

Efecto de los metales sobre microcrustáceos de agua dulce. Avances metodológicos y potencialidad de cladóceros y copépodos como organismos test

Effects of metals on freshwater microcrustaceans. Methodological advances and potentiality of cladocerans and copepods as test organisms

María Florencia Gutierrez¹ y Ana María Gagneten²

1 Instituto Nacional de Limnología (CONICET- UNL). Ciudad Universitaria. Santa Fe, Argentina. Email: fgutierrez@inali.unl.edu.ar

2 Facultad de Humanidades y Ciencias, Universidad Nacional del Litoral, Ciudad Universitaria. Santa Fe, Argentina. Email: amgagnet@fhuc.unl.edu.ar

Resumen

El incremento de los metales en los cuerpos de agua dulce a causa de las actividades antropogénicas genera importantes alteraciones sobre la biota. Esta revisión analiza los efectos adversos de varios metales de relevancia ecotoxicológica sobre los microcrustáceos zooplanctónicos (cladóceros y copépodos), los avances experimentales en esta línea y las ventajas de cada grupo como organismos test. En general, la necesidad de obtener indicadores más sensibles y representativos que los tradicionales, promovió lineamientos hacia estudios subcrónicos, interspecíficos y multigeneracionales. Por otra parte, la tendencia actual hacia el estudio de mezclas de sustancias y los efectos indirectos permite adquirir una visión más integral del problema. El impacto sobre las poblaciones es muy variable, dependiendo de la naturaleza del metal, las características del medio, el tiempo de exposición, las condiciones de cultivo y aspectos genéticos. Sin embargo, la mayoría de los trabajos se centran en pocas especies, dejando vacancias en el conocimiento de las representantes de cada región particular. Si bien algunos atributos de los cladóceros y copépodos como el tamaño, la morfología y el rol ecológico los tornan buenos indicadores, las diferencias en el desarrollo, reproducción y estrategias de perpetuación confieren ventajas a un grupo sobre otro.

Palabras clave: ecotoxicología; metales; microcrustáceos zooplanctónicos; diseños experimentales.

Abstract

The increase of metals in fresh water systems due to anthropogenic activities cause important alterations on the biota. The present review analyze the adverse effects of various metals of ecotoxicological relevance on microcrustaceans zooplankton species (cladocerans and copepods), the experimental advances and the advantages of each group as test organisms. In general, the need to obtain more sensitive and representative indicators than the traditional ones leads to subchronic, interspecific and multigenerational studies. Additionally, the analysis of mixtures as well as their indirect effects allows to acquire more integral knowledges of the impact of contaminants. The toxic effects are different, depending on the nature of metals, the physicochemical characteristics of the water, exposure time and genetic traits. However, most works are focused on few species, leading vacant areas on the knowledge of the representatives of every particular region. Despite some cladocerans and copepods attributes make them good bioindicators (size, morphology and ecological role), differences of development, reproduction and perpetuation strategies bring advantages to one group on another.

Keyword: ecotoxicology metals zooplanktonic microcrustaceans; experimental designs.

Presentado: 11/05/2011
Aceptado: 16/08/2011
Publicado online: 08/02/2012

Introducción

Los metales constituyen componentes comunes de la litosfera y forman parte de numerosos ciclos biológicos y geológicos naturales. No obstante, se ha demostrado que la creciente industrialización y actividades agrícolas suelen generar importantes modificaciones en estos ciclos, causando el incremento de las concentraciones normales en los cuerpos de agua continentales (Chen & Folt 2000). Estos ecosistemas constituyen los ambientes más sensibles a dichos cambios y sus alteraciones tienden a repercutir directamente sobre las poblaciones humanas que los utilizan como fuente de recursos. Una de las principales medidas para su conservación implica evaluar los efectos de estas sustancias sobre la biota que los habita y desarrollar normas de gestión adecuadas en base a los niveles guía determinados en campo y laboratorio (Baudouin & Scoppa 1974).

Entre los integrantes de los mencionados ecosistemas, el zooplancton constituye una comunidad clave. Sus componentes poseen un rol central en las tramas tróficas, y su elevada sensibilidad a los cambios físicos y químicos del medio los tornan adecuados para su utilización como bioindicadores de contaminación por metales. Si bien pertenecen a diversos grupos funcionales, en

conjunto contribuyen al transporte de materia y energía desde los niveles tróficos inferiores hacia los superiores. Intervienen activamente en el reciclado de materia orgánica disuelta, se alimentan de algas, detritos u otros microorganismos y son el principal recurso de numerosos peces e invertebrados acuáticos (Ortiz et al. 2006).

Los cladóceros y copépodos pertenecen al grupo de los microcrustáceos del zooplancton y dada su gran sensibilidad, son los más utilizados en estudios ecotoxicológicos si se los compara con otros miembros de dicha comunidad. Además, su pequeño tamaño, cortos períodos generacionales y facilidad para los cultivos les otorgan relevancia y practicidad para estudios experimentales y de impacto ambiental (Gaete & Paredes 1996). En este sentido, permiten evaluar no sólo los efectos directos, sino también el impacto indirecto de los contaminantes o estresores ambientales, otorgando mayor representatividad a los resultados obtenidos y estimaciones a largo plazo (Boyd 2010). Esto se debe a que dicho análisis requiere frecuentemente observaciones a mayor escala, o bien sobre las interacciones con los niveles tróficos adyacentes, lo cual resultaría dificultoso con organismos de mayor talla o tiempo generacional.

El objetivo de esta revisión es analizar los trabajos más relevantes sobre los efectos negativos de los metales de importancia ecotoxicológica en cladóceros y copépodos de agua dulce. Esta breve revisión no intenta cubrir toda la literatura existente, sino proveer información útil a partir de las investigaciones experimentales importantes para el ámbito académico, y sugerir posibles vías para futuros estudios. Adicionalmente, dado que al presente la mayoría de las revisiones en esta temática refieren a estudios de campo (Ferdous 2009, Boyd 2010), este trabajo pretende además aportar información para una base de datos de trabajos experimentales de referencia.

En primera instancia, se detallarán los avances metodológicos en estudios de laboratorio resaltando los cambios ocurridos. Luego, se identificarán los efectos adversos de varios metales sobre cladóceros y copépodos y, finalmente se mencionarán las ventajas y desventajas de cada grupo como organismos test.

Diseños experimentales y avances metodológicos en estudios de laboratorio.

