

## EFFECTOS DEL CLORPIRIFOS SOBRE LA SUPERVIVENCIA Y REPRODUCCIÓN DE *Daphnia pulex*

### EFFECTS OF CHLORPYRIFOS ON SURVIVAL AND REPRODUCTION TO *Daphnia pulex*

Diana Luz Giraldo<sup>1</sup> y Jaime A. Palacio<sup>2</sup>

#### Resumen

Neonatos de *Daphnia pulex* fueron expuestos durante un periodo de dieciséis días a cinco concentraciones subletales del insecticida organofosforado Clorpirifos (0.016, 0.020, 0.026, 0.032 y 0.040 µg/l) con el objeto de evaluar los efectos sobre la supervivencia y la reproducción.

Durante los experimentos se mantuvo una temperatura de  $22 \pm 1$  °C, un fotoperiodo de dieciséis horas y una intensidad lumínica de 1.000 a 1.500 lux. El agua de dilución fue moderadamente dura y el oxígeno disuelto se controló a un nivel de saturación superior al 60%. Se utilizó un sistema semiestático, con renovación de las soluciones cada 48 horas. Para cada nivel de exposición y para los controles con agua de dilución y acetona se emplearon diez réplicas.

A pesar de que la supervivencia se redujo con el incremento del nivel de exposición, de acuerdo con la prueba exacta de Fisher ninguna concentración presentó diferencias estadísticamente significativas en la supervivencia en relación con los controles. En contraste, el número de neonatos por hembra fue considerablemente inferior en las concentraciones mayores y el análisis estadístico ratificó este resultado. Mientras la concentración de efecto no observado que no presentó diferencias con el control fue 0.026 µg/l, la concentración de efecto observado que mostró diferencias con el control fue 0.032 µg/l.

*Palabras clave:* *Daphnia pulex*, concentraciones subletales, Clorpirifos, supervivencia, reproducción.

#### Abstract

Newborn of *Daphnia pulex* were exposed during a period of sixteen days to five sublethal concentrations of the insecticide organophosphorate Chlorpyrifos (0.016, 0.020, 0.026, 0.032 and 0.040 µg/l), in order to evaluating the effects on the survival and the reproduction of this species.

During the experiments stayed a temperature of  $22 \pm 1$  °C, a fotoperiod of sixteen hours and a light intensity from 1.000 to 1.500 lux. The dilution water was moderately hard and the dissolved oxygen was controlled at level higher of 60% saturation, with renovation of the solutions every 48 hours. For each concentration and for the controls with dilution water and acetone ten replicas were used.

Although the survival decreased with the increment of the concentration, in accordance with the exact test of fisher no concentration presented differences statistically significant in the survival in connection with the controls. In contrast, the newborn number for female was considerably lower in the biggest concentrations and the statistical analysis ratified this result. While the concentration of not observed effect that don't present differences with the control was 0.026 µg/l, the concentration of observed effect that showed differences with the control was 0.032 µg/l.

*Key words:* *Daphnia pulex*, sublethal concentrations, Chlorpyrifos, survival, reproduction.

Recibido: abril de 1999; aprobado para publicación: agosto de 1999.

<sup>1</sup> Ingeniera de Minas y Metalurgia, magister en Ingeniería Ambiental. G&A Geomántica Ltda. E-mail: arangin@hotmail.com.

<sup>2</sup> Profesor, Facultad de Ingeniería, Centro de Investigaciones Ambientales, Universidad de Antioquia, Medellín.

## INTRODUCCIÓN

Dado que frecuentemente las sustancias xenobióticas se encuentran en niveles muy bajos en los ecosistemas acuáticos, los efectos adversos sobre la biota no se manifiestan en forma inmediata sino que pueden trascender su ciclo de vida y evidenciarse a través de la reducción en la capacidad reproductiva (Rand y Petrocelli, 1985).

El Clorpirifos ( $C_9H_{11}Cl_3NO_3PS$ ) es un insecticida organofosforado de amplio espectro, usado globalmente en numerosas situaciones. En Colombia, el Clorpirifos se emplea para el control de insectos de cultivos comerciales y el volumen de producción en 1994 ascendió a 471.460 kg, 15.3% de la producción total del país (ICA, 1995).

