

APLICACION DE UN SISTEMA DE CANALES ARTIFICIALES EN EL ESTUDIO ECOTOXICOLÓGICO DE COMUNIDADES MICROBENTÓNICAS

E. Navarro, H. Guasch, I. Muñoz, M Real & S. Sabater.

Departamento de Ecología, Facultad de Biología, Universidad de Barcelona, Avda. Diagonal 645, 08028 Barcelona

RESUMEN

El artículo describe el desarrollo de un sistema de canales artificiales y su aplicación en el estudio del efecto tóxico de un metal pesado, el cobre, y un herbicida, la atrazina. Nuestro objetivo ha sido el de desarrollar un sistema de canales que posean un funcionamiento autónomo, sean fácilmente transportables y permitan una buena replicación.

Se han llevado a cabo en ellos dos tipos de diseño experimental. En el primero, factorial, se estudió el efecto del cobre sobre la comunidad algal. En este se observó un progresivo incremento de la toxicidad del cobre. Con el segundo tipo de diseño, exponencial, se llevaron a cabo dos experimentos. En uno se estudió el efecto de la interacción del cobre y la velocidad de la corriente sobre la comunidad algal. Se observó un efecto sinérgico del incremento de la velocidad en la toxicidad del cobre. En el otro se estudió el efecto de la interacción entre la atrazina y el herbivorismo (provocado por el gasterópodo *Physella acuta*); sobre la comunidad algal. El herbicida y los herbívoros causaron un descenso significativo en la actividad algal. Los dos tipos de diseño son complementarios y han permitido el estudio de comunidades microbentónicas en condiciones similares a las naturales.

Palabras clave: ecotoxicología, río artificial, cobre, atrazina, perifiton, microbentos, herbivorismo

ABSTRACT

In this paper we described the development of an artificial stream system and its application on the study of the toxic effect of copper (heavy metal) and atrazine (herbicide). Our main objectives were to design and to construct a system of streams providing a controlled environment, easy to transport and with a defined and replicated range of conditions.

*Two experiments were carried out. The first, with an exponential design, was used to study the relationship between the magnitude of the effect and the biota. The second was factorial and was used to study the interaction between two factors. We studied the effect of copper on the algal community using an exponential design. The copper toxicity increased throughout the experiment. The effect of interaction between copper and water velocity on algal community was studied with a factorial design. The increase in velocity increases the copper toxicity. The effect of the interaction between herbivorism (caused by gastropod *Physella acuta*) and atrazine on periphyton was also studied. The interaction of both factors caused a significant decrease on photosynthetic activity. These designs were complementary and allowed us to study the effect of toxicants on the microbenthic communities, during relatively long time periods.*

Keywords: ecotoxicology, artificial stream, copper, atrazine, periphyton, microbenthos, grazing.

INTRODUCCIÓN

En la actualidad la mayoría de sistemas naturales se ven afectados por alteraciones y perturbaciones de origen antropico. Un modo de evaluar el efecto de una perturbación en sistemas naturales consiste en estudiar el sistema en condiciones controladas y simplificadas, como las ofrecidas por los diseños que usan ríos o canales artificiales.

Los ríos artificiales se definen como cualquier tipo de canal, con un flujo de agua controlable, usado para estudiar propiedades físicas, químicas o biológicas de los sistemas naturales (Warren & Davis, 1971). Los ríos de laboratorio están situados en espacios cerrados, donde algunas de las variables ambientales, como luz, temperatura y calidad del agua están controladas.

Cuando se quiere estudiar el efecto de un tóxico en un sistema, confluyen dos aspectos a tener

en cuenta: el efecto de las variables ambientales y el efecto propio del tóxico sobre los organismos. El uso de ríos artificiales es una de las metodologías adecuadas, porque permiten aislar el efecto del tóxico, gracias al control de las variables ambientales. Con esta metodología se evita, además, el efecto que el uso del tóxico tendría al experimentar en condiciones naturales.

Los diseños experimentales que usan canales artificiales se suelen ajustar a la comprobación de hipótesis relativas a la observación de efectos, causados por un factor (diseño factorial). Así mismo, los canales artificiales permiten plantear un diseño de tipo potencial, donde se intenta relacionar una causa (por ejemplo una concentración de tóxico) con su efecto de un modo cuantitativo (diseño de regresión).

El desarrollo de comunidades en recipientes cerrados (microcosmos), es un diseño experimental con numerosas posibilidades. Pero si se es capaz de introducir un sistema de cultivo continuo, con entrada y salida de agua, y con un mayor número de factores, se introduce uno de los principios de la regulación de las poblaciones, donde las salidas están controladas principalmente por la densidad de los organismos en el sistema. Esa densidad es a su vez el resultado de la interacción de los factores que se están estudiando, dándose un paso más en la aproximación entre el sistema artificial y el natural: el río. Los canales artificiales, como mesocosmos, sirven de puente para salvar la distancia que va desde los experimentos de campo hasta los ensayos con especies aisladas en el laboratorio.

La variación entre las réplicas (canales de un mismo tratamiento), ha de ser menor que entre los tratamientos, ya que de otra manera no seremos capaces de encontrar diferencias entre ellos. Dicho de otro modo, la variación entre canales no debe ser mayor que la capacidad del experimentador para detectarla (Rodgers *et al.*, 1996). Trabajando con tiempos de residencia 10 suficientemente cortos, los cambios longitudinales en los canales, en variables como temperatura y oxígeno disuelto, son mínimos. Así se evita la formación de gradientes biológicos a 10 largo de nuestros canales (Belanger 1997). De

este modo se podrá reducir la variabilidad dentro de cada canal.

En el caso de los estudios ecotoxicológicos, el riesgo potencial de los productos químicos liberados por el hombre en sistemas lóticos, es evaluado generalmente usando bioensayos estandarizados con especies aisladas. Aunque los bioensayos pueden ser una herramienta adecuada para la predicción del efecto del tóxico, son limitados en la extensión de estas predicciones a los ecosistemas (Kimball & Levin, 1985). Los bioensayos no distinguen adecuadamente entre los efectos directos del tóxico y los indirectos. Los directos son los debidos al efecto del tóxico, por sí mismo, sobre los organismos estudiados. Los indirectos serían los que provocaría el tóxico por el efecto sobre otras especies o variables ambientales que interaccionen con nuestra especie sujeto del estudio; los herbívoros, por ejemplo, al actuar sobre especies contaminadas con ese tóxico, pueden verse afectados, lo que a su vez puede tener efectos sobre la comunidad algal.

Los diseños multiespecíficos, son más realistas para estimar el rango de toxicidad de un compuesto en comunidades acuáticas, que una batería de los correspondientes diseños monoespecíficos. Además la tolerancia frente a un tóxico se puede ver modificada por las relaciones de las especies en la comunidad, y eso no se verá reflejado en los diseños monoespecíficos (Giesy, 1985; Niederlehner, 1986; Cairns & Pratt, 1989).

Algunos autores sin embargo, han sugerido lo contrario; que los diseños multiespecíficos son igual o menos sensibles que los monoespecíficos (Kooijman 1985). Dada la gran variabilidad de fondo de estos diseños, se hace difícil distinguir las causas reales al medir las variables (Lowen-gart & Maki 1985). Pero al ser esas mismas variables las usadas en condiciones naturales para valorar el estado de la comunidad, el ruido presente en las mediciones incrementará, muchas veces, el realismo del diseño.

Los usos posibles de los canales artificiales en ecotoxicología van desde validar los resultados obtenidos en el laboratorio o microcosmos (Belanger *et al.*, 1990); valorar la influencia de factores ambientales sobre el efecto de los tóxicos

(Clements *et al.*, 1990), hasta la investigación de la influencia de otros niveles tróficos sobre la respuesta ecotoxicológica (Clements, 1991; Stewart & Hill, 1993; Brock *et al.*, 1995; Kiffney 1996).