Los primeros conocimientos sobre los efectos de los metales en los organismos acuáticos se inician a principios del siglo XX (Norwood et al. 2003). Éstos provienen de estudios experimentales basados en ensayos de toxicidad aguda y crónica, mediante los cuales se obtienen las concentraciones letales o efectivas para el 50% de la población analizada (LC_{50} ; EC_{50}) y las concentraciones de efecto mínimo y de efecto no observables (CEM; CENO). A partir de estos valores las agencias internacionales suelen establecer los niveles guía para la protección de la biota (OECD 1981, EPA 1984, APHA 1989). Sin embargo, numerosas investigaciones han cuestionado la representatividad de tales métodos (Heugens 2001, Cairns 1986). Esto se debe, en primera instancia, a que las concentraciones determinadas por ellos son frecuentemente mayores a las presentes en los ambientes naturales. En segundo lugar, no contemplan los efectos más sutiles de los contaminantes sobre los organismos. Es decir, aquellos efectos inducidos por concentraciones aún más bajas, capaces de generar estrés y alterar la eficacia biológica de las especies o la estabilidad de las poblaciones a largo plazo (Sibly & Calow 1989, Cohen & Forward 2005). Finalmente, no suelen analizar la existencia de los efectos indirectos de los contaminantes, subestimando de este modo su toxicidad real.

La necesidad de obtener indicadores más sensibles y representativos promovió entonces los primeros lineamientos hacia estudios subcrónicos, interespecíficos y en ocasiones, multigeneracionales utilizando generalmente concentraciones menores a las empleadas en los ensayos tradicionales. En esta línea, los cladóceros y copépodos son uno de los principales representantes, lo cual se refleja en la extensa literatura existente hasta el momento (De Cohen & Janssen 1997, Reichwaldt & Stibor 2005, Sánchez-Ortíz et al. 2010).

Numerosos ejemplos de estos avances se observan en diferentes niveles de organización biológica. Desde el punto de vista fisiológico, Barata et al. (2004) propusieron diseños que permiten reconocer disrupciones endocrinas en copépodos mediante el análisis de los ciclos de vida y posibles desvíos del patrón de desarrollo normal. Esta metodología fue utilizada por Gutierrez et al. (2010) quienes analizaron los efectos del cobre y cromo sobre el copépodo *Notodiaptomus conifer*

y detectaron importantes alteraciones con concentraciones aún mas bajas que las que produjeron daños reproductivos. Por otra parte, el estudio del comportamiento se ha propuesto como otro indicador subcrónico altamente sensible y representativo para cladóceros y copépodos. En este sentido, los comportamientos de escape (Sullivan et al., 1983; West et al., 1998), alimentación (Sharp y Stearns, 1997), fototaxis (Stearns y Sharp, 1994) y natación (Sullivan et al., 1983) entre otros, han demostrado gran sensibilidad y eficiencia en la detección temprana de contaminantes. Además, su facilidad de medición los constituyen herramientas complementarias de gran potencial para futuros estudios ecotoxicológicos. Finalmente, los análisis a nivel poblacional han ponderado el empleo del indicador r (tasa intrínseca de crecimiento natural) por la capacidad integradora de diversos parámetros biológicos en estudios de ciclo de vida (Coniglio & Baudo 1989, Koivisto & Ketola 1995, Forbes & Calow, 1999). Pese a haber sido cuestionado por algunos autores (Allan 1976, Janssen et al. 1994), este indicador es altamente confiable y es utilizado en estudio para evaluar los efectos directos de los metales y otros contaminantes.

Otra de las principales líneas de investigación en ecotoxicología de microcrustáceos acuáticos es el estudio del efecto de las mezclas de metales, empleando particularmente el género *Daphnia* como modelo experimental (Jak et al. 1996, Gaete & Paredes 1996, Wong & Pak 2004). La relevancia de esta línea radica en que los distintos contaminantes, no se encuentran aislados en la naturaleza, sino combinados e interactuando con diferentes componentes del medio. Existen varios métodos gráficos y estadísticos que proporcionan curvas de dosis-respuesta para cada metal en modelos de mezclas. Esta información es utilizada para generar las concentraciones críticas y predecir el impacto de la interacción de los metales (Norwood et al. 2003). Dado que estos trabajos sólo son aplicables a la toxicidad aguda, aún quedan por diseñar nuevos modelos para valores crónicos. Pese a la gran importancia de los avances mencionados, hasta el momento ningún organismo internacional ha creado protocolos que involucren estos modelos para el monitoreo orientado al mantenimiento de la calidad del ambiente acuático.

Finalmente, considerando la incidencia indirecta de los tóxicos sobre los microcrustáceos, recientes líneas de investigación se han abocado al estudio de posibles mecanismos de interferencias en las interacciones intra o interespecíficas (Boyd 2010), o los efectos de la bioacumulación de compuestos a lo largo de la trama trófica (Zyadah 2000). Es sabido que las interacciones biológicas cumplen un rol clave en la estructuración y mantenimiento de los ecosistemas, y si tales interacciones son alteradas por factores antropogénicos, la principal consecuencia sería una desestabilización de los mismos.

A partir de lo desarrollado, se podría afirmar que las nuevas tendencias metodológicas aportan una visión más integral y representativa de la contaminación química real del ambiente. Esto reside por un lado, en que la incorporación de parámetros más sensibles y de relevancia ecológica permite analizar los balances energéticos de los organismos y estimar las consecuencias poblacionales a mayor plazo. Por otra parte, el análisis de mezclas y de los efectos indirectos favorece una mejor comprensión de los efectos de los contaminantes que interactúan en el medio e interfieren en los procesos biológicos.

Efectos adversos de los principales metales de importancia ecotoxicológica.

Entre los metales “no esenciales”, es decir aquellos cuya presencia en el organismo no es necesaria para el desarrollo normal de las funciones metabólicas se consideraron el mercurio, el cadmio, el plomo y el arsénico. Entre los más representativos del grupo de los “esenciales” se analizó el níquel, el zinc, el cromo y el cobre. Estos poseen funciones metabólicas importantes a concentraciones traza, pero se tornan altamente tóxicos cuando superan el umbral de tolerancia.