En el suelo el Clorpirifos es degradado lentamente a 3,5,6-tricloro-2-piridinol, con una vida media de 60 a 120 días. Este metabolito es subsecuentemente degradado a otros compuestos organoclorados y a dióxido de carbono. El ingreso de Clorpirifos a los ecosistemas acuáticos ocurre principalmente desde la atmósfera en las áreas de aplicación. Las partículas libres de Clorpirifos que alcanzan a los ambientes acuáticos se unen probablemente por adsorción a los materiales orgánicos en suspensión y a los sedimentos.

A pesar de que la vida media del Clorpirifos es relativamente corta, puede afectar en forma crónica a las especies de ciclos cortos. Estos organismos constituyen un recurso trófico muy importante para especies ubicadas en niveles superiores. En consecuencia, la acción subletal del Clorpirifos sobre estos elementos de la biota puede reducir considerablemente la disponibilidad de alimento para otros organismos.

La toxicidad del Clorpirifos es probablemente el resultado de una conversión metabólica a su análogo oxigenado Clorpirifos-oxon y la subsecuente inhibición de colinesterasas, carboxilasas, acetilcolinesterasas (ACE) y fosforilasas oxidativas mitocondriales. Generalmente, se acepta que la interferencia con la ACE es el principal modo de acción de los pesticidas organofosforados. Estas

sustancias se combinan con la enzima y forman un complejo irreversible, el cual subsecuentemente se disocia dejando la enzima fosforilada inactiva (Racke, 1993).

En los ensayos de toxicidad crónica se exponen los organismos durante todo o parte de su ciclo de vida a un contaminante. Con estas pruebas se busca estimar la mayor concentración no efectiva o segura del tóxico ensayado. Básicamente, se evalúan las alteraciones sobre las tasas de reproducción y crecimiento y sobre la esperanza de vida o supervivencia (Tortorelli *et al.*, 1994).

Las especies del género *Daphnia* se adaptan fácilmente a condiciones de laboratorio. *Daphnia pulex* es un organismo estándar empleado ampliamente en ecotoxicología acuática para evaluar los efectos letales y subletales de xenobióticos (ASTM, 1988; SEPA, 1989, 1990, 1994a, 1994b).

El principal objetivo de un estudio de toxicidad crónica es determinar los efectos biológicos de la exposición y estimar una concentración aceptable. La concentración aceptable es aquella en la cual no se presenta un efecto detectable sobre la supervivencia, maduración o reproducción y se conoce como la concentración de efecto no observado (CENO).

En el presente estudio se buscó establecer los efectos subletales del Clorpirifos sobre la reproducción y supervivencia de *Daphnia pulex* y constituye la primera investigación en nuestro país sobre los efectos ecotoxicológicos crónicos de la exposición de un organismo acuático a una sustancia química.

## MATERIALES Y MÉTODOS

La cepa de *D. pulex* fue obtenida en la represa La Fe a 35 km al oriente de Medellín y a 2.156 msnm (Vega *et al.*, 1994). El agua utilizada para los cultivos de dafnia y para el estudio fue moderadamente dura. Es decir, con una dureza total entre 80 y 100 mg/l de  $CaCO_3$ . Esta agua se preparó a partir de agua destilada, adicionándole las sustancias químicas de

grado analítico según recomendaciones de APHA, AWWA, WPCF (1995). Además de cumplir la condición de dureza, el agua se mantuvo a un pH entre 7.4 y 7.8 y una alcalinidad entre 60 y 70 mg/l de  $\text{CaCO}_3$ . El agua de dilución recién preparada se aireó, al menos durante 24 horas, con el fin de estabilizar el pH y garantizar niveles adecuados de oxígeno.

