio para todas las combinaciones de cladóceros (0 (testigo), 0.087 y 0.35 mgL⁻¹ N-NH₃) las cuales se seleccionaron por ser aproximadas a la densidad más baja y mas alta del toxico utilizado en las pruebas de toxicidad crónicas descritas con anterioridad. Se organizaron tres combinaciones, en la primera las especies *Daphnia pulex*, *Ceriodaphnia dubia* y *Moina macrocopa* crecieron solas. En la segunda combinación se colocaron pares de especies para que se desarrollaran en el mismo recipiente. Las combinaciones fueron *D. pulex* vs *C. dubia*, *D. pulex* vs *M. macrocopa* y *M. macrocopa* vs *C. dubia*. En el tercer grupo se colocaron a las tres especies juntas para evaluar la interacción. Cada experimento contó con tres replicados para cada combinación así como para cada concentración de N-NH₃ contabilizando un total de 63 recipientes para todas las combinaciones.

Para realizar la prueba, se separaron individuos de diferentes edades de *Daphnia pulex* *Moina macrocopa* y *Ceriodaphnia dubia* en recipientes con 50 ml. de medio colocando a diez individuos por recipiente en los lotes donde las especies se desarrollaron solas y 5 individuos de cada especie en los lotes donde se efectuaron las combinaciones. El conteo se realizó cada 24 horas determinando el número de individuos vivos.

Después de cada conteo se renovaron los medios con el alimento y la concentración de tóxico apropiados transfiriendo a los especímenes y se continuó el proceso hasta el término de 30 días.

7.3.1. Resultados.

Los datos sobre crecimiento poblacional de *Ceriodaphnia dubia* sola y en competencia con *Daphnia pulex* y *Moina macrocopa* a diferentes concentraciones de amonio se presentan en la figura 23. En relación a la presencia o ausencia de especies competidoras, *C. dubia* presentó un pequeño crecimiento poblacional a 0.35 mg L^{-1} de amonio. A 0.087 mg L^{-1} de amonio, *C. dubia* mostró un incremento poblacional aunque sus valores fueron mucho más bajos que en el lote testigo. En presencia de otras especies de cladóceros, el crecimiento poblacional se redujo. De este modo, cuando *C. dubia* se encuentra en competencia con *D. pulex* y *M. macrocopa*, su crecimiento poblacional se ve fuertemente afectado de manera negativa. La densidad máxima de *C. dubia* fue de 9 ind. mL^{-1} en el lote testigo, mientras que bajo una concentración de 0.35 mg L^{-1} de amonio disminuyó a 0.5 ind. mL^{-1} (Fig. 26).

En presencia de *Daphnia pulex*, y bajo 0.35 mg L^{-1} de amonio, *C. dubia* tuvo la menor densidad de población. La tasa de incremento poblacional, (promedio \pm error estándar) de *C. dubia* presentó variaciones de -0.12 ± 0.001 a 30 ± 0.01 por día dependiendo de la concentración de amonio y de la presencia de especies competidoras, (Fig. 27). Estadísticamente, la concentración de amonio y la presencia de especies competidoras tuvieron un efecto significativo sobre la máxima densidad de población y la tasa de incremento poblacional ($p < 0.01$, ANOVA). La interacción de la concentración de amonio y la competencia fue muy significativa ($p < 0.001$).

Las tendencias en el crecimiento poblacional de *D. pulex* en los testigos y bajo diferentes niveles de amonio, con y sin la presencia de especies competidoras se observan en la figura 24. En general, con respecto a la presencia de especies competidoras, *D. pulex* fue capaz de crecer en concentraciones de amonio de 0.087 mg L^{-1} de forma comparable con los

testigos. Mientras que a 0.35 mg L^{-1} de amonio, la población declinó y más rápidamente

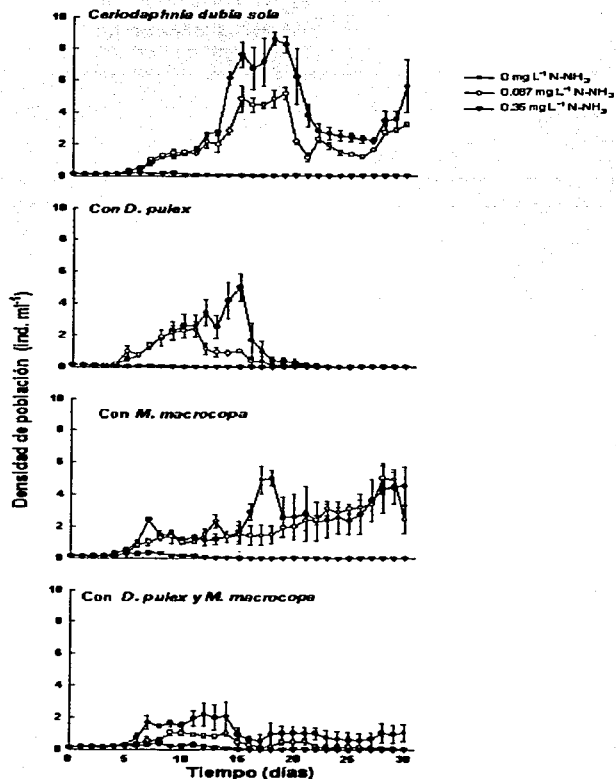


Fig. 23. Crecimiento de *Ceriodaphnia dubia* en competencia con otros cladóceros a diferentes concentraciones de amonio.

cuando se encontró en competencia con *C. dubia* y *M. macrocopa*. El pico de densidad máxima de *D. pulex* varió de 3 a 1 ind. ml⁻¹ dependiendo de la concentración de amonio y de la presencia de cladóceros competidores. La tasa de incremento poblacional por día varió entre 0.04 ± 0.001 y 0.22 ± 0.002 (Figs. 28 y 29). La concentración de amonio y la presencia de otras especies de cladóceros tuvieron un efecto significativo sobre el pico máximo y la tasa de incremento poblacional. La interacción de la concentración del toxicante y la competencia fueron significativas.

El crecimiento poblacional de *Moina macrocopa* en relación a los niveles de amonio y la competencia con otras dos especies de cladóceros se observan en la figura 24. En general, *M. macrocopa* presentó decrecimiento poblacional cuando se incrementa la concentración de amonio en el medio. Esta tendencia se aceleró con la presencia de especies competidoras. *M. macrocopa* se benefició con la presencia de *D. pulex* a una concentración de amonio de 0 y 0.087 mgL^{-1} en el medio. El tiempo requerido para el pico máximo de población de *M. macrocopa* fue más corto en presencia de *D. pulex* (10 días). La máxima densidad de población registrada fue de varió de 7 a 8 ind. ml⁻¹, dependiendo de la concentración de amonio y la presencia de *C. dubia* y/o *D. pulex* (Fig.30 y 31). La tasa de incremento poblacional por día varió de 0.201 ± 0.028 a 0.235 ± 0.019 dependiendo de la concentración de amonio en el medio.

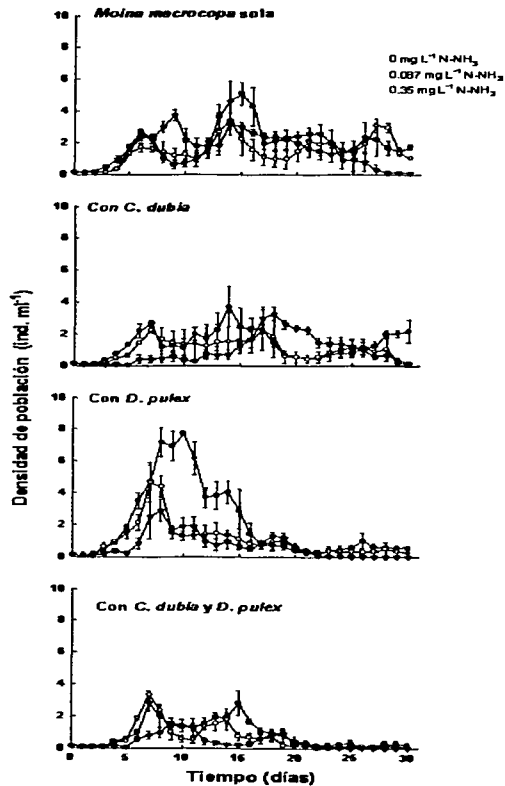


Fig. 24. Crecimiento de *Moina macrocopa* en competencia con otros cladóceros a diferentes concentraciones de amonio.

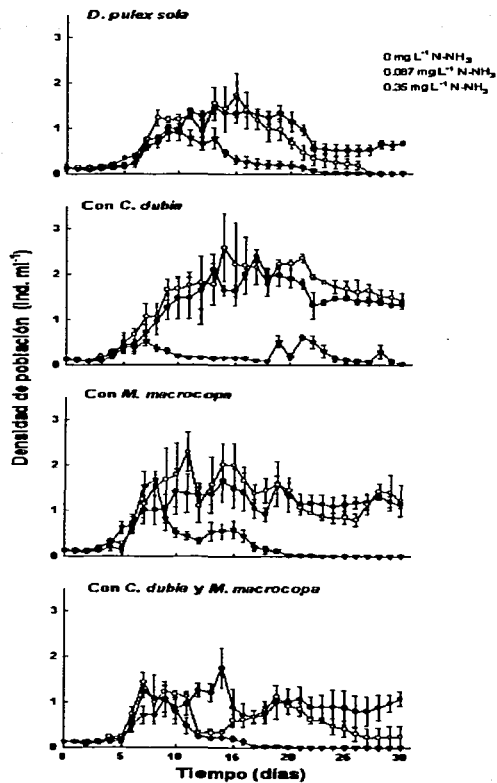


Fig. 25. Crecimiento de *Daphnia pulex* en competencia con otros cladóceros a diferentes concentraciones de amonio.

Discusión:

La ocurrencia de más de 3 especies de cladóceros al mismo tiempo en el plancton de agua dulce en sistemas subtropicales y tropicales no es común (Dumont, 1994). La existencia de la competencia entre cladóceros esta bien documentada, la mayor parte de las referencias usan solo dos taxa a un tiempo bajo condiciones de laboratorio (e.g., Matveev & Gabriel, 1994). De esta manera el posible resultado de la competencia cuando ocurre simultáneamente con mas de dos especies, es una conjetura.

En el presente trabajo, analizamos el resultado de la competencia utilizando tres especies de cladóceros en combinaciones diferentes. Así, con respecto a la concentración de amonio, la densidad de población y la tasa de crecimiento de cada especie de cladóceros fue afectada por la presencia de otro taxa. Se conoce que el resultado de la competencia en el zooplancton depende de diversos factores como la temperatura, la salinidad, la concentración de alimento y la tasa de incremento poblacional de las especies competidoras (Lampert & Sommer, 1997). Algunos toxicos modifican el resultado de competencia. Por ejemplo Hanazato & Yasuno (1990) indican que depende de la sensibilidad de las especies competidoras al insecticida carbaryl, *Bosmina fatalis* predomino sobre otras especies de *Daphnia* en pruebas experimentales.

El uso de de niveles de amonio en el presente estudio representa una variable natural que ocurre en todos los cuerpos de agua en algunos meses del año (Hutchinson, 1967). Aunque el efecto de la toxicidad del amonio es conocido en diversos taxa de cladóceros como *Ceriodaphnia* (Andersen & Buckley, 1998) y *Daphnia* (Adamsson *et al.* 1998), el impacto de la presión competitiva entre el zooplancton fue escasamente considerado. Para el presente estudio, es evidente que *C. dubia* fue fuertemente afectada por la presencia de *D. Pulex* y *M. macrocopa* independientemente del nivel de amonio en el medio.



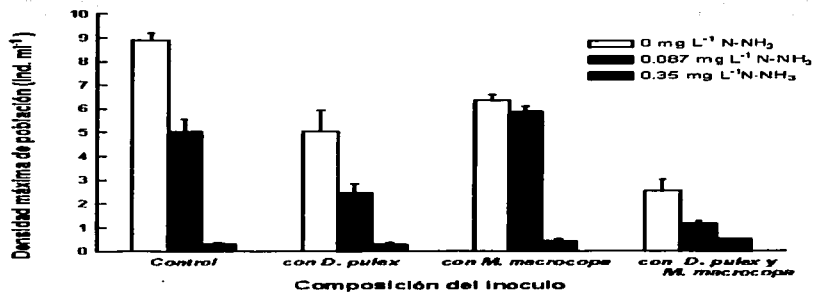


Fig. 26. Comparación entre la densidad máxima de población de *Ceriodaphnia dubia* en competencia con otros cladóceros a diferentes concentraciones de N-NH₃.

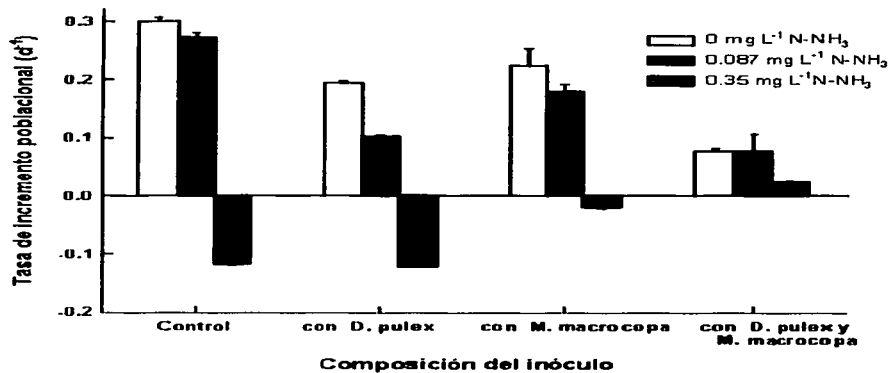


Fig. 27. tasa de incremento poblacional de *Ceriodaphnia dubia* en competencia con otros cladóceros a diferentes concentraciones de cloruro de amonio

C. dubia en los recipientes sin competidor, pudo crecer con concentración de amonio de 0.087 mg L^{-1} , pero en presencia de *D. pulex* o *M. macrocopa*, el crecimiento fue mucho menor.

La máxima densidad de población alcanzada por cada una de las especies observada en el presente estudio esta en general de acuerdo al rango

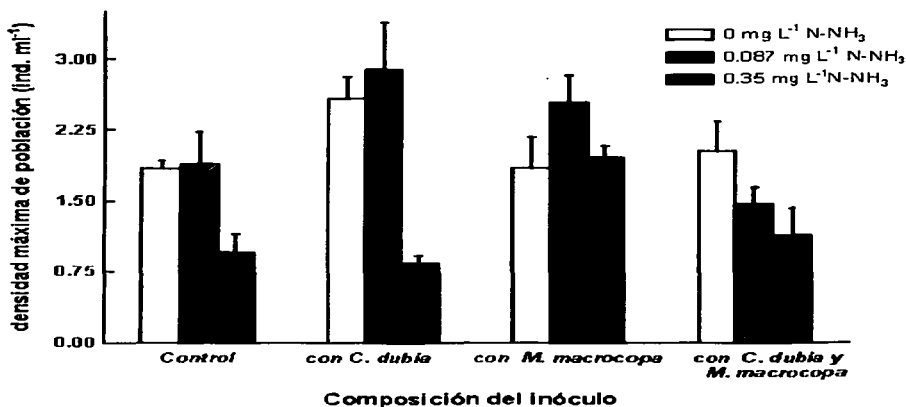


Fig. 28. Comparación entre la densidad máxima de población de *Daphnia pulex* en competencia con otros cladóceros a diferentes concentraciones de amonio.

documentado para cladóceros (Alva-Martínez *et al.*, 2001). De las tres especies utilizadas aquí, *D. pulex* es la de mayor tamaño (longitud corporal = $2413 \pm 129 \mu\text{m}$) mientras que *C. dubia* es la más pequeña ($951 \pm 57 \mu\text{m}$) y *M. macrocopa* es de un tamaño intermedio. ($1286 \pm 49 \mu\text{m}$) (Alva-Martínez *et al.*, 2001). Bajo una densidad de alimento específica, las especies de cladóceros con tamaño corporal pequeño alcanzan una elevada abundancia numérica que las especies de tallas grandes (Downing & Rigler, 1984). Esto es evidente también en el presente estudio, cuando en los lotes testigo *D. pulex* alcanzó un pico en la

densidad máxima de población de 3 ind. ml^{-1} mientras que *M. macrocopa* alcanzó más del doble de esa densidad. La tasa de incremento poblacional en relación a las especies de cladóceros fue consistente con los datos disponibles en la literatura donde muchas especies en general tienen valores de r inferiores a 0.2 por día (Nandini & Sarma, 2000). En nuestros datos se observa una baja dentro de este rango. *Moina* usualmente tiene valores de r superiores a muchos otros cladóceros (Kilham *et al.*, 1997; Nandini & Rao, 1998). En el presente estudio, *Moina macrocopa* tiene la mayor tasa de crecimiento

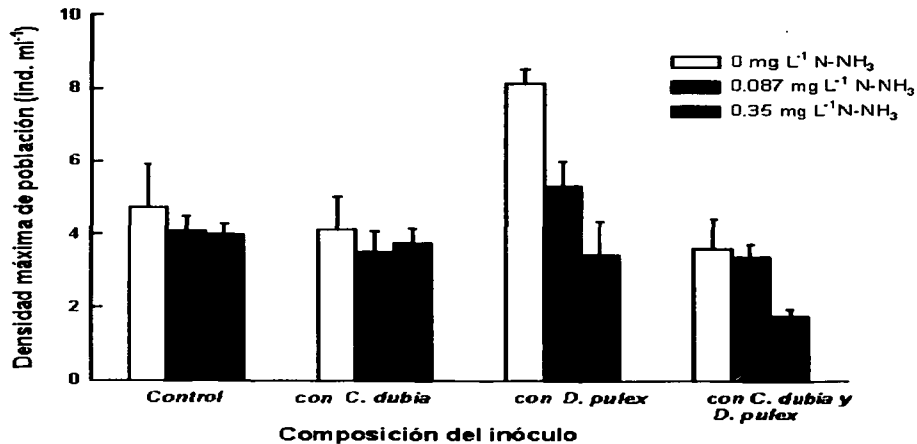


Fig. 30. Comparación entre la densidad máxima de *Moina macrocopa* en competencia con otros cladóceros a diferentes concentraciones de amoníaco.