Mercurio. La mayoría de los estudios sobre los efectos biológicos del mercurio se centran en el cladócero *D. magna*. En esta especie, De Cohen y Janssen (1997) observaron que dicho metal y otros compuestos asociados pueden inhibir enzimas digestivas específicas. Sin embargo, tales efectos estarían estrechamente ligados a la temperatura del medio, que puede determinar su ingreso y eliminación (Tsui & Wang 2004): temperaturas bajas reducirían los efectos tóxicos, aunque se ha demostrado que el potencial de transferencia trófica desde las algas hacia los dáfidos no se ve completamente afectado. Tal observación favorece la evidencia que el grado de toxicidad del mercurio puede ser diferente según el nivel biológico considerado y promueve la necesidad de continuar las investigaciones acerca de la importancia relativa de los factores externos, como determinantes de la toxicidad.

Khengarot y Das (2009) evaluaron el desarrollo de huevos partenogenéticos de *D. carinata* exponiéndolos a concentraciones entre 0,1 y 32 g L⁻¹ de mercurio. Los resultados obtenidos indicaron que la inhibición de los mismos constituye un indicador eficaz de la toxicidad de este metal. Dada la sensibilidad del método empleado, futuras investigaciones en esta línea contribuirían a detectar indicadores tempranos y muy apropiados para biomonitoreo.

Cadmio. Hasta el momento los cladóceros más estudiados en relación a la toxicidad del cadmio son *Ceriodaphnia dubia*, *D. magna* (Suedel et al. 1997) y *Moina macrocopa* (Wong & Wong 1990) y entre los copépodos, *Eurytemora affinis* (Hall et al. 1995). Sin embargo, se ha reconocido que varias especies de la biota acuática poseen gran tolerancia a este metal. Esta propiedad podría estar asociada, entre otros factores, a la presencia de ciertos componentes del medio capaces de inhibir o disminuir su ingreso al organismo. Por ejemplo, se ha demostrado en otros invertebrados acuáticos que la exposición a bajas concentraciones de sulfato de zinc disminuye la susceptibilidad a la toxicidad del cadmio (Howell 1985). La presencia de enzimas o complejos de detoxificación tales como las metalotioneínas también podrían ejercer un rol clave, aunque la relación entre éstos y la elevada tolerancia aun está poco resuelta (Wright & Welbourn 1994). Por otra parte, se ha demostrado el potencial bioacumulativo de este elemento a lo largo de las cadenas tróficas (Munger et al. 1998, Croteau et al. 2005), indicando que tal proceso es notablemente mayor en la comunidad planctónica que en la de peces.

Entre los trabajos experimentales más significativos se encuentra el de Barata et al. (2002). Estos investigadores analizaron cómo el aporte de alimento y la densidad poblacional pueden afectar las respuestas del cladócero tropical *Moinodaphnia macleayi* a la toxicidad del cadmio. Estos autores reconocieron un efecto denso-dependiente sobre la toxicidad del metal, sin

embargo dicho efecto es variable según la cantidad de alimento provisto. La relevancia de dicha investigación reside en reconocer la posibilidad de subestimar la toxicidad real del metal según las condiciones ambientales.

Plomo. En los ambientes naturales los efectos adversos del plomo incluyen alteraciones en el crecimiento, reproducción, comportamiento, metabolismo y sobrevivencia. En cuanto a la incorporación del metal disuelto en los organismos, no existen muchas investigaciones, pero se comprobó que *D. magna*, absorbe casi el 90% a través de su exoesqueleto (Berglund et al. 1985). Por otra parte, de modo similar que para otros metales, existen diferencias específicas en la sensibilidad y numerosos autores concuerdan que los calanoideos resultan generalmente más sensibles (Sharma & Selvaraj 1994), seguidos por los cladóceros, particularmente *D. magna*, y los copépodos ciclopoideos (Offem & Ayotunde 2008). De todos modos, pese al aporte de información, estos estudios sólo consideran parámetros irreversibles, obtenidos a partir de ensayos agudos. Sería necesario realizar nuevas investigaciones a nivel crónico o subcrónico para conocer en detalle los efectos más concretos y mecanismos de acción del plomo sobre el ciclo de vida de los organismos. Otros autores analizaron la influencia del sedimento (García-García 2006) o de la disponibilidad de alimento (Enserink 1995) en la toxicidad del plomo durante el ciclo de vida de varias especies, enfatizando nuevamente la importancia de los factores externos como determinantes de la toxicidad de éste y otros elementos.

Arsénico. En contraposición con otros metales, los compuestos inorgánicos de arsénico son más tóxicos que los orgánicos, aún para cladóceros y copépodos de agua dulce. Los principales estudios sobre sus efectos tóxicos se realizaron en *Bosmina longirostris*, *D. magna*, *D. pulex* y *Simocephalus serrulatus* (Eisler 2004). Los trabajos más recientes han considerado no sólo las características del metal sino las posibles alteraciones en la naturaleza o el modo de exposición. Por ejemplo, Hoang (2007) evaluó las respuestas de *D. magna* a exposiciones fluctuantes de arsénico observando que el parámetro más afectado fue la mortalidad, mientras que el crecimiento corporal no fue significativamente alterado. Otro aporte interesante lo proveen Chen et al. (1999), quienes detectaron la capacidad del arsénico de incrementar la expresión del ARNm en células constitutivas de *D. pulex*. Este análisis permitió desarrollar biomarcadores eficientes utilizando técnicas moleculares y demográficas combinadas. Sin embargo, cabe mencionar que pese a su sensibilidad, las investigaciones a escala molecular no contemplan los efectos individuales más sutiles, de relevancia ecológica. Estos efectos son esenciales para comprender procesos tóxicos a mayor plazo, tales como cambios en las dinámicas poblacionales, lo cual adquiere gran relevancia desde el punto de vista ecológico y ambiental.

Níquel. Se ha detectado que la presencia y distribución de níquel en los fluidos corporales, caparazón, apéndices filtradores y huevos se deben principalmente a procesos de acumulación a partir del medio (Hall 1982). A nivel celular, el efecto tóxico más claro se refleja en la homeostasis del Mg²⁺. Entre las principales alteraciones fisiológicas en cladóceros de agua dulce, se conoce el efecto inhibitorio sobre el crecimiento (Khengarot & Ray 1987), el consumo de oxígeno y la concentración de hemoglobina (Panne 2003). Tal como fue demostrado para otros metales, la toxicidad del níquel varía según las condiciones del medio. En esta línea Keithly et al. (2004) y, posteriormente, Deleebeck

et al. (2008) observaron que el incremento de la dureza del agua aumenta la concentración efectiva (LC_{50}) del níquel en *C. dubia* y otros cladóceros de agua dulce. Actualmente existen varios modelos que permiten predecir la biodisponibilidad de este metal para los crustáceos, sin embargo están diseñados casi únicamente para experiencias con *D. magna* y *C. dubia*. Aún quedan por desarrollar modelos que involucren otros organismos planctónicos de relevancia ecológica.