En este artículo se van a presentar tres experimentos que difieren tanto en sus objetivos y diseño experimental, como en los parámetros estudiados. Dos de los experimentos utilizaron el cobre, un metal pesado que se encuentra en muchos dos de Europa en concentraciones potencialmente tóxicas para el ecosistema. En el tercer experimento se usó un herbicida, la atrazina, de la familia de las triazinas (Tabla 1). En el primer experimento se desarrolló un diseño exponencial, al estudiar la sensibilidad de la comunidad algal frente al cobre, en un experimento a largo plazo. Gracias a los resultados de este experimento, se determinó la sensibilidad de la comunidad algal frente al cobre, y su evolución a lo largo del tiempo.

En un segundo experimento, utilizando un diseño factorial, se estudió el efecto de la interacción del cobre con la velocidad. Se sabe que el intercambio de elementos entre los organismos acuáticos y el medio depende entre otros factores de la difusión a través de la capa límite. La reducción en el grosor de la capa límite, provocada por un incremento de la velocidad del agua, afectará por tanto a la biodisponibilidad del tóxico, a iguales concentraciones en el agua. La concentración de cobre usada se decidió a partir del primer experimento.

Finalmente un tercer experimento analizaba la posible modificación de la toxicidad de la atrazina sobre las algas, sujetas a la acción de organismos herbívoros.

MATERIAL Y MÉTODOS

Diseño del sistema de ríos artificiales

El sistema de dos artificiales constaba de hasta 14 canales de metacrilato de 5 mm de grosor. Los canales tenían una longitud, dependiendo del experimento de entre 0.85 y 1.7 m, y una anchura y altura de 0.1 m. La alimentación de los canales se realizaba por goteros. Esto resultaba una novedad, respecto a los sistemas descritos en otros trabajos. Los goteros (NETAFIM, con un caudal de 24 l/hora), usados habitualmente en riego por goteo, tenían la función de proveer un caudal constante de agua dentro de unos márgenes de presión. De este modo una sola bomba y una sola canalización donde se disponían los goteros, era suficiente para alimentar todos los canales. Los goteros proporcionaban un flujo de 1.5 l/min a cada canal. Los canales se iluminaban con focos halógenos (OSRAM HALOLINE, R7s 230v-500w) que proporcionaban una irradiancia de entre 110-130 μmol de fotones $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$, de radiación fotosintéticamente activa (400 a 700 nm). El fotoperiodo se sincronizó con el natural, dependiendo de la época, entre 8-12 horas de luz y 16-12 horas de oscuridad. Con el fin de evitar un calentamiento excesivo del agua, la instalación disponía de 6 ventiladores y un extractor. La inyección del tóxico se realizaba con una bomba peristáltica (COLE-PARMER, 7521-10, tubos Masterflex-Norprene 6404-14), a partir de un depósito (250 litros) donde se dispuso el tóxico objeto de estudio (Fig. 1). Todo el sistema de inyección de tóxicos y de agua esta compuesto por

Tabla 1. Resumen de los experimentos realizados. Trat: número de tratamientos. Can: número de canales. Rep: número de réplicas. t: duración del experimento en días. *Experiments data. Trat: number of treatments. Can: number of channels used. Rep: number of replicates. t: experiment duration in days.*

Experimento	Diseño	Factor 1	Factor 2	Trat.	Can.	Rep.	Días muestreo	t	Parámetros
EC ₅₀ de Cobre	Exponencial	Cobre	-	9	12	-	0, 1, 3, 6, 12, 16	16	F ₀ , Rend. elec.
Cobre velocidad	Factorial	Cobre	Velocidad	4	12	3	0, 1, 3, 7	7	C _{inc.} , Chl
Atrazina herbivo.	Factorial	Atrazina	Herbivorismo	4	12	3	0, 1, 3, 12, 18	18	C _{inc.} , Chl, Comunidad

plásticos inertes, usados en industria alimentaria, y que por tanto no liberan ningún tipo de tóxico. La temperatura del agua oscilaba entre los 18-22°, a lo largo de todo el día. Dependiendo del tipo de experimento, el agua usada procedía de un pozo subterráneo cercano a los canales, o del río donde habían sido colonizados los sustratos.

Métodos

La superficie de cada canal se recubrió con cristales esmerilados de 12x9 cm que proporcionaron soporte a los organismos colonizadores, así como una superficie homogénea a lo largo del canal. Entre ellos se situaron los cristales de 1.2x1.2 cm que serían las unidades de muestreo. Todos los cristales se expusieron a un periodo de colonización, de entre 2 y 4 semanas, en soportes de metacrilato diseñados específicamente para la sujeción de los cristales, en diferentes ríos (Avencó, Brugent, Francolí y Furió, NE de España). Los

cristales colonizados se transportaban sumergidos en agua del río, en tanques de plástico inerte, protegidos de la luz, en un tiempo corto (1 h.), desde el río hasta el laboratorio. Una vez situados en los canales correspondientes, los cristales colonizados se aclimataron durante una semana a las condiciones definidas en el experimento.

Las muestras de agua para análisis de cobre se conservaron congeladas con ácido nítrico al 1% para su posterior análisis. La concentración de cobre se analizó con ICP-OES (Plasma de inducción acoplado a emisión espectroscópica). La concentración de atrazina fue medida con el test de inmunoensayo enzimático "EnviroGard Triazine QuantiTube Test Kit" (ENVR TOO 01, MILLIPORE.).

Un día antes de colocar los organismos en los canales, se ponía en marcha el sistema de canales, comprobando el funcionamiento. Entre otras operaciones, se realizaba la medición de las velocidades del agua en los canales. Esta se llevó a cabo

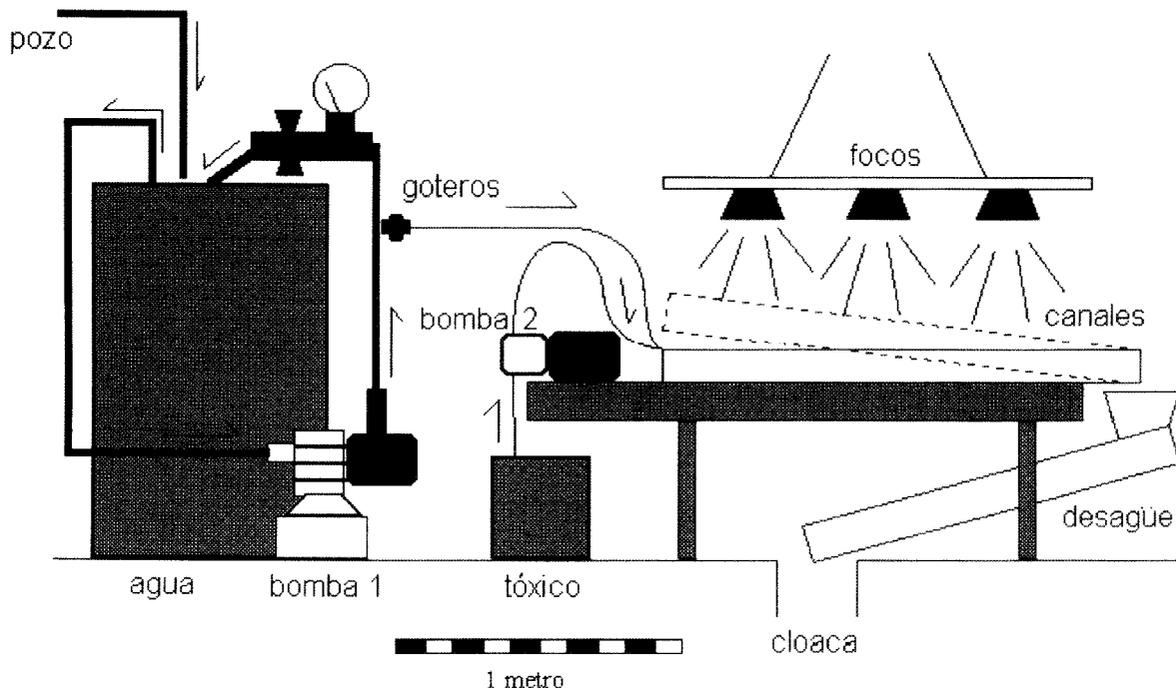


Figura 1. Esquema de los canales artificiales. Dependiendo del tipo de experimento el agua usada provenía del pozo situado cerca del laboratorio, o de los ríos estudiados. *Artificial channel system scheme. According to the experiment, water come from a well or from natural river:*

mediante la adición de NaCl, y siguiendo la evolución de la conductividad (Triska et al., 1984).