Los cultivos fueron mantenidos a  $22 \pm 1$  °C, un fotoperiodo de dieciséis horas de luz y ocho de oscuridad y una iluminación de 1.000 a 1.500 lux. La concentración de oxígeno disuelto se mantuvo por encima de 60% de saturación. Del alimento, constituido por una mezcla de Tetramin y alfalfa, se suministraron diariamente 7.0 ml/l a los cultivos en masa y 0.2 ml/25 ml a los cultivos individuales.

En los cultivos individuales, los ejemplares de dafnia se transfirieron cada dos días a medio fresco. Durante las renovaciones se controlaron la temperatura, la dureza, el pH y la alcalinidad, se registraron la supervivencia y la reproducción y se

descartaron los neonatos. Cada semana se iniciaron nuevos cultivos individuales, con el fin de disponer permanentemente de individuos partenogenéticos de diferentes edades. Para el estudio se emplearon neonatos menores de veinticuatro horas de edad, procedentes de los cultivos individuales y de hembras con una producción superior a ocho neonatos por camada.

Para la investigación se utilizó un sistema semiestático, con renovación de las soluciones cada 48 horas. Los neonatos de *D. pulex* se expusieron a cinco concentraciones de Clorpirifos (0.016, 0.020, 0.026, 0.032 y 0.040  $\mu\text{g/l}$ ) durante un periodo en el que se produjeron al menos tres camadas en los controles. Los niveles de exposición se establecieron con base en la concentración letal media del Clorpirifos para *D. pulex*. En la tabla 1 se señalan las condiciones experimentales durante la exposición de *D. pulex* a Clorpirifos.

Tabla 1. Condiciones experimentales durante la exposición de *D. pulex* a niveles subletales de Clorpirifos

Tipo de prueba	Bioensayo de toxicidad crónica, semiestático, con renovación del medio de prueba cada 48 horas
Duración de la prueba	16 días (un mínimo de tres camadas)
Temperatura	$22 \pm 1$ °C
Calidad de la luz	Iluminación de laboratorio
Intensidad de la luz	1.000 a 1.500 lux
Fotoperiodo	16 horas de luz
Tamaño de la cámara de prueba	30 ml
Volumen de la solución	25 ml por réplica
Edad de los ejemplares	Menores de 24 horas
Ejemplares por cámara de prueba	Uno
Réplicas por concentración	10
Ejemplares por concentración	10
Alimentación	Diaria 0.2 ml/25 ml de solución
Aireación	Ninguna
Agua de dilución	Agua reconstituida moderadamente dura
Concentraciones de prueba	Cinco y dos controles, uno con solución acuosa de acetona y otro con agua de dilución
Factor de dilución	0.8
Efecto observado	Supervivencia y reproducción
Criterio de aceptabilidad de la prueba	Mínimo 80% de supervivencia en los controles y al menos el 60% de las hembras sobrevivientes en los controles con tres camadas
Expresión de resultados	Concentración de Efecto No Observado, Concentración de Efecto Observado y Valor Crónico

Los experimentos se realizaron en recipientes de 30 ml con 25 ml de la solución de ensayo y un neonato de *D. pulex*. Para cada concentración se emplearon diez réplicas. La posición de los recipientes fue aleatoria y se modificó en cada recambio de la

solución. Las dafnias se mantuvieron durante dieciséis días en las mismas condiciones ambientales de los cultivos.

En cada recambio se midieron el oxígeno disuelto, la temperatura, el pH y la dureza, en la concentración más alta, en una intermedia, en la más baja y en los controles. Este procedimiento se realizó tanto en las soluciones nuevas como en las que eran descartadas.

Al final del periodo de exposición, se determinó el promedio de neonatos por hembra y el número de hembras adultas sobrevivientes. Con estos datos, se calculó la concentración de efecto no observado (CENO), la concentración de efecto observado (CEO) y el valor crónico, definido como la media geométrica entre CENO y CEO.

Con el fin de establecer si existían diferencias estadísticamente significativas en la supervivencia entre las concentraciones y el control se empleó la prueba exacta de Fisher (Oris y Bailer, 1993; Steel y Torrie, 1985). Como regla de decisión se adoptó que si  $P > 0.05$ , no existían diferencias estadísticamente significativas.