Zinc. Las investigaciones más recientes sobre los efectos del zinc confieren particular énfasis a la calidad del alimento y a la aclimatación como factores determinantes de la toxicidad y tolerancia. En líneas generales, los estudios a nivel celular indican que el zinc es capaz de alterar el balance de Ca^{2+} , y si tal cosa ocurre, los daños embrionarios, en el desarrollo o el crecimiento podrían ser irreversibles, con graves consecuencias poblacionales (Jeziorski & Yan 2006). A nivel reproductivo, la toxicidad actuaría más en forma directa inhibiendo la eclosión de los huevos en la cámara incubatriz, que indirectamente por la disminución de la fecundidad de las hembras (Brown et al. 2005).

Entre los cladóceros de agua dulce más estudiados se encuentran los géneros *Daphnia* y *Ceriodaphnia*. Varios trabajos registran la elevada tolerancia de *D. magna* al zinc que podrían deberse a características genéticas específicas (Shaw et al. 2006) o al efecto de aclimatación a las condiciones de laboratorio (Muyssen et al. 2005). Por otra parte, se investigó el efecto individual de diferentes cationes mayores (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ , K^+ , y H^+) sobre la toxicidad aguda del zinc para *D. magna* (Heijerick, 2002) así como el efecto de la transferencia trófica sobre la misma especie alimentada con algas contaminadas. En este trabajo, no se observaron efectos en el crecimiento, pero sí en la reproducción total (De Schamphelaere et al., 2004). Para el caso de los copépodos se desarrolló un protocolo que permite evaluar el efecto de la toxicidad y el modo de acción de este metal sobre *Bryocamptus zschokkei*. En ausencia de alimento, los estadios larvarios fueron más sensibles y los principales efectos tóxicos fueron la reducción en el número de huevos por camada, aumento del tiempo de desarrollo y elevada mortalidad durante la eclosión (Brown 2005).

Cromo. Los efectos tóxicos que generan elevadas concentraciones de cromo inciden sobre numerosos parámetros de la historia de vida de microcrustáceos. Sin embargo, se han registrado diferentes resultados que dependen en gran medida de las condiciones de cultivo así como aspectos genéticos de las diferentes especies (Martínez-Jerónimo et al. 2006). En este sentido, entre los trabajos más completos en cladóceros, se encuentran los de Spehar y Fiantt (1986); Coniglio y Baudo (1989); Gagneten (2006), quienes estudiaron alteraciones en la longevidad, alimentación y reproducción. Asimismo, en condiciones similares, se evaluaron los efectos adversos del cromo en forma individual y en mezclas en el copépodo *Mesocyclops pehpeiensis* (Wong & Pak 2004) y otros copépodos dulceacuícolas (Gutierrez et al. 2010, Soto et al. 2003).

A nivel comunitario, el impacto del cromo fue evaluado intensamente en estudios de mesocosmos, donde se observaron importantes modificaciones en la diversidad, riqueza y densidad del zooplancton (Gagneten, 2002). Dicho trabajo denota la necesidad de realizar estudios multispecíficos, dada su mayor capacidad predictiva al compararla con ensayos que involucran sólo una especie.

Cobre. En los compartimientos biológicos, este elemento forma parte de numerosas enzimas que actúan como catalizadoras redox o "carriers" (Flemming & Trevors 1989). En el caso de los cladóceros, la sensibilidad es muy variada, y depende principalmente de las condiciones del medio. Entre la literatura analizada en este trabajo, *D. magna* registra un rango de toxicidad aguda entre 1,4 y 70 $\mu\text{g L}^{-1}$ (Winner & Farrel 1976, Bossuyt et al. 2004). *C. dubia*, otra de las especies más estudiadas en ensayos de laboratorio, registró valores entre 35 to 79 $\mu\text{g L}^{-1}$ a diferentes grados de dureza del agua (Belanger et al. 1989), sin embargo, Gagneten y Vila (2001) encontraron límites menores de sensibilidad (entre 5 y 20 $\mu\text{g L}^{-1}$) en el mismo cladóceros sometido a diferentes niveles de pH. En estudios crónicos con tres generaciones sucesivas, Cowgill y Milazzo (1991) compararon el efecto del cobre metálico individual y como nitrato de cobre en la misma especie, observando diferentes respuestas tóxicas, lo que demuestra la importancia de tener en cuenta la especiación de los metales en los ambientes naturales. En el caso de los copépodos, las variaciones en la sensibilidad dependen del estadio de desarrollo. Por ejemplo, la LC_{50} -48 h registrada para nauplios de *Mesocyclops pehpeiensis* fue 75 $\mu\text{g L}^{-1}$ (Wong & Pak 2004), mientras que los adultos de *Cyclops abyssorum* y *Eudiaptomus padanus* registraron valores de 2500 $\mu\text{g L}^{-1}$ y 500 $\mu\text{g L}^{-1}$ respectivamente (Baudouin & Scoppa 1974).

Los mecanismos de toxicidad conocidos para cobre consideran interacciones con proteínas, enzimas, ácidos nucleicos y metabolitos (Flemming & Trevors 1989). Sin embargo, los estudios con cobre a nivel celular en invertebrados acuáticos son muy escasos o incompletos. Pese a esta falta de información, los ensayos crónicos suelen ser útiles para detectar indicios de los mecanismos de toxicidad (Winner & Farrel 1976). A nivel comunitario, Havens (1994) realizó estudios de mesocosmos observando una importante reducción en la biomasa total así como en el transporte del carbono orgánico a lo largo de la cadena trófica. Por otro lado, a pesar de la gran relevancia del comportamiento en la dinámica de las comunidades, los estudios etológicos actuales sobre los efectos del cobre son muy escasos y los antecedentes registrados hasta el momento se centran principalmente en *D. magna* (Untersteiner et al. 2003, Ferrando & Andreu 1993).

En líneas generales se puede afirmar que numerosos factores tales como la calidad del alimento, la predeterminación genética, el grado de desarrollo, el tamaño o el sexo determinan importantes diferencias en la sensibilidad individual (Vasela & Vijverberg 2007, Brown et al. 2005) y entre las especies. Por esta razón, los trabajos comparativos y multispecíficos son necesarios e importantes para reconocer las condiciones óptimas de análisis y evitar subestimar la toxicidad de los metales.