Para el estudio de la comunidad algal se conservaron 2 cristales de cada canal, en 2 ml de formol al 4%, tomados a lo largo del experimento. La composición de la comunidad y su estructura fue caracterizada después de sonicar los sustratos de vidrio, durante 2 periodos de 2 minutos (Sabater et al., 1998). Un mínimo de 400 células fue contado e identificado en cada muestra, usando la técnica de Utermohl. Los diferentes taxones se clasificaron, además, en diferentes clases, atendiendo a su morfología y fijación al sustrato (Gregory, 1983).

La incorporación de $H^{14}CO_3^-$, se determinó sobre cinco cristales, procedentes de cada canal. Los cristales eran incubados con la misma irradiación ($110 \mu mol m^{-2} s^{-1}$) y temperatura ($17-19^\circ C$) que en el canal, durante una hora. La incubación se realizaba en viales, con 4 ml de agua del canal correspondiente al vidrio muestreado, en un baño con temperatura controlada y agitación. Después de una preincubación de 30 minutos, se adicionaba $1 \mu Ci$ de $NaH^{14}CO_3$. La incorporación se detenía al cabo de una hora, adicionando 0.3 ml de formol al 40%. El carbono radiactivo no fijado era eliminado mediante evaporación en medio ácido, durante 8 horas en una placa calefactora. Para incrementar la extracción del material fotosintetizado se añadía 1 ml de DMSO (Filbin & Hough, 1983).

Un Fluorimetro de Amplitud Modulada (Photosynthesis yield analyzer MINI-PAM, WALZ, Effeltrich, Alemania), se utilizó de modo alternativo al ^{14}C para valorar la fotosíntesis (Samson et al., 1988; Schreiber et al., 1993; Hofstraat et al., 1994; Karsten et al., 1996). Este método, al no ser destructivo, permitía realizar medidas repetidas sobre la misma muestra. Los parámetros fotosintéticos F_0 y el rendimiento de fotones, se midieron sobre cinco cristales de cada canal (12 en total). El parámetro F_0 es una medida de la fluorescencia total, que se relaciona con la cantidad total de clorofila, y por extensión a la biomasa. El rendimiento de fotones (Yield) estima la tasa del flujo de electrones en el fotosistema II en muestras iluminadas y es proporcional a la tasa foto-

sintética. Los cristales se muestrearon al azar, y las medidas de fluorescencia se realizaron en una placa de Petri, con el mismo agua en que se encontraban y bajo la misma luz.

La concentración de clorofila-a se determinó a partir de cinco cristales de cada canal. Para la extracción de clorofila-a se usó acetona al 90%. Los cristales fueron sonicados para acelerar la extracción, durante tres periodos de 7 minutos (Guasch et al., 1997). La concentración de clorofila-a fue calculada a partir de las ecuaciones de Jeffrey y Humphrey (1975).

El efecto directo de la atrazina sobre *Physella acuta* se midió tras su exposición a un banco de concentraciones de atrazina en un experimento anterior (Rosés et al., 1999). La acumulación de biomasa en forma de peso seco ($60^\circ C$ hasta peso constante) de los caracoles se determinó por la diferencia de peso entre el inicio y el final del experimento, tratando por separado a los individuos de cada uno de los tratamientos.

Las diferencias de las variables estudiadas en los diferentes tratamientos, se valoraron usando un análisis de la varianza (ANOVA), de medidas repetidas (Winer, 1971). Cuando las diferencias eran significativas, la comparativa múltiple se llevaba a cabo con un test TUKEY HSD (Winer, 1971). Las variables estudiadas fueron la incorporación de carbono, la concentración de clorofila, la eficiencia fotosintética (expresada como el cociente entre $\mu g C$ incorporado/ μg de clorofila-a) y el incremento de biomasa de los caracoles.

Determinación del umbral de toxicidad del cobre sobre la comunidad algal

En este caso se aplicó un diseño de tipo regresión, para conocer la sensibilidad de la comunidad frente al cobre y su evolución a lo largo del tiempo. Se utilizaron doce canales: tres canales control (sin adición de cobre) y nueve expuestos a concentraciones crecientes de este metal, desde 5 a $80 \mu g/l$ (5; 7.5; 10; 15; 20; 30; 40; 60; 80). El experimento tuvo una duración de 16 días, a lo largo de los cuales se hizo el seguimiento de las características químicas del agua y la concentración de cobre (tal como se ha descrito en los

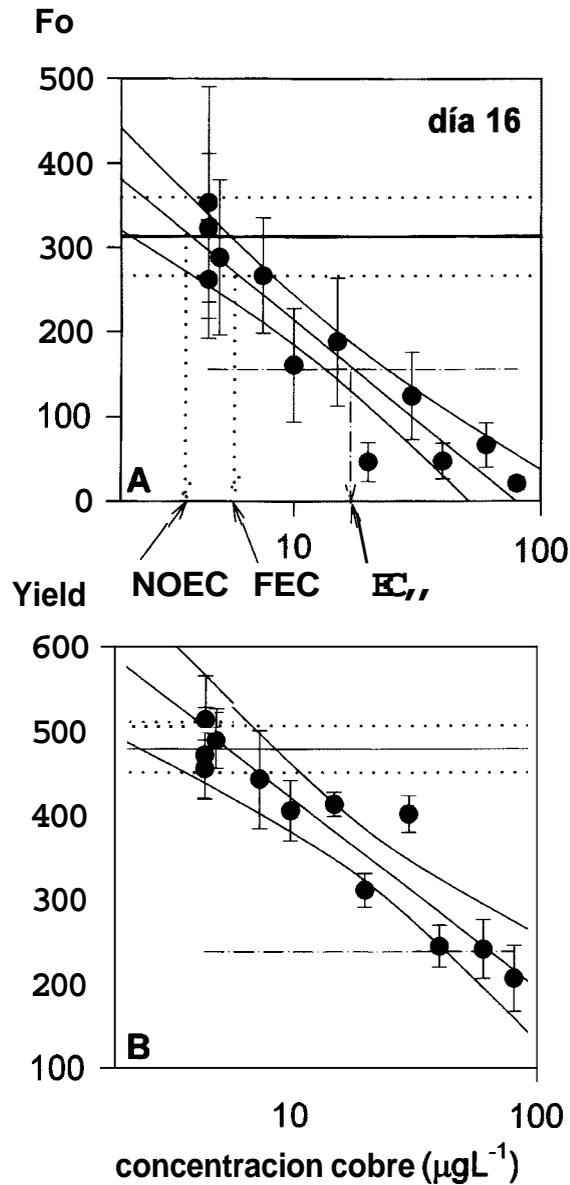


Figura 2. A) Efecto del cobre sobre la F_o . El parámetro F_o es una medida de la fluorescencia total, que se relaciona con la cantidad total de clorofila, y por extensión a la biomasa. B) Efecto del cobre sobre el Yield. El rendimiento de fotones (Yield) estima la tasa del flujo de electrones en el fotosistema II en muestras iluminadas y es proporcional a la tasa fotosintética. La NOEC (A) se determinó mediante interpolación lineal de la recta de regresión, con la media de los canales control. La FEC, mediante la interpolación con el límite inferior de confianza de los canales control. La EC_{50} se determinó mediante interpolación lineal con el punto en el que el parámetro utilizado presentaba la mitad del valor medio de los canales control. Los datos provienen del día 16. Las barras repre-

metodos), en los días 0, 1, 3, 6, 9, 12, y 16. También se tomaron muestras para la determinación de la concentración de clorofila y el estudio de la composición de la comunidad.

