Bol. Inst. Oceanogr. Venezuela, Univ. Oriente 309 (1 & 2); 65-72 (1991); 4 figs. 6 tabs.

EFECTOS DE LA TEMPERATURA SOBRE LA ACUMULACION Y LA DEPURACION DE COBRE EN TEJIDOS DE JUVENILES DE MUGIL CUREMA (PISCES: MUGILIDAE)

MÉLIDA A. BOADA & K. S. CHUNG

Instituto Oceanográfico de Venezuela, Universidad de Oriente, Cumaná, Venezuela

MAIRÍN J. LEMUS

Escuela de Ciencias, Núcleo de Sucre, Universidad de Oriente, Cumaná, Venezuela

RESUMEN: Se realizaron bioensayos estáticos para determinar los valores de las concentraciones letales medias (LC_{50}), grado de acumulación y depuración de cobre en músculo, hígado y branquias de juveniles de *Mugil curema* (V.) a temperaturas de 22 y 28°C. Los valores de LC_{50} para cobre a las 96 horas, determinados por transformación de la probabilidad logarítmica de la concentración y el porcentaje de supervivencia, fue de 1,39 µg/g de peso seco a 22°C y 2,33 µg/g de peso seco a 28 °C. Se determinaron los niveles de acumulación de cobre por espectrofotometría de absorción atómica en ejemplares juveniles de *M. curema* expuestos a concentraciones de 0,06 y 1,00 ppm de cobre, preparadas con $CuSO_4$. El grado de acumulación de cobre presentó el siguiente orden: hígado > branquias > músculo. La temperatura ejerce un efecto significativo sobre la acumulación del metal; las branquias y el músculo acumulan más metal a la temperatura de 28°C, mientras que el hígado lo hace a 22°C. Todos los tejidos tienden a acumular mayor concentración del metal cuando están expuestos a dosis de 1,00 ppm. El proceso de depuración en hígado y en branquias se realiza en un período de siete días, mientras que el músculo necesita por lo menos 14 días.

ABSTRACT: Static bioassays were carried out to determine median letal concentration values (LC_{50}), accumulation and depuration levels of copper in muscle, liver and gills of *Mugil curema* (V.) juveniles at temperatures of 22 and 28°C. The 96-hour LC_{50} values for copper, determined by the transformation of the logarithmic probability of concentrations and survival percentages were 1.39 µg/g of dry weight at 22°C and 2.33 µg/g of dry weight at 28°C. We determined cooper accumulation levels by spectrophotometry of atomic absorption in juveniles samples of *M. Curema* exposed to 0.06 and 1.00 ppm copper concentrations prepared from $CuSO_4$ stock solution. The order of accumulation levels for copper was: liver > gills > muscle. The temperature has significant effect on the heavy metals accumulation; gills and muscle accumulated more at 2 8°C, while liver showed higher concentrations at 22°C. All tissues have a tendency to accumulate more heavy metals when exposed to dose of 1.00 ppm. The depuration process in liver and gills required seven days,while muscle needed at least fourteen days.

INTRODUCCION

El problema de la toxicidad por elementos contaminantes en organismos acuáticos es crítica, particularmente en peces, que constituyen un renglón alimenticio bastante significativo para las poblaciones del mundo. Las zonas costeras son las más productivas, sin embargo son las más sensibles a las fuerzas severas de los contaminantes. Muchos de estos elementos tiene una degradación muy lenta o simplemente no la tienen y se van acumulando constantemente en el agua y en el sedimento para luego pasar a los organismos a través de la cadena trófica.

El cobre normalmente se encuentra en estado nativo y en una gran variedad de sulfuros y de óxidos, aunque puede existir en forma de hidróxido y carbonatos que son menos solubles. La concentración normal de cobre en el agua de mar es de 0,001-0,02 ppm en aguas costeras, sin embargo, se han detectado concentraciones de 1 ppm en zonas cercanas a depósitos de cobre. Este elemento es bioesencial para los organismos y se encuentra formando parte de muchas moléculas, particularmente enzimas tales como la ureasa, citocromo oxidasa, tiroxinasa, butiril CoA deshidrogenasa, etc. (BRYAN, 1976; WHITE & RAINBOW, 1985; MORENO, *et al.*, 1989; CHÓPITE & NUSETTI, 1990), este metal en general se comporta como un elemento tóxico a concentraciones significativamente bajas y en este sentido ha sido utilizado por el hombre para combatir organismos indeseables.

