

CHIRONOMUS CALLIGRAPHUS GOELDI Y MOINA MACROCOPA (SARS) COMO HERRAMIENTAS ECOTOXICOLÓGICAS PARA LA EVALUACION DEL LINDANO Y CLORPIRIFOS

Chironomus calligraphus Goeldi and *Moina macrocopa* (Sars) as Ecotoxicological tools to evaluate Lindane and Chlorpyrifos

JOSE A. IANNAONE¹ & LORENA ALVARIÑO

RESUMEN

La evaluación de riesgos ambientales de productos fitosanitarios es un componente importante en los estudios de impacto ambiental en el sector agrícola. Se evaluó la ecotoxicidad de los plaguicidas de suelo Lindano y Clorpirifos sobre dos invertebrados: la lombriz roja *Chironomus calligraphus* y la pulga del agua *Moina macrocopa*. En ambos invertebrados se evaluaron efectos letales: *C. calligraphus* (CL₅₀ 48 h) y en *M. macrocopa* (CL₅₀ 48 h). *Moina* es más sensible que *Chironomus* al Clorpirifos. Los dos bioensayos revelaron una mayor toxicidad por el organofosforado Clorpirifos. Se analizan las perspectivas de empleo en el Perú de estas herramientas ecotoxicológicas para la evaluación de riesgos ambientales por productos fitosanitarios.

ABSTRACT

The environmental risk assessment of phytosanitary products is a main subject in studies of environmental impact assessment in agriculture. Ecotoxicity of the soil pesticides Lindane and Chlorpyrifos were performed with two invertebrates: the bloodworm *Chironomus calligraphus* and the water flea *Moina macrocopa*. Lethal effects were assayed in both invertebrates *C. calligraphus* (LC₅₀ 48 h) and *M. macrocopa* (LC₅₀ 48 h). *Moina* was more sensitive than *Chironomus* to Chlorpyrifos. All bioassays showed a higher toxicity for the organophosphate Chlorpyrifos. The perspectives of use these ecotoxicological tools in Peru for environmental risk assessment of phytosanitary products was analyzed.

KEYWORDS. Ecotoxicological assay, ecological risk assessment, insect, crustacea, agrochemistry, Lindane, Chlorpyrifos.

INTRODUCCION

El término biodiversidad, usado por Wilson (1988) es una contracción de diversidad biológica, que representa la diversidad de vida en todos sus

niveles incluyendo el genético, de especies y de ecosistemas. En la Convención de Biodiversidad realizada en Río de Janeiro, Brazil en junio de 1992 con participación de más de 156 países, se señaló que debido a la contaminación mundial, entre otros factores, la proporción de especies que se extinguen anualmente es de 17 500 a 35 000 (Stork, 1993).

Cada año se aplican aproximadamente tres millones de toneladas de plaguicidas en todo el orbe y las plagas pueden destruir el 40% de la producción agrícola mundial (Pimentel, 1998). Se considera que si no se aplicara plaguicidas químicos, las

¹Autor al que debe dirigirse toda correspondencia. Laboratorio de Ecofisiología, Área de Biodiversidad Animal. Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas, Universidad Nacional Federico Villarreal. Lima-Perú. Calle San Marcos 383, Pueblo Libre, Lima 21- Perú. Telefax 4600930. e-mail: joselorena12@terra.com.pe

plagas destruirían más del 50-60% de la producción agrícola. Además, menos del 0,1% de los plaguicidas aplicados anualmente, llegan a las plagas objetivos del control; se cree que muchos de los organismos invertebrados componentes de la biodiversidad animal, no destinatarios del control químico, son adversamente afectados por aproximadamente el 99% del plaguicida restante (Pimentel, 1998).

Del enorme número de estudios de efectos de plaguicidas, sólo una minoría han sido orientados a los ambientes acuáticos. Los campos agrícolas terrestres, en los cuales son aplicados regularmente, es donde se observan los efectos más evidentes. Sin embargo, muchos químicos agrícolas persistentes, alcanzan a los cuerpos de agua, siendo transportados a todos los niveles de la pirámide trófica (Heckmann, 1982). Los plaguicidas en los ecosistemas acuáticos pueden matar a peces susceptibles, eliminar insectos y otros invertebrados, o reducir los niveles de oxígeno disuelto en el agua por la descomposición de plantas acuáticas (Pimentel, 1998). Gran cantidad de literatura sobre la contaminación accidental de cursos de agua con plaguicidas, muestra la dominancia de estudios con vertebrados, sin embargo, escasa información es disponible sobre fauna de invertebrados. Los artrópodos son uno de los grupos más adversamente afectados (Hart, 1997).