A lo largo del experimento, se aplicó un modelo de regresión entre la concentración de cobre (en escala logarítmica) y la biomasa o actividad algal (representadas respectivamente por los parámetros F_o y el rendimiento de fotones), para calcular la concentración para la que no se observan efectos (NOEC) y la concentración efectiva que reduce en un 50% la actividad respecto a la concentración control (EC_{50}). La NOEC se determinó mediante interpolación lineal de la recta de regresión, con la media de los canales control. La concentración para la que se observa el primer efecto (FEC) se calculó mediante interpolación lineal de la recta de regresión y el límite inferior de confianza de los canales control. La EC_{50} se determinó mediante interpolación lineal de la recta de regresión, con el punto en el que el parámetro utilizado presentaba la mitad del valor medio medido respecto a los canales control (Fig. 2). Los cálculos del NOEC y el FEC, se realizaron siguiendo las recomendaciones expuestas en Liber *et al.*, (1992), aplicando el mismo procedimiento utilizado y descrito en Dahl & Blanck (1996). Dicho procedimiento se aplica para el análisis de los resultados de experimentos de tipo exponencial. El NOEC se estima mediante una técnica de regresión lineal (Liber *et al.*, 1992). Se calcula la regresión lineal con límites superior e inferior (coeficiente de confianza del 95%) entre la concentración (creciente) del tóxico y el parámetro fotosintético estudiado. Los puntos cercanos al NOEC se incluyeron en la regresión siem-

prentan el error estándar dentro de cada canal. A) *Effect of copper on F_o , a measure of the total fluorescence, which related to the total amount of chlorophyll and biomass.* B) *The copper effect on the Yield. Yield was an estimation of the electron flux on photosystem II on illuminated samples, and is directly associated with the photosynthetic rate. The NOEC (A) was determined by lineal interpolation of the regression line with the mean of control channels. The FEC, by lineal interpolation with the lower confidence limit of control channels. The EC_{50} by lineal interpolation with the point where the parameter used represents the 50% of the control channels. Data are from day 16. Bars represent the standard error into each channel.*

pre y cuando su inclusión representara un aumento en el coeficiente de la regresión lineal. En caso contrario, dichos puntos se excluían de la regresión y se incorporaban a los valores obtenidos de las tres réplicas control para calcular la línea base y su correspondiente margen de confianza. (95%). El rango de NOEC se calculó a partir de la interceptación de la línea de regresión y la línea base, incluyendo un nivel inferior y otro superior calculados con los límites de confianza del 95%. El límite inferior representa la concentración a partir de la cual se detecta el primer efecto significativo (FEC). Los cálculos del NOEC y el FEC son utilizados para la estimación del riesgo que el tóxico, objetivo del estudio, representa para el ecosistema (Cardwell *et al.*, 1999).

Influencia de la velocidad sobre el efecto tóxico del cobre en la comunidad algal

Se aplicó un diseño factorial para determinar si el incremento de la velocidad del agua potenciaba la toxicidad del cobre. Se dispusieron dos tratamientos con sus correspondientes controles, con tres réplicas cada uno (un total de 12 canales): adición de cobre y velocidad del agua de 1 cm/s (cu) y su control sin cobre (c); adición de cobre y velocidad de 15 cm/s (cu+v) y su control sin cobre (v). Los tratamientos se distribuyeron aleatoriamente entre todos los canales disponibles. Se añadió una solución de cobre a los canales correspondientes hasta mantener una concentración nominal de 15 µg/l. La solución de cobre se preparó a partir de una solución concentrada de 1 g/l CuCl (Titrisol MERCK), que se inyectaba mediante una bomba peristáltica. Concentraciones similares son frecuentes en ríos moderadamente contaminados de la misma zona (NE de España), pudiendo alcanzarse valores de hasta 120 µg/l (Armengol *et al.*, 1993). Las diferentes velocidades se lograron modificando la inclinación de los canales correspondientes. La evolución en la concentración de clorofila y la incorporación de carbono, fue medida los días 0, 1, 3 y 7. Este tiempo de exposición al cobre respondía al interés por conocer la evolución de las variables biológicas a corto plazo.

Influencia del herbivorismo sobre el efecto de la atrazina en la comunidad algal

Con el fin de estudiar el efecto de los herbívoros en la toxicidad de la atrazina sobre el perifiton, se realizó un experimento de 18 días de duración. La concentración de atrazina utilizada fue de 14.18 ± 5.93 (n=22) µg/l. Esta concentración no tiene un efecto negativo sobre las algas (Huber, 1993) ni sobre los caracoles (Rosés *et al.*, 1999). Los caracoles, de un tamaño entre 7-9 mm fueron introducidos en los canales con una densidad de 118 ind/m² y 48 h antes de la inyección del tóxico, para su aclimatación.

El diseño experimental consistió en cuatro tratamientos con tres réplicas cada uno: 1) tres canales con atrazina (A); 2) tres canales sin atrazina (C); 3) tres canales con atrazina y herbívoros (A-S); 4) tres canales con herbívoros (S). Los diferentes parámetros físicos, químicos y biológicos se analizaron los días 0, 1, 3, 12 y 18.

RESULTADOS Y DISCUSION

Determinación del umbral de toxicidad del cobre

El efecto del cobre sobre la biomasa algal (medida como F_0) y su eficiencia fotosintética (medida como rendimiento de fotones, Yield), fue evidente a partir del tercer día de exposición. Ello permitió el cálculo de la NOEC y la EC₅₀, medidas sobre la F_0 el día 16, obteniendo unos valores de 15.29 y 45.04 µg/l de cobre, respectivamente.

Los resultados obtenidos en las EC₅₀ sobre la F_0 (17.3 µg/l de cobre, al cabo de 12 días), son del mismo rango que las observadas en otros estudios (Kaufman, 1982; Pratt & Rosenberger, 1993). La evolución observada en la EC₅₀ medida sobre la F_0 en los días 3, 6, 12 y 16 (respectivamente 45.05; 20.4; 17.3; y 17.5 µg/l de Cobre), muestra un progresivo incremento en la toxicidad del cobre, estabilizándose la EC₅₀ a partir del día 12. El valor de la EC₅₀ valorada sobre el Yield es más elevada (63.9 µg/l el día 16).