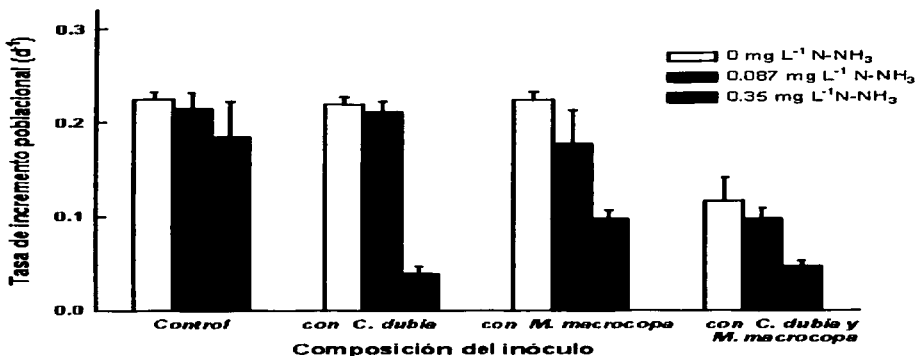


Fig. 29. Tasa de incremento poblacional de *Daphnia pulex* en competencia con otros cladóceros a diferentes concentraciones de amonio.

Los datos sobre el crecimiento poblacional de *Ceriodaphnia dubia* sola y en competencia con *D. pulex* y *M. macrocopa* a diferentes concentraciones de amonio se presentan en la figura 23. Independientemente de la presencia o ausencia de especies competidoras, *C. dubia* presentó un pequeño crecimiento a 100 mg L⁻¹ de amonio. *C. dubia* tuvo incremento su crecimiento poblacional cuando el amonio tuvo concentraciones de amonio más así como en el testigo. En presencia de otras especies de cladóceros el crecimiento poblacional fue duramente afectado de forma negativa reduciéndolo. El pico de máxima densidad de población fue de 9 ind. ml⁻¹ (fig. 12). En presencia de *D. pulex* y con 0.35 mg L⁻¹ de N-NH₃.

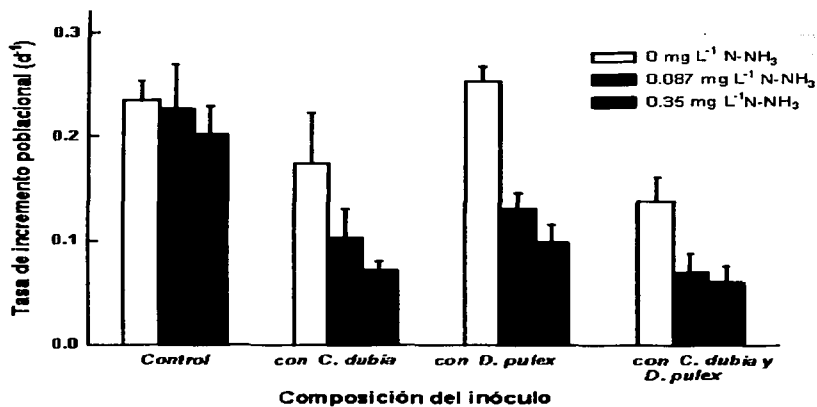


Fig. 31. Tasa de incremento poblacional de *Moina macrocopa* en competencia con otros cladóceros a diferentes concentraciones de amonio.

CONCLUSIONES FINALES:

Se determinó en las pruebas de toxicidad aguda que la especie más sensible al amonio fue *Ceriodaphnia dubia* quien presentó una CL_{50} de 0.395 ± 0.023 mg L^{-1} de $N-NH_3$, mientras que *Daphnia pulex* mostró mayor resistencia con una CL_{50} de 0.861 ± 0.029 mg L^{-1} de $N-NH_3$ seguida de *Moina macrocopa* una CL_{50} de 0.808 ± 0.017 mg L^{-1} de $N-NH_3$.

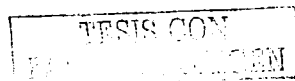
Las pruebas indicaron que en los vasos experimentales la disminución de la amonio debido a la presencia de algas no fue significativa.

Los resultados demostraron que El efecto tóxico del amonio fue reducido por el incremento en la densidad del alimento algal en los bioensayos de toxicidad aguda y crónica.

En el bioensayo demográfico los niveles de amonio estuvieron tan bajos como 1 % de LC_{50} lo que significa que tienen un efecto negativo sobre el crecimiento poblacional de *C. dubia*, *D. pulex* y *M. macrocopa*.

Aquellas especies de cladóceros sensibles a la concentración del amonio fueron eliminadas de la competencia por otras taxa menos sensibles cuando fueron expuestas a 0.087 o 0.35 mg L^{-1} de amonio. Durante la competencia las especies de zooplancton incluidas dentro de la prueba causaron la supresión de una o mas especies competidoras, la presencia del amonio expedito estos procesos en base a la sensibilidad relativa de los cladóceros

Dentro de las observaciones que se determinaron en campo en el embalse Manuel A. Camacho en el estado de Puebla sobre el comportamiento global de los diferentes taxa, se encontró que un incremento de amonio en el sistema



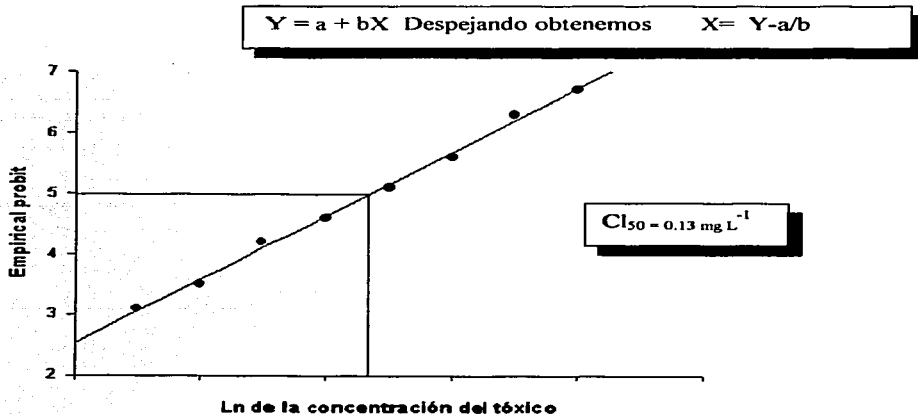
donde coexisten las tres especies de cladóceros referidas en el presente trabajo favorece el desplazamiento de *Ceriodaphnia dubia* por *Moina macrocopa* sin afectar a *Daphnia pulex*.

Los resultados obtenidos en el presente estudio demuestran una mayor susceptibilidad de *Ceriodaphnia dubia* a los efectos tóxicos del amonio que los mostrados por las otras especies de cladóceros. Así mismo, el aumento en la biomasa del fitoplancton y la interacción entre las tres especies en presencia del tóxico, evidentemente favorece a *Moina macrocopa* sobre *Ceriodaphnia dubia* afectando poco el desarrollo de *Daphnia pulex*, lo cual nos da una idea proximal de los eventos que sucedieron en el embalse Manuel Ávila Camacho que dieron origen a las variaciones poblacionales de estas tres especies de crustáceos para ese periodo de estudio particular.

APÉNDICE 1.**Método Empírico Probit Para determinar la CL_{50} .**

El método consiste en realizar una regresión lineal en donde el valor de X esta dado por el logaritmo natural de las concentraciones del tóxico utilizado mientras que en el eje Y se coloca el índice de probabilidad empírica al porcentaje de mortalidad obtenido para cada concentración del toxico. Debido a que el valor de probabilidad empírica al 50 % de mortalidad es igual a cinco, al obtener los datos de la regresión lineal (a , b y r^2) obtengo el valor incógnito de X (logaritmo natural de la concentración del tóxico) a una mortalidad del 50 %. Posteriormente se aplica el antilogaritmo a este valor y se obtiene la concentración letal media en $mg L^{-1}$ del tóxico en cuestión.

en una gráfica la CL_{50} se observa en el empalme con el valor de $Y = 5$.



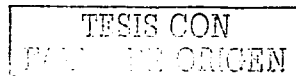
APÉNDICE 2.

A continuación se indica la información derivada a partir del presente estudio de tesis doctoral presentada en congresos.

| Autor(es) | Título de la ponencia | Congreso (ciudad, fecha) | Tipo de participación |
|--|---|--|-----------------------|
| Mangas-Ramírez E. S.S.S. Sarma y S. Nandini. | Effect of ammonium chloride and algal food density <i>Chlorella vulgaris</i>) on the life table demography of the cladoceran <i>Moina macrocopa</i> | IV international meeting on plancton. Guadalajara Jal. 2000. | oral. |
| Mangas-Ramírez E. S.S.S. Sarma y S. Nandini | Efectos del amonio sobre la tabla de vida de el cladóceros <i>Daphnia pulex</i> leydig en relación al la densidad del alimento algal | V international meting on plancton. Xalapa Ver. 2002. | oral |
| Mangas-Ramírez E. S.S.S. Sarma y S. Nandini. | Estudio sobre los efectos de la concentración de cadmio y metil paration en la recuperación de <i>Moina macrocopa</i> (Cladocera) en crecimiento poblacional y tabla de vida. | International meting on plancton Varsovia. agosto de 2002. | cartel |

BIBLIOGRAFIA:

- Achenbach, L. & W. Lampert. 1997. Effects of elevated temperatures on threshold food concentrations and possible competitive abilities of differently sized cladoceran species. *Oikos* 79, 469-476.
- Adamsson, M., G. Dave, L. Forsberg & B. Guterstam. 1998. Toxicity identification evaluation of ammonia, nitrite and heavy metals at the stensund wastewater aquaculture plant, Sweden. *Water Sci. Technol.* 38, 151-157.
- Alva-Martínez A.F., S.S.S. Sarma & S. Nandini. 2001. Comparative population dynamics of three cladoceran species (Cladocera) in relation to different levels of *Chlorella vulgaris* and *Microcystis aeruginosa*. *Crustaceana* 74 (8): 749-764.
- Andersen, H.B. & J.A. Buckley. 1998. Acute toxicity of ammonia to *Ceriodaphnia dubia* and a procedure to improve testigo survival. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 61, 116-122.
- Anonymous. 1985. Methods of measuring the acute toxicity of effluents to freshwater and marine organisms. US Environment Protection Agency EPA/600/4-85/013
- Barry M.J., D.C. Logan, J.T. Ahokas & D.A. Holdway. 1995. Effect of algal food concentration on toxicity of two agricultural pesticides to *Daphnia carinata*. *Ecotoxicol. Environ. Safety.* 32: 273-279.
- Beklioglu, M. & B. Moss. 1996. Mesocosm experiments on the interaction of sediment influence, fish predation and aquatic plants with the structure of phytoplankton and zooplankton communities. *Freshwater Biology* 36: 315-325.



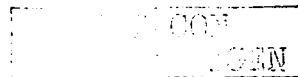
- Besser, J.M., C.G. Ingersoll, E.N. Leonard, & D.R. Mount. 1998. Effect of zeolite on toxicity of ammonia in freshwater sediments: Implications for toxicity identification evaluation procedures. *Environ. Toxicol. Chem.* 17 (11): 2310-2317.
- Borowitzka M.A., & L.J. Borowitzka. 1988. Micro-algal biotechnology. Cambridge University Press, London.
- Cairns, J. & J. R. Pratt. 1989. The scientific basis of bioassays. *Hydrobiologia*. 188/189: 5-20
- Cairns, J. Jr; B.R. Niederlehner, & J.R. Pratt. 1990. Evaluation of joint toxicity of chlorine and ammonia to aquatic communities. *Aquat. Toxicol.*, 16(2): 87-100.
- DeMott, W.R. 1989. The role of competition in zooplankton succession. In: Sommer, U. (Ed.), "Plankton ecology: Succession in plankton communities." Springer, New York, pp. 195-252.
- Dodson S. & D.G. Frey. 1991 Cladocera and other branchiopoda. In: JH Thorp & A. Covich (eds.) Ecology and classification of North American freshwater invertebrates. Academic Press. San Diego. pp: 732-776.
- Downing, J. A. & F. H. Rigler (eds.), 1984. A manual for the methods of assessment of secondary productivity in fresh waters. 2nd ed. IBP Handbook 17. Blackwell Scientific Publ. London. 501 pp.
- Dumont, H.J. 1994. On the diversity of the Cladocera in the tropics. *Hydrobiologia*, 272: 27-38.

- Elías-Gutiérrez M. 1994. Notas sobre los cladóceros de embalses de gran altitud en el Estado de México, México. *An. Esc. Nal. de Cienc. Biol. Mex.* 40: 1-17
- Elías-Gutiérrez M. 1996. Taxonomía y algunos aspectos ambientales de los grupos Ctenopoda y Anomopoda (antes Cladocera en parte) de la provincia Neovolcanense subprovincia meridional de la Republica Mexicana. Tesis de Doctorado. I.P.N. México.
- Finney D.J. 1971. Probit analysis. Cambridge University Press, 3rd edn, London.
- Flores-Tena, F. & M. Silva-Briano. 1995. A note on El Niágara, a polluted reservoir in Aguascalientes, México. *Hidrobiología.* 308: 235-241.
- Forbes V.E. & 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.
- Fontenot, Q.C., J.J. Isely & J.R. Tomasso. 1998. Acute toxicity of ammonia and nitrite to shortnose sturgeon fingerlings Prog. *Fish-Cult.* 60: 315-318.
- Gaete, H., y K. Paredes. 1996. Toxicidad de mezclas de contaminantes químicos sobre el cladóceros *Daphnia magna*. *Rev. Inter. Contam. Ambient.* 12 (1): 23-28.
- Gama-Flores J.L., S.S.S. Sarma & M.A.F. Araiza. 1999. Combined effects of *Chlorella* density and methyl parathion concentration on the population growth of *Brachionus calyciflorus* (Rotifera). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 62(6): 769-755

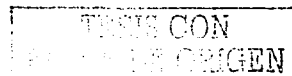
- García E. 1973. Modificaciones del sistema de clasificación climática de Köppen. 2da ed. Instituto de Geografía. UNAM. México.
- Gliwicz, Z.M. 1990. Food thresholds and body size in cladocerans. *Nature* 343: 638-640.
- Greenwood, T.L., J.D. Green, B.J. Hicks & M.A. Chapman. 1999. Seasonal abundance of small cladocerans in Lake Mangakaware, Waikato, New Zealand. *New Zealand J. Mar. Freshw. Res.* 33: 399-415.
- Gulyas, P. & E. Fleit. 1990. Evaluation of ammonia toxicity on *Daphnia magna* and some fish species. *Aquacult. Hung.* 6: 171-183.
- Gyore, K., J. Olah & G. Kovacs. 1982. Effect of various (unionized) ammonia (NH₃) concentrations on the respiration of *Daphnia magna* Strauss (Cladocera) species. *Aquacult. Hung.* 3: 69-75.
- Halbach, U., M. Siebert, M. Westermayer & C. Wissel, 1983. Population dynamics of rotifers as a bioassay tool for ecotoxicological tests in aquatic environments. *Ecotoxicol. Environ. Safety* 7: 484-513.
- Hanazato, T. 1998. Response of a zooplankton community to insecticide application in experimental ponds: a review and the implications of the effects of chemicals on the structure and functioning of freshwater communities. *Environ. Poll.* 101: 361-373.
- Hanazato, T. & M. Yasun. 1990.. Influence of time of application of an insecticide on recovery patterns of a zooplankton community in experimental ponds. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 19: 77-83.