Por otra parte, está ampliamente documentado que la incidencia de los elementos externos sobre la toxicidad de los metales es muy variable según el nivel de organización biológica considerado. En este sentido, los efectos de la temperatura o las condiciones fisicoquímicas del medio, tales como el pH, entre otros, tienden a influir de modo diferente en la toxicidad de los metales sobre los individuos, las poblaciones o sus interacciones.

Finalmente, destaca la falta de estudios con especies regionales o representativas de cada sitio contaminado en particular. La mayor parte de los estudios en relación a la toxicidad de los metales se centran en los géneros *Daphnia* o *Ceriodaphnia*, que

si bien presentan una amplia distribución y facilidad para el desarrollo de cultivos experimentales, su relevancia y utilidad como organismos test para estudios ambientales ha sido muy cuestionada (Koivisto 1995).

Potencialidades de cladóceros y copépodos como organismos test

Las características de la historia de vida de los cladóceros y copépodos de agua dulce son adaptaciones adquiridas que permitieron su éxito evolutivo (Paggi 1995). Estas características los tornan muy apropiados para estudios ecotoxicológicos, sin embargo, ciertas diferencias confieren ventajas a un grupo sobre el otro, según los objetivos propuestos.

En primer lugar, la morfología constituye una característica favorable para los estudios toxicológicos de campo y laboratorio en ambos grupos (De Bernardis & Peters, 1987). Su longitud media varía entre uno y dos milímetros, y sus diversos apéndices permiten reconocer malformaciones o alteraciones en el desarrollo sea por causas naturales, tales como parasitismo o regeneración post daño, o antropogénicas como las consecuencias de eventos de contaminación ambiental (Fleminger 1985, Sillett & Stemberger 1998, Otha et al. 1998, Sinev 2000).

Otro aspecto ventajoso compartido son los parámetros fisiológicos relacionados con las funciones de respiración. Los intercambios de gases se dan principalmente en la superficie del cuerpo, pero ciertos cladóceros poseen además "órganos nucleares" que cumplen funciones excretoras (Aladin & Potts 1995). En este sentido, el consumo de oxígeno así como la proporción de hemoglobina en el cuerpo se encuentran entre los indicadores fisiológicos más sensibles (Pane et al. 2003).

Una primera diferenciación entre ambos grupos reside en la alimentación, ya que los cladóceros se caracterizan principalmente por ser herbívoros-detritívoros, aunque algunos pocos son depredadores. Los copépodos, en cambio, poseen modos de alimentación más variados, siendo algunos grupos filtradores, otros ramoneadores o carnívoros. El conocimiento de estos hábitos es particularmente importante cuando se llevan a cabo estudios de laboratorio por la necesidad de realizar cultivos paralelos para alimentar a los organismos.

Otro de los aspectos de particular importancia en estudios experimentales ecotoxicológicos es el desarrollo postembrionario (Gutierrez et al. 2010). En este sentido, los copépodos, a diferencia de los cladóceros, presentan un ciclo de vida altamente complejo, pero a la vez muy favorable para la obtención de información sobre los efectos tóxicos en cada etapa (Kovatch et al, 1999). Esta característica permite además obtener una mayor aproximación sobre las respuestas poblacionales (Hutchinson 2002). El desarrollo de los copépodos incluye el paso por doce estadios larvarios y una metamorfosis de la morfología naupliar (N6) a la de copepodito (C1). Cada uno de dichos estadios es fácilmente identificable, y el pasaje de N6 a C1 constituye un excelente parámetro para evaluar una posible disrupción endocrina ya que implica un momento de gran estrés y susceptibilidad ante alteraciones ambientales (Barata et al., 2004). Contrariamente, los cladóceros poseen un desarrollo directo, y sus estadios larvarios son más variables y difíciles de identificar, con lo cual la detección de alteraciones en este proceso podría resultar imprecisa.

La reproducción es un parámetro de particular relevancia en los ensayos de laboratorio. En este caso, dado que los cladóceros poseen reproducción partenogénica, son más favorables que los copépodos, razón por la cual han sido estandarizados y considerados más apropiados para establecer comparaciones y determinar los niveles guía de toxicidad (De Bernardis & Peters 1987). En condiciones ambientales estables, estos organismos producen individuos genéticamente idénticos, promoviendo mayor certeza en las evaluaciones a escala de microcosmos, donde se requiere el mayor control posible de las variables externas al tóxico que se intenta analizar. Los copépodos en cambio poseen reproducción sexual, más compleja y prolongada y carecen consecuentemente de la homogeneidad que caracteriza a los cladóceros.

Finalmente, considerando el esquema r - K de estrategias de perpetuación, los copépodos estarían ubicados entre los K estrategias por su extenso período de desarrollo, su comparativamente modesta tasa intrínseca de crecimiento natural y su sexualidad. Contrariamente, por el gran oportunismo y capacidad partenogénica, los cladóceros serían estrategias r , vinculándose a los rotíferos (Allan 1976). Estas particularidades son importantes si se pretende realizar estudios de campo, o extrapolar resultados de laboratorio a escalas mayores.

Conclusión

Los primeros criterios ecotoxicológicos para evaluar la toxicidad de los contaminantes sobre las especies acuáticas fueron la mortalidad y daños reproductivos en ensayos cortos. La ventaja de dichos tests radica en su claridad, ya que los resultados obtenidos son cuantales, generando respuestas de tipo "todo o nada". Sin embargo, la necesidad de obtener información subletal a bajas dosis de contaminantes, que permita detectar el estrés previo a la muerte y tomar medidas oportunas para mitigar los riesgos, promovió nuevos enfoques metodológicos.

Los análisis sobre los efectos más sutiles o subcrónicos, el efecto de las mezclas de metales y el impacto indirecto de los mismos sobre los individuos y las poblaciones, son los principales puntos de interés actual en la comunidad científica. Estos permiten además obtener resultados más representativos de la potencialidad tóxica de los contaminantes, aunque aún es necesario un mayor esfuerzo interdisciplinario para integrar los resultados alcanzados.

Pese a la existencia de un gran número de trabajos ecotoxicológicos respecto a la toxicidad de los metales, la gran mayoría se han focalizado en pocas especies de microcrustáceos, dejando áreas vacantes en el conocimiento de la sensibilidad de especies representativas de cada región en particular. Considerando la importancia biológica y ecológica de las mismas, el desarrollo de estudios en esta línea proveería información complementaria y de gran utilidad para evaluaciones de impacto ambiental y estudios integrales de los ecosistemas.