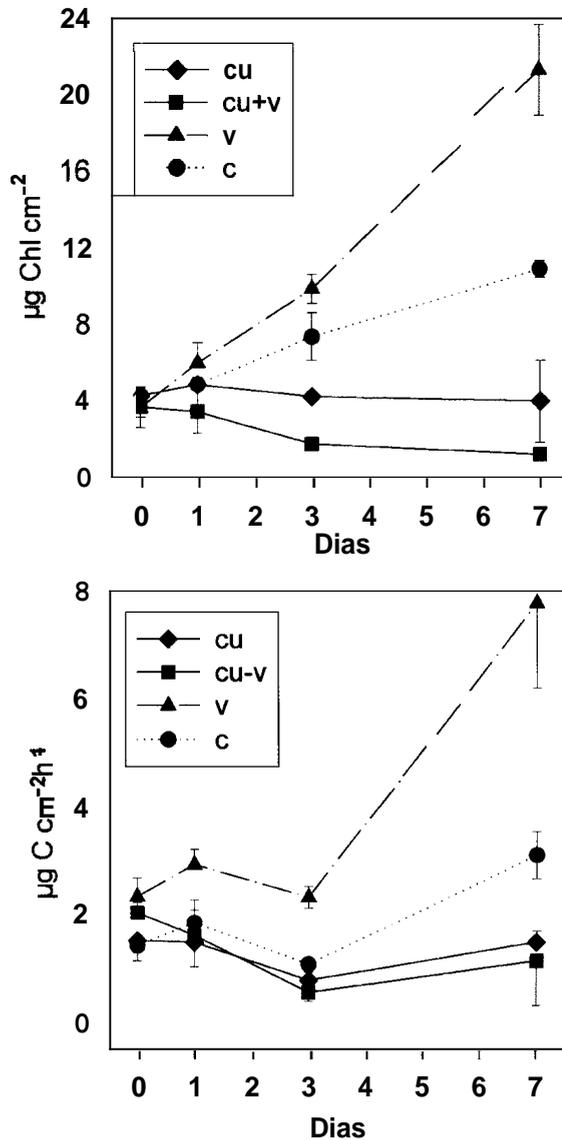


Figura 3. Influencia de la velocidad sobre el efecto del cobre: Concentración de clorofila y incorporación de Carbono a lo largo del experimento. Las barras representan la desviación estandar. CU (tratamiento con cobre); CU-V (t. con cobre y velocidad); V (t. con velocidad); C (t. control). *Effect of velocity on copper toxicity: Chlorophyll-a and Carbon incorporation. Bars represent standard deviation. CU (copper treatment); CU-V (copper plus velocity t.); V (velocity t.); C (control t.)*

Influencia de la velocidad sobre el efecto toxico del cobre en la comunidad algal

Los canales control incrementaron la concentración de clorofila, a lo largo del tiempo (Fig. 3). El efecto que los 15 µg/l de cobre tuvieron sobre la reducción de clorofila-a fue significativo a lo largo del tiempo ($p < 0.0001$). La adición de cobre redujo significativamente la biomasa algal ($p = 0.00015$) al cabo de 7 días bajo velocidad de 1 cm/s, necesitando en cambio, sólo 3 días cuando la velocidad era 15 cm/s ($p = 0.00015$).

El efecto del cobre sobre la incorporación de carbono fue significativo a lo largo del tiempo ($p < 0.0001$). La adición del cobre causó una reducción significativa del 47% ($p = 0.02$) en la incorporación el día 3, cuando la velocidad era de 15 cm/s ($p = 0.02$), pero no bajo 1 cm/s. Las diferencias entre los dos tratamientos crecieron con el tiempo (Fig. 3). Solo después de 7 días el cobre causó una reducción significativa ($p = 0.023$) si la velocidad era 1 cm/s.

Las diatomeas dominaban en la comunidad algal. *Fragilaria capucina*, *Synedra ulna* y células basales de la cloroficea *Stigeoclonium tenue*, fueron las más abundantes. El incremento de velocidad del agua, causó un incremento del número de células basales de *Stigeoclonium tenue* y de *Synedra ulna*. La adición de cobre, en los canales con velocidad de 15 cm/s, provocó un descenso significativo en el número de células de *Synedra ulna* ($p = 0.0018$) al contrario que las células basales de *Stigeoclonium tenue*, que experimentaron un incremento significativo ($p = 0.0002$).

Las concentraciones intermedias de cobre (alrededor de 15 µg L⁻¹), poseen un reconocido efecto tóxico sobre diferentes parámetros estructurales y fisiológicos de las comunidades algales, así como en la concentración de clorofila (Kaufman, 1982; Pratt & Rosenberger, 1993), en la producción primaria (Leland & Carter, 1985), y en la composición de la comunidad (Foster, 1982; Leland & Carter, 1985; Clements, 1991). Nuestros experimentos confirman estos efectos, mostrando alteraciones en esos parámetros, como máximo al cabo de 7 días. En presencia de una mayor velocidad los efectos se observan

después de 3 días. Esto confirma nuestra hipótesis acerca de un incremento en la biodisponibilidad del cobre, debida al incremento en la velocidad del agua. La aparición de efectos en los canales con cobre y una mayor velocidad del agua se da con tiempos menores de exposición que en los canales con cobre y menor velocidad del agua.

Ciertos mecanismos contribuyen a reducir la toxicidad de los metales pesados sobre el perifiton: por ejemplo la excreción de exopolimeros (Loaec, 1997; Hsieh, 1994), y la reducción en la biodisponibilidad del metal, por alteraciones en su especiación (Mason & Jenkins, 1995). En contraposición, la velocidad demuestra poseer un efecto sinkrgico sobre la toxicidad del cobre. En nuestro estudio vemos como un incremento en la velocidad de 1 a 15 cm/s acelera la disminución de la biomasa y la incorporación de carbono, adelantando la aparición de los efectos del día 7 al día 3.

Este efecto sinkrgico del incremento de velocidad sobre la toxicidad de los metales puede estar basada en la progresiva reducción de la capa límite (Stevenson, 1996). Este mecanismo viene a ser similar al descrito para la disponibilidad de nutrientes (Biggs *et al.*, 1998), que resulta de un incremento del flujo de compuestos a través de la membrana celular. De este modo a mayores velocidades y a igualdad de concentración, la biodisponibilidad del cobre es mayor.

Las implicaciones ecológicas de este mecanismo, son remarcables. Se puede esperar que el efecto del cobre sobre las comunidades de rios de corrientes medianamente rápidas sea mayor que sobre las comunidades de aguas más tranquilas. Además, si estas zonas de corrientes más lentas, reciben mayores cargas de nutrientes, se incrementará la biomasa (Sabater & Sabater, 1992). Este incremento de biomasa puede tener un efecto protector sobre los organismos (Admiraal, 1999). Todo esto sugiere que rios de zonas bajas, con corrientes bajas y mayores cargas de nutrientes, el efecto del cobre se verá minimizado. En rios de montaña, donde se suman los efectos de la velocidad y bajas biomazas, las comunidades perifíticas se verán mucho más afectadas.

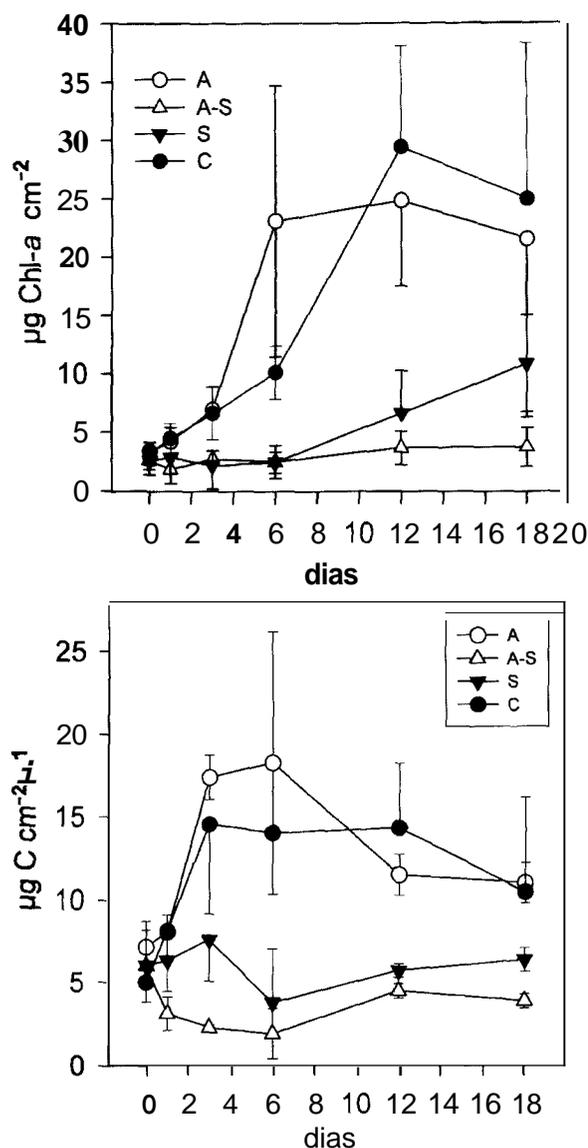


Figura 4. Influencia del herbivorismo en el efecto tóxico de la atrazina: Concentración de clorofila-a y incorporación de Carbono a lo largo del experimento. Las barras corresponden a la desviación estándar. A (tratamiento con atrazina); A-S (tratamiento con atrazina y herbivoros); S (tratamiento con herbivoros); C (tratamiento control). *Effect of herbivory on atrazine toxicity: Chlorophyll-a concentration and Carbon incorporation. Bars represent standard deviation. A (atrazine treatment); A-S (atrazine plus herbivory t.); S (herbivory t.); C (control treatment).*

Influencia del herbivorismo sobre el efecto de la atrazina en la comunidad algal

En este caso no se encontraron diferencias significativas entre los canales control (C) y los sometidos a atrazina. En ambos tratamientos, la concentración de clorofila-a y la incorporación de carbono (Fig. 4), se incrementaron durante los primeros días y se mantuvieron o disminuyeron al final del experimento. Los tratamientos con caracoles presentaron una biomasa algal y una incorporación de carbono mucho menor que los canales sin caracoles. Estas diferencias se hicieron significativas ($p < 0.05$) a partir del tercer día de experimento.