- Hansen, A-M., F.O. Andersen & H.S. Jensen. 1997. Seasonal pattern in nutrient limitation and grazing testigo of the phytoplankton community in a non-stratified lake. *Freshwat. Biol.* 37: 523-534.
- Hargreaves J.A. 1998. Nitrogen biogeochemistry of aquaculture ponds. *Aquaculture* 166: 181-212.
- Ho, K.T., A. Kuhn, M.C. Pelletier, T.L. Hendricks & A. Helmstetter 1999. pH Dependent toxicity of five metals to three marine organisms. *Environ. Toxicol.* 14 (2): 235-240.
- Hurtado-Bocanegra, M.D., S. Nandini & S.S.S. Sarma. 2000. Competitive interactions between *Moina macrocopa* (Cladocera) and *Brachionus patulus* (Rotifera) Effect of the food concentration and initial density of rotifers p. 138-139. En : E. Ríos-Jara, E. Juárez- Carrillo, M. Pérez-Peña, E. López-Uriarte, E.G. Robles-Jarero, D.U. Hernandez Becerril y M. Silva-Briano (eds.) Estudios sobre el plancton en México y el Caribe. Sociedad Mexicana de Planctología y Universidad de Guadalajara. 147 p.
- Hutchinson, G.E. 1967. A treatise on limnology. 2. Introduction to lake biology and limnoplankton. John Wiley, New York, pp. 1111.
- INEGI. 1987a. Síntesis Geográfica; Nomenclator y Anexo Cartográfico del Estado de Puebla, México, pp. 2-56.
- INEGI. 1987b. Carta topográfica. San Francisco Totimehuacan. E14B53. Escala 1:50000. México.
- Jak, R.G., J.L. Maas & M.C.Th. Scholten. 1998. Ecotoxicity of 3,4-dichloroaniline in enclosed freshwater plankton communities at different nutrient levels. *Ecotoxicology.* 7: 49-60.

- Kaniewska-Prus, M. 1982. The effect of ammonia, chlorine, and chloramine toxicity on the mortality of *Daphnia magna* Straus. *Pol. Arch. Hydrobiol./Pol. Arch. Hydrobiol.* 29(3-4): 607-624.
- Kilham, S.S., D.A. Kreeger, C.E. Goulden & S.G. Lynn. 1997. Effects of algal food quality on fecundity and population growth rates of *Daphnia*. *Freshwat. Biol.* 38: 639-647.
- Krebs, J. C. 1985. Ecology. The experimental analysis of distribution and abundance. 3ed. Harper & Row. New York. pp. 216-219.
- Lampert, W. & U. Sommer. 1997. "Limnoecology. The ecology of lakes and streams." Oxford University Press, New York, pp. 382.
- Lugo, A., L.A. Bravo-Inclan, J. Alcocer, M.L. Gaytán, Ma. G. Oliva, Ma. del R. Sánchez, M. Chavez, & G. Vilaclara. 1998. Effect on the planktonic community of the chemical progeam used to testigo water hyacinth (*Eichhornia crassipes*) in Guadalupe Dam, México. *Acuatic Ecosystem Health Management 1*: 333-343.
- Mangas-Ramírez E. 2000. Evaluación de los efectos de la remoción del lirio acuático (*Eichhornia crassipes*) en la biota y la calidad del agua en el embalse Manuel Avila Camacho, en el Estado de Puebla. Tesis de Maestría en Ciencias Ambientales. Instituto de Ciencias. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.
- Mangas-Ramírez, E., S.S.S. Sarma & S. Nandini 2001. Acute and chornic toxicity of ammonium chloride to the cladoceran *Daphnia pulex* in relation to algal food density. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 67: 834-840.



- Manning T.M., S.P. Wilson & J.C. Chapman 1996. Toxicity of chlorine and other chlorinated compounds to some Australian aquatic organisms. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 56: 971-976
- Margalef, R. 1983. Limnología, ed. Omega, Barcelona.
- Martínez-Jerónimo, F. 1991. La importancia de los bioensayos en la evaluación de toxicidad aguda. *Universidad: Ciencia y Tecnología.* 1(4): 37-44.
- Martínez-Jerónimo F. & R. García-González. 1994. Effect of food concentration on the chronic toxicity of sodium dodecyl sulphate to *Daphnia magna*. *J. Aquat. Ecosyst. Health* 3: 247-253.
- Martínez, J. F., R. C. Villaseñor, F. C. Espinosa, G. B. Ríos & R. G. Ramírez. 1997. Metodología para la producción de neonatos como organismos de prueba en toxicología acuática. *Zoología informa ENCB.* 36/37: 59-82.
- Matveev, V., & W. Gabriel. 1994. Competitive exclusion in Cladocera through elevated mortality of adults. *J. Plankton Res.* 16, 1083-1094.
- McDonald, S. F., S. J. Hamilton, K. J. Buhl, & J. F. Heisinger. 1995. Acute toxicity of fire testigo chemicals to *Daphnia magna* (Straus) and *Selenastrum capricornutum* (Printz). *Ecotox. Environ. Saf.* 33(7):62-72.
- McDonald, S. F., S. J. Hamilton, K. J. Buhl & J. F. Heisinger. 1995b. Acute toxicity of fire-retardant and foam-suppressant chemicals to *Hyalella azteca* (Saussure). *Environ. Toxicol. Chemis.* 16(7):1370-1376



- Mourelatos, S. & G. Lacroix. 1990. *In situ* filtering rates of Cladocera: Effect of body length, temperature, and food concentration. *Limnol. Oceanogr.* 35(5): 1101-1111.
- Muro-Cruz G. & S. Nandini. 2002. Comparative life table demography and population growth of *Alona rectangula* and *Macrothrix triserialis* (Cladocera:Crustacea) in relation to algal (*Chlorella vulgaris*) food density. *Journal of freshwater Ecology.* 17(1): 1-10.
- Nandini, S. & T.R. Rao. 1998. Somatic and population growth in selected cladoceran and rotifer species offered the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* as food. *Aquat. Ecol.* 31, 283-298.
- Nandini, S. & S.S.S. Sarma. 1998. Lifetable demography of four cladoceran species in relation to food density. *Memorias del Primer Congreso Nacional de Limnología.* Morelia.
- Nandini S. & S.S.S. Sarma. 2000. Competition between *Moina macrocopa* y *Ceriodaphnia dubia*: Demography and population growth studies. En : Ríos-Jara E., E. Juárez- Carrillo, M. Pérez-Peña, E. López-Uriarte, E.G. Robles-Jarero, D.U. Hernandez Becerril y M. Silva-Briano (eds.). Estudios sobre el plancton en México y el Caribe. Sociedad Mexicana de Planctología y Universidad de Guadalajara. 147 p.
- Nandini S. & S.S.S. Sarma 2000a Zooplankton preference by two species of freshwater ornamental fish larvae. *J. Appl. Ichthyol* 16: 273-275
- Nandini S. & S.S.S. Sarma 2000b Lifetable demography of four cladoceran species in relation to algal food (*Chlorella vulgaris*) density. *Hydrobiologia* 435: 117-126



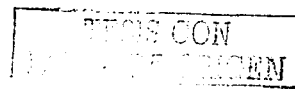
- Nandini S. & S.S.S. Sarma 2001 Population growth of *Lepadella patella* (O. F. Müller, 1786) at different algal (*Chlorella vulgaris*) densities and in association with *Philodina roseola* Ehrenberg, 1832. *Hydrobiologia* 446/447: 63-69
- Nandini S. (2000). Responses of rotifers and cladocerans to *Mycrocistis aeruginosa* (Cyanophyceae): A demographyc study. *Acuatic Ecology* 34: 227-242.
- Ostrensky, A., W. Wasielesky, Jr. & D. Pestana. 1992. Toxicidade aguda da amonia para *Artemia* sp. *An. Acad. Bras. Cienc.* 64(4): 391-395.
- Pardian, T. J. & M. P. Marian. 1991. Manual on culture of live food organisms for prawns. School of Biological Sciences, Madurai Kamaraj University. Madurai. 165 p.
- Pennak, R. W. 1978. Fresh-water invertebrates of the unites states. 2nd. ed. Jhon Wiley and Sons. New York.
- Pica-Granados Y., G.D. Trujillo & H.S. Hernández. 2000. Bioassay Standardization for water quality monitoring in México. *Environ. Wat. Qualit.* 12: 322-330.
- Quadri, T. G., F. V. Paramo, J. M. Flores & E. B. Lezcano. 1994. Manual del Departamento de Calidad del Agua y Bioensayos del INE.. SEDESOL. Instituto Nacional de Ecologia. 89 p.
- Ramírez, E. 1989. Dosis-Respuesta (DORES). Ensayos biológicos y pruebas de toxicidad. Curso regional INDERENA/ PAC/ PNAMA/ FAO/ COI. Cartagena, Colombia.



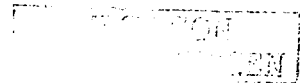
- Rao, T. R. & S.S.S. Sarma. 1986. Demographic parameters of *Brachionus patulus* Muller. (Rotifera) exposed to sublethal DDT concentrations at low and high food levels. *Hydrobiologia* 139:193-200
- Robles, V. E., 1998. Contaminación Química del agua. en: Chio A. R., Hacia una renovación ambiental en México. Univ. Auton. Del Estad. de Morelos. Cuernavaca. pp 78-85.
- Roex E.W.M., C.A.M.V. Gestel, A.P.V. Wezel & N.V. Straalen. 2000 Ratios between acute aquatic toxicity and effects on population growth rates in relation to toxicant mode of action. *Environ Toxicol Chem* 19: 685-693
- Sarma, S. S. S. 1996, Rotifer ecotoxicology, Laboratory manual. UNAM. campus Iztacala. México. 181 p.
- Sarma S. S. S., S. Nandini & H. J. Dumont 1998. Feeding preference and population growth of *Asplanchna brightwelli* (Rotifera) offered two non-evasive prey rotifers. *Hydrobiologia* 361: 77-87.
- Sarma S. S. S., S. Nandini & M. A. Fernandez-Araiza. 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. & S. Nandini. 1999. International Workshop on Zooplankton Ecotoxicology. Laboratory Manual. UNAM. Campus Iztacala. México. 181 p.
- Sarma S.S.S. & S. Nandini. 2001. Life table demography and population growth of *Brachionus variabilis* (Hampel, 1896) in relation to algal (*Chlorella vulgaris*) density. *Hydrobiologia* 446/447: 75-83



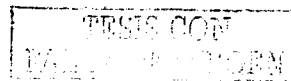
- Sarma S.S.S., M.A. Fernández-Araiza & S. Nandini. 1999. Competition between *Brachionus calyciflorus* (Pallas) and *Brachionus patulus* (Müller) (Rotifera) in relation to algal food concentration and initial population density. *Aquatic Ecology* 33: 339-345
- Sarma S. S. S., S. Nandini, J.L. Gama-Flores & M.A. Fernandez-Araiza 2001b. Population Growth of *Euchlanis Dilatata* (Rotifera): Combined Effects of Methyl Parathion and Food (*Chlorella vulgaris*). *Environ. SCI.Health, B36(1)*, 43-54.
- Sarma S. S. S., T. Ramírez-Pérez, S. Nandini & I. Peñalosa-Castro. 2001a. Combined effects of concentration and the Herbicide 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid on the Population Dynamics of *Brachionus patulus* (Rotifera). *Ecotoxicology*, 10:91-99.
- Smirnov N. 1996. Guides to the identification of the microinvertebrates of the continental waters of the world. SPB Academic Publishing. Netherlands. 197 p.
- Snell T.W. & C. R. Janssen. 1995. Rotifers in ecotoxicology. *Hydrobiologia*. 313/314: 231-247.
- Snell T.W. & G. Persoone. 1989. Acute toxicity bioassays using rotifers. I. A test for brackish and marine environments with *Brachionus plicatilis*. *Aquat. Toxicol.* 14: 65-80.
- Snell T.W., B.D. Moffat, C.R. Janssen & G. Persoone 1991. Acute toxicity bioassays using rotifers III. Effects of temperature, stain and exposure time on the sensitivity of *Brachionus plicatilis*. *Ecotoxicol. Envir. Safety* 21: 308-317.



- Sokal, R.R. & F.J. Rohlf, 1993. *Biometry* (2nd edn). W.H. Freeman and Company, San Francisco.
- Spote, E. 1979. *Fish and invertebrate culture: Water management in closed systems*, 2nd edition John Wiley. New York USA.
- Steffens, W. 1981. *Moderne Fischwirtschaft-Grundlagen und Praxis*. Verlag J. Neumann-Neudamma, Melsunge.
- Stewart, K.M., & J.W. Sutherland. 1993. Zooplankton migration in three lakes of western New York. *Internat. Rev. ges. Hydrobiol.* 78: 21-37.
- Thurston, R. V. & E. Meyn. 1986. Chronic toxicity of ammonia to fathead minnows. *Trans. Am. Fish. Soc.* 115: 196-207.
- Thurston, R.V. & R. C. Russo. 1983. Acute toxicity of ammonia to cutthroat trout fry. *Trans. Am. Fish. Soc.*, 112: 696-704.
- UNEP/ FAO/ IAEA. 1986. Test of the acute lethal toxicity of pollutants to marine fish and invertebrates. *Reference methods for marine pollution studies No. 43 (draft)*. UNEP.
- U.S.E.P.A. (U.S. Environmental Protection Agency). 1985. Ambient Water Quality criteria for ammonia 1984. US EPA 440/5-85001, Office of Water Regulations and Standard, Washinton, D.C.
- Vallentyne, J. F. 1978. *Limnologia*, ed. Omega, Barcelona.
- Van Sprang, P.A. & C.R. Janssen. 1997. Identification and confirmation of ammonia toxicity in contaminated sediments using a modified toxicity



- identification evaluation approach. *Environ. Toxicol. Chem.* 16(12): 2501-2507.
- Vázquez, A., E. Solís, N. Macedo & I. Rosas. 1986. Influencia de la calidad del agua sobre la ocurrencia de *Daphnia pulex* en la presa José Antonio Alzate y algunos aspectos de su pesquería. *Contam. Ambient.* 2: 39-56.
- Vera-Herrera, F.R., J.A. Medina., D.R. Flores. & J.L. Rojas-Galavis. 1980. Testigo biológico del lirio acuático *Eichhornia crassipes* mediante la carpa herbívora *Ctenopharyngodon idella* (Pices: Cyprinidae) en estanques. *An. Centro cienc. Del mar y limnol. UNAM. México* 7(2):259-274
- Wade, A., B. Maher, I. Lawrence, N. Davis, C. Zoppou & C. Bell. 1998. Estimating the allowable ammonia concentrations in wastewater treatment plant discharge to ensure protection of aquatic biota. *Environ. Technol.* 19: 749-754
- Wetzel, R. 1981. Limnología, ed. Omega, Barcelona
- Yuxin A. & H. Zhihui. 1996. Toxicity of ammonia to *Moina mongolica* Daday J. *Dalian Fish. Coll./Dalian Shuichan Xueyuan Xuebao*. 11(4): 19-26.
- Zhao, J.H., J.Y. Guo & T.J. Lam. 1998. Lethal doses of ammonia on the late-stage larvae of Chinese mitten-handed crab, *Eriocheir sinensis* (H. Milne-Edwards), (Decapoda: Grapsidae) reared in the laboratory. *Aquacult. Res.* 29: 635-642.



Acute and Chronic Toxicity of Ammonium Chloride to the Cladoceran *Daphnia pulex* Leydig in Relation to Algal Food Density

E. Mangas-Ramírez,¹ S. S. S. Sarma,² S. Nandini³

¹ School of Biology, Benemerita Autonomus University of Puebla, Avenue San Claudio and 14 Sur, CP 72560, University City, Col. San Manuel, Puebla, State of Puebla, Mexico

² Laboratory of Aquatic Zoology, Division of Research and Postgraduate Studies, National Autonomous University of Mexico, Campus Iztacala, AP 314, CP 54000, Los Reyes, Tlalnepantla, State of Mexico, Mexico

³ Limnology, Conservation, and Improvement of Environment, Division of Research and Postgraduate Studies, National Autonomous University of Mexico, Campus Iztacala, AP 314, CP 54000, Los Reyes, Tlalnepantla, State of Mexico, Mexico

Received: 10 January 2001/Accepted: 6 August 2001

Cladocerans are generally a dominant group in freshwater zooplankton where they may contribute up to 80% of the secondary production. In natural waterbodies they are subjected to strong variations in the physical and chemical variables. Among abiotic factors, temperature and pH are known to influence the density and dynamics of cladocerans (Downing and Rigler 1984). Nitrogen is a macronutrient directly controlling the phytoplankton densities, which in turn influence the biomass of zooplankton (Hutchinson 1967). Among nitrogenous compounds, free-ammonia has a strong and negative influence on both survival and reproduction of cladocerans. Dissolved ammonia is also toxic to zooplankton but at much higher concentrations (Manning et al. 1996). However, dissolved ammonia is also an important source of nitrogen for phytoplankton, which they could directly absorb from the ambient (Pales-Espinosa and Moreau 1997). Therefore, the toxicity of ammonium compounds to zooplankton in general and cladocerans in particular, could be influenced by the seasonal variations in the density of phytoplankton.