La toxicidad de muchos elementos trazas están influenciados por muchos factores ambientales, siendo la

temperatura quizás uno de los factores más importantes, ya que cambios en la temperatura afectan la tasa metabólica y su desarrollo, así como también influye en la distribución y el comportamiento de los organismos dentro del ecosistema (STEELER, 1983; BOUBEE, 1991). Se ha demostrado que la temperatura es un factor que afecta el límite de tolerancia media de muchos tóxicos, así como también el tiempo de supervivencia a diversas concentraciones del elemento traza (MACLEOD y PESSAH, 1973; HUDSON y SPRAGUE, 1975).

Debido a la capacidad de muchos metales a formar complejos con sustancia orgánicas, existe la tendencia a fijarse en los tejidos. La incorporación de estos metales pesados, con la subsecuente migración de los organismos, transferencia de la cadena alimenticia y deposición fecal provee un rápido sistema de transporte en el medio marino, además la concentración de metales en organismos marinos puede ser un buen indicador de contaminación. La vía de incorporación de los metales pesados puede ser a través de la alimentación, por vía cutánea o respiratoria y su eliminación a través del intestino, riñón y glándulas digestivas, claro que esto es muy particular para cada especie.

El objetivo del presente trabajo es determinar el efecto de la temperatura sobre la acumulación de cobre en tejidos de juveniles de *M. curema* y el tiempo necesario para que diferentes órganos y tejidos puedan depurar este elemento tóxico.

MATERIALES Y METODOS

Los ejemplares juveniles de *Mugil curema* se colectaron en la Laguna la Chica y Guacarapo, Golfo de Cariaco, Edo. Sucre (Fig. 1), se tomaron muestras de agua para la determinación de cobre, salinidad y temperatura. Los peces fueron llevados hasta la estación hidrobiológica de Turpialito del Instituto Oceanográfico donde permanecieron siete días y se les suministró una dieta de pescado fresco, luego fueron trasladados hasta el laboratorio para su aclimatación a 22 y 28°C durante siete días, durante este período de aclimatación los peces fueron alimentados con alimento básico en hojuelas.

Para la determinación del LC_{50} se realizaron bioensayos estáticos en envases de vidrio (16 × 16 × 20 cm) con tres litros de agua de mar natural y 4 ejemplares de

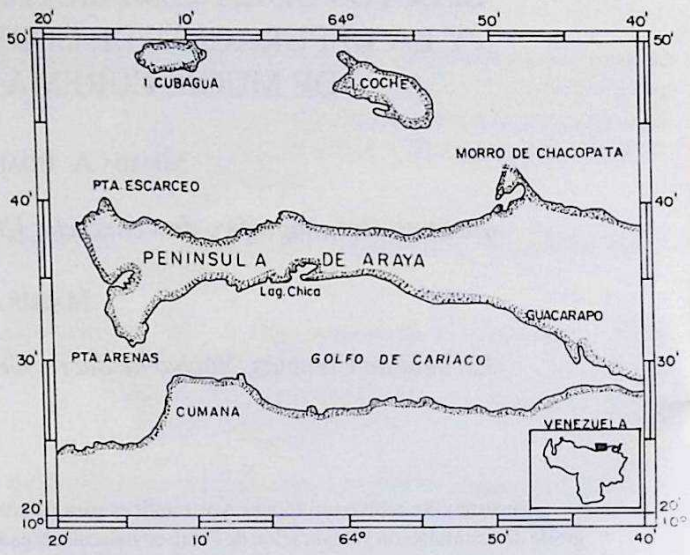


Fig. 1.- Ubicación geográfica de la Laguna Chica y Guacarapo, Golfo de Cariaco, Edo. Sucre.

M. curema en cada frasco con sus respectivos aireadores. Las concentraciones utilizadas fueron 1,0; 2,5; 5,5; 10 y 25 ppm de cobre preparadas con $CuSO_4$ y se realizaron 3 réplicas para cada concentración con sus respectivos controles. Los valores de LC_{50} se determinaron por transformación de la probabilidad logarítmica de la concentración letal y el porcentaje de supervivencia (SPRAGUE, 1973).