La interacción entre los herbívoros y la atrazina (tratamiento **AS**), afectó significativamente a la incorporación de carbono ($p < 0.05$). Respecto a los tratamientos control y atrazina, las diferencias son evidentes desde el día 6 hasta el final del experimento. En la concentración de clorofila-a, el factor herbivorismo es el que marca diferencias significativas, y la adición de atrazina no tiene un efecto sumatorio ($p = 0.7614$).

La estructura de la comunidad del perifiton cambió por efecto del herbivorismo disminuyendo las especies filamentosas y las diatomeas pedunculadas. No se ha observado un efecto significativo en el tratamiento con tóxico y herbívoros y tampoco se determinaron diferencias significativas en la acumulación de biomasa de los caracoles entre los diferentes tratamientos.

La exposición a concentraciones basales de atrazina ($14 \mu\text{g/l}$) no altera la incorporación de carbono ni la concentración de clorofila de la comunidad algal. Esta falta de inhibición ha sido observada en diversos estudios (Huber, 1993; Solomon *et al.*, 1996). El herbivorismo sí marca diferencias significativas respecto a los tratamientos sin este nivel trófico, disminuyendo la biomasa y la incorporación de carbono por unidad de superficie del perifiton. La respuesta del perifiton al efecto de los herbívoros ha sido también objetivo de múltiples estudios, en muchos de ellos se observan resultados similares a los nuestros (Steinman, 1996). Sin embargo el herbivorismo sobre comunidades sometidas a atrazina disminu-

ye significativamente la actividad fotosintética. Los herbívoros mantienen una baja biomasa de algas y probablemente de esta manera podrían evitar que las algas se adapten a la exposición del tóxico como sucede en el tratamiento que sólo está sometido al herbicida. DeNoyelles *et al.*, (1982) y Hoagland *et al.*, (1993) demostraron en comunidades de fitoplancton y perifiton que una concentración de $20 \mu\text{g/l}$ de atrazina tenía un efecto negativo en la producción y biomasa de las algas durante los primeros días de exposición; después la comunidad se recuperaba como un signo de su adaptación a las bajas concentraciones del herbicida.

Por otro lado, los herbívoros podrían incrementar la movilización de los tóxicos, favoreciendo su difusión entre el perifiton después de consumir las algas que se disponen en las capas superiores. Stewart & Hill (1993) sugieren que los herbívoros modificarían el efecto de los tóxicos interfiriendo en su transporte y movilización de forma similar a lo que se describe para los nutrientes (Newbold *et al.*, 1983). En todo caso, estos resultados implican un importante control del tipo "top-down" de los herbívoros sobre la comunidad de algas expuesta a la atrazina; dicho mecanismo necesita todavía una mayor investigación.

Diseño de los canales

En el uso de canales artificiales se deben considerar distintos factores. El tamaño de los canales será uno de los elementos primordiales. Los canales deben tener el tamaño suficiente para: **A)** permitir el desarrollo y supervivencia de la biota a estudiar. **B)** para permitir la expresión de los factores que se pretende controlar y que servirán para probar nuestra hipótesis. **C)** los muestreos (extracción de biota) no deben constituir un impacto excesivo sobre la comunidad de los canales. Por otra parte, la complejidad de la comunidad estará influida, en parte, por el tamaño de los canales, por el tipo de inóculo que se aporte, por el acceso que tengan los organismos libres a ellos (en el caso de canales artificiales, situados en la naturaleza) y por su configuración. Canales pequeños (de menos de 5 metros) pueden poseer

una comunidad 10 suficientemente compleja, para obtener resultados extrapolables a las comunidades naturales (Belanger, 1997). En nuestro caso, en el experimento exponencial de cobre, al usar el PAM (Fluorímetro de amplitud modulada) para las medidas de actividad fotosintética (medida no destructiva), la superficie necesaria era mucho menor, y se usaron canales de 0.85 m de longitud. Para los otros experimentos, en cambio, fue necesario el uso de los canales de 1.7 m. En el experimento de cobre-velocidad, se utilizó un método destructivo para medir la actividad fotosintética (^{14}C), con lo que era necesario una mayor superficie de muestreo, donde el impacto del muestreo fuera menor. En el caso del experimento atrazina-herbivoros, se requería toda la superficie del canal colonizada por algas, para que los herbivoros pudieran alimentarse.

Las condiciones impuestas artificialmente en los canales, podrán provocar cambios en las características del agua, que deberán ser controlados. Entre estos cambios cabe considerar la sedimentación (si disminuimos la velocidad del agua respecto al punto de suministro, el material en suspensión puede sedimentar...), o la precipitación de solutos (si existen cambios de temperatura, pH o estado redox). Esto es particularmente importante en 10 que se refiere a la recirculación del agua. La recirculación puede provocar que los productos residuales del metabolismo, generados por las comunidades, se acumulen, afectando así a las características del agua. En nuestro caso se ha evitado, contando siempre con un suministro continuo de agua.

La elección del tipo de sustrato, que se usa en los canales, es siempre complicada, ya que el material seleccionado afectará al comportamiento y efectos que manifiesten las comunidades y el tóxico respectivamente. Los sustratos susceptibles de ser usados son naturales: rocas, guijarros, gravas, sedimentos, materia orgánica... o artificiales: cerámica, vidrio, metacrilato, plásticos diversos. El vidrio esmerilado o granulado es especialmente indicado en estudios ecotoxicológicos, pues es inerte, y permite la colonización de las algas; además, proporciona espacios a las **algas**, fuera del alcance de la rúdula de los

herbivoros, evitando una limpieza total del sustrato, y facilitando el mantenimiento de una cierta biomasa algal, que permitirá una recuperación de la comunidad.

En el laboratorio, el control de los factores y la aproximación a la realidad del ecosistema fluvial, son dos objetivos que aun siendo difícilmente compatibles, requieren un elevado grado de compromiso. Los canales artificiales representan fragmentos aislados de un curso de agua, donde la dinámica de los procesos ecológicos es esencialmente compleja. En los sistemas artificiales, la menor escala, la simplificación de niveles tróficos, el menor reclutamiento y regeneración de la comunidad diferencian a Cstos de los naturales.

Mediante los diseños de tipo factorial y exponencial, se han obtenido resultados complementarios sobre distintos aspectos de la toxicidad del cobre. El diseño tipo regresión, proporciona una red de seguridad al investigador, en comparación con el diseño factorial, donde el número de tratamientos es menor. En los diseños factoriales, al tener pocos tratamientos, se limita la interpretación de los efectos que puedan ocurrir, como gradientes a lo largo del rango de exposición al tóxico empleado (Belanger, 1997). En los diseños de tipo factorial, al tener que reducirse el número de tratamientos, es imprescindible elegir correctamente las concentraciones de tóxico a emplear. Este es un problema que en un diseño tipo regresión no suele darse.