Finalmente, se podría concluir que ciertas particularidades comunes de los cladóceros y copépodos tales como el tamaño, la morfología y el rol ecológico, los tornan buenos indicadores de toxicidad y permiten evaluar eficientemente los efectos y mecanismos de acción de los metales. No obstante, ciertas diferencias en el desarrollo, la reproducción y las estrategias de perpetuación confieren ventajas a un grupo sobre otro según el análisis requerido, que necesariamente deben ser consideradas en cada diseño metodológico particular.

Agradecimientos

A la Universidad Nacional del Litoral, por el financiamiento del trabajo (Proyecto CAI+D 2009).

Literatura citada

- Aladin N.V. & W.T. Potts. 1995. Osmoregulatory capacity of the cladocera. *Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology* 164(8): 671-683.
- Allan D.J. 1976. Life history patterns in zooplankton. *The American Naturalist* 110 (971): 165-180.
- APHA 1989. *Toxicity Test Methods for Aquatic Organisms, Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 17th ed., Washington, DC, Part 8000.
- Barata C., D.J Baird & A.M.V. Soares. 2002. Demographic responses of a tropical cladoceran to cadmium: effects of food supply and density. *Ecological Applications* 12(2): 552-564.
- Barata C., C. Porte & D.J. Baird. 2004. Experimental designs to assess endocrine disrupting effects in invertebrates: A review. *Ecotoxicology* 13: 511-517.
- Baudouin M.F. & P.S. Scoppa. 1974. Acute toxicity of various metals to freshwater zooplankton. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 12: 745-751.
- Belanger S.E., J.L. Farris & D.S. Cherry. 1989. Effects of diet, water hardness, and population source on acute and chronic copper toxicity to *Ceriodaphnia dubia*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 18(4): 601-611.
- Berglund R., G. Dave & M.L. Sjobeck. 1985. The effects of lead on aminolevulinic acid dehydratase activity, growth, hemoglobin content, and reproduction in *Daphnia magna*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 9: 216-229.
- Bossuyt B.T., K.A. De Schamphelaere & C.R. Janssen. 2004. Using the biotic ligand model for predicting the acute sensitivity of cladoceran dominated communities to copper in natural surface waters. *Environ. Sci. Technol.* 38(19): 5030-5037.
- Boyd R.S. 2010. Heavy metal pollutants and chemical ecology: exploring new frontiers. *Journal of chemical ecology* 36: 46-58.
- Brown R.J., S.D. Rundle, T.H. Hutchinson, T.D. Williams & M.B. Jones. 2005. A microplate freshwater copepod bioassay for evaluating acute and chronic effects of chemicals. *Environ. Toxicol. Chem.* 24(6): 1528-1531
- Cairns J. Jr. 1986. The Myth of the Most Sensitive Species. *BioScience* 36 (10): 670-672
- Chen C.Y. & C. L. Folt. 2000. Bioaccumulation and diminution of arsenic and lead in a freshwater food web. *Environ. Sci. Tec.* 34 (18): 3878-3884.
- Chen D., H. Ma, H. Hong, S.S. Koh, S.M. Huang, B.T. Schurter, D.W. Aswad & M.R. Stallcup. 1999. Regulation of transcription by a protein methyltransferase. *Science* 284: 2174-2177.
- Cohen J.H. & R.B.Jr Forward. 2005. Fotobehaviour as an inducible defense in the marine copepod *Calanopia Americana*. *Limnol Oceanogr* 50 (4): 1269-1277.
- Coniglio L. & R. Baudo. 1989. Life-tables of *Daphnia obtusa* (Kurz) surviving exposure to toxic concentrations of chromium. *Hydrobiologia* 188-189(1): 407-410.
- Cowgill U.M. & D.P. Milazzo. 1991. Comparison of the effect of metallic copper and copper nitrate (Cu(NO₃)₂. 3H₂O) on *Ceriodaphnia dubia* utilizing the three-brood test. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 46: 141-145.
- Croteau M.N., S.N. Luoma & A.R. Stewart. 2005. Trophic transfer of metals along freshwater food webs: Evidence of cadmium biomagnification in nature. *Limnol. Oceanogr.* 50(5):1511-1519.
- De Bernardi R. & R.H. Peters. 1987. Why *Daphnia*? In: *Daphnia* (Eds R.H. Peters & R. de Bernardi), pp. 1-9. *Memorie Dell'istituto Italiano Di Idrobiologia*, Pallanza, Italy.
- De Cohen W.M. & C.R. Janssen. 1997. The use of biomarkers in *Daphnia magna* toxicity testing II. Digestive enzyme activity in *Daphnia magna* exposed to sublethal concentrations of cadmium, chromium and mercury. *Chemosphere* 35(5): 1053-1067.
- De Schamphelaere K.A.C., M.Canli, V. Van Lierde, I. Forrez, F. Vanhaecke & C.R. Janssen. 2004. Reproductive toxicity of dietary zinc to *Daphnia magna*. *Aquatic Toxicology* 70(3):233-244.
- Deleebeeck N.M.E., K.A.C. De Schamphelaere, D.G. Heijerick, B.T.A. Bossuyt & C.R. Janssen. 2008. The acute toxicity of nickel to *Daphnia magna*: predictive capacity of bio-availability models in artificial and natural waters. *Ecotox. Env. Safe.* 70(1): 67-78.
- Eisler R. 2004. Arsenic Hazards to Humans, Plants, and Animals from Gold Minino. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 180: 133-165
- Enserink E.M., M.J.J. Kerkhofs, C.A.M. Baltus & J.H. Koeman. 1995. Influence of food quantity and lead exposure on maturation in *Daphnia magna*; evidence for a trade-off mechanism. *Functional Ecology* 9(2): 175-185.
- EPA 1984. Estimating concern levels for concentrations of chemical substances in the environment. Environmental effects Branch, environmental Protection Agency, Washington DC, USA.
- Ferdous Z. & A.K. Muktedir. 2009. A Review: Potentiality of Zooplankton as Bioindicator. *American Journal of Applied Sciences* 6 (10): 1815-1819.
- Ferrando M.D. & E. Andreu. 1993. Feeding behavior as an index of copper stress in *Daphnia magna* and *Brachionus calyciflorus*. *Comparative biochemistry and physiology part C* 106 (2): 327-331.
- Fleminger A. 1985. Dimorphism and possible sex change in copepods of the family Calanidae. *Marine Biology* 88(3): 273-294.
- Flemming C.A. & J.T. Trevors. 1989. Copper toxicity and chemistry in the environment: a review. *Water Air and Soil Pollution* 44(1-2): 143-158.
- Forbes V.E. & P. Calow. 1999. Is the per capita rate of increase a good measure of population-level effects in ecotoxicology? *Environ. Toxicol. Chem.* 18(7): 1544-1556.
- Gaete H. & K. Paredes (1996) Toxicidad de mezclas de contaminantes químicos sobre el cladóceros *Daphnia magna*. *Rev. Int. Contam. Ambient.*, 12(1): 23-28.
- Gagneten A.M. 2002. Respuesta de una comunidad zooplanctónica de agua dulce a la aplicación de cromo en clausuras experimentales. *Interciencia*, 27 (10): 563-570.
- Gagneten A.M. 2006. Effects of chronic toxicity of Cr and Cu on *Daphnia magna* Straus (Crustacea, Cladocera). In: *Environmental and human health: An holistic vision* (Ed.: Jorge Herkovits). *Soc. Environ. Toxicol. Chem.* p. 168.
- Gagneten A.M. & I. Vila. 2001. Effects of Cu⁺² and pH on the fitness of *Ceriodaphnia dubia* (Richard 1894) (Crustacea, Cladocera) in microcosm experiments. *Environmental Toxicology* 16 (5): 428-438.
- García-García G., S. Nandini & S.S.S. Sarma. 2006. Turbidity mitigates lead toxicity to cladocerans (Cladocera). *Ecotoxicology* 15(5):425-436.
- Gutierrez M.F., J.C. Paggi & A.M. Gagneten. 2010. Fish infochemicals alter life cycle and growth of a calanoid copepod. *Journal of Plankton Research* 32 (1): 47-55.
- Hall L.W. 1982. On some simple estimates of an exponent of regular variation. *J. Roy. Statist. Soc. B* 44: 37-42.