El Reglamento Peruano sobre el registro, comercialización y control de plaguicidas agrícolas y sustancias afines (Decreto Supremo N 15-95-AG) en su artículo 18 inciso f, indica que para el registro de un plaguicida, se requiere antecedentes y datos de ensayos toxicológicos y ambientales, que demuestren no ser peligroso para la salud humana, animal y el medio ambiente (SENASA, 1995).

De esta forma, es importante determinar el nivel de peligrosidad de los plaguicidas Lindano y Clorpirifos sobre el ecosistema epicontinental acuático utilizando biosensores o bioensayos (Fernandez-Casalderry *et al.*, 1992). Entre éstos, a los ensayos de segunda generación, conocidos en el Perú, como la lombriz roja de agua dulce *Chironomus calligraphus* Goeldi y la pulga del agua *Moina macrocopa* (Sars) (Wong *et al.*, 1995; Iannacone & Alvaríño, 1998). La determinación de la toxicidad de estos dos plaguicidas mediante herramientas ecotoxicológicas permitirá contar con ensayos sencillos y prácticos para catalogar diferentes muestras ambientales y se contribuirá a tomar medidas para disminuir la problemática del uso de agroquímicos (Bodestein, 1972; Moore *et al.*, 1998).

Los objetivos específicos planteados en la presente investigación fueron: 1) determinar la ecotoxicidad del lindano y clorpirifos mediante el bioensayo con *Chironomus calligraphus* y *Moina macrocopa* a 48 h de exposición y 2) proponer un protocolo estandarizado de bioensayo con *Chironomus* y *Moina* para evaluar ecotoxicológicamente agroquímicos.

MATERIALES Y METODOS

Chironomus calligraphus

Los especímenes se identificaron a nivel genérico con las larvas, pupas y adultos, siguiendo las claves de Merritt y Cummins (1984). La identificación específica se realizó a nivel larval morfológica y citogenéticamente por el Prof. Dr. Wolfgang Wuelker, Institut fuer Biologie I (Zoologie), Universidad de Freiburg, como *Chironomus calligraphus* Goeldi. Series de especímenes se depositaron en el Museo de Entomología de la Universidad Nacional Agraria La Molina (UNALM). Las masas de huevos de *Chironomus* se colectaron en la laguna secundaria de 1,84 ha de la Planta de Aguas Residuales de San Juan de Miraflores, ubicado a 14 km al sur de la ciudad de Lima, Perú y se colocaron en un medio con hojas de cereal "Cereal leaves"®. Las larvas recién eclosionadas se alimentaron dos veces por semana y se mantuvieron a temperatura de 25°C y oxígeno disuelto de 7 mg/l. Sobre el envase de cría se colocó una rejilla para retener los adultos de los mosquitos, evitando su salida (APHA 1995). Cada experimento se inició con larvas de primer estadio con menos de 24 h de haber eclosionado de los huevos. Diez larvas se distribuyeron al azar para cada concentración en cada una de las cuatro repeticiones. Las larvas no se alimentaron durante los ensayos estáticos, es decir sin renovación de la solución y en oscuridad, para evitar la degradabilidad de los plaguicidas. Se consideraron muertas aquellas larvas que no efectuaban ningún movimiento al ser pinchadas con un alfiler entomológico, bajo observación con estereoscopio durante 15 segundos (Iannacone & Alvaríño, 1998). Las lecturas se realizaron a las 48 h de exposición. El agua de dilución a usarse para cada prueba de toxicidad se preparó a base de una solución amortiguadora (Buffer-fosfato = pH 7) (APHA, 1995). Cada ensayo fue realizado por triplicado con el fin de obtener significancia estadística.

Moina macrocopa

Los especímenes adultos se identificaron a nivel de especie usando las claves de Streble & Krauter (1987). La identificación como *Moina macrocopa* (Sars) la realizó la hidrobióloga Lorena Alvaríno Flores del Laboratorio de Ecofisiología de la Universidad Nacional Federico Villarreal. Hembras ovíparas se colectaron en la misma localidad que las masas de *Chironomus*. Se cultivaron en un medio para dafnidos a base de 0,5 g hojas de cereal ® y 10g de hojuelas para alimento de peces en 250 ml de agua desionizada, mezclado vigorosamente en un vortex y filtrado posteriormente con una malla de 60µ y posteriormente se completó con 50 ml adicionales de agua. La suspensión se refrigeró. Los cultivos masales se realizaron en envases de plástico de 4 l y los cultivos individuales para la obtención de neonatos en vasos de plástico de 100 ml de capacidad, siendo alimentados con el medio para dafnidos a 0,2 ml/semana/100ml a una temperatura de 25°C siguiendo las recomendaciones de APHA (1995). Los experimentos se realizaron con cohortes con menos de 24h que se extrajeron de hembras partenogénicas ovíparas de los frascos de cultivo individuales. Los juveniles neonatos no se alimentaron durante la prueba. Los neonatos se consideraron muertos si no producían ningún latido cardíaco durante 10 segundos de observación. El agua de dilución usada para cada prueba de toxicidad se preparó en base a una solución amortiguadora (Buffer-fosfato=pH 7) (APHA, 1995). Para cada prueba se emplearon 240 individuos. Se condujeron ensayos de Toxicidad Aguda estáticos, en oscuridad con 48 h de exposición a Lindano y Clorpirifos. Cada ensayo fue realizado por triplicado con el fin de obtener significancia estadística.