Los bioensayos de acumulación se realizaron colocando 16 ejemplares de *M. Curema* en tanques de 60 × 35 × 30 cm a 22 y 28°C con agua de mar natural. Se utilizaron dos concentraciones de cobre 0,06 y 1,00 ppm, dos réplicas para cada concentración con sus respectivos controles. Se tomaron muestras al azar durante un período total de exposición de 4 días en intervalos de 1/4, 1/2, 1, 2, 3, y 4 días. Posteriormente se les disectó las branquias, hígado y un trozo de músculo, los cuales fueron colocados en tubos de ensayo y secados durante 24 h a 110°C.

Para realizar los bioensayos de depuración se colocaron 16 ejemplares de *M. curema* en acuarios y después de transcurrido los cuatro días de acumulación de metal fueron colocados en agua limpia (sin metal) y se procedió a tomar muestras cada 7 días durante 4 semanas.

Las muestras previamente secadas de los bioensayos de acumulación y depuración fueron tratadas con 5 ml de $HN0_3$ (65%) para su digestión y se calentaron hasta la sequedad. El residuo se disolvió con agua dionizada y se filtró sobre papel Watman No. 42, posteriomente se

aforaron en balones de 10 ml. La determinación de cobre en los tejidos se realizó por espectrofotometría de absorción atómica utilizando un aparato Perkin Elmer Mod. 403. Los resultados obtenidos fueron expresados en µg/g de peso seco.

RESULTADOS

Los valores de la concentración letal media (LC_{50}) para cobre a las temperaturas de 22 y 28°C a las 96 horas, determinadas por transformación de la probabilidad logarítmica y el porcentaje de supervivencia están resumidas en la Tabla 1 donde se observa que los juveniles de *Mugil curema* presentan un LC_{50} a 22°C de 1,39 ppm de Cu y a 28°C de 2,33 ppm.

La acumulación de cobre en branquias y en músculo de juveniles de *M. curema* expuestos a concentraciones de 0,06 y 1,00 ppm de Cu a temperaturas de 22 y 28°C, indican que la asimilación de este elemento en los tejidos difiere significativamente en cuanto a la temperatura, concentración del metal y el tiempo de exposición (Tablas 2 y 3). En el tejido hepático se demostró que la temperatura ejerce un efecto significativo sobre la acumulación del metal, no siendo así para la concentración del contaminante ni para el tiempo de exposición (Tabla 4).

La curva de acumulación de cobre en branquia de los ejemplares (Fig. 2) expuestos a una concentración de cobre de 1,00 ppm mostró un incremento rápido durante las primeras 12 horas hasta el primer día para luego declinar el cuarto día de exposición. Para los ejemplares sometidos a una concentración de 0,06 ppm y 28°C la acumulación de cobre fue progresiva durante los cuatro días.

La acumulación de cobre en músculo fue mucho menor que en branquias e hígado. A 28°C las curvas de