- Hall L.W.Jr, M.C. Ziegenfuss, R.D. Anderson & B.L. Lewis. 1995. The effect of salinity on the acute toxicity of total and free cadmium to a Chesapeake Bay copepod and fish. *Mar. Pol. Bull.* 30(6): 376-384.
- Havens K.E. 1994. Structural and functional responses of a freshwater plankton community to acute copper stress. *Environmental Pollution* 86(3): 259-266.
- Heijerick D.G., K.A.C. De Schampelaere & C.R. Janssen. 2002. Predicting acute zinc toxicity for *Daphnia magna* as function of key water chemistry characteristics: development and validation of a biotic ligand model. *Environ. Toxicol. Chem.* 21(6): 1309-1315.
- Heugens E., A. Hendriks, T. Dekker, N. van Stralen & W. Admiraal. 2001. A review of the effects of multiple stressors on aquatic organisms and analysis of uncertainty factor for use in risk assessment. *Critical Reviews in Toxicology* 31 (3): 247-284.
- Hoang T.C., J.S. Gallagher & S.J. Klaine. 2007. Responses of *Daphnia magna* to pulsed exposures of arsenic. *Environ. Toxicol.*, 22: 308-317.
- Howell R. 1985. Effect of zinc on cadmium toxicity to the amphipod *Gammarus pulex*. *Hydrobiologia* 123(3): 245-249.
- Hutchinson T.H. 2002. Reproductive and development effect of endocrine disrupters in invertebrates: in vitro and in vivo approaches. *Toxicology Letters* 131: 75-81.
- Jak R.G., J.L. Maas & T.M.C. Scholten. 1996. Evaluation of laboratory derived toxic effect concentrations of a mixture of metals by testing fresh water plankton communities in enclosures. *Water Research* 30: 1215-1227
- Janssen C.R., G. Persoone & T.W. Snell. 1994. Cyst- based toxicity test. VIII. Short-chronic toxicity tests with the freshwater rotifer *Brachionus calyciflorus*. *Aquatic Toxicology* 28: 243-258.
- Jeziorski A. & N.D. Yan. 2006. Species identity and aqueous calcium concentrations as determinants of calcium concentrations of freshwater crustacean zooplankton. *Can. Jour. Fish. Aquatic Sci.* 63(5): 1007-1013.
- Keithly J., J. Brooker, D.K. DeForest, B.K. Wu & K.V. Brix. 2004. Acute and chronic toxicity of nickel to a cladoceran (*Ceriodaphnia dubia*) and an amphipod (*Hyalella azteca*). *Environ. Toxicol. Chem.* 23(3): 691-696.
- Khargarot B.S. & Das. 2009. Toxicity of mercury on in vitro development of parthenogenetic eggs of a freshwater cladoceran *Daphnia carinata*. *J. Hazard. Mat.* 161(1): 68-73.
- Khargarot B.S. & P.K. Ray. 1987. Correlation between heavy metal acute toxicity values in *Daphnia magna* and fish. *Bul. Environ. Contam. Toxicol.* 38(4): 722-726.
- Koivisto S. 1995. Is *Daphnia magna* an ecologically representative zooplankton species in toxicity tests? *Environmental Pollution* 90 (2):263-267.
- Koivisto S. & M. Ketola. 1995. Effects of copper on life-history traits of *Daphnia pulex* and *Bosmina longirostris*. *Aquatic Toxicology* 32(2-3):255-269.
- Kovatch C., G. Chandler & B. Cull. 1999. Utility of a full life-cycle copepod bioassay approach for assessment of sediment-associated contaminant mixtures. *Marine Pollution Bulletin* 38 (8): 692-701.
- Martínez-Jerónimo F., L. Martínez-Jerónimo & F. Espinosa-Chávez. 2006. Effect of culture conditions and mother's age on the sensitivity of *Daphnia magna* Straus 1820 (Cladocera) neonates to hexavalent chromium. *Ecotoxicology* 15(3): 259-266.
- Munger C., L. Hare, A. Craig & P.M. Charest. 1998. Influence of exposure time on the distribution of cadmium within the cladoceran *Ceriodaphnia dubia*. *Aquatic Toxicology* 44(3): 195-200.
- Muysen B.T.A., B. Bossuyt & C.R. Janssen. 2005. Inter- and intra-species variation in acute zinc tolerance of field-collected cladoceran populations. *Chemosphere* 61(8):1159-1167.
- Nowood W.P., U. Borgmann, D.G. Dixon & A. Wallace. 2003. Effects of metal mixtures on aquatic biota: a review of observations and methods. *Humann and Ecol. Risk Assess.* 9(4): 795-811.
- OECD. 1981. Test Guideline 452. Chronic Toxicity Studies. In: OECD Guideline for the Testing of Chemicals. Organization for Economic Cooperation & Development, Paris
- Offem B.O. & E.O. Ayotunde. 2008. Toxicity of lead to freshwater invertebrates (*Water fleas*; *Daphnia magna* and *Cyclop* sp) in fish ponds in a tropical floodplain. *Water, Air and Soil Pollution*, 192 (1-4):39-46.
- Ortiz M., E. González & C. Peñaherrera. 2006. Depredación de peces sobre el zooplancton en tres embalses neotropicales con distintos estados tróficos. *Interciencia* 31(7):517-524.
- Otha T., S. Tokishita, Y. Shiga, T. Hanazato & H. Yamagata. 1998. An assay system for detecting environmental toxicants with cultured cladoceran eggs in vitro: malformations induced by ethylenethiourea. *Environ. Res. Sec A* 77: 43-48.
- Paggi J.C. 1995. Crustacea – Cladocera, p. 909-951. In: E.C. Lopretto & G. Tell (Eds). *Ecosistema de aguas continentales: metodologías para su estudio*. La Plata, Ediciones Sur, Tomo III.
- Pane E.F., C. Smith, J.C. McGeer & C.M. Wood. 2003. Mechanisms of acute and chronic waterborne nickel toxicity in the freshwater cladoceran, *Daphnia magna*. *Environ. Sci. Technol.* 37: 4382-4389.
- Reichwaldt E.S. & H. Stibor. 2005. The impact of diel vertical migration of *Daphnia* on phytoplankton dynamics. *Oecologia* 146 (1): 50-56.
- Sánchez-Ortiz R., S. Sarma & S. Nandini. 2010. Comparative population growth of *Ceriodaphnia dubia* and *Daphnia pulex* (Cladocera) exposed to zinc toxicity. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, 45 (1): 37 – 41.
- Sharma M.S. & C.S. Selvaraj. 1994. Zinc, lead and cadmium toxicity to selected freshwater zooplankters. *Pollution Research* 13(2): 191-201.
- Sharp A.A. & D.E. Stearns. 1997. Sublethal effects of cupric ion activity on the grazing behaviour of three calanoid copepods. *Mar. Pol. Bull.* 34(12): 1041-1048.
- Shaw J.R., T.D. Dempsey, C.Y. Chen, J.W. Hamilton & C.L. Folt. 2006. Comparative toxicity of cadmium, zinc, and mixtures of cadmium and zinc to daphnids. *Environ. Toxicol. Chem.* 25(1): 182-189.
- Sibly & P. Calow. 1989. A life-cycle theory or responses to stress. *Biological Journal of the Linnean Society* 7: 101-116.
- Sillett K.B. & R.S. Stemberger. 1998. Masculinized females in a population of *Leptodiptomus minutus* (Copepoda, Calanoida). *Can. J. Zool.* 76(3): 596-600.
- Sinev A.Y. 2000. Postembryonal development of male and abnormal sexual individuals of *Alona affinis* (Leydig, 1860) (Anomopoda, Chydoridae). *Hydrobiologia* 437: 197-202.
- Soto E., G. Oyarce, B. Inzunza & E. Bay-Schmith. 2003. Acute toxicity of organic and inorganic compounds on the freshwater cyclopoid copepod *Eucyclops neumani neumani* (Pesta, 1927). *Bull. Environ. Contamin Toxicol.* 70 (5): 1017-1021.
- Spehar R.L. & J.T. Fiandt. 1986. Acute and chronic effects on water quality criteria-based metal mixtures on three aquatic species. *Environ. Toxicol. Chem.* 5: 917-931.
- Stearns D.E. & A.A. Sharp. 1994. Sublethal effects of cupric ion activity on the phototaxis of three calanoid copepods. *Hidrobiología* 292/293: 505-511.