Much of the information on the toxic effects of ammonia to cladoceran zooplankton is concerned with deriving median lethal tests or chronic tests at one food level (Andersen and Buckley 1998) or field-observations where several factors simultaneously interact (Arthur et al. 1987). Since variations in the algal densities naturally occur, it is of considerable interest to know the influence of phytoplankton on the toxicity of ammonia to cladoceran zooplankton under both acute and chronic test conditions.

The aim of this work was to study the effect of low and high algal food concentrations on the toxicity of ammonium chloride to the survival and population growth of the cladoceran *Daphnia pulex*.

MATERIALS AND METHODS

The test organism, *Daphnia pulex* Leydig, 1860 was isolated from the dam Manuel Avila Camacho in the State of Puebla (Mexico) and mass cultured using

the green alga *Chlorella vulgaris* as the exclusive food. Conditions that favoured good population growth in mass culture tanks were, pH 7.5; temperature 24°C, continuous fluorescent illumination and *Chlorella* at 1.5×10^6 cells/mL and change of culture media every alternate day. In the mass culture tanks the average density of *D. pulex* was maintained at about 2 ind./mL. *Chlorella* was mass cultured in 2L transparent bottles using Bold's basal medium (Borowitzka and Borowitzka 1988). For routine cultures as well as for experiments we used reconstituted moderate hard water (the EPA medium, Anon. 1985): The EPA medium was prepared by dissolving 96 mg NaHCO_3 , 60 mg CaSO_4 , 60 mg MgSO_4 and 4 mg KCl in one litre of distilled water.

For acute toxicity tests, we used neonates (24 ± 2 h age) of *D. pulex*. We selected three densities of *Chlorella vulgaris* (resuspended alga) viz. 0 (no food), 0.5×10^6 and 1.5×10^6 cells/mL. A stock solution of 500 mg/L ammonium chloride was prepared using distilled water. Bioassays were conducted for 24 h using eight ammonia levels ranging from 0 (control) to 300 mg/L. For each of the ammonia concentrations and algal levels, we used three replicates and each replicate with 10 individuals. We counted the number of live cladocerans from each replicate and the data were used to derive median lethal concentration (LC50) following probit method (Finney 1971).

Based on the data of median lethal concentration, chronic toxicity tests were conducted in a static-renewal system using the population growth of *D. pulex* at five concentrations of ammonium chloride viz., 0 (control), 20, 40, 80 and 120 mg/L under two food levels (low: 0.5×10^6 and high: 1.5×10^6 cells/mL). For the growth experiments we used a mixed population of *D. pulex* obtained from mass culture tanks in the exponential phase. The experimental design consisted a total of 30 test jars (5 ammonia concentrations \times 2 algal food levels \times 3 replicates) of 200 mL capacity, each containing 50 mL medium with specified algal food-ammonia combination. Into each test jar, we introduced 10 individuals of *D. pulex* using a Pasteur pipette under stereomicroscope at 20X. Following inoculation, every day we counted the number of test cladocerans alive in each replicate and medium was changed appropriately with alga-ammonia combinations. The population growth experiments were discontinued after 4 weeks by which time most replicates began to decline. Based on the data collected, we evaluated statistically using the analysis of variance the combined effects of ammonia concentrations and the algal food levels on the peak cladoceran density, day of maximal population density and the rate of population density (r) per day. The r values were derived using the 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. We used varying data points along the growth curve to calculate the mean growth rate per replicate. In general we took 4-6 data points during the exponential phase of the population for each replicate following Dumont et al. (1995).

RESULTS AND DISCUSSION

The 24 hr median lethal concentration values of ammonium chloride for *D. pulex* in relation to algal food density are presented in Table 1. There was a distinct difference between with and without inclusion of food in the acute toxicity tests. When the tests were conducted without food, the concentration of ammonia required to produce a 50% mortality of neonate *D. pulex* was much lower than when food was supplied. Data on the population growth of *D. pulex* in relation to ammonia concentrations and *Chlorella* levels are presented in Figure 1. Regardless of ammonia concentration, an increase in *Chlorella* level from 0.5×10^6 to 1.5×10^6 cells/mL, there was an increase in the population growth. However, at any food level, an increase in ammonia concentrations resulted in a decrease of population growth of *D. pulex*. At any given ammonia level, an increase in algal food density resulted in a higher population abundance (Figure 2) or growth rate (Figure 3). Statistically significant ($p < 0.001$, ANOVA, F-test) effects of ammonia on the peak population density, day of maximal abundance and the rate of population were observed. Similarly, food density also significantly influenced these variables. The interaction of food level X ammonia concentration was also significant ($p < 0.001$) except for rate of population increase ($p > 0.12$).

Table 1. LC50 values (mean \pm standard error) of ammonium chloride for *D. pulex* in relation to different levels of *Chlorella*. Bioassays were performed at 24h.

| Food density ($\times 10^6$ cells/mL) | Median lethal concentration (mg/L) |
|--|------------------------------------|
| 0.0 (no food) | 247.12 \pm 8.29 |
| 0.5 | 271.66 \pm 1.39 |
| 1.5 | 277.10 \pm 0.42 |

The fact that the toxicity of ammonia could be reduced by the presence of living algae is evident in both acute and chronic test conditions. The algal food density chosen here was based on the literature where *Chlorella* generally higher than 1.5×10^6 cells/mL could cause feeding inhibition and the resultant reduction in population growth rates (Nandini and Sarma 2000). In controls an increase in algal concentration resulting in an increase mean population density observed here is known among cladocerans (Lampert and Sommer 1997). Thus, the maximal population density (7.6 ± 0.4 ind./mL) observed at 1.5×10^6 cells/mL of *Chlorella* in controls was not uncommon even for *Daphnia*. For example *D. carinata* reached up to 20 ind./mL when fed *Microcystis* (Nandini and Raq 1998). Similarly, the rate of population increase per day as observed here (positive values ranging from 0.02 to 0.12) (Figure 3) were earlier observed for other daphnids (Hietala et al. 1997, Lürling and Van Donk 1997).

In most toxicity tests using dissolved ammonia, the mortality of test individuals were also attributed to the free ammonia associated with the former (Manning et al. 1996). In our study, such a possibility exists, but this could decrease with increasing algal abundance. Thus, when we measured the ammonia levels using

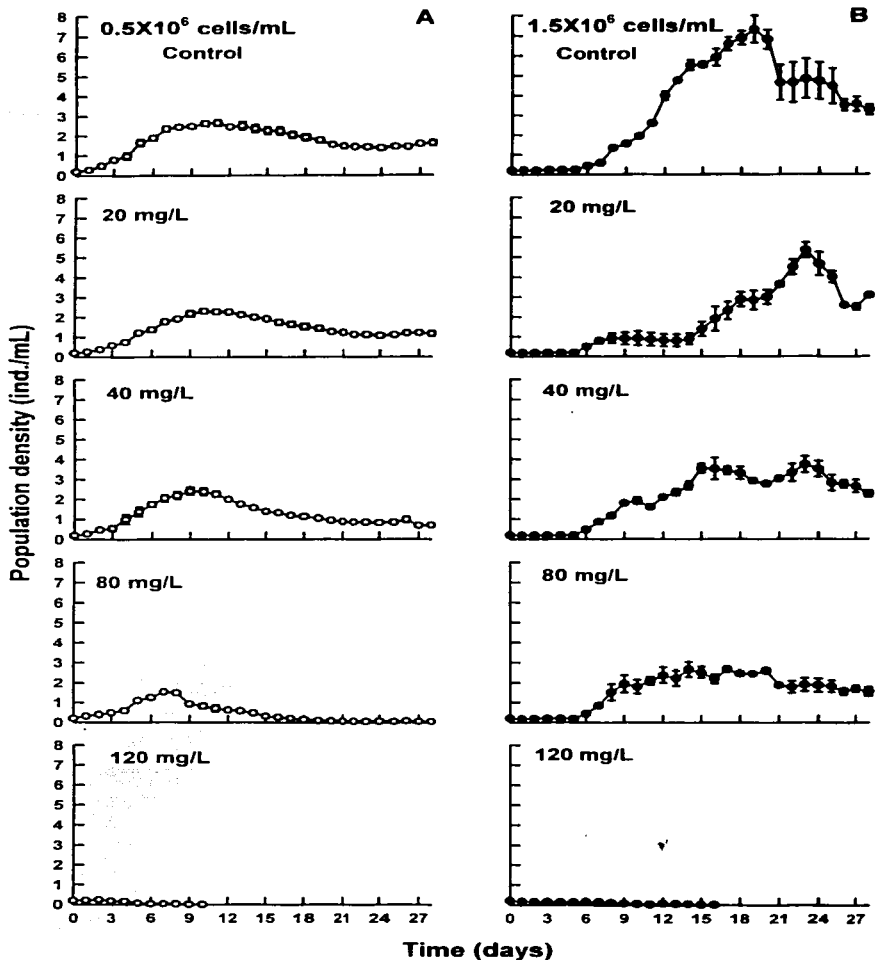


Figure 1. Population growth of *Daphnia pulex* in relation to different concentrations of ammonium chloride under low (column A, 0.5×10^6) and high (column B, 1.5×10^6 cells/mL) *Chlorella* densities. Shown are mean \pm standard error values.

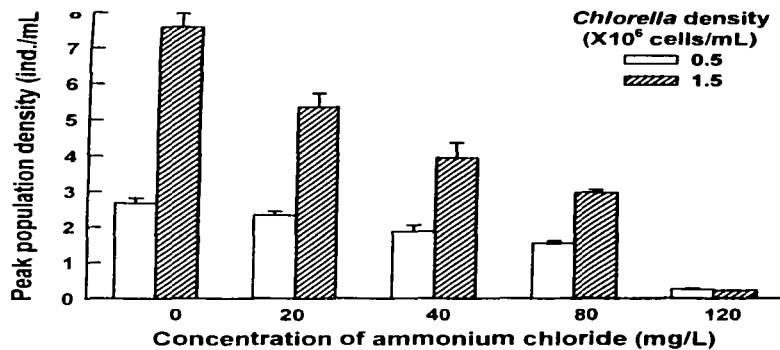


Figure 2. Maximum population density of *D. pulex* in relation to different concentrations of ammonium chloride at low (0.5×10^6) and high (1.5×10^6 cells/mL) *Chlorella* levels. Shown are mean \pm standard error values.

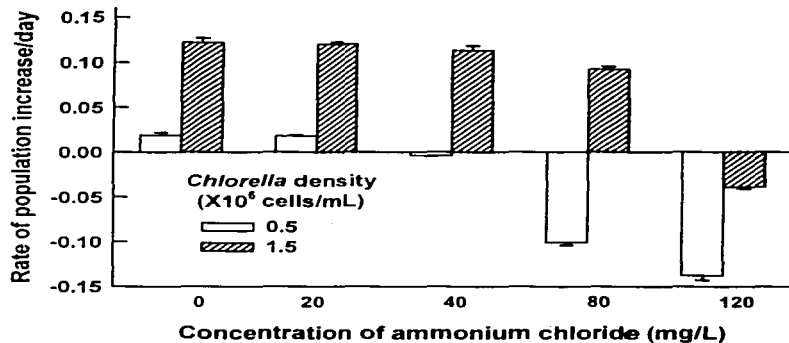


Figure 3. Rate of population increase per day of *D. pulex* in relation to different concentrations of ammonium chloride at low (0.5×10^6) and high (1.5×10^6 cells/mL) *Chlorella* levels. Shown are mean \pm standard error values.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

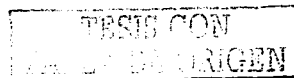
various concentrations of *Chlorella* alone (without the presence of cladocerans), and after 24 h, there was a reduction in dissolved ammonia levels (and thus the free ammonia). This condition however, cannot be also directly attributed to the experimental containers because the algal density could vary due to grazing depending on the density of *D. pulex* in each container (Downing and Rigler 1984) and the excretion of ammonia by the cladocerans (Arner and Koivisto 1993).

Based on the published data, dissolved ammonia in general is less toxic and cladocerans can tolerate more than 100 mg/L without apparent ill-effects (Manning et al. 1996; Andersen and Buckley 1998). Our observations in acute toxicity bioassays support this. However, due to prolonged exposure *D. pulex* became more sensitive to even much less ammonia concentrations. In conclusion our study emphasizes the importance of chronic toxicity tests instead of relying exclusively on the results from the acute bioassays since the final effect of a toxicant depends not only on its concentration but also the duration of exposure. This study also demonstrates the effectiveness of algae in mitigating adverse effects of ammonia to *D. pulex*.

Acknowledgments. EM received a scholarship from CONACyT (Ref. 144644). SSSS and SN thank National System of Investigators (SNI Ref. 18723 & 20520) for support. Additional grants received from UNAM-Iztacala for SNI-members is gratefully acknowledged.

REFERENCES

- Andersen HB, Buckley JA (1998) Acute toxicity of ammonia to *Ceriodaphnia dubia* and a procedure to improve control survival. *Bull Environ Contam Toxicol* 61: 116-122
- Anonymous (1985) Methods of measuring the acute toxicity of effluents to freshwater and marine organisms. US Environment Protection Agency EPA/600/4-85/013
- Arner M, Koivisto S (1993) Effects of salinity on metabolism and life history characteristics of *Daphnia magna*. *Hydrobiologia* 259: 69-77
- Arthur JW, West CW, Allen KN, Hedtke SF (1987) Seasonal toxicity of ammonia to five fish and nine invertebrate species. *Bull Environ Contam Toxicol* 38: 324-331
- Borowitzka MA, Borowitzka LJ (1988) *Micro-algal biotechnology*. Cambridge University Press, London
- Downing JA, Rigler FH (eds) (1984) *A manual on the methods for the assessment of secondary productivity in fresh waters*. IBP Handbook 17, Blackwell Scientific Publ. London
- Dumont HJ, Sarma SSS, Ali AJ (1995) Laboratory studies on the population dynamics of *Anuraeopsis fissa* (Rotifera) in relation to food density. *Freshwater Biol.* 33: 39-46
- Finney DJ (1971) *Probit analysis*. Cambridge University Press, 3rd edn, London



- Hietala J, Lauren-Määttä C, Walls M (1997) Life history responses of *Daphnia* clones to toxic *Microcystis* at different food levels. *J Plankton Res* 19: 917-926.
- Hutchinson GE (1967) A treatise on limnology. 2. Introduction to lake biology and limnoplankton. John Wiley, New York
- Lampert W, Sommer U (1997) Limnoecology. The ecology of lakes and streams. Oxford University Press, New York
- Lürling M, Van. Donk E (1997) Life history consequences for *Daphnia pulex* feeding on nutrient-limited phytoplankton. *Freshwater Biol* 38: 693-709
- Manning TM, Wilson SP, Chapman JC (1996) Toxicity of chlorine and other chlorinated compounds to some Australian aquatic organisms. *Bull Environ Contam Toxicol* 56: 971-976
- Nandini S, Rao TR (1998) Somatic and population growth in selected cladoceran and rotifer species offered the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* as food. *Aquat Ecol* 31: 283-298
- Nandini S, Sarma SSS (2000) Lifetable demography of four cladoceran species in relation to algal food (*Chlorella vulgaris*) density. *Hydrobiologia* 435: 117-126
- Pales-Espinosa E, Moreau C (1997) Effect of ammonium nitrogen on the biodiversity of natural phytoplanktonic communities from Bourgneuf Bay (France). Determination of optimal and toxic amounts for the growth of tested diatoms. *J Rech Oceanogr* 22: 117-124.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Combined Effects of Algal (*Chlorella vulgaris*) Density and Ammonia Concentration on the Population Dynamics of *Ceriodaphnia dubia* and *Moina macrocopa* (Cladocera)

Ernesto Mangas-Ramírez,* S. S. S. Sarma,†¹ and S. Nandini‡

*School of Biology, Benemerita Autonomous University of Puebla, Avenida San Claudio & 14 Sur, C.P. 72560, University City, Col. San Manuel, Puebla, Puebla, Mexico; †Laboratory of Aquatic Zoology, Division of Research and Postgraduate Studies, National Autonomous University of Mexico, Campus Iztacala, A.P. 314, C.P. 54000, Los Reyes, Tlaxtepec, Mexico; ‡Limnology, Conservation and Improvement of Environment, Division of Research and Postgraduate Studies National Autonomous University of Mexico, Campus Iztacala, A.P. 314, C.P. 54000, Los Reyes, Tlaxtepec, Mexico, Mexico

Received November 1, 2001

Key Words: Cladocera; ammonia toxicity; food density; population growth.