Para evaluar la distribución de los datos de reproducción, se aplicó la prueba Kolmogorov-Smirnov al número total de jóvenes producidas por hembra en todos los niveles de exposición y en los controles. Adicionalmente, se calcularon la media, la desviación estándar y la varianza. Los D máximos de la prueba de Kolmogorov-Smirnov se calcularon a partir de la expresión:

$$D = \text{máximo} \left\{ \text{máximo} \left[ \frac{F(X_i) - F_s(X_i)}{F_s(X_i) - F_s(X_{i-1})} \right] \right\}$$

En donde  $F_s(X)$  es la función de distribución acumulada de la muestra y  $F_i(X)$  es la función de distribución acumulada teórica.

Si  $D_{\text{max-cal}} < D_{\text{tab}}$  a un nivel de significancia de 0.01, los datos están normalmente distribuidos.

Para evaluar la homogeneidad de varianzas se empleó la prueba de Bartlett por medio de la siguiente expresión:

$$X^2_{\text{cat}} = \frac{V [ a (Ln S^2) - \sum Ln S_i^2 ]}{C}$$

En donde  $V$  es el número de grados de libertad para cada concentración [réplicas menos uno ( $-1$ )],  $a$  es el número de niveles de exposición más los controles,  $S^2$  es la media de las varianzas individuales y  $C = [1+(a+1)/3aV]$ .

Si  $X^2_{\text{cat}} < X^2_{\text{tab}}$  a un nivel de significancia de 0.001, existe homogeneidad de varianzas. A los datos se les aplicó además la prueba ANOVA de una vía.

Se usó la prueba de Dunnett para determinar cuáles concentraciones eran diferentes al control. Para esto, se calculó el valor "d" mediante la siguiente expresión:

$$d_{\text{cat}} = \frac{(X - X_c)}{\sqrt{MS_E (1/n + 1/n_c)}}$$

En donde  $X$  es la media de los valores del control,  $X_i$  es la media de los valores de las concentraciones,  $MS_E$  es la media de los cuadrados debida al error,  $n$  es el número de réplicas en el control y  $n_i$  el número de réplicas en cada concentración.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Como se infiere de la tabla 2, la totalidad de las variables fisicoquímicas permanecieron muy estables durante las pruebas de toxicidad y sus valores se movieron dentro de los rangos considerados normales por la EPA (1989, 1994) para la validación de los resultados.

Los efectos crónicos del Clorpirifos sobre *D. pulex* se evaluaron a partir del comportamiento reproductivo y la supervivencia. La mortalidad de adultos al final del periodo de exposición se incrementó paralelamente con la concentración y en los dos controles (agua y acetona) se presentó también mortalidad (tabla 3).

Al comparar los resultados de la supervivencia del control con agua de dilución y del control con acetona se infiere que no existen diferencias estadísticamente significativas. En consecuencia,

Tabla 2. Fluctuación de las variables fisicoquímicas controladas durante las pruebas

Variable	Fluctuación
Temperatura (°C)	22 ± 1
pH (unidades de pH)	7.35 ± 0.4
Dureza (mg/l de CaCO <sub>3</sub> )	90 ± 10
Porcentaje de saturación de oxígeno disuelto	72 ± 8

Tabla 3. Supervivencia y mortalidad de adultos de *D. pulex* a los dieciséis días de exposición a Clorpirifos

Concentración (µg/l)	Total de adultas	Vivas		Muertas	
		Número	Porcentaje	Número	Porcentaje
Control agua	10	8	80	2	20
Control acetona	10	9	90	1	10
0.016	10	10	100	0	0
0.020	10	9	90	1	10
0.026	10	8	80	2	20
0.032	10	7	70	3	30
0.040	10	6	60	4	40

esta operación se realizó para cada concentración con relación al control con acetona.

A partir del valor del P calculado, menor que 0.05, se concluye que no existen diferencias estadísticamente significativas en la supervivencia entre las concentraciones y los controles (tabla 4). Por tanto, todos los datos se emplearon en el cálculo estadístico de la reproducción.