Parámetros físico-Químicos del agua

El oxígeno disuelto se determinó usando el método Winkler al inicio del ensayo (APHA, 1995) y el pH se midió en dos repeticiones al inicio de los ensayos, estandarizándose a 7±0,5. El agua desionizada empleada en los cultivos y en los bioensayos presentó las siguientes características físicas (pH= 7,12 y conductividad eléctrica= 70µmhos/cm).

Sustancias químicas

Los plaguicidas Lindano 1,5% PS (Kuro wañuchi®) y Clorpirifos 2,5 PS (Lorsban®) se

disolvieron al 1% en agua destilada, usando como solvente acetona (0,5% v/v), a una concentración que no causó efecto en los resultados de los bioensayos (Calleja & Persoone, 1993). A partir de la solución madre se hicieron las diluciones respectivas. Para el Lindano, se emplearon las siguientes concentraciones en orden creciente: 3,84 µg/l, 9,6 µg/l, 24 µg/l, 60 µg/l y 150 µg/l y para el Clorpirifos, se utilizaron las siguientes concentraciones en orden creciente: 3,2 µg/l, 8µg/l, 20µg/l, 50µg/l y 125µg/l. El factor de dilución empleado en ambos casos fue de 0,4.

Diseño experimental y tratamiento estadístico

Las pruebas de toxicidad aguda se realizaron en cuatro repeticiones con cinco concentraciones nominales más el control en un diseño en Bloque Completamente Randomizado (BCR): 6 x 4. La eficacia de los tratamientos se evaluaron a través de un ANDEVA, previa transformación de los datos a raíz cuadrada del arcoseno. En el caso de existir diferencias significativas entre las repeticiones se realizó una prueba de Tukey. La CL₅₀ y sus límites de confianza al 95% se calcularon usando Próbit, un programa computarizado de la EPA (E.P.A., Environmental Protection Agency de los E.E.U.U, versión 1,5). El modelo de regresión fue verificado usando el estadístico Chi-cuadrado. Los resultados de las repeticiones se sumaron. Para determinar si dos CL₅₀s son estadísticamente iguales se usó la técnica de superposición de límites de confianza (APHA, 1995).

RESULTADOS

Los resultados, para ambos ensayos ecotoxicológicos, muestran que el Clorpirifos es más tóxico que el Lindano. En ambos agroquímicos, se observó, que *M. macrocopa* es más sensible que *C. calligraphus*. Para el caso de los ensayos realizados con la lombriz roja *C. calligraphus* con Lindano y Clorpirifos a 48 h de exposición, se obtuvieron valores de CL₅₀ de 25,73±3,92 µg/l y 15,56±4,06 µg/l respectivamente (Figura 1). Las CL₅₀ y sus respectivos límites de confianza del Lindano y Clorpirifos frente a la lombriz roja, muestran por la técnica de superposición de límites de confianza que no existen diferencias significativas entre ambos agroquímicos (P> 0,05) (APHA, 1995). Los ensayos realizados con la pulga del agua *M. macrocopa* con Lindano y Clorpirifos a 48 h de

exposición, obtuvieron valores de CL_{50} de $26,50 \pm 6,99 \mu\text{g/l}$ y $10,48 \pm 1,60 \mu\text{g/l}$ respectivamente. En el caso de *Moina* se observó que el Clorpirifos a 48 h de exposición resultó ser más tóxico que el Lindano en 2,5 veces (Figura 1). Las CL_{50} y sus respectivos

límites de confianza del Lindano y Clorpirifos frente a la pulga del agua, muestran por la técnica de superposición de límites de confianza que existen diferencias significativas entre ambos agroquímicos ($P < 0,05$). La figura 2 muestra el efecto del