Ammonia is a natural variable in ponds and lakes. Although an important source of nitrogen for microalgae, at high concentrations ammonia can affect the density and diversity of cladocerans. Using the cladocerans *Ceriodaphnia dubia*, and *Moina macrocopa*, the effect of nominal concentrations of ammonium chloride under acute and chronic exposures at different levels of algal food was tested. Regardless of food level, *C. dubia* was more sensitive than *M. macrocopa* to ammonia. In the absence of food, the median lethal concentration of ammonia (LC₅₀ 24 h) for *C. dubia* was (112 mg L⁻¹) less than half that of *M. macrocopa* (232 mg L⁻¹). When algal food (0.5 × 10⁶ and 1.5 × 10⁶ cells mL⁻¹ of *Chlorella*) was used, the LC₅₀ values were much higher for both cladoceran species. Based on the population growth studies, it was found that in controls of *M. macrocopa* an increase in the availability of *Chlorella* from 0.5 to 1.5 × 10⁶ cells mL⁻¹ led to an increase in the maximum density from 4.7 ± 0.2 to 16.4 ± 1.2 ind. mL⁻¹, while in *C. dubia* the peak population density decreased from 7.9 ± 0.6 to 5.0 ± 1.0 ind. mL⁻¹. An increase in ammonia concentration (10 to 40 mg L⁻¹ for *C. dubia* and 20 to 120 mg L⁻¹ for *M. macrocopa*) resulted in a corresponding decrease in peak population densities of the tested cladocerans. The rate of population increase (*r*) values for *M. macrocopa* in the controls ranged from 0.21 ± 0.001 and 0.25 ± 0.02 at 0.5 and 1.5 × 10⁶ cells mL⁻¹ of *Chlorella*, respectively. The corresponding values of *C. dubia* in controls were 0.21 ± 0.004 and 0.18 ± 0.01. At 0.5 × 10⁶ cells mL⁻¹ of algal food, the *r* values became negative under 40 and 120 mg L⁻¹ of ammonia for *C. dubia* and *M. macrocopa*, respectively. The role of algal food in ammonia toxicity to cladocerans was discussed. © 2002 Elsevier Science (USA)

INTRODUCTION

Freshwater zooplanktons are mainly composed of protozoans, rotifers, cladocerans, and copepods. Cladocerans, in terms of biomass, are often the dominant group (Downing and Rigler, 1984). Their role in controlling the abundance of phytoplankton, including toxic algae, has implications in the biomanipulation of lakes (Alva-Martínez *et al.*, 2001). The fact that they are also suitable live prey for a variety of fish species is of importance for aquaculturists (Gerking, 1994; Nandini and Sarma, 2000a). However, due to their high sensitivity to changes in the physico-chemical characteristics of freshwater lakes and ponds, only a few genera are found at a time. For example, temperate waterbodies are, in general, rich in genera such as *Bosmina*, *Cercopagis*, and *Daphnia*. On the other hand, tropical waters normally have high densities of *Ceriodaphnia*, *Moina*, and *Simocephalus* (Dumont, 1994).

The density and diversity of cladocerans in general are controlled by biotic factors such as the availability of alga and predation from fish and invertebrates and abiotic factors such as pH, temperature, dissolved oxygen, and ammonia levels (Downing and Rigler, 1984). Ammonia is an important source of nitrogen for microalgae (Hansen *et al.*, 1997). Levels of ammonia in waterbodies can be as high as 5 mg L⁻¹ due to the excretion by zooplankton, fish, and other aquatic animals (Hargreaves, 1998). However, due to agricultural and aquacultural inputs and algal blooms arising as a result of eutrophication, ammonia in

¹To whom correspondence should be addressed. Fax: +52 5 623 1155. E-mail: sarma@servidor.unam.mx.

water bodies could reach levels toxic to aquatic organisms (Handy and Poxton, 1993).

It has been documented that the ability of zooplanktonic organisms to withstand the adverse effects of toxicants improves with increased availability of living food such as algae (Sarma *et al.*, 2001). However, when the algal food is supplied in excess, its interaction with toxicants may become antagonistic (Martinez-Jeronimo and Garcia-Gonzalez, 1994). Thus it is of considerable interest to know if the toxicity of ammonia to cladocerans is influenced by the food availability.

The aim of the present work was to test the effect of different levels of green alga *Chlorella vulgaris* on the toxicity of ammonia to the cladocerans *Ceriodaphnia dubia* and *Moina macrocopa* at population level.

MATERIALS AND METHODS

The test cladoceran species *C. dubia* Richard, 1894, and *M. macrocopa* Goulden, 1968, were originally isolated from a Lake Valsaquillo in the State of Puebla in Mexico. Clonal populations were established using *Chlorella* as the exclusive food and were maintained in EPA medium. *Chlorella* was cultured in Bold's basal medium (Borowitzka and Borowitzka, 1988), under conditions of continuous illumination and aeration. After approximately 10 days, the algae were harvested, centrifuged at 3000 rpm for 10 min, and resuspended in reconstituted moderate hard-water (EPA medium). This medium was prepared by dissolving 96 mg NaHCO_3 , 60 mg CaSO_4 , 60 mg MgSO_4 , and 4 mg KCl in 1 L of distilled water (Anon., 1985). From the stock algal concentrate, desired food levels were prepared.

The authors raised mass cultures of both the cladoceran species separately in 20-L glass aquaria. The cultures were fed daily but the entire medium was replaced twice a week. The conditions for routine maintenance of cladoceran cultures and for experiments were the following: temperature 25°C, pH 7.5–7.8, in continuous but diffused fluorescent illumination.

Ammonium chloride (analytical grade) was used as toxicant. A stock concentration of 1 g L^{-1} using distilled water was prepared. All test concentrations were nominal. Based on a preliminary range finding test, depending on the food level, for acute toxicity tests, six concentrations (40 to 310 mg L^{-1}) of NH_4Cl were chosen for *C. dubia* while for *M. macrocopa* higher levels (80 to 800 mg L^{-1}) were used. For each ammonia concentration the authors used three food levels (0, 0.5, and $1.5 \times 10^6 \text{ cells mL}^{-1}$) and for each treatment three replicates were used. Thus, into each of the 45 test jars (5 ammonia levels \times 3 food levels \times 3 replicates) of 100 ml capacity containing specified ammonia-algal combination, introduced 20 neonates (22 ± 2 h age) of *C. dubia* were introduced. The experimental design

for *M. macrocopa* was similar except that a higher range of ammonium chloride was used. After a 24-h interval the number of live test individuals was counted. The data were transformed to obtain median lethal concentration following the probit method (Finney, 1971).

For chronic toxicity evaluations, the population dynamics of both cladoceran species was studied using sublethal concentrations of ammonia at two food levels (0.5×10^6 and $1.5 \times 10^6 \text{ cells mL}^{-1}$). For population growth of *C. dubia* four levels (0, 10, 20, and 40 mg L^{-1}) were used and for *M. macrocopa*, five concentrations (0, 20, 40, 80, and 120 mg L^{-1}) of ammonia were selected. Thus the experimental design for *C. dubia* consisted a total of 24 transparent jars (4 ammonia levels \times 2 food densities \times 3 replicates). Into each test jar containing 50 mL of medium with specified food level and ammonia levels, 20 individuals of *C. dubia* were introduced. For *M. macrocopa* a similar experimental setup was used except that 30 test jars were used. Following the inoculation, the number of living individuals in each of the replicate was counted and transferred to new jars containing appropriate ammonia–food level combinations. The population growth experiments were terminated after 3 weeks, when most replicates began to decline.

From the data collected, the rate of population growth per day (r) was determined using the following exponential growth equation: $r = (\ln N_t - \ln N_0) / t$ where, N_0 = initial population density, and N_t = density of population after time t (days) (Krebs, 1985). The r value was obtained from a mean of 3 to 5 values during the exponential phase of the population growth from each replicate. To detect the effect of ammonium chloride and algal density, separately and together, on the peak population abundance and r , the data were treated using a two-way analysis of variance (Sokal and Rohlf, 1993).

RESULTS

The median lethal concentration (LC_{50}) values to ammonium chloride for *M. macrocopa* and *C. dubia* in relation to algal density are found in Table 1. Regardless of food level, *C. dubia* was more sensitive than *M. macrocopa* and the differences among them are statistically significant ($P < 0.001$, t test). In the absence of food, the median lethal concentration of ammonia for *C. dubia* was less than half that of *M. macrocopa* under similar test conditions. Food availability had a toxicity mitigating effect in both species tested. When the acute toxicity tests were conducted in the absence of *Chlorella*, the concentrations of ammonia required to produce a 50% mortality in the neonates were 60% more than when the test organisms were offered algal food at $0.5 \times 10^6 \text{ cells mL}^{-1}$.

Population growth curves of *C. dubia* and *M. macrocopa* in relation to different concentrations of ammonia at

TABLE 1
Data on the Median Lethal Concentration for Ammonium Chloride (Nominal Concentration) Bioassayed at 24 h for Neonate *C. dubia* and *M. macrocopa*

| Species | Concentration of algae ($\times 10^6$ cells mL $^{-1}$) | LC $_{50}$ mean \pm standard error (mg L $^{-1}$) |
|---------------------|---|--|
| <i>C. dubia</i> | 0.0 | 112.8 \pm 6.5 |
| | 0.5 | 274.3 \pm 2.4 |
| | 1.5 | 263.4 \pm 7.0 |
| <i>M. macrocopa</i> | 0.0 | 231.9 \pm 5.1 |
| | 0.5 | 381.2 \pm 25.5 |
| | 1.5 | 492.1 \pm 8.3 |

0.5×10^6 and 1.5×10^6 cells mL $^{-1}$ *Chlorella* are presented in Figs. 1 and 2. Regardless of ammonia concentration, *M. macrocopa* showed increased population abundance with increasing *Chlorella* level, while *C. dubia* showed higher population abundance at lower food level in control ($=0$ mg L $^{-1}$) and at 10 mg L $^{-1}$ of ammonia concentration. Further increase in ammonia concentration caused marginally higher numerical abundance at higher *Chlorella* level than that at lower food density.

The peak population densities reached by the test populations were clearly affected by the food availability (Fig. 3). In *M. macrocopa* an increase in the availability of *Chlorella* from 0.5 to 1.5×10^6 cells mL $^{-1}$ led to an increase in the maximum density of the controls from 4.7 ± 0.2 to 16.4 ± 1.2 ind. mL $^{-1}$, while in the case of *C. dubia* the peak population density decreased from 7.9 ± 0.6 to 5.0 ± 1.0 ind. mL $^{-1}$. Regardless of ammonia concentration, *M. macrocopa* reached a higher numerical abundance than *C. dubia*. The peak population densities of both cladoceran species were significantly affected by the food level and ammonia concentration as well as their interaction ($P < 0.01$, ANOVA, Table 2).

Data on the rate of population increase (r) of *C. dubia* and *M. macrocopa* in relation to different ammonia levels at 0.5×10^6 and 1.5×10^6 cells mL $^{-1}$ of *Chlorella* are presented in Fig. 4. The r values for *M. macrocopa* in the controls ranged from 0.21 ± 0.001 and 0.25 ± 0.02 at 0.5 and 1.5×10^6 cells mL $^{-1}$ of *Chlorella*, respectively. The corresponding values of *C. dubia* in controls were 0.21 ± 0.004 and 0.18 ± 0.01 . The effect of ammonia concentration had a significant ($P < 0.001$, Table 2) effect on r for both cladoceran species. However, only food level had a significant effect in the case of *M. macrocopa*, while the interaction between food level and the toxicant concentration was significant only for *C. dubia*.

DISCUSSION

Ammonia exists in two forms, viz. ionized (NH_4^+) and nonionized (or free NH_3) states. There exists an equi-

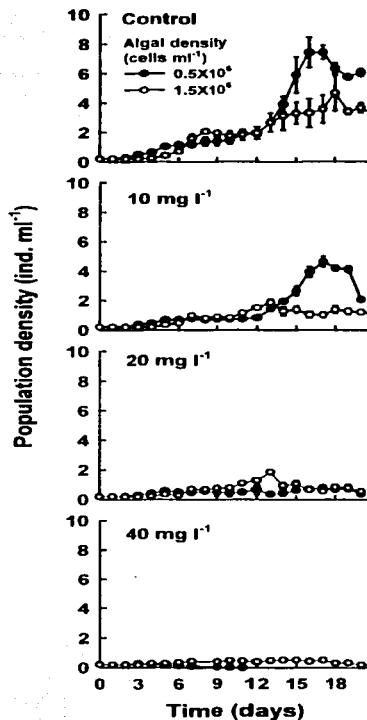


FIG. 1. Population growth curves of *C. dubia* in relation to different concentrations of ammonium chloride at 0.5×10^6 and 1.5×10^6 cells mL $^{-1}$. Values represent mean \pm standard error based on three replicate recordings.

rium between these forms which varies depending on pH and temperature of the medium (Steffens, 1981). For aquatic organisms free ammonia is several times more toxic than when it is present in the dissolved state (Manning *et al.*, 1996; Andersen and Buckley, 1998). Nevertheless, it is difficult to detect separately the effect of these two forms on zooplankton and therefore they interact in a combined way (Fontenot *et al.*, 1998). In the present work too, the nominal concentrations of ammonium chloride could have

ALGAL DENSITY AND AMMONIA CONCENTRATION EFFECTS ON CLADOCERA

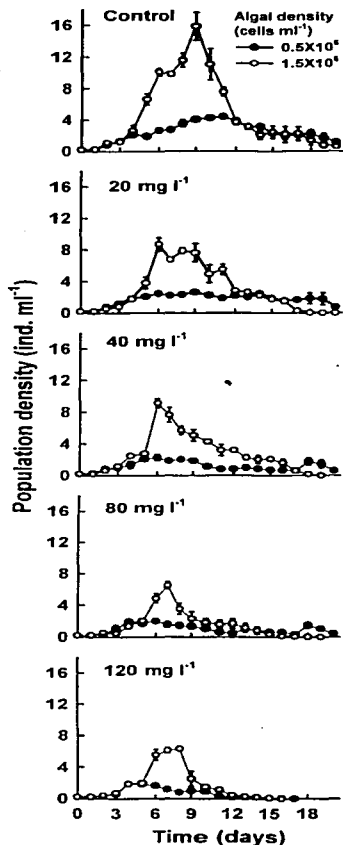


FIG. 2. Population growth curves of *M. macrocopa* in relation to different concentrations of ammonium chloride at 0.5×10^6 and 1.5×10^6 cells mL^{-1} . Values represent mean \pm standard error based on three replicate recordings.

combined effects of free and dissolved forms on both *C. dubia* and *M. macrocopa*. Published data on the acute toxicity of ammonia to aquatic animals vary manifold, depending on the taxa and the test conditions. For

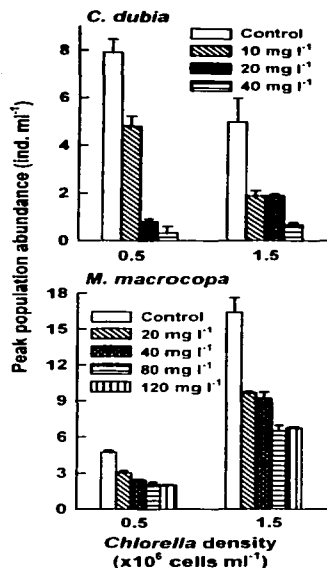


FIG. 3. Peak population abundance (ind. mL^{-1}) values of *C. dubia* and *M. macrocopa* in relation to different concentrations of ammonium chloride at 0.5×10^6 and 1.5×10^6 cells mL^{-1} . Values represent mean \pm standard error based on three replicate recordings for each species.

example, Fontenot *et al.* (1998) have shown a 96-h LC_{50} for larval shortnose sturgeon of about 150 mg L^{-1} , while larval forms of Chinese mitten-handed crab had 24-h LC_{50} values varying from 33 to 90 mg L^{-1} (Zhao *et al.*, 1998). Although data on the acute toxicity of ammonia to cladocerans are available (Andersen and Buckley, 1998), information based on chronic exposure is very limited (Mangas-Ramirez *et al.*, 2001).