Un diseño tipo factorial permite distinguir el efecto de los factores aislados y combinados. Si se desea maximizar el número de tratamientos, debe tenerse en cuenta que ello acarreará una pérdida de replicación. Debe, además, evitarse la "pseudoreplicación" (Kosinski, 1989); en consecuencia, el número de tratamientos no puede crecer a expensas de las réplicas. Se debe asegurar que la utilización de la inferencia estadística, sea la correcta. En nuestro caso hemos buscado la interacción de los tóxicos, con alguno de los factores con que interaccionan en condiciones naturales, de modo que la potenciación o inhibición del efecto se pueda atribuir a ese factor.

En los diseños exponenciales, si se elige un rango lo suficientemente amplio de concentracio-

nes se encontrara un efecto relacionado con una concentracion; el efecto observado sera el provocado por una cierta concentracion de toxico. Es por ello que este tipo de diseios resultan idoneos en el contexto de la valoracion de riesgos. En los experimentos bien diseiados, la presión selectiva de las diferentes concentraciones de tóxico es substancialmente más importante que la variabilidad dentro de cada canal; logrando de este modo resultados concluyentes en un alto porcentaje de casos (Belanger, 1997).

Conociendo las ventajas de un tipo de diseño y de otro, es posible complementar nuestros experimentos toxicologicos, usando ambos. Cuando el trabajo comienza con un tóxico cuyos efectos y concentraciones tóxicas (NOEC y EC50) son desconocidas, puede resultar una buena aproximación el diseño tipo regresión. Con este tipo de aproximación se obtendrán como primeros resultados unas concentraciones del toxico que se podrán relacionar con unos efectos valorables, que permitan planteamientos posteriores. Cuando se conoce la concentración de toxico a partir de la cual se observan ciertos efectos sobre las comunidades, el experimentador se podra basar en diseios factoriales para estudiar el efecto que tendra un factor sobre la acción del toxico. A posteriori, podrá exponer esas mismas comunidades a diseios tipo regresión, para conocer como ha evolucionado la tolerancia frente al tóxico bajo el efecto del factor estudiado.

Como conclusion, podemos decir que el uso de canales artificiales en ecotoxicologia resulta una buena aproximación para el estudio de las comunidades de perifiton. Su uso, bajo diseios de tipo exponencial o factorial, ha demostrado ser apropiado, especialmente en aquellos a largo plazo, donde fue necesario el control de ciertos factores, a lo largo de varias semanas. Su polivalencia nos permitió estudiar la interacción de tóxicos y otros factores. Los diseios utilizados nos permitieron controlar el factor estudiado y la detección de sus efectos sobre la comunidad algal. Han demostrado asi mismo ser un buen soporte para el desarrollo de comunidades algales y de macroinvertebrados herbivoros, lo suficientemente complejas, como para obtener resultados extrapolables a los estudios realizados en sistemas naturales.

AGRADECIMIENTOS

Los experimentos descritos en este articulo fueron llevados a cabo dentro de un proyecto de la Comunidad Europea ("Microbenthos", ENV4-CT96-0298). Uno de los autores (ENR), disfruta de una beca pre-doctoral de la Universidad de Barcelona. Se agradece también la contribución de la Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología (CIRIT) 1997SGR-122. Los "Servicios Científico-Técnicos de la Universidad de Barcelona", proporcionaron los medios para la realización de análisis químicos. Así mismo, este artículo quiere honrar la memoria de Aimé Delonca.

BIBLIOGRAFÍA

- ADMIRAAL, W., H. BLANCK, M. BUCKERT DE JONG, H. GUASCH, N. IVORRA, V. LEHMANN, B.A.H. NYSTROM, M. PAULSSON, & S. SABATER. 1999. Short-term toxicity of zinc to microbenthic algae and bacteria in a metal polluted stream. *Water Research*, 33: 1989-1996.
- ARMENGOL, J., S. SABATER, Y F. SABATER. 1993. *Variaciones en la carga de nutrientes en la cuenca del rio Ter y su efecto sobre las comunidades de indicadores biológicos*. Informe técnico para la Junta de Sanejament. Dept. Ecologia. Univ. Barcelona.
- BELANGER, S. E., J.L. FARRIS, D.S. CHERRY & J.J. CAIRNS. 1990. Validation of *Corbicula fluminea* growth reductions induced by copper in artificial streams and river systems. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 47: 904-914.
- BELANGER, S. E. 1997. Literature Review and Analysis of Biological Complexity in Model Stream Ecosystems: Influence of Size and Experimental Design. *Ecotox. and Environ. Saf.*, 36: 1-16.
- BIGGS, B. J. F., D.G. GORING & V.I. NIKORA. 1998. Subsidy and stress responses of stream periphyton to gradients in water velocity as a function of community growth. *J. Phycol.*, 34: 598-607.
- BROCK, T. C. M., R.M.M. ROIJACKERS, R. ROLLON, F. BRANSEN & L. VAN DER HEYDEN. 1995. Effects of nutrient loading and insecticide application on the ecology of *Elodea*-dominated freshwater microcosm. II Responses of macrophytes, periphyton and macroinvertebrate grazers. *Arch. Hydrobiol.*, 134: 53-74.