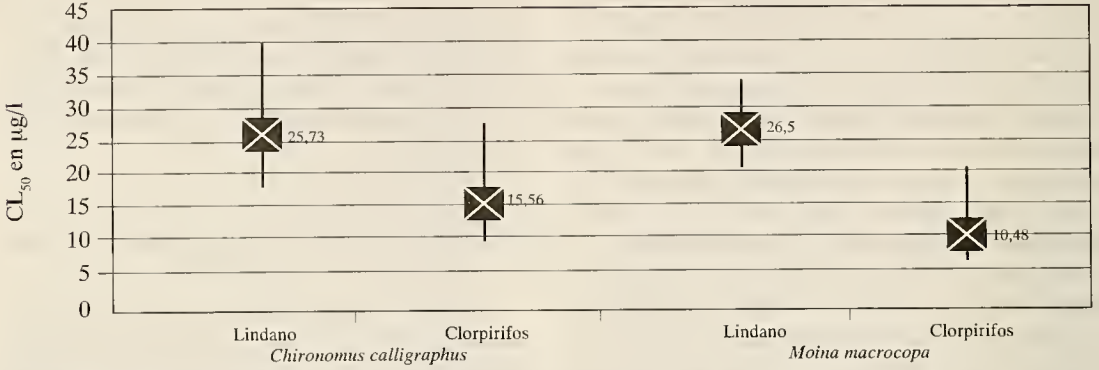


FIGURA 1. CL_{50} y sus límites de confianza de *Chironomus calligraphus* y *Moina macrocopa* después de 48 h de exposición a Lindano y Clorpirifos.

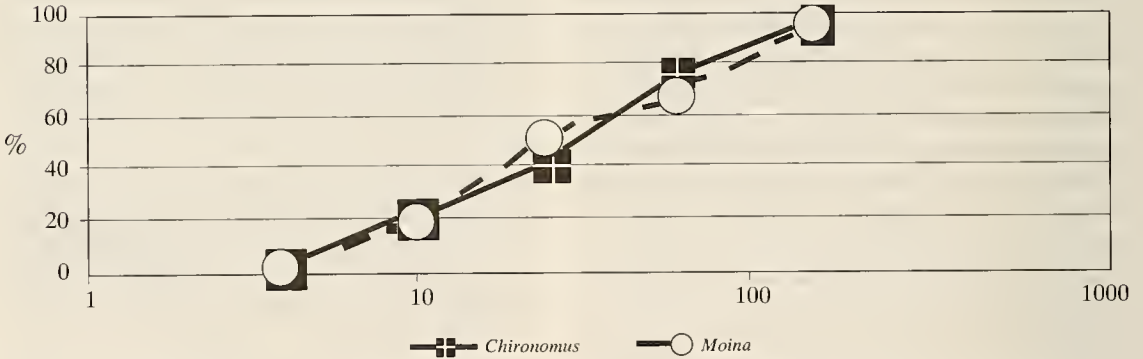


FIGURA 2. Mortalidad de *Chironomus calligraphus* y *Moina macrocopa* después de 48 h de exposición a Lindano ($\mu\text{g/l}$).

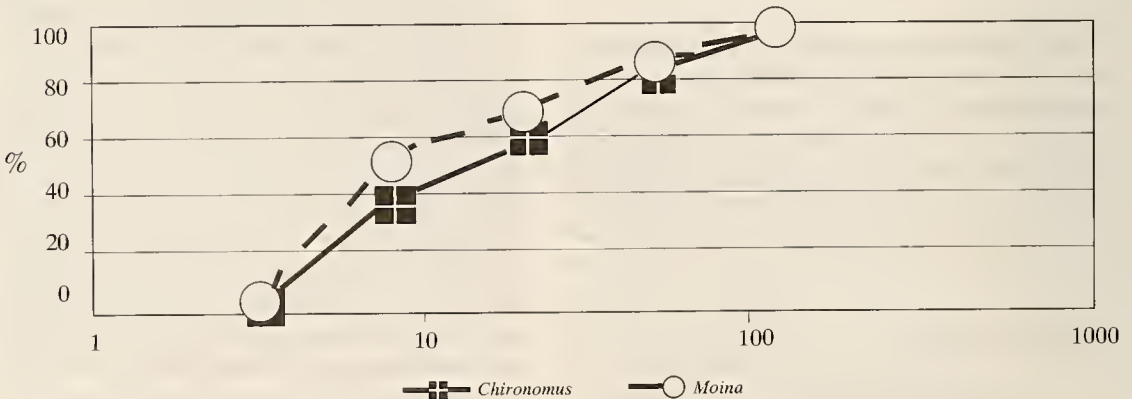


FIGURA 3. Mortalidad de *Chironomus calligraphus* y *Moina macrocopa* después de 48 h de exposición a Clorpirifos ($\mu\text{g/l}$).

Lindano en el porcentaje de mortalidad de *C. calligraphus* y *M. macrocopa* a 48 h de exposición. A 3,84 µg/L de Lindano se observó un 0,93% y un 0,83% de mortalidad para *C. calligraphus* y *M. macrocopa*. La figura 3 muestra el efecto del Clorpirifos en el porcentaje de mortalidad de *C. calligraphus* y de *M. macrocopa* a 48 h de exposición respectivamente. A 3,2 µg/L de Clorpirifos se puede observar un 0,83% y un 1,87% de mortalidad para *C. calligraphus* y *M. macrocopa*.