Halbach *et al.* (1983) were among the earliest to advocate the use of population dynamics of zooplankton to understand the effects of toxicants beyond individual level because of their implications in ecosystem functioning. In single-species tests, peak population abundance and the rate of population increase attained are generally important variables to be considered (Sarma *et al.*, 1999). Data on the peak population abundance reached by a population in relation to food and toxicant levels

TABLE 2
Results of Two-Way Analysis of Variance (ANOVA)
Performed on the Peak Population Density and the Rate of
Population Increase of *C. dubia* and *M. macrocopa*

| Source | DF | SS | MS | F |
|-----------------------------|----|---------|--------|-----------|
| <i>C. dubia</i> | | | | |
| Peak population density | | | | |
| Toxicant (A) | 3 | 125.167 | 41.72 | 67.16*** |
| Food level (B) | 1 | 7.504 | 7.50 | 12.88** |
| Interaction A × B | 3 | 20.336 | 6.78 | 10.91*** |
| Error | 16 | 9.319 | 0.58 | |
| Rate of population increase | | | | |
| Toxicant (A) | 3 | 0.114 | 0.04 | 64.11*** |
| Food level (B) | 1 | 0.002 | 0.002 | 4.39ns |
| Interaction A × B | 3 | 0.014 | 0.004 | 7.89** |
| Error | 16 | 0.009 | 0.0006 | |
| <i>M. macrocopa</i> | | | | |
| Peak population density | | | | |
| Toxicant (A) | 4 | 157.584 | 39.40 | 63.47*** |
| Food level (B) | 1 | 351.576 | 351.58 | 566.40*** |
| Interaction A × B | 4 | 50.776 | 12.69 | 20.45*** |
| Error | 20 | 12.414 | 0.62 | |
| Rate of population increase | | | | |
| Toxicant (A) | 4 | 0.109 | 0.03 | 15.80*** |
| Food level (B) | 1 | 0.053 | 0.05 | 31.05*** |
| Interaction A × B | 4 | 0.004 | 0.001 | 0.58, NS |
| Error | 20 | 0.034 | 0.0017 | |

Note. DF, degrees of freedom; SS, sum of Squares; MS, mean square; F, F, ratios; NS, nonsignificant ($P > 0.05$).

* $P < 0.05$.

** $P < 0.01$.

*** $P < 0.001$.

eventually are used to predict carrying capacity. Since peak population densities are derived independent of time, they are not strongly affected by the intrareplicate variations with regard to time required to reach the highest densities. Also, depending on food levels, two species may have similar growth rates but dissimilar peak abundances. For example, the r values of *C. dubia* and *M. macrocopa* at 0.5×10^6 cells mL^{-1} of *Chlorella* were nearly the same, but the peak population densities varied greatly (Figs. 3 and 4). From this point of view, peak population density values are sometimes more important than the rate of population increase. In the present study, for example, the peak population densities were strongly and negatively affected by algal food level and ammonia concentration as well as their interaction but this was not the case with the r values (Table 2). However, for obtaining data on the peak population densities, the zooplankton growth experiments must be continued until the declining trends are visible, which in certain cases may be cumbersome. In the present study, peak population densities reached by *C. dubia* and *M. macrocopa* in controls were within the range reported for cladocerans, considering their body size (Alva-Martínez *et al.*, 2001).

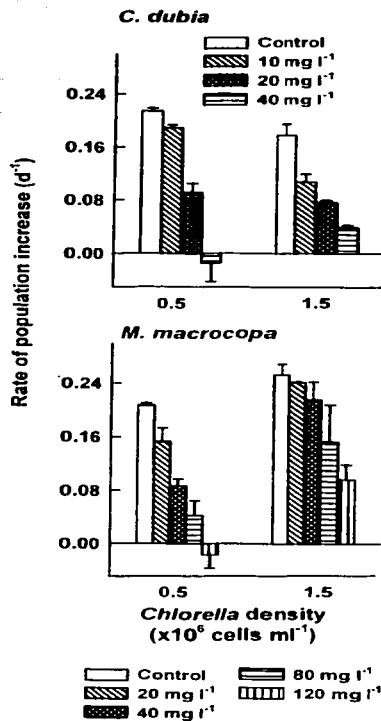


FIG. 4. Rate of population increase (d^{-1}) (r) values of *C. dubia* and *M. macrocopa* in relation to different concentrations of ammonium chloride at 0.5×10^6 and 1.5×10^6 cells mL^{-1} . Values represent mean \pm standard error based on three replicate recordings for each species.

The rate of population increase has received much attention from ecotoxicologists because it is generally more sensitive than short-term and "surrogate variables" such as mortality (Forbes and Calow, 1999; Sarma *et al.*, 2001). A reduction in the r values with increasing ammonia levels, as found in this study, has been documented for various zooplanktonic species chronically exposed to different toxicants: rotifers (Gama-Flores *et al.*, 1999) and cladocerans (Roex *et al.*, 2000). In general zooplankton show increased r values with increasing food levels (Nandini and

MANGAS-RAMÍREZ, SARMA, AND NANDINI

- Manning, T. M., Wilson, S. P., and Chapman, J. C. (1996). Toxicity of chlorine and other chlorinated compounds to some Australian aquatic organisms. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 56, 971-976.
- Martínez-Jeronimo, F., and García-González, R. (1994). Effect of food concentration on the chronic toxicity of sodium dodecyl sulphate to *Daphnia magna*. *J. Aquat. Ecosyst. Health* 3, 247-253.
- Nandini, S., and Sarma, S. S. S. (2000a). Zooplankton preference by two species of freshwater ornamental fish larvae. *J. Appl. Ichthyol.* 16, 273-275.
- Nandini, S., and Sarma, S. S. S. (2000b). Lifetable demography of four Cladoceran species in relation to algal food (*Chlorella vulgaris*) density. *Hydrobiologia* 435, 117-126.
- Nandini, S., and Sarma, S. S. S. (2001). Population growth of *Lepadella patella* (O. F. Müller, 1786) at different algal (*Chlorella vulgaris*) densities and in association with *Philodina roseola* Ehrenberg, 1832. *Hydrobiologia* 446/447, 63-69.
- Roex, E. W. M., Van Gestel, C. A. M., Van Wezel, A. P., and Van Straalen, N. (2000). Ratios between acute aquatic toxicity and effects on population growth rates in relation to toxicant mode of action. *Environ. Toxicol. Chem.* 19, 685-693.
- Sarma, S. S. S., Fernández-Araiza, M. A., and Nandini, S. (1999). Competition between *Brachionus calyciflorus* Pallas and *Brachionus patulus* (Müller) (Rotifera) in relation to algal food concentration and initial population density. *Aquatic Ecol.* 33, 339-345.
- Sarma, S. S. S., and Nandini, S. (2001). Life table demography and population growth of *Brachionus variabilis* Hampel, 1896 in relation to algal (*Chlorella vulgaris*) density. *Hydrobiologia* 446/447, 75-83.
- Sarma, S. S. S., Nandini, S., and Gama-Flores, J. L. (2001). 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.
- Sokal, R. R., and Rohlf, F. J. (1993). *Biometry*, 2nd ed. Freeman, San Francisco.
- Steffens, W. (1981). *Moderne Fischwirtschaft-Grundlagen und Praxis*. Verlag J. Neumann-Neudamm, Melsunge.
- Zhao, J. H., Guo, J. Y., and Lam, T. J. (1998). Lethal doses of ammonia on the late-stage larvae of Chinese mitten-handed crab, *Eriocheir sinensis* (H. Milne-Edwards), (Decapoda: Grapsidae) reared in the laboratory. *Aquacult. Res.* 29, 635-642.



Sarma, 2000b), a trend also observed in *M. macrocopa* (Fig. 4). However, some rotifer and cladoceran species are well-adapted to lower food levels and in such cases increased algal densities could cause a reduction in both peak population density and *r* values: Rotifera (*Brachionus variabilis* and *Lepadella patella*): Sarma and Nandini 2001; Nandini and Sarma, 2001) and Cladocera (*Daphnia magna*: Martinez-Jeronimo and Garcia-Gonzalez, 1994; *C. dubia*: Nandini and Sarma, 2000b). Regardless of food and toxicant effects, *M. macrocopa* has generally higher growth rates than many species of cladocerans, including *C. dubia*. Most cladocerans have *r* values varying from 0.1 to 0.5 (Nandini and Sarma, 2000b; Alva-Martinez *et al.*, 2001) and the present data fall within this range.

The role of algal food density in influencing the toxicity of a substance to freshwater zooplankton is of considerable interest from the point of view changing phytoplankton densities in polluted waterbodies (Lay *et al.*, 1985; Fliedner and Klein, 1996). It has been widely documented that increased algal concentrations reduce the toxicity of herbicides, pesticides, heavy metals, and ammonia to zooplankton (Barry *et al.*, 1995). Various mechanisms, including algal detoxification, have been proposed to explain the positive role of algae in reducing the toxic effect of ammonia to cladocerans (Mangas-Ramirez *et al.*, 2001). On the other hand, when increased algal food levels actually enhance toxicity of a substance to cladocerans, alternate explanations such as feeding inhibition, biological peculiarities of the test organism, or chemical nature of the toxicants have been proposed (Martinez-Jeronimo and Garcia-Gonzalez, 1994; Barry *et al.*, 1995). In the present study, an increase in the algal food level had a positive role on the survival of populations of both *C. dubia* and *M. macrocopa*. In the former, this was evident only when the ammonia levels were higher (20 and 40 mg L⁻¹) where the cladocerans exposed to lower food levels either did not survive beyond 1 week or had lower growth rates.

CONCLUSION

Results demonstrated the toxic effect of ammonia were reduced by the increase in algal food density in both acute and chronic bioassays. Ammonia levels as low as 1/10th of LC₅₀ had a significant negative effect on the population growth of *C. dubia* and *M. macrocopa*.

ACKNOWLEDGMENTS

E. M. R. received a scholarship from CONACyT, Mexico (Ref. 144644), S.S.S.S. and S.N. thank National System of Investigators (SNI Ref. 18723 and 20520) for support. Additional grants received from UNAM-Iztacala for SNI members are gratefully acknowledged.

REFERENCES

- Alva-Martinez, A. F., Sarma, S. S. S., and Nandini, S. (2001). Comparative population dynamics of three cladoceran species (Cladocera) in relation to different levels of *Chlorella vulgaris* and *Microcystis aeruginosa*. *Crustaceana* 78, 749-764.
- Andersen, H. B., and Buckley, J. A. (1998). Acute toxicity of ammonia to *Ceriodaphnia dubia* and a procedure to improve control survival. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 61, 116-122.
- 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.
- Barry, M. J., Logan, D. C., Ahokas, J. T., and Holdway, D. A. (1995). Effect of algal food concentration on toxicity of two agricultural pesticides to *Daphnia carinata*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 32, 273-279.
- Borowitzka, M. A., and Borowitzka, L. J. (1988). *Micro-algal Biotechnology*. Cambridge Univ. Press, London.
- Downing, J. A., and Rigler, F. H. (Eds.) (1984). *A Manual for the Methods of Assessment of Secondary Productivity in Fresh Waters*, 2nd ed., 1BP Handbook 17. Blackwell Scientific, London.
- Dumont, H. J. (1994). On the diversity of the Cladocera in the tropics. *Hydrobiologia* 272, 27-38.
- Finney, D. J. (1971). *Probit Analysis*, 3rd ed. Cambridge Univ. Press, London.
- Fliedner, A., and Klein, W. (1996). Effects of lindane on the planktonic community in freshwater microcosms. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 33, 228-235.
- Fontenot, Q. C., Isely, J. J., and Tomasso, J. R. (1998). Acute toxicity of ammonia and nitrite to shortnose sturgeon fingerlings. *Prog. Fish-Cult.* 60, 315-318.
- Forbes, V. E., and 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.
- Gama-Flores, J. L., Sarma, S. S. S., and Aruiza, 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.
- Gerking, S. D. (1994). *Feeding Ecology of Fish*. Academic Press, London.
- 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.
- Handy, R. D., and Poxton, M. G. (1993). Nitrogen pollution in mariculture: Toxicity and excretion of nitrogenous compounds by marine fish. *Rev. Fish Biol. Fish.* 3, 205-241.
- Hansen, A.-M., Andersen, F. O., and Jensen, H. S. (1997). Seasonal pattern in nutrient limitation and grazing control of the phytoplankton community in a non-stratified lake. *Freshwat. Biol.* 37, 523-534.
- Hargreaves, J. A. (1998). Nitrogen biogeochemistry of aquaculture ponds. *Aquaculture* 166, 181-212.
- Krebs, C. J. (1985). *Ecology. The Experimental Analysis of Distribution and Abundance*, 3rd ed. Harper & Row, New York.
- Lay, J. P., Schauerte, W., Peichl, L., Klein, W., and Korte, F. (1985). Influence of benzene on the phytoplankton and on *Daphnia pulex* in compartments of an experimental pond. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 10, 218-227.
- Mangas-Ramirez, E., Sarma, S. S. S., and Nandini, S. (2001). Acute and chronic toxicity of ammonium chloride to the cladoceran *Daphnia pulex* in relation to algal food density. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 67, 834-840.

MANGAS-RAMÍREZ, SARMA, AND NANDINI

- Manning, T. M., Wilson, S. P., and Chapman, J. C. (1996). Toxicity of chlorine and other chlorinated compounds to some Australian aquatic organisms. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **56**, 971-976.
- Martínez-Jeronimo, F., and García-González, R. (1994). Effect of food concentration on the chronic toxicity of sodium dodecyl sulphate to *Daphnia magna*. *J. Aquat. Ecosyst. Health* **3**, 247-253.
- Nandini, S., and Sarma, S. S. S. (2000a). Zooplankton preference by two species of freshwater ornamental fish larvae. *J. Appl. Ichthyol.* **16**, 273-275.
- Nandini, S., and Sarma, S. S. S. (2000b). Lifetable demography of four Cladoceran species in relation to algal food (*Chlorella vulgaris*) density. *Hydrobiologia* **435**, 117-126.
- Nandini, S., and Sarma, S. S. S. (2001). Population growth of *Lepadella patella* (O. F. Müller, 1786) at different algal (*Chlorella vulgaris*) densities and in association with *Philodina roseola* Ehrenberg, 1832. *Hydrobiologia* **446/447**, 63-69.
- Roex, E. W. M., Van Gestel, C. A. M., Van Wezel, A. P., and Van Straalen, N. (2000). Ratios between acute aquatic toxicity and effects on population growth rates in relation to toxicant mode of action. *Environ. Toxicol. Chem.* **19**, 685-693.
- Sarma, S. S. S., Fernández-Araiza, M. A., and Nandini, S. (1999). Competition between *Brachionus calyciflorus* Pallas and *Brachionus patulus* (Müller) (Rotifera) in relation to algal food concentration and initial population density. *Aquatic Ecol.* **33**, 339-345.
- Sarma, S. S. S., and Nandini, S. (2001). Life table demography and population growth of *Brachionus variabilis* Hampel, 1896 in relation to algal (*Chlorella vulgaris*) density. *Hydrobiologia* **446/447**, 75-83.
- Sarma, S. S. S., Nandini, S., and Gama-Flores, J. L. (2001). 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.
- Sokal, R. R., and Rohlf, F. J. (1993). *Biometry*, 2nd ed. Freeman, San Francisco.
- Steffens, W. (1981). *Moderne Fischwirtschaft-Grundlagen und Praxis*. Verlag J. Neumann-Neudamm, Melsunge.
- Zhao, J. H., Guo, J. Y., and Lam, T. J. (1998). Lethal doses of ammonia on the late-stage larvae of Chinese mitten-handed crab, *Eriocheir sinensis* (H. Milne-Edwards), (Decapoda: Grapsidae) reared in the laboratory. *Aquacult. Res.* **29**, 635-642.