- Suedel B.C., J.H.Jr Rodgers & E. Deaver. 1997. Experimental factors that may affect toxicity of cadmium to freshwater organisms. *Arch. Environ. Cont. Toxicol.* 33(2): 188-193
- Sullivan B.K., E. Buskey, D.C. Miller & P.J. Ritacco. 1983. Effects of copper and cadmium on growth, swimming and predator avoidance in *Eurytemora affinis* (Copepoda). *Marine Biology* 77: 299-306.
- Tsui M.T.K. & W.X. Wang. 2004. Temperature influences on the accumulation and elimination of mercury in a freshwater cladoceran, *Daphnia magna*. *Aquatic Toxicology* 70(3): 245-256.
- Untersteiner H., J. Kahapka & H. Kaiser. 2003. Behavioural response of the cladoceran *Daphnia magna* Straus to sublethal Copper stress—validation by image analysis *Aquatic Toxicology* 65(4): 435-442.
- Vasela S. & J. Vijverberg. 2007. Effect of body size on toxicity of zinc in neonates of four differently sized *Daphnia* species. *Aquatic Ecology* 41: 67-73.
- West C.W. & G.T. Ankley. 1998. A laboratory assay to assess avoidance of contaminated sediments by the freshwater oligochaete *Lumbriculus variegatus*. *Arch. Environm. Con. Toxicol.* 35: 20-24.
- Winner R.W. & M.P. Farrell. 1976. Acute and chronic toxicity of copper to four species of *Daphnia*. *J. Fish. Res. Board Can.* 33: 1685-1691.
- Wong C.K. & A.P. Pak. 2004. Acute and subchronic toxicity of the heavy metals copper, chromium, nickel and zinc, individually and in mixture to the freshwater copepod *Mesocyclops pehpeiensis*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 73: 190-196.
- Wong C.K. & P.K. Wong. 1990. Life table evaluation of the effects of cadmium exposure on the freshwater cladoceran, *Moina macrocarpa*. *Bull. Env. Con. Toxicol.* 44: 135-141.
- Wright D.A. & P.M. Welbourn. 1994. Cadmium in the aquatic environment: a review of ecological, physiological, and toxicological effects on biota. *Environ. Rev.* 2(2): 187-214.
- Zyadah, M.A. & T.E. Abdel-baky. 2000. Toxicity and Bioaccumulation of Copper, Zinc, and Cadmium in Some Aquatic Organisms. *Bull. Environm. Contam. Toxicol.* 64: 740-747.