DISCUSION

La amplia diversidad de insectos acuáticos, su abundancia en ríos no contaminados, su sensibilidad a bajas concentraciones de contaminantes y su fácil mantenimiento bajo condiciones de laboratorio, hace de estos invertebrados una herramienta útil en ecotoxicología acuática. Las sustancias químicas tóxicas, pueden interferir en la supervivencia, crecimiento, reproducción, emergencia y metabolismo de los insectos acuáticos (Snedel *et al.*, 1994). Varios ordenes de insectos, han sido sugeridos por su sensibilidad a diversas sustancias químicas como plecoptera, ephemeroptera, trichoptera y diptera, principalmente de la familia chironomidae (APHA, 1995). Merritt & Cummins (1984) señalan al ephemeroptero *Hexagenia limbata* Serville y los dipteros *Chironomus tentans* Fabricius y *Chironomus riparius* Meigen para su empleo en bioensayos. Nosotros sugerimos a una especie Neotropical *C. calligraphus*. Algunas especies de *Chironomus* son muy sensibles a varios plaguicidas contaminantes del medio acuático y a diferencia de *H. limbata* son más fácilmente cultivables (Phipps *et al.*, 1995). Este género ha sido ampliamente usado en pruebas de toxicidad aguda de 48 h y en ensayos crónicos a 29 días de exposición (Kosalwat & Knight, 1987 a,b). En nuestro caso empleamos el tiempo de exposición de 48h. Sin embargo el estado larval es la etapa más sensible a sustancias tóxicas del ciclo vital de *Chironomus*, y el primer estadio larval zooplanctónico es la fase más sensible para *Chironomus decorus* Meigen, *C. tentans* y *C. riparius* (Van Wijngaarden *et al.*, 1996b). Igualmente empleamos al primer estadio larval de *C. calligraphus*, debido a su mayor sensibilidad a tóxicos ambientales (Iannacone & Alvarino, 1998). Los quironómidos, podría esperarse que sean ligeramente más resistentes a diversos tóxicos que algunas otras especies zooplanctónicas estandarizadas por residir en aguas relativamente contaminadas y por presentar el resto

de la fase larval bentónica (Cairns *et al.*, 1984). Esto explicaría por que *C. calligraphus* es ligeramente menos sensible que *M. macrocopa*, al ser esta última permanentemente planctónica.

Los microcrustáceos como los camarones salinos *Streptocephalus rubricaudatus* Frouenfeld, *Streptocephalus texanus* Baird, *Streptocephalus proboscideus* Frouenfeld y *Artemia salina* Linne y la pulga del agua *Daphnia magna* Strauss, se han usado frecuentemente en pruebas de toxicidad aguda con plaguicidas. Durante la exposición al tóxico, mayormente sus formas inmaduras no son alimentadas. La lectura de su mortalidad se realiza a las 24 h y 48 h de exposición (Crisinel *et al.* 1994). Las pulgas del agua *Ceriodaphnia dubia* Richard (Taylor 1993) y *M. macrocopa* (Martinez *et al.*, 1997), han sido también utilizadas en ensayos de toxicidad crónica. En los experimentos se usan exclusivamente individuos jóvenes con menos de 24 h de nacidos. Estas especies, es posible encontrarlas en bioensayos comerciales de rápida aplicación. Sin embargo la especie más usada es *D. magna* (Kungolos & Aoyama, 1993). Nosotros decidimos utilizar a *M. macrocopa*, especie adaptada a la región neotropical. Existen diferentes criterios de lectura para reconocer a los especímenes muertos como: la carencia total de movimiento durante 10 segundos de observación bajo el microscopio de disección; la incapacidad para poder mover las antenas después de una ligera agitación del agua y no poder nadar después de 15 segundos de la agitación del envase experimental (Kiviranta *et al.*, 1991). En nuestro caso la lectura final, se hizo cuando los neonatos de *M. macrocopa* no producían ningún latido cardíaco durante 10 segundos de observación.

Los plaguicidas como el Lindano y el Clorpirifos afectan a las comunidades biológicas acuáticas que no son los organismos destinatarios, siendo los invertebrados, mucho más sensibles (Crane *et al.*, 1995; Barron & Woodburn, 1995; Fliedner, 1996). Nuestros resultados concuerdan con esta afirmación, pues ambas especies de invertebrados, son muy sensibles. Green *et al.* (1986), al estudiar la toxicidad aguda del Lindano sobre 10 invertebrados dulceacuícolas, muestra que los valores de toxicidad aguda para estos invertebrados varían de 33 µg/l para el insecto díptero *Chaoborus* spp. a 3 300 µg/l para el molusco *Lymnaea stagnalis* Linné.