ACADEMIC
PRESS

Available online at www.sciencedirect.com

SCIENCE @ DIRECT®

Ecotoxicology and Environmental Safety 55 (2003) 227–235

Ecotoxicology
and
Environmental
Safety

<http://www.elsevier.com/locate/ecotox>

Effect of ammonia toxicity on the competition among three species of cladocerans (Crustacea: Cladocera)

S.S.S. Sarma,^{a,*} Ernesto Mangas-Ramirez,^b and S. Nandini^c

^a *Laboratory of Aquatic Zoology, Division of Research and Postgraduate Studies, Campus Iztacala, National Autonomous University of Mexico, AP314 Iztacala, Tlalnepanitla, Estado de Mexico, CP 54000, Los Reyes, State of Mexico, Mexico*

^b *School of Biology, Benemerita Autonomus University of Puebla. Av. San. Claudio & 14 Sur, CP 72560, University City, Col. San Manuel, Puebla, State of Puebla, Mexico*

^c *Limnology, Conservation and Improvement of Environment, Division of Research and Postgraduate Studies, Campus Iztacala, National Autonomous University of Mexico, AP 314, CP 54000, Los Reyes, Tlalnepanitla, State of Mexico, Mexico*

Received 30 January 2002; accepted 26 June 2002

Abstract

Among the natural abiotic variables affecting the species density and composition of cladocerans, ammonia is important. Using population growth data as tool, we studied the competitive outcome of three cladoceran species (*Ceriodaphnia dubia*, *Daphnia pulex*, and *Moina macrocopa*) grown alone and together at three different concentrations (0, 25, and 100 mg L⁻¹) of ammonia at one density (1 × 10⁶ cells ml⁻¹) of the microalga *Chlorella vulgaris*. Regardless of the presence or absence of competing species, *C. dubia* showed little population growth at 100 mg L⁻¹ of ammonia. At 25 mg L⁻¹ of ammonia, the population density of *C. dubia* increased but the value was much lower than that in control. *D. pulex* was able to grow at the ammonia concentration of 25 mg L⁻¹, comparable to controls. However, at 100 mg L⁻¹ of ammonia, the population declined and more rapidly when competed with other cladocerans. *M. macrocopa* showed decreased population density with increasing ammonia concentration in the medium. This trend was accelerated by the presence of competing cladocerans. *M. macrocopa* was benefited by the presence of *D. pulex* at 0 and 25 mg L⁻¹ of ammonia in the medium. The peak population density of *C. dubia* varied from 0.5 to 9 ind. ml⁻¹, whereas for *D. pulex* and *M. macrocopa*, these values varied from 1 to 3 ind. ml⁻¹ and 7 to 18 ind. ml⁻¹, respectively, depending on the ammonia concentration and the presence of competing species. The rates of population increase per day of *C. dubia*, *D. pulex*, and *M. macrocopa* ranged from -0.12 ± 0.001 to 0.30 ± 0.01, 0.04 ± 0.001 to 0.22 ± 0.002, and 0.201 ± 0.028 to 0.235 ± 0.019, respectively, depending on the ammonia concentration and the presence of competitors. Our study showed that while competition within the chosen cladoceran species caused suppression of one or two competing species, the presence of ammonia expedited this process based on the relative sensitivities of the tested zooplankton.

© 2002 Elsevier Science (USA). All rights reserved.

Keywords: Competition; Zooplankton; Cladocera; Ammonia toxicity; *Ceriodaphnia dubia*; *Daphnia pulex*; *Moina macrocopa*

1. Introduction

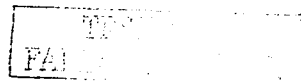
Among freshwater zooplankton, rotifers, cladocerans, and copepods are of greater importance in controlling the abundance and diversity of phytoplankton through their continuous feeding. In terms of biomass, cladocerans often dominate the zooplankton community in freshwater bodies (Downing and Rigler, 1984). Among the natural abiotic variables affecting the species composition of cladocerans, ammonia is important.

Ammonia exists in two forms: free and ionic states. The ionic form is highly soluble in water and is generally considered less toxic to zooplankton (Manning et al., 1996). However, natural levels of ammonia can be sometimes high enough to affect the life history variables such as birth and death rates of cladocerans. Also, agricultural and aquacultural practices could lead to higher concentrations of ammonia to freshwater bodies (Hargreaves, 1998; Wade et al., 1998).

In most water bodies, planktonic cladoceran species could vary from 5 to 15 taxa (Dumont, 1994), while their combined average density could be more than 200 ind. L⁻¹ (Downing and Rigler, 1984). Under

*Corresponding author. Fax: + 52-5-55-6231256.

E-mail address: sarma@servidor.unam.mx (S.S.S. Sarma).



stressful conditions, the diversity of zooplankton decreases and, at the same time, one or two species could reach much higher densities owing to the elimination of sensitive competitors (Fliedner and Klein, 1996; Jak et al., 1998). Competition among cladocerans is generally thought to be food dependent (Greenwood et al., 1999). However, many other factors could be expected to alter this food-dependent competitive outcome. Among them are the natural variables such as dissolved oxygen, temperature, and dissolved ammonia (DeMott, 1989; Stewart and Sutherland, 1993; Achenbach and Lampert, 1997; Hanazato, 1998). In many works, the effects of these variables are studied on individual zooplankton species rather than on mixed cultures (Lampert and Sommer, 1997). Such studies on mixed cladoceran cultures are also needed for predicting the possible competitive outcome. Toxicant effects on the life-history variables of zooplankton which are summed up at population level can be assessed using two common approaches: population dynamics (Halbach, 1979) and life cycle analysis (Klein, 1998). However, studies using population dynamics provide information on the effect of toxicants on individuals of different generations simultaneously occurring in a growing culture.

The aim of this work is to understand the competitive outcome of three cladoceran species grown alone and together at various concentrations of ammonia using population growth data as tool.

2. Materials and methods

In order to study the effect of different levels of ammonia on the competition among cladocerans, we selected three species, namely *Ceriodaphnia dubia* Richard, 1894; *Daphnia pulex* Leydig, 1860; and *Moina macrocopa* Goulden, 1968, all isolated from Lake Valsaquillo (Manuel Avila Camacho) in the State of Puebla (Mexico). Clonal populations were established for each cladoceran species using *Chlorella vulgaris* as the exclusive food. *C. vulgaris* was mass cultured using Bold's basal medium (Borowitzka and Borowitzka, 1988). For routine maintenance and for experiments, we used re-constituted moderate softwater as the medium (EPA medium; Anonymous, 1985). The EPA medium was prepared by dissolving 96 mg NaHCO₃, 60 mg CaSO₄, 60 mg MgSO₄, and 4 mg KCl in 1 L of distilled water. For maintenance of zooplankton in mass cultures and for competition studies, we used the alga harvested during the log phase, centrifuged at 3000 rpm for 5 min, and resuspended in EPA medium. This process eliminated the nutrient-rich medium, including ammonium salts used for alga cultures, which could interfere with growth of the test cladocerans.

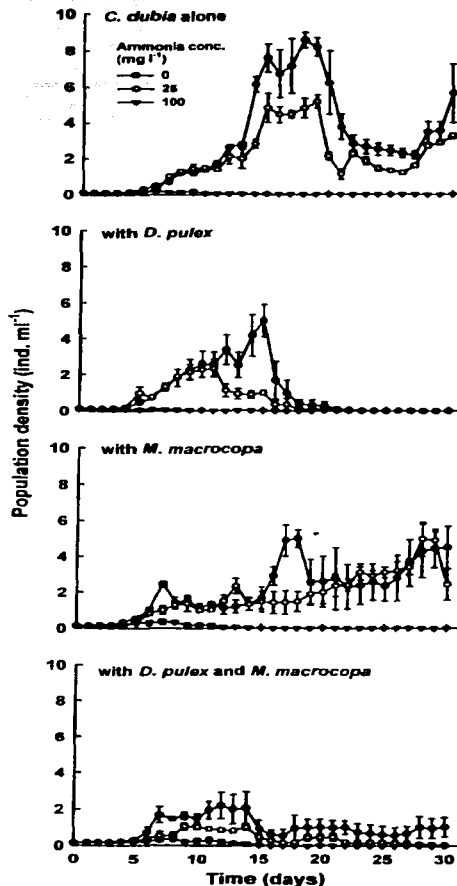
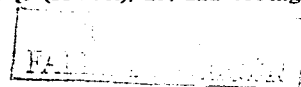


Fig. 1. Population growth of *C. dubia* alone and in competition with *D. pulex* and *M. macrocopa* under different levels of ammonia. Shown are the mean \pm standard error based on three replicates.

Based on previous study (Mangas-Ramirez et al., 2002), we chose three (nominal) concentrations of ammonium chloride [0 (control), 25, and 100 mg L⁻¹]



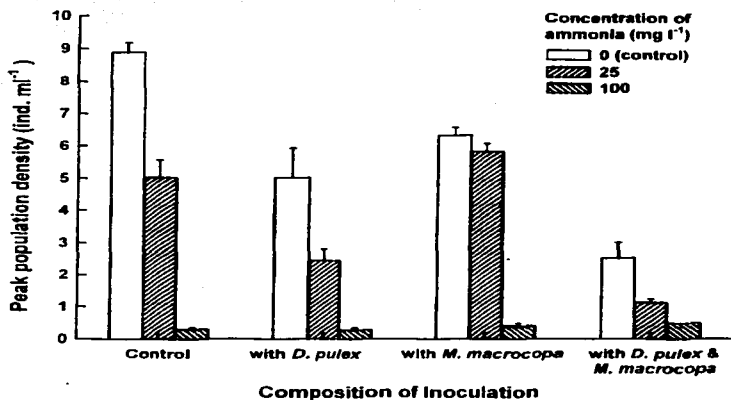


Fig. 2. Peak population density of *C. dubia* grown alone and in competition with *D. pulex* and *M. macrocopa* under different levels of ammonia. Shown are the mean \pm standard error based on three replicates.

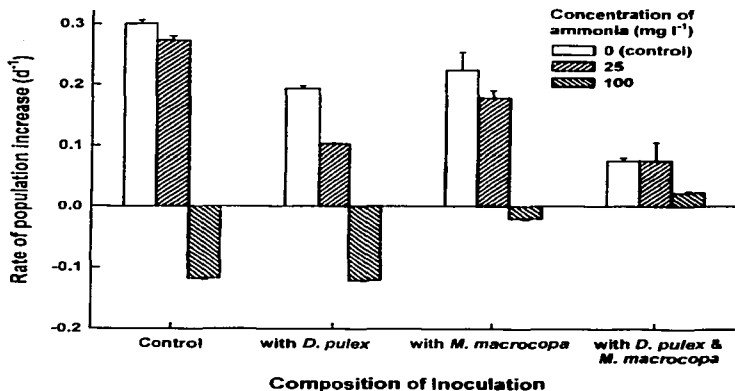


Fig. 3. Rate of population increase of *C. dubia* grown alone and in competition with *D. pulex* and *M. macrocopa* under different levels of ammonia. Shown are the mean \pm standard error based on three replicates.

which could permit population growth of the cladoceran species over a period of time yielding some quantitative data. In order to minimize the effect of overriding factors such as temperature, food level, and photoperiod, all experiments were done at 25°C, under

1×10^6 cells ml⁻¹ of *Chlorella* and 12-h light:12-h dark test conditions. The experimental design consisted of 100 transparent jars of 120 ml capacity. These include the test jars for each cladoceran taxon grown separately and in competition with one and two other species. For

Table 1
Analysis of variance performed on the peak abundance and the rate of population increase of *C. dubia*, *D. pulex*, and *M. macrocopa* in relation to ammonia concentration and competition

| Source | DF | SS | MS | F |
|--|----|--------|--------|-----------|
| <i>Peak population abundance</i> | | | | |
| <i>C. dubia</i> vs ammonia and competition | | | | |
| Ammonia (A) | 2 | 173.44 | 86.72 | 192.69*** |
| Competition (B) | 3 | 68.268 | 22.76 | 50.56*** |
| Interaction (A × B) | 6 | 44.967 | 7.49 | 16.65*** |
| Error | 24 | 10.801 | 0.45 | |
| <i>D. pulex</i> vs ammonia and competition | | | | |
| Ammonia (A) | 2 | 7.208 | 3.6 | 15.74*** |
| Competition (B) | 3 | 2.811 | 0.94 | 4.09* |
| Interaction (A × B) | 6 | 5.123 | 0.85 | 3.73** |
| Error | 24 | 5.496 | 0.23 | |
| <i>M. macrocopa</i> vs ammonia and competition | | | | |
| Ammonia (A) | 2 | 22.517 | 11.26 | 9.18** |
| Competition (B) | 3 | 35.601 | 11.87 | 9.68*** |
| Interaction (A × B) | 6 | 18.469 | 3.08 | 2.51* |
| Error | 24 | 29.424 | 1.23 | |
| <i>Rate of population increase</i> | | | | |
| <i>C. dubia</i> vs ammonia and competition | | | | |
| Ammonia (A) | 2 | 0.513 | 0.2565 | 80.15*** |
| Competition (B) | 3 | 0.047 | 0.0157 | 4.91** |
| Interaction (A × B) | 6 | 0.172 | 0.0287 | 8.97*** |
| Error | 24 | 0.077 | 0.0032 | |
| <i>D. pulex</i> vs ammonia and competition | | | | |
| Ammonia (A) | 2 | 0.073 | 0.0365 | 26.07*** |
| Competition (B) | 3 | 0.068 | 0.0227 | 16.21*** |
| Interaction (A × B) | 6 | 0.024 | 0.0040 | 2.86* |
| Error | 24 | 0.034 | 0.0014 | |
| <i>M. macrocopa</i> vs ammonia and competition | | | | |
| Ammonia (A) | 2 | 0.055 | 0.0275 | 13.75*** |
| Competition (B) | 3 | 0.090 | 0.0300 | 15.00*** |
| Interaction (A × B) | 6 | 0.014 | 0.0023 | 1.15* |
| Error | 24 | 0.049 | 0.0020 | |

*ns, nonsignificant ($P > 0.05$).

** $P < 0.05$.

*** $P < 0.01$.

**** $P < 0.001$.

each treatment we used three replicates. Into each test jar containing 50 ml of EPA medium with 1.0×10^6 cells ml^{-1} of *Chlorella*, we introduced each cladoceran species at an initial density of 0.2 ind. ml^{-1} . We used the same density of each cladoceran species in mixed cultures. Following inoculation of cladocerans, every day we made a total count of all living individuals in each replicate and the medium was changed completely using fresh *Chlorella* at the chosen density and ammonia concentration. The experiments were terminated after 1 month, when most replicates began to decline.

Based on the data collected, we derived the rate of population increase (r) using the following equation (Krebs, 1985): $r = (\ln N_t - \ln N_0) / t$, where N_0 is initial population density and N_t is population density after time t . The r was obtained from a mean of 4–5 values

during the exponential phase of the population growth for each species.

3. Results

Data on the population growth of *C. dubia* alone and in competition with *D. pulex* and *M. macrocopa* at different concentrations of ammonium chloride are presented in Fig. 1. Regardless of the presence or absence of competing species, *C. dubia* showed little population growth at 100 mg L^{-1} of ammonia. At 25 mg L^{-1} of ammonia, *C. dubia* showed increased population growth but the values were much lower than those in control. In the presence of other cladoceran species, population growth was reduced. Thus, when *C. dubia* was in competition with both *D.*

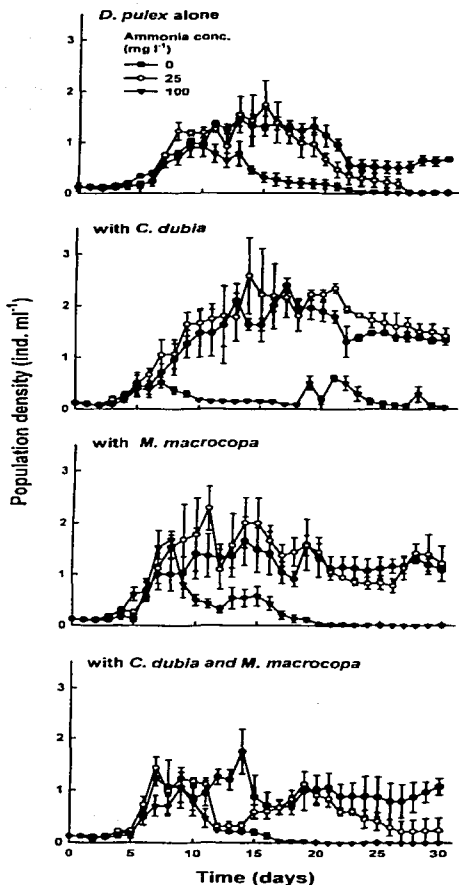


Fig. 4. Population growth of *D. pulex* alone and in competition with *C. dubia* and *M. macrocopa* under different levels of ammonia. Shown are the mean \pm standard error based on three replicates.

pulex and *M. macrocopa*, its population growth was strongly and negatively affected. The peak population density of *C. dubia* was 9 ind. ml⁻¹ in control, while at

100 mg L⁻¹ of ammonia, it was less than 0.5 ind ml⁻¹ (Fig. 2). In the presence of *D. pulex* and under 100 mg L⁻¹, *C. dubia* had the lowest peak population density. The rate of population increase (mean \pm standard error) for *C. dubia* varied from -0.12 ± 0.001 to 30 ± 0.01 per day depending on the ammonia concentration and the presence of competing species (Fig. 3). Statistically, both ammonia concentration and the presence of competing species had a significant effect on the maximal population density and the rate of population increase ($P < 0.01$, ANOVA, F test). The interaction of ammonia level and competition was also significant ($P < 0.001$, Table 1).