- CAIRNS, J. J., & J.R.E. PRATT. 1989. *Functional Testing of Aquatic Biota for Estimating Hazards of Chemicals*. ASTM, Philadelphia.
- CARDWELL, R.D., M.S. BRANCATO, J. TOLL, D. DEFOREST & L. TEAR. 1999. Ecological Risk posed by tributyltin in United States surface waters: pre 1989 to 1996 data. *Environ. Tox. and Chem.* 18: 567-577
- CLEMENTS, W. H. 1991. 13. Community Responses of Stream Organisms to Heavy Metals: A Review of Observational and Experimental Approaches. In: *Metal ecotoxicology. Concepts & Applications*. M. C. Newman & A. W. Mc Intosh, (eds.):363-391. Lewis Publ. Boca Raton, USA.
- CROSSLAND, N. O., & T.W.C. LA POINT. 1992. Symposium on aquatic mesocosms in ecotoxicology. *Environ. Contam. Toxicol.*, 11: 1-130.
- DAHL, B & H. BLANCK. 1996. Pollution Induced Community Tolerance (PICT) in periphyton communities established under TBT stress in marine microcosm. *Aquatic Toxicology*, 34: 305-325.
- DENOYELLES, F., W.D. KETTLE, & D.E. SINN. 1982. The responses of plankton communities in experimental ponds to atrazine, the most heavily used pesticide in the United States. *Ecology*, 63: 1285-1293.
- FILBIN, G. J., & R.A. HOUGH. 1983. Extraction of ¹⁴C-labeled photosynthate from aquatic plants with dimethyl sulfoxide (DMSO). *Limnol. Oceanogr.*, 29: 426-428.
- FOSTER, P. L. 1982. Species associations and metal contents of algae from rivers polluted by heavy metals. *Freshwater Biology*, 12: 17-39.
- GIESY, J. P. J. 1985. Multispecies tests: Research needs to assess the effects of chemicals on aquatic life. *Aquatic Toxicology and Hazard Assessment: Eighth Symposium*. STP 891. R.C. Bahner & D.J. Hanson (eds.): 67-77. ASTM, Philadelphia, USA.
- GREGORY, S. V. 1983. Plant-herbivore interactions in stream systems. In: *Stream ecology*. J. R. Barnes & G. W. Minshall, (eds.):157-189. Plenum Press.
- GUASCH, H., I. MUÑOZ, N. ROSES & S. SABATER. 1997. Changes in atrazine toxicity throughout succession of stream periphyton communities. *J. Appl. Phycol.*, 9: 137-146.
- HOAGLAND, K. D., R.W. DRENNER, J.D. SMITH & D.R. CROSS. 1993. Freshwater community responses to mixtures of agricultural pesticides: Effects of atrazine and bifenthrin. *Environ. Toxicol. Chem.* 12: 627-637.
- HOFSTRAAT, J. W., J.C.H. PEETERS, J.F.H. SNEL & C. GEEL. 1994. Simple determination of photosynthetic efficiency and photoinhibition of *Dunaliella tertiolecta* by saturating pulse fluorescence measurements. *Marine Ecology Progress Series*, 103: 187-196.
- HSIEH, K. M., G.A. MURGEL, L.W. LION, & M.L. SHULER. 1994. Interactions of Microbial Biofilms with Toxic Trace Metals: 1. Observation and Modeling of Cell Growth, Attachment, and Production of Extracellular Polymer. *Biotechnology and Bioengineering*, 44: 219-231.
- HUBER, W. 1993. Ecotoxicological relevance of atrazine in aquatic systems. *Environ. Toxicol. Chem.*, 12: 1865-1881.
- HURLBERT, S. H. 1984. Pseudoreplication and the design of ecological field experiments. *Ecol. Monogr.*, 54: 187-211.
- JEFFREY, S. & G.F. HUMPHREY. 1975. New spectrophotometric equations for determining chlorophylls a, b, c1 and c2 in higher plants, algae and natural phytoplankton. *Biochem. Physiol. Pflanzen.*, 167: 191-194.
- KARSTEN, U., I. KLIMANT & G. HOLST. 1996. Fluorimetric method for growth. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62: 232-243.
- KAUFMAN, L. H. 1982. Stream aufwuchs accumulation: disturbance frequency and stress resistance and resilience. *Oecologia*, 52: 57-63.
- KIFFNEY, P. M. 1996. Main and interactive effects of invertebrate density, predation, and metals on a Rocky Mountain stream macroinvertebrate community. *Can. J. of Fish. and Aqua. Sci.*, 53: 1595-1601.
- KIMBALL, K. D. & S.A. LEVIN. 1985. Limitations of laboratory bioassays: The need for ecosystem-level testing. *Bioscience*, 35: 165-171.
- KOOIJMAN, S. A. L. 1985. Toxicity at population level. In: *Multispecies Toxicity Testing*. J. Cairns, Jr. (ed.): 143-164. Pergamon Press, New York.
- KOSINSKI, R.J. 1989. Artificial streams in ecotoxicological studies. In: *Aquatic Toxicology: Fundamental concepts and Methodologies*. A. B. F. Ribeyre (ed.) CRC Press, Boca Raton, USA.
- LAMBERTI, G. A. & A.D. STEINMAN. 1993. Research in artificial streams: applications, uses and abuses. *J. N. Am. Benthol. Soc.*, 12: 313-384.
- LELAND, H. V. & J.L. Carter. 1985. Effects of copper on production of periphyton, nitrogen fixation and processing of leaf litter in a Sierra Nevada, California, stream. *Freshwater Biology*, 15: 155-173.

- LIBER, K., N.K. KAUSHIK, K.R. SOLOMON & J.H. CAREY. 1992. Experimental design for aquatic mesocosm: a comparison of the anova and regression design for assessing the impact of tetrachlorophenol on zooplankton populations in limnocorrals. *Environm. Tox. Chem.*, 11: 61-77.
- LOAEC, M., R. OLIER, & J. GUEZENNEC. 1997. Uptake of lead, cadmium and zinc by a novel bacterial exopolysaccharide. *Water Research*, 31: 1171-1179.
- LOWENGART, G., & A.W. MAKI. 1985. Multispecies toxicity tests in the safety assessment of chemicals: Necessity or curiosity. In: *Multispecies Toxicity Tests*. J. C. Jr. (ed.): 112-150. Pergamon Press, New York.
- MASON, A. Z., & K.D. JENKINS. 1995. Metal detoxification in aquatic organisms. In: *Metal speciation and bioavailability*. A. Tessier and D. T. Turner (eds.): 479-608. John Wiley & Sons, New York.
- NEWBOLD, J. D., J.W. ELWOOD, R.V. O'NEILL & A.D. SHELDON. 1983. Phosphorus dynamics in a woodland stream ecosystem: A study of nutrient spiralling. *Ecology*, 64: 1249-1265.
- NIEDERLEHNER, B. R., J.R. PRATT, A.L.J. BUIKEMA & J.J. CAIRNS. 1986. Comparison of estimates of hazard derived at three levels of complexity. In: *Community Toxicity Testing*. J. Cairns. Jr. (ed.): 30-48. ASTM, Philadelphia.
- PRATT, J. R., & J.L. ROSENBERGER. 1993. *Community change and ecosystem functional complexity: a microcosm study of copper toxicity*. ASTM, Philadelphia.
- RODGERS, J. H., N.O. CROSSLAND, E.R. KLINE, W.B. GILLESPIE, R.A. FIGUEROA & P.B. DORN. 1996. Design and construction of model stream ecosystems. *Ecotox. and Environ. Saf.*, 33: 30-37.
- ROSES, N., M. POQUET & I. MUNOZ. 1999. Behavioural and histological effects of atrazine on freshwater molluscs (*Physa acuta* Drap. and *Ancylus fluviatilis* Mull. Gartropoda). *Journal of Applied Toxicology*, 19, 351-356.
- SABATER, S., & F. SABATER. 1992. Longitudinal changes of benthic algal biomass in a mediterranean river during two high production periods. *Arch. Hydrobiol.*, 124: 475-487.
- SABATER, S., S.V. GREGORY & J.R. SEDELL. 1998. Community dynamics and metabolism of benthic algae colonizing wood and rock substrata in a forest stream. *Journal of Phycology*, 34: 561-567.
- SAMSON, G., & R. POPOVIC. 1988. Use of algal fluorescence for determination of phytotoxicity of heavy metals and pesticides as environmental pollutants. *Ecotox. and Environ. Saf.*, 16: 272-278.
- SCHERIBER, U. & W. BILGER. 1993. III Progress in chlorophyll fluorescence research: major developments during the past years in retrospect. *Progr. Bot.*, 54: 151-173.
- SOLOMON, K. R., D.B. BAKER, R.P. RICHARDS, K.R. DIXON, S.J. KLAINE, T.W. LA POINT, R.J. KENDALL, C.P. WEISSKOPF, J.M. GIDDINGS, J.P.H. GIESY, L.W. HALL Jr. & W. M. WILLIAMS. 1996. Ecological risk assessment of atrazine in North American surface waters. *Environ. Toxicol. Chem.*, 15: 31-76.
- STEINMAN, A. D. 1996. Effects of grazers on freshwater benthic algae. In: *Algal Ecology*. R. J. Stevenson, M. L. Bothwell, & R. L. Lowe (eds.): 341-366. Academic Press Inc, San Diego, USA.
- STEVENSON, R. J. 1996. An introduction to algal ecology in freshwater benthic habitats. In: *Algal Ecology*. R. J. Stevenson, M. L. Bothwell, & R. L. Lowe (eds.): 3-26. Academic Press Inc, San Diego, USA.
- STEWART, A. J. & W.R. HILL. 1993. Grazers, periphyton and toxicant movement in streams. *Environ. Toxicol. Chem.*, 12: 955-957.
- TRISKA, F. J., J.R. SEDELL, S.V. CROMACK, S.V. GREGORY, & F.M. CCORISON. 1984. Nitrogenous budget for a small coniferous forest stream. *Ecol. Monogr.*, 54: 119-140.
- UTERMOHL, H. 1985. Zur Vervollkommung der quantitativen Phytoplankton-Methodik. *Mitt. int. Vex Limnol.*, 9: 1-39.
- WARREN, C. E. & G.E. DAVIS. 1971. Laboratory stream research: Objectives, possibilities and constraints. *Annu. Rev. Ecol. Syst.*, 2: 111-142.
- WINER, B. J. 1971. *Statistical principles in experimental design*. McGraw Hill, New York.