El ensayo con partículas mitocondriales muestra que el Clorpirifos es más tóxico que el Lindano (Knobeloch *et al.*, 1990), en nuestro caso los resultados fueron semejantes. Los resultados obtenidos,

conducen con los resultados de los ensayos con el nemátodo *Panagrellus redivivus* Pat y con la microalga *Chlorella vulgaris* Linne, pero no con el ensayo con el género *Allium* (Iannacone, 1998).

Las dos especies de invertebrados, la pulga del agua y la lombriz roja empleadas a 48 h de exposición fueron más sensibles a la toxicidad aguda del Lindano en términos de CL_{50} que los microcrustáceos *D. magna* (1 220 $\mu\text{g/l}$ a 24, 850 $\mu\text{g/l}$ a 48 h); *S. rubricaudatus* (10 000 mg/l a 24 h); *S. texanus* (10 000 $\mu\text{g/l}$ a 24 h); *A. salina* (10 000 $\mu\text{g/l}$ a 24 h) y el rotífero *Brachionus calyciflorus* Pallas (7 660 $\mu\text{g/l}$ a 24 h) (Crisinel *et al.*, 1994).

Los valores de toxicidad crónica del Lindano para invertebrados sobre la base de la NOEC (Concentración de efectos No observables) variaron entre 0,13 $\mu\text{g/l}$ para *C. riparius* a 19 $\mu\text{g/l}$ para la supervivencia y reproducción de *D. magna*. (Taylor *et al.* 1991). Maund *et al.* (1991) señalan valores de NOEC en un rango de 0,13 a 0,8 $\mu\text{g/l}$ para larvas de insectos acuáticos expuestas al Lindano. Taylor *et al.* (1993) evalúan el impacto del Lindano (gamma-hexaclorociclohexano) en el ciclo biológico del insecto *C. riparius*, tomando en cuenta parámetros como eclosión de huevos, sobrevivencia y desarrollo a través de los cuatro estadios larvales; pupación y emergencia de adultos, todos los cuales son indicadores de toxicidad crónica, concluyendo que valores de 9,9 $\mu\text{g/l}$ de Lindano interfieren con el desarrollo y el potencial reproductivo de *C. riparius*.

Las dos especies de invertebrados, la pulga del agua y la lombriz roja, empleadas a 48 h de exposición fueron menos sensibles a la toxicidad aguda del Clorpirifos en términos de CL_{50} sobre los microcrustáceos *D. pulex* (0,25-0,38 mg/l a 48 h), *D. magna* (1 $\mu\text{g/l}$ a 48h), *Penaeus vannamei* Broodstock (4,8 $\mu\text{g/l}$ a 48 h) y del copépodo *Diatomus forbesi* Krefer (8,8 $\mu\text{g/l}$ a 48 h) (Reyes *et al.*, 1996; Thankamoni & Konar, 1996; Van Den Brink *et al.*, 1996; Van Der Hoeven & Gerritsen, 1997). Sin embargo, la pulga del agua y la lombriz roja empleada fueron más sensibles que el copepodo *Amphiascus tenuiremis* Mielke (66 $\mu\text{g/l}$ a 48 h), que el oligoqueto *Branchiura sowerbyi* Beddard (129 $\mu\text{g/l}$ a 48 h) y que el pez *Oreochromis mossambicus* Peters (100 $\mu\text{g/l}$ a 96 h) (Green *et al.*, 1996; Van Wijngaarden *et al.*, 1996).

Los valores de toxicidad crónica para el Clorpirifos muestran un valor de LOEC (Concentración más baja de efectos observables) de 0,05 $\mu\text{g/l}$ para *Daphnia pulex* Leydig (Vander Hoeven & Gerritsen, 1997).

En el empleo de procedimientos ecotoxicológicos estandarizados, la Agencia de Protección Ambiental (E.P.A. de E.E.U.U.) sugiere utilizar *Equivalentes Ecológicos*, altamente sensibles de cada latitud en nuestro caso el insecto *C. calligraphus* y una especie de pulga del agua adaptada a condiciones neotropicales *M. macrocopa*, para evitar así, el deterioro ambiental (Iannacone & Alvarino, 1998; Moore *et al.*, 1998).

CONCLUSIONES

M. macrocopa presenta mayor ecotoxicidad aguda al Lindano (CL_{50} = 26,5 $\mu\text{g/l}$, a 48 h) y Clorpirifos (CL_{50} = 10,48 $\mu\text{g/l}$, a 48 h) y el mismo patrón de valores obtenidos para el Lindano (CL_{50} = 25,73 $\mu\text{g/l}$, a 48 h) y Clorpirifos (CL_{50} = 15,56 $\mu\text{g/l}$, a 48 h) para *C. calligraphus*. Los dos ensayos mostraron una mayor toxicidad al organofosforado Clorpirifos que al organoclorado Lindano. *M. macrocopa* y *C. calligraphus* son propuestos como dos ensayos ecotoxicológicos estandarizados para la evaluación de riesgos ambientales por agroquímicos.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Enrique Bay-Schmith (Universidad de Concepción, Chile) por las valiosas sugerencias críticas en el manuscrito.