Tabla 4. Valores de P para la supervivencia

Tabla de contingencia	Valores de P
Control agua – Control acetona	0.395
0.016 – Control acetona	0.499
0.020 – Control acetona	0.526
0.026 – Control acetona	0.395
0.032 – Control acetona	0.248
0.040 – Control acetona	0.135

De acuerdo con los resultados de la prueba exacta de Fisher ninguna concentración presentó diferencias estadísticamente significativas en relación con el control. Sin embargo, de la tabla 3 se infiere que la supervivencia disminuyó a medida que aumentó la concentración del Clorpirifos. De esta forma el porcentaje de supervivencia alcanzó 60% al final de los dieciséis días de exposición en la concentración más alta (0.04 µg/l).

En la tabla 5 se presentan los resultados de reproducción de adultos de *D. pulex* expuestos a niveles subletales de Clorpirifos.

De la tabla 5 se obtiene que  $\Sigma Y_i = 1979$  y  $S^2 = 98.3444$ .

El valor D en la tabla de Kolmogorov-Smirnov para  $n$  igual a 10 es 0.486. Dado que ningún valor de  $D_{\max\text{-cal}}$  (tabla 6) fue mayor que el  $D_{\text{tab}}$ , los datos de reproducción están normalmente distribuidos.

La evaluación de la homogeneidad de varianzas, mediante la prueba de Bartlett, indicó que a un nivel de significancia de 0.01 el  $X^2$  (9.3034) es menor que el  $X^2_{\text{tab}}$  (16.81) para seis grados de libertad. En consecuencia, hay homogeneidad de varianzas.

Debido a que los datos de reproducción están normalmente distribuidos y presentan homogeneidad de varianzas, se aplicó la prueba ANOVA de una vía (tabla 7). Al confrontar los valores del  $F_{\text{cal}}$  y del  $F_{\text{tab}}$ , se concluye que existe una diferencia estadísticamente significativa entre las concentraciones ( $F_{\text{cal}}$ ,  $F_{\text{tab}}$ ).

Debido a que el análisis de varianza mostró que existían diferencias en los datos de reproducción entre las concentraciones, se usó la prueba de Dunnett para

Tabla 5. Neonatos producidos por hembra a los dieciséis días de exposición

Réplica	Control Agua	Control Acetona	Concentraciones ( $\mu\text{g/l}$ )				
			0.016	0.020	0.026	0.032	0.040
1	45	33	41	45	38	16	16
2	49	45	22	23	33	17	0
3	42	27	40	34	31	21	0
4	42	36	26	27	45	0	12
5	43	37	31	40	12	23	0
6	58	27	37	40	24	12	11
7	35	48	40	38	33	25	20
8	12	37	39	0	12	0	8
9	45	42	33	36	28	19	14
10	26	37	34	38	45	21	13
Total ( $Y_i$ )	397	369	343	321	301	154	94
Media ( $\bar{X}_i$ )	39.7	36.9	34.3	32.1	30.1	15.4	9.4
D. estándar	12.8067	6.8872	6.4300	12.9910	11.6471	8.9094	7.1988
$S^2$	164.011	47.4333	41.344	168.767	135.65	79.377	51.822

Tabla 6. D máxima para la reproducción en cada nivel de exposición

Concentración	D máxima
Control agua	0.271
Control acetona	0.196
0.016	0.167
0.020	0.260
0.032	0.228
0.040	0.205

Tabla 7. Análisis de varianza

Fuente de variación	Suma de Cuadrados	Grados de libertad	Media de cuadrados	$F_{\text{cat}}$	$F_{\text{tab}}$
Entre	7812.1429	6	1302.0238	13.2394	2.244
Dentro	6195.7001	63	98.3444		

determinar cuáles concentraciones eran diferentes al control. Las únicas concentraciones que exhibieron un valor de "d" mayor que el valor "d" crítico de la tabla fueron 0.032 y 0.040  $\mu\text{g/l}$  (tabla 8)