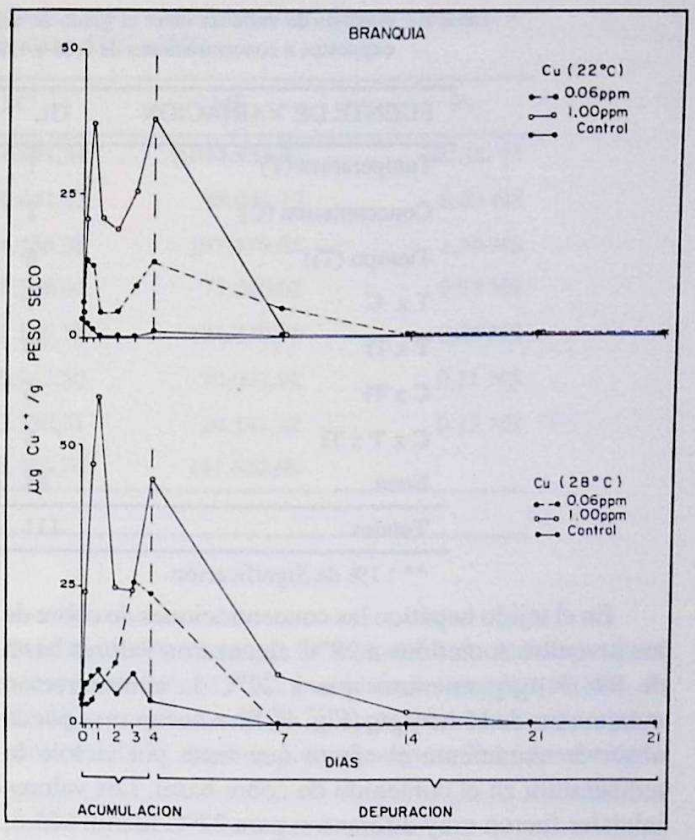


Fig. 2.- Acumulación y depuración de cobre en branquias de juveniles de *Mugil curema* expuestos a concentraciones de 0,06 y 1,00 ppm y temperaturas de 22°C y 28°C.

acumulación de cobre señalan que el contenido de cobre es mayor en peces expuestos a 1,00 ppm que a 0,06 ppm a diferencia de las curvas señaladas para 22°C en donde se observa que el contenido de cobre al cuarto día fue similar para ambas concentraciones del metal; en este tejido se evidencia que la acumulación de cobre es progresiva hasta el cuarto día. La temperatura por si sola no parece ejercer efecto sobre la distribución del metal en este tejido, pues las concentraciones basales pueden llegar a alcanzar valores hasta de 4,4 µg/g de peso seco a ambas temperaturas (Fig. 3).

Tabla 1.- Concentración letal media (LC_{50}) de cobre en ejemplares de *Mugil curema* durante 96 horas de exposición a 22°C y a 28°C.

N	Temperatura (°C)	LC_{50} (ppm)	Long. Total (cm)	Peso Total (g)
96	22	1,39	7,6 ± 1,0	4,5 ± 1,7
120	28	2,33	6,2 ± 0,3	3,8 ± 0,4

N: Número de Muestras

Tabla 2.- Análisis de varianza entre el grado de acumulación de cobre en branquias de *Mugil curema*, expuestos a concentraciones de 0,06 y 1,00 ppm durante cuatro días a 22°C y 28°C.

FUENTE DE VARIACION	GL	SC	MS	Fs
Temperatura (T)	1	960,64	960,64	27,10 **
Concentración (C)	1	9.067,12	9.067,12	255,77 **
Tiempo (Ti)	6	6.590,96	1.098,49	30,99 **
T x C	1	336,98	336,98	9,51 **
T x Ti	6	1.457,38	242,90	6,85 **
C x Ti	6	4.137,97	688,66	19,43 **
C x T x Ti	6	1.727,70	287,93	8,12 **
Error	84	2.978,06	35,45	
Totales	111			

** : 1% de Significación

En el tejido hepático las concentraciones de cobre de los juveniles sometidos a 28°C alcanzaron valores hasta de 891,3 µg/g mientras que a 22°C la concentración máxima fue de 164,6 µg/g (Fig. 4). En esta figura se puede observar claramente el efecto que tiene por si solo la temperatura en el contenido de cobre basal. Los valores iniciales fueron muy diferentes; para 22°C fueron 665,6; 849,1 y 724,2 µg/g para los grupos de control, 0,06 y 1,00 respectivamente, mientras que para 28°C los valores fueron 210, 225 y 251 µg/g.

Los peces sometidos a temperaturas de 22°C presentaron un comportamiento bifásico con un máximo a las 12 horas y un decrecimiento hasta el tercer día para volver a aumentar al cuarto día, mientras que a 28°C no se observó variación significativa durante el tiempo de exposición a las dos concentraciones (Fig. 4).

El proceso de depuración en branquias y músculo fue afectado significativamente (Tablas 5 y 6) por la concentración del metal, temperatura y tiempo de exposición, observándose que 7 días son suficientes para que las branquias depuren el cobre hasta alcanzar una concentración normal, mientras que el músculo requiere por lo menos 14 días, para alcanzar concentraciones similares a los basales (Figs. 2, 3 y 4).