BIBLIOGRAFIA

- APHA. (AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION), AWWA (AMERICAN WATER WORKS ASSOCIATION), WPCF (WATER POLLUTION CONTROL FEDERATION). 1995. Standard methods for examination of water and wastewater. 19 th. ed. American Health Association. Washington, D.C.
- Barrón, M.G. & K.B. Woodburn. 1995. Ecotoxicology of chlorpyrifos. Rev. Environ. Contam. Toxicol. 144: 1-93.
- Bodestein, G. 1972. Lindane in the environment. En Lindane. Centre International D'Etudes du Lindane (C.I.E.L.). Bruselles. 422 pp.
- Cairns, J.JR.; K.L. Dickson & G.F. Westlake. 1984. Biological monitoring of water and effluent quality. Symposium: biological monitoring of water ecosystems, Blackburg, Virginia. Technical Publication 04-607000-16. American Society for testing and Material, Philadelphia. 95 pp.
- Calleja, M.C. & G. Persoone. 1993. The influence of solvents on the acute toxicity of some lipophilic chemicals to aquatic invertebrates. Chemosphere 26: 2007-2022.
- Crane, M.; P. Delaney; C. Mainstone & S. Clarke. 1995. Measurement by *in situ* bioassay of water quality in an

- agricultural catchment. *Wat. Res.* 29: 2441-2448.
- Crisinel, A.; L. Delauney; D. Rosel; J. Tarradellas; H. Meyer; H. Saiah; P. Vogel; C. Defisic & C. Blaise. 1994. Cyst-based ecotoxicological tests using anostracans: comparison of two species of *Streptocephalus*. *Environ. toxicol. Water Qual.* 9: 317-326.
- Fernández-Casalderry Y. A.; M.D. Ferrando & E. Andren. 1992. Acute toxicity of several pesticides to rotifer (*Brachionus calyciflorus*). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 48: 14-17.
- Fliedner, A. 1996. Effects of Lindane on the planktonic community in freshwater microcosms. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 33: 228-235.
- Green, D.W.J.; K.A. Willians & D. Pascoe. 1986. Studies on acute toxicity of pollutants to freshwater macroinvertebrates 4: Lindane (Gamma-hexachlorocyclohexane). *Arch. Hydrobiol.* 106: 263-273.
- Green, A.S. & G.T. Chandler. 1996. Life-table evaluation of sediment-associated chlorpyrifos chronic toxicity to the benthic copepod, *Amphiascus tenuiremis*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 31: 77-83.
- Hart, L.J. 1997. Exposure of Tilapia fish to the pesticide lindane results in hypocellularity of the primary hematopoietic organ (promorphos) and the spleen without altering activity of phagocytic cells in these organs. *Toxicol.* 118: 211-221.
- Heckman, C.H. 1982. Pesticide effects on aquatic habitats. *Environ. Sci. Technol.* 16: 48A-57A.
- Jannacone, J.A. 1998. *Panagrellus* nemátode que ayuda a monitorear el contenido de plaguicidas en suelos y aguas. *Boletín RAAA (Perú)* 28: 16.
- Jannacone, J.A. & L. Alvarino. 1998. Ecotoxicidad aguda del insecticida organofosforado temephos sobre *Chironomus calligraphus* Goeldi (Diptera: Chironomidae). *Acta Ent. Chilena* 22: 53-55.
- Kiviranta, J.; A. Abdel-Hameed; K. Sivonen; S.J. Niemelä & G. Carlberg. 1991. Toxicity of Cyanobacteria to Mosquito Larvae-Screening of Active Compounds. *Environ. Toxicol. Water Qual.* 8: 63-72.
- Knobeloch, L.M.; G.A. Blondin & J.M. Harkin. 1990a. Use of submitochondrial particles for prediction of chemical toxicity in man. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 19: 661-668.
- Kosalwat, P. & A.W. Knight. 1987a. Acute toxicity of aqueous and substrate-bound copper to the midge *Chironomus decorus*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 16:275-282.
- Kosalwat, P. & A.W. Knight. 1987b. Chronic toxicity of copper to the parical cycle of the midge *Chironomus decorus*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 16:283-290.
- Kungolos, A. & I. Aoyama. 1993. Interaction effect, food effect, and bioaccumulation of cadmium and chromium for the system *Daphnia magna- Chlorella ellipsoidea*. *Environ. Toxicol. Water Qual.* 8: 351-369.
- Maund, S.J.; A. Peither; E.J. Taylor; Y. Juttner; R. Beyerle-Pfner; J.P. Lay & D. Pascoe. 1991. Toxicity of lindane to freshwater insect larvae in compartments of an experimental pond. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 23: 76-88.