Tabla 8. Valores de "d" de Dunnett

Concentración ( $\mu\text{g/l}$ )	$d_{\text{cal}}$
Control acetona	0.6313
0.016	1.2176
0.020	1.7137
0.026	2.1646
0.032	5.4792
0.040	6.8321

De la tabla 9 se infiere que la producción promedio de neonatos por hembra fue afectada negativamente por la exposición al Clorpirifos. El número de neonatos por hembra fue significativamente inferior en los niveles de exposición más altos (0.032 y 0.040  $\mu\text{g/l}$ ) y cayó significativamente ( $P < 0.05$ ) desde 39.7 en el control a 9.4 en 0.040  $\mu\text{g/l}$  de Clorpirifos.

De acuerdo con el análisis de varianza de una vía y la prueba de rangos múltiples de Dunnett, la concentración de efecto no observado (0.026  $\mu\text{g/l}$ ) no presenta diferencias estadísticamente significativas sobre la reproducción en relación con el control. En contraste, la concentración de efecto observado (0.032  $\mu\text{g/l}$ ) muestra diferencias estadísticamente

**Tabla 9.** Promedio de neonatos por hembra de *D. pulex* expuestas a Clorpirifos durante dieciséis días

Concentración ( $\mu\text{g/l}$ )	Número medio de jóvenes/adulta
Control agua	39.7
Control acetona	36.9
0.016	34.3
0.020	32.1
0.026	30.1
0.032	15.4
0.040	9.4

significativas sobre la reproducción en relación con el control. El valor crónico (VC) estimado como la media geométrica entre los valores CENO y CEO es 0.029  $\mu\text{g/l}$ .

El valor de CENO de Clorpirifos para *Daphnia magna* reportado por Kersting y Van Wijngaarden (1992) fue 0.1  $\mu\text{g/l}$ . Este resultado indica que *D. pulex* es significativamente más sensible al Clorpirifos que *D. magna* y podría estar asociado a las diferencias en talla, debido a que las especies más pequeñas son más sensibles a tóxicos (Koivisto, 1995).

Constable y Orr (1994) estudiaron los efectos crónicos del Lindano sobre *Ceriodaphnia dubia* y reportaron valores de CENO de 6.6  $\mu\text{g/l}$ , CEO de 10.5  $\mu\text{g/l}$  y VC de 8.3  $\mu\text{g/l}$ . En *D. magna*, Ferrando *et al.* (1995) establecieron para Lindano valores de CENO de 0.16 mg/l, CEO de 0.25 mg/l y un VC de 0.20 mg/l. De otro lado, Fernández-Casalderrey y Andreu-Moliner (1995) investigaron los efectos subletales del Metilparatión sobre *D. magna* y reportaron un CENO de 0.20 ng/l, un CEO de 0.25 ng/l y un VC de 0.22 ng/l.

## CONCLUSIONES

Debido a que los parámetros fisicoquímicos se mantuvieron dentro de un rango aceptable de variación y la adición del pesticida no afectó en forma significativa sus valores, se puede concluir que éstos

## REFERENCIAS

APHA, AWWA, WPCF. 1995. Standard methods for the examination of water and waste water. American Public Health Association, Washington, DC.

no tuvieron efecto sobre la mortalidad y la reproducción de *D. pulex* en las pruebas de toxicidad crónica.

De acuerdo con los resultados de la Prueba Exacta de Fisher, ninguna concentración presentó diferencias estadísticamente significativas en la supervivencia en relación con los controles. Sin embargo, la supervivencia disminuyó a medida que aumentó la concentración de Clorpirifos y alcanzó 60% al final del periodo de exposición en la mayor concentración (0.04  $\mu\text{g/l}$ ).

Es indiscutible que la natalidad por hembra se redujo considerablemente con el incremento del nivel de Clorpirifos. Este hecho es ratificado por el análisis estadístico. El número de neonatos fue considerablemente inferior en las concentraciones más altas (0.032 y 0.040  $\mu\text{g/l}$ ).