Trends in the population growth of *D. pulex* in controls and under different levels of ammonium chloride with and without the presence of other competing species are presented in Fig. 4. In general, regardless of the presence of other competing species, *D. pulex* was able to grow at the ammonia concentration of 25 mg L⁻¹, comparable to controls. However, at 100 mg L⁻¹ of ammonia, the population declined and more rapidly when in competition with *C. dubia* and *M. macrocopa*. The peak population density of *D. pulex* varied from about 3 to 1 ind. ml⁻¹ depending on the ammonia concentration and the presence of other competing cladocerans (Fig. 5). The rate of population increase per day varied from 0.04 ± 0.001 to 0.22 ± 0.002 (Fig. 6). Ammonia concentration and the presence of other cladoceran species had a significant effect on both the peak population abundance and the rate of population increase. The interaction of toxicant concentration and competition was also significant.

Population growth of *M. macrocopa* in relation to ammonia levels and the competition from other two cladoceran species is shown in Fig. 7. In general, *M. macrocopa* showed decreased population with increasing ammonia concentration in the medium. This trend was accelerated by the presence of other competing cladocerans. *M. macrocopa* was benefited by the presence of *D. pulex* at 0 and 25 mg L⁻¹ concentration of ammonia in the medium. The time required to reach peak population density of *M. macrocopa* was shortest in the presence of *D. pulex* (10 days). The maximal population density reached by *M. macrocopa* varied from 7 to 18 ind. ml⁻¹, depending on the ammonia concentration and the presence of *C. dubia* and/or *D. pulex* (Fig. 8). The rate of population increase per day varied from 0.201 ± 0.028 to 0.235 ± 0.019 depending the ammonia concentration in the medium (Fig. 9).

4. Discussion

Occurrence of more than three species of cladocerans in the plankton of freshwater is not uncommon in tropical and subtropical waters (Dumont, 1994). The

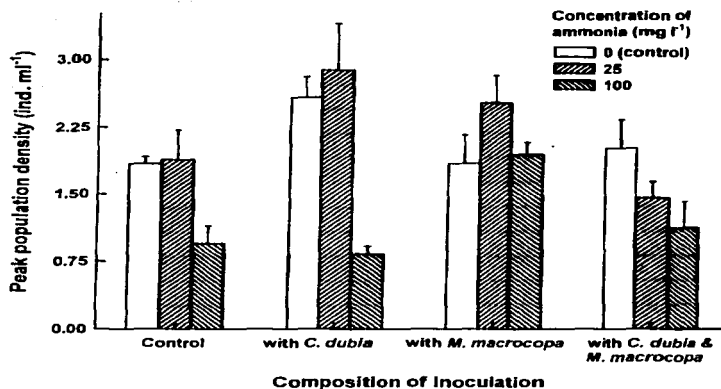


Fig. 5. Peak population density of *D. pulex* grown alone and in competition with *C. dubia* and *M. macrocopa* under different levels of ammonia. Shown are the mean \pm standard error based on three replicates.

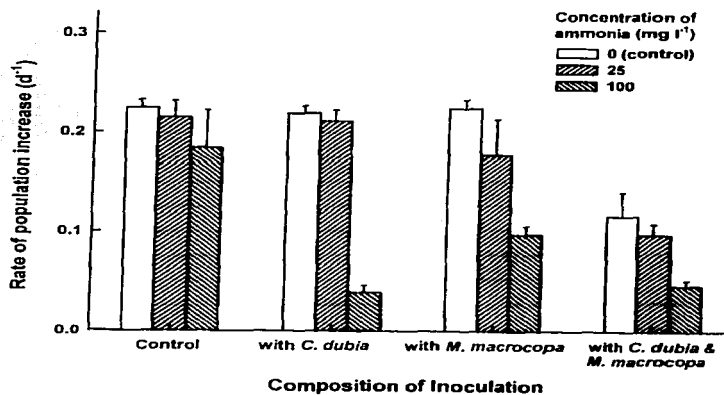


Fig. 6. Rate of population increase of *D. pulex* grown alone and in competition with *C. dubia* and *M. macrocopa* under different levels of ammonia. Shown are the mean \pm standard error based on three replicates.

existence of competition among cladocerans so far has been documented mostly with reference to only two taxa at a time under laboratory conditions (e.g., Matveev and Gabriel, 1994). Thus, the possible outcome of competi-

tion when more than two species simultaneously occur, remains as a conjecture. In the present work, we analyzed the outcome of competition using three cladoceran species in different combinations. Thus,

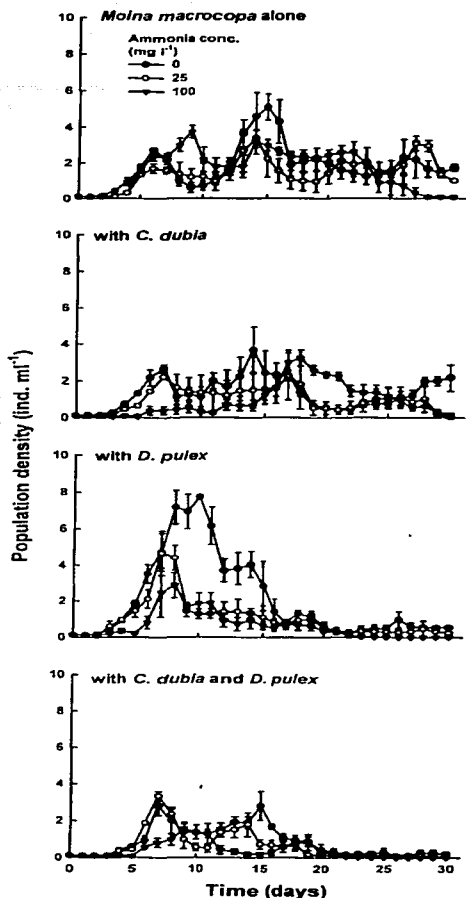


Fig. 7. Population growth of *M. macrocopa* alone and in competition with *C. dubia* and *D. pulex* under different levels of ammonia. Shown are the mean \pm standard error based on three replicates.

regardless of the concentration of ammonia, population density and growth rate of each of the cladoceran species was affected by the presence of other taxa.

The outcome of competition in zooplankton is known to depend on several factors such as temperature, salinity, food concentration, and rate of population increase of competing species (Lampert and Sommer, 1997). Toxicants also modify the outcome of competition. For example, Ihanazato and Yasuno (1990) have shown that depending on the sensitivity of the competing species to the insecticide carbaryl, *Bosmina fatalis* predominated over the species of *Daphnia* in experimental ponds. The use of ammonia levels in the present study represents a natural variable occurring in all water bodies in certain months of the year (Hutchinson, 1967). Although ammonia toxicity is known to affect diverse taxa of cladocerans such as *Ceriodaphnia* (Andersen and Buckley, 1998) and *Daphnia* (Adamsson et al., 1998), the impact of competitive pressure among the zooplankton was rarely considered. From this study, it is evident that *C. dubia* was strongly affected by the presence of *D. pulex* and *M. macrocopa* independent of ammonia level in the medium. When the concentration of ammonia was as 25 mg L^{-1} , *C. dubia* could grow but in the presence of *D. pulex* or *M. macrocopa*, but this growth was much lower (Fig. 1).

The maximal population densities reached by each of the species observed in this study are in general agreement with the range documented for cladocerans (Alva-Martinez et al., 2001). Of the three species used here, *D. pulex* is the largest (body length = $2413 \pm 129 \mu\text{m}$) while *C. dubia* is the smallest ($951 \pm 57 \mu\text{m}$) and *M. macrocopa* is of an intermediate size ($1286 \pm 49 \mu\text{m}$) (Alva-Martinez et al., 2001). Under a specified food level, cladoceran taxon with smaller body size reaches higher numerical abundance than a larger species (Downing and Rigler, 1984). This is evident in the present study also, where in controls *D. pulex* could reach a peak population density of about 3 ind. ml^{-1} while *M. macrocopa* reached more than twice this density. The rate of population increase recorded for the cladoceran taxa in this was consistent with the data available in literature where most species in general have r values lower than 0.2 per day (Nandini and Sarma, 2000). Our present data fall in this range. *Moina* usually has the r values higher than many other cladocerans (Kilham et al., 1997; Nandini and Rao, 1998; Mangas-Ramirez et al., 2002). In the present study too, *M. macrocopa* had the highest growth rates (Fig. 9).

In conclusion, our results showed that cladoceran species sensitive to ammonia concentration were eliminated from competition by other less sensitive taxa when exposed to ammonium chloride at 25 or 100 mg L^{-1} . While competition within the tested zooplankton species caused suppression of one or more competing species, the presence of ammonia expedited this process based on the relative sensitivities of the cladocerans.

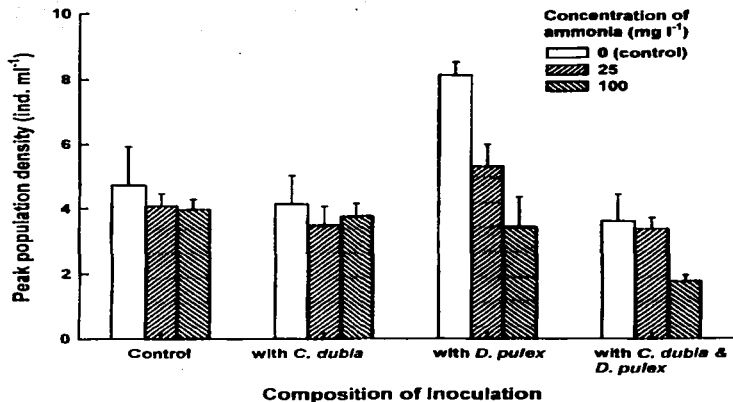


Fig. 8. Peak population density of *M. macrocopa* grown alone and in competition with *C. dubia* and *D. pulex* under different levels of ammonia. Shown are the mean \pm standard error based on three replicates.

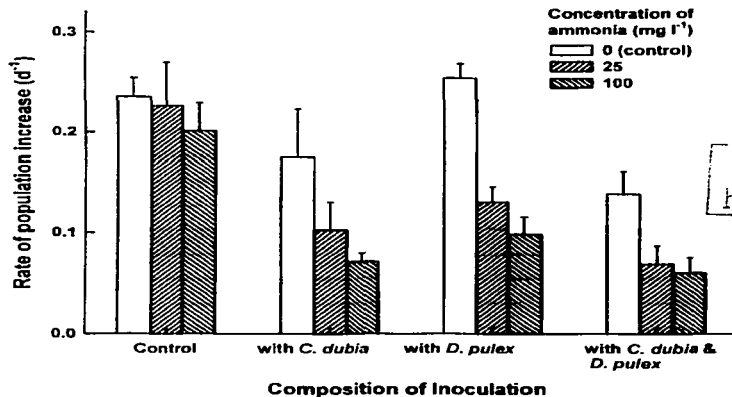


Fig. 9. Rate of population increase of *M. macrocopa* grown alone and in competition with *C. dubia* and *D. pulex* under different levels of ammonia. Shown are the mean \pm standard error based on three replicates.

Acknowledgments

E.M. received a scholarship from CONACyT (Ref. 144644). S.S.S. and S.N. thank The National System of Investigators (SNI Ref. 18723 & 20520) for support.

References

- Achenbach, L., Lampert, W., 1997. Effects of elevated temperatures on threshold food concentrations and possible competitive abilities of differently sized cladoceran species. *Oikos* 79, 469–476.

- Adamsson, M., Dave, G., Forsberg, L., Guterstam, B., 1998. Toxicity identification evaluation of ammonia, nitrite and heavy metals at the Stensund Wastewater Aquaculture plant, Sweden. *Water Sci. Technol.* 38, 151–157.
- Alva-Martinez, A.F., Sarma, S.S.S., Nandini, S., 2001. Comparative population dynamics of three cladoceran species (Cladocera) in relation to different levels of *Chlorella vulgaris* and *Microcystis aeruginosa*. *Crustaceana* 74, 749–764.
- Andersen, H.B., Buckley, J.A., 1998. Acute toxicity of ammonia to *Ceriodaphnia dubia* and a procedure to improve control survival. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 61, 116–122.
- Anonymous, 1985. Methods of measuring the acute toxicity of effluents to freshwater and marine organisms. EPA/600/4-85/013, US Environment Protection Agency, Washington, DC.
- Borowitzka, M.A., Borowitzka, L.J., 1988. *Micro-algal Biotechnology*. Cambridge University Press, London.
- DeMott, W.R., 1989. The role of competition in zooplankton succession. In: Sommer, U. (Ed.), *Plankton Ecology: Succession in Plankton Communities*. Springer, New York, pp. 195–252.
- Downing, J.A., Rigler, F.H. (Eds.), 1984. *IBP Handbook 17: A Manual for the Methods of Assessment of Secondary Productivity in Fresh Waters*. 2nd Edition. Blackwell, London.
- Dumont, H.J., 1994. On the diversity of the cladocera in the tropics. *Hydrobiologia* 272, 27–38.
- Fliedner, A., Klein, W., 1996. Effects of lindane on the planktonic community in freshwater microcosms. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 33, 228–235.
- Greenwood, T.L., Green, J.D., Hicks, B.J., Chapman, M.A., 1999. Seasonal abundance of small cladocerans in Lake Mangakaware, Waikato, New Zealand. *New Zealand J. Mar. Freshw. Res.* 33, 399–415.
- Halbach, U., 1979. Introductory remarks: strategies in population research: exemplified by rotifer population dynamics. *Fortschr. Zool.* 25, 1–27.
- Ilanazato, T., 1998. Response of a zooplankton community to insecticide application in experimental ponds: a review and the implications of the effects of chemicals on the structure and functioning of freshwater communities. *Environ. Pollut.* 101, 361–373.
- Ilanazato, T., Yasuno, M., 1990. Influence of time of application of an insecticide on recovery patterns of a zooplankton community in experimental ponds. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 19, 77–83.
- Hargreaves, J.A., 1998. Nitrogen biogeochemistry of aquaculture ponds. *Aquaculture* 166, 181–212.
- Hutchinson, G.E., 1967. *A treatise on Limnology*. 2. Introduction to lake biology and limnoplankton. Wiley, New York.
- Jak, R.C., Maas, J.L., Scholten, M.C.Th., 1998. Ecotoxicity of 3,4-dichloroaniline in enclosed freshwater plankton communities at different nutrient levels. *Ecotoxicology* 7, 49–60.
- Kilham, S.S., Kreeger, D.A., Goulden, C.E., Lynn, S.G., 1997. Effects of algal food quality on fecundity and population growth rates of *Daphnia*. *Freshwater Biol.* 38, 639–647.
- Klein, W., 1998. The ecotoxicological assessment of pollutants: prospective and retrospective. *S. Afr. J. Sci.* 94, 411–414.
- Krebs, C.J., 1985. *Ecology: the Experimental Analysis of Distribution and Abundance*, 3rd Edition. Harper & Row, New York.
- Lampert, W., Sommer, U., 1997. *Limnology: the Ecology of Lakes and Streams*. Oxford University Press, New York.
- Mangas-Ramirez, E., Sarma, S.S.S., Nandini, S., 2002. Combined effects of algal (*Chlorella vulgaris*) density and ammonia concentration on the population dynamics of *Ceriodaphnia dubia* and *Moina macrocopa* (Cladocera). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 51, 216–222.
- Manning, T.M., Wilson, S.P., Chapman, J.C., 1996. Toxicity of chlorine and other chlorinated compounds to some Australian aquatic organisms. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 56, 971–976.
- Matveev, V., Gabriel, W., 1994. Competitive exclusion in cladocera through elevated mortality of adults. *J. Plankton Res.* 16, 1083–1094.
- Nandini, S., Rao, T.R., 1998. Somatic and population growth in selected cladoceran and rotifer species offered the cyanobacterium *Asterocystis aeruginosa* as food. *Aquat. Ecol.* 31, 283–298.
- Nandini, S., Sarma, S.S.S., 2000. Lifetable demography of four cladoceran species in relation to algal food (*Chlorella vulgaris*) density. *Hydrobiologia* 435, 117–126.
- Stewart, K.M., Sutherland, J.W., 1993. Zooplankton migration in three lakes of western New York. *Int. Rev. ges. Hydrobiol.* 78, 21–37.
- Wade, A., Maher, B., Lawrence, I., Davis, N., Zoppou, C., Bell, C., 1998. Estimating the allowable ammonia concentrations in wastewater treatment plant discharge to ensure protection of aquatic biota. *Environ. Technol.* 19, 749–754.