- Martínez, T.L.; B.M. Ramírez; C.G. Germán; I.C. Galarc.; Madrigal M.O.; V.G. Ulloa. & M.F. Orozco. 1997. Toxic effect of sodium dodecylbenzenesulfonate, lead, petroleum, and their mixtures on the activity of acetylcholinesterase of *Moina macrocopa* in vitro. *Environ. Toxicol. Water Qual.* 12: 211-215.
- Merritt, R.W. & K.M. Cummins. 1984. An introduction to the aquatic insects of North America. Kendall. Hunt Publishing Co. Dubuque, I.A.
- Moore, M.T.; D.B. Huggett; W.B.Jr. Gillespie; J.H.Jr. Rodgers & C.M. Cooper. 1998. Comparative toxicity of chlordane, chlorpyrifos, and aldicarb to four aquatic testing organisms. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 34: 152-157.
- Phipps, G.L.; V.R. Mattson & G.T. Ankley. 1995. Relative sensitivity of three freshwater benthic macroinvertebrates to ten Contaminants. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 28: 281-286.
- Pimentel, D. 1998. Environmental and economic issues associated with pesticide use. Book of abstracts International Conference on Pesticide use in Developing Countries: Impact on Health and Environment, Costa Rica. 272 pp.
- Reyes, J.G.; J.A. Medina & C. L. Villagrana. 1996. Toxic effects of organochlorine pesticides on *Penaeus vannamei* shrimps in Sinaloa, Mexico. *Chemosphere* 33: 567-575.
- Servicio Nacional de Sanidad Agraria (SENASA). 1995. Compendio de plaguicidas agrícolas y sustancias afines registrados en el Servicio Nacional de Sanidad Agraria- Ministerio de Agricultura. Lima-Perú. 170 pp.
- Snedel, B.C.; J.A. Bopraczek; R.K. Peddycord; P.A. Clifford & T.M. Dillon. 1994. Trophic transfer and biomagnification potential of contaminants in aquatic ecosystems. *Rev. Env. Contam. Toxic.* 136: 21-89.
- Stork, N.E. 1993. How may species are there?. *Biodiversity and Conservation* 2: 215-232.
- Streble, H. & D. Krauter. 1987. Atlas de los microorganismos de agua dulce: La vida en una gota de agua. Ed. Omega. (España) 357 pp.
- Taylor, P.A. 1993. An evaluation of the toxicity of various forms of chlorine to *Ceriodaphnia dubia*. *Environ. Toxicol. Chem.* 12: 925-930.
- Taylor, E.J.; S.J. Maund & D. Pascoe. 1991. Evaluation of a chronic toxicity test using growth of the insect *Chironomus riparius* Meigen. In: Bioindicators and environmental management. Jeffrey DW. & B. Madden (Eds.), Proc. 6th IUBS Symposium, Dublin, 1990. Academic Press, London, pp. 343-352.
- Taylor, E.J.; S.J. Blockwell; S.J. Maund & D. Pascoe. 1993. Effects of lindane on the life-cycle of a freshwater macroinvertebrate *Chironomus riparius* Meigen (Insecta: Diptera). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 24: 145-150.
- Thankamoni, A.V.G. & S.K. Konar. 1996. Pollutional effects of chlorpyrifos on fish, fish food organisms and water quality. *Environ. Ecol.* 14:723-730.
- Van Den Brink, P.J.; R.P.A. Van Wijngaarden; W.G.H. Lucassen; T.C.M. Brock & P. Leeuwangh. 1996. Effects of the insecticide Dursban registered 4E (active ingredient chlorpyrifos) in outdoor experimental ditches: 2. Invertebrate community responses and recovery. *Environ. Toxicol. Chem.* 15:1143-1153.
- Van Der Hoeven, N. & A.A.M. Gerritsen. 1997. Effects of chlorpyrifos on individuals and populations of *Daphnia pulex* in the laboratory and field. *Environ. Toxicol. Chem.* 16: 2438-2447.
- Van Wijngaarden, R.P.A.; P.J. Van Den Brink; S.J.H. Crum; J.H. onde Voshaar; T.C.M. Brock & P. Leeuwangh. 1996. Effects of the insecticide Dursban registered 4E (active ingredient chlorpyrifos) in outdoor experimental ditches: 1. Comparison of short-term toxicity between the laboratory and the field. *Environ. Toxicol. Chem.* 15: 1133-1142.
- Wilson, E.O. 1988. The current state of biological diversity. In: Biodiversity. Wilson, E.O. & F.M. Peters (eds.). Washinton, D.C. National Academy Press. pp. 3-18.
- Wong, C.K.; K.H. Chu & F.F. Shum. 1995. Acute and chronic toxicity of malathion to the freshwater cladoceran *Moina macrocopa*. *Water, Air & Soil Pollut.* 84: 399-405.