De acuerdo con el análisis de varianza de una vía y la prueba de rangos múltiples de Dunnett, la concentración de efecto no observado que no presentó diferencias estadísticamente significativas sobre la reproducción con relación al control fue 0.026  $\mu\text{g/l}$ . Por su parte, la concentración de efecto observado que mostró diferencias estadísticamente significativas sobre la reproducción en relación con el control fue 0.032  $\mu\text{g/l}$ .

El valor estimado para el efecto crónico, 0.029  $\mu\text{g/l}$ , debe constituir un elemento a considerar en la fijación de los límites permisibles, ya que este valor asegura que estadísticamente no se presenten efectos sobre la supervivencia o la reproducción de parte de la biota acuática.

Los valores de CENO del Clorpirifos para *D. pulex* fueron menores que los reportados para otras especies. Esto indica que *D. pulex* es significativamente más sensible a este pesticida.

American Society for Testing and Materials (ASTM). 1998. Standart guide for conducting renewal life-cycle toxicity test with *Daphnia magna* (designation: E 1193-87). Philadelphia.

- Constable M, Orr P.** 1994. Lethal and sublethal toxicity of lindane to *Pimephales promelas* and *Ceriodaphnia dubia*. *Bull Environ Contam Toxicol* 52:298-304.
- Environmental Protection Agency (EPA).** 1989. Short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving water to freshwater organisms. 2nd ed. Cincinnati, Ohio. 600/4-89/001.
- Environmental Protection Agency (EPA).** 1990. Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms. 4th ed. Estados Unidos: 600/4-90/013.
- Environmental Protection Agency (EPA).** 1994. 48-hour acute toxicity test using *Daphnia magna* and *Daphnia pulex*. Estados Unidos: 2024/10-94
- Environmental Protection Agency (EPA).** 1994a. 24-hours range finding test using *Daphnia magna* and *Daphnia pulex*. Estados Unidos: 2021/10-94.
- Environmental Protection Agency (EPA).** 1994b. 10-day chronic toxicity test using *Daphnia magna* and *Daphnia pulex*. Estados Unidos: 2028/11-94.
- Fernández-Casalderrey A, Andreu-Moliner E.** 1995. Chronic toxicity of methyparathion to *Daphnia magna*: effects on survival, reproduction and growth. *Bull Environ Contamin Toxicol* 54:43-49.
- Ferrando MD, Sancho E, Andreu-Moliner E.** 1995. Effects of lindane on *Daphnia magna* during chronic exposure. *En: Journal of environmental sciences and health*. 30(6):815.
- Instituto Colombiano Aropecuario (ICA).** 1995. Comercialización de plaguicidas: importación, producción, ventas y exportación. 59 p.
- Kesrting K, Van Wijngaarden R.** 1992. Effects of chlorpyrifos on a microecosystem. *Environ Toxicol Chem* 11:365-372.
- Koivisto S.** 1995. Is *Daphnia magna* an ecologically representative zooplankton species in toxicity test? *Environ Poll* 90 (2):263-267.
- Oris JT, Bailer A.** 1993. Statistical analysis of the *Ceriodaphnia* toxicity test: sample size determination for reproductive effects. *Environ Toxicol Chem* 12:85-90.
- Racke KD.** 1993. Environmental fate of chlorpyrifos. *Rev Environ Contamin Toxicol* 131: 3-127.
- Rand GM, Petrocelli SR.** 1985. *Fundamentals of aquatic toxicology*. Washinton: Hemisphere Publishing Corporation. 666 p.
- Steel R, Torrie J.** 1985. *Bioestadística: principios y procedimientos*. 2ª ed. McGraw-Hill, Santafé de Bogotá: 622 p.
- Tortorelli M del C, Di Marzio W, Sáenz M, Alberdi J.** 1994. Ensayos ecotoxicológicos con organismos acuáticos para la evaluación de la contaminación ambiental. Curso de posgrado, Universidad Nacional de Luján.
- Vega EJ, Díez R, Ruiz O.** 1994. Limnología de dos embalses en el oriente Antioqueño. *Rev Contamin Amb* 13 (24):155.