DISCUSION

Los ejemplares juveniles de *Mugil curema* son más

Tabla 3.- Análisis de varianza entre el grado de acumulación de cobre en músculo de *Mugil curema* expuestos a concentraciones de 0,06 y 1,00 ppm durante cuatro días a 22°C y 28°C.

FUENTE DE VARIACION	GL	SC	MS	Fs
Temperatura (T)	1	2,71	2,71	6,30 **
Concentración (C)	1	62,03	62,03	114,26 **
Tiempo (Ti)	6	468,85	74,18	181,72 **
T x C	1	219,60	219,60	510,70 **
T x Ti	6	44,68	7,45	17,33 **
C x Ti	6	45,13	7,52	17,49 **
C x T x Ti	6	48,13	8,02	18,65 **
Error	84	36,29	0,43	
Totales	111			

** : 1% de Significación

Tabla 4.- Análisis de varianza entre el grado de acumulación de Cobre en hígado de *Mugil curema* expuestos a concentraciones de 0,06 y 1,00 ppm durante cuatro días a 22°C y 28°C.

FUENTE DE VARIACION	GL	SC	MS	Fs
Temperatura (T)	1	9.074.981,31	9.074.981,31	61,05 **
Concentración (C)	1	88.641,12	88.641,12	0,63 NS
Tiempo (Ti)	6	1.184.386,08	197.379,68	1,39 NS
Te x C	1	75.560,02	75.560,02	0,53 NS
Te x Ti	6	731.105,78	121.850,96	0,86 NS
C x Ti	6	180.017,50	30.002,92	0,21 NS
C x T x Ti	6	123.250,91	20.541,82	0,15 NS
Error	84	11.901.368,70	141.682,96	
Totales	111			

** 1% de Significación

NS: No Significativo

sensibles a cobre a bajas temperaturas (22°C) que a temperaturas cálida de 28°C. Probablemente esta condición esté directamente relacionada a la temperatura a la cual se encuentra expuesto dentro de su ecosistema durante todo el día; el rango de variación de la temperatura superficial fue de 3°C, la máxima temperatura fue de 27,5°C y la mínima de 24,5°C, no observándose temperaturas de 22°C durante los muestreos. Esta condición a

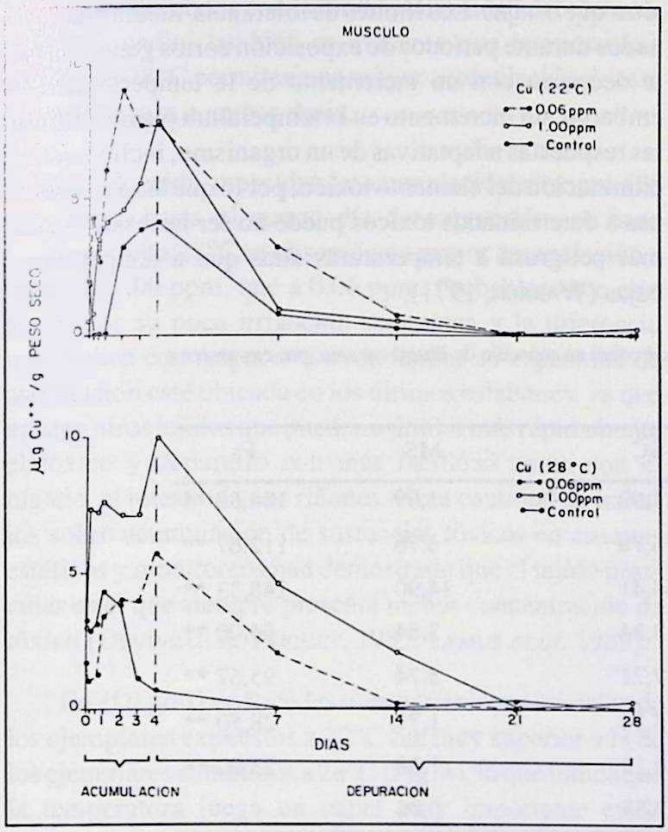


Fig. 3.- Acumulación y depuración de cobre en músculo de juveniles de *Mugil curema* expuestos a concentraciones de 0,06 y 1,00 ppm a temperaturas de 22°C y 28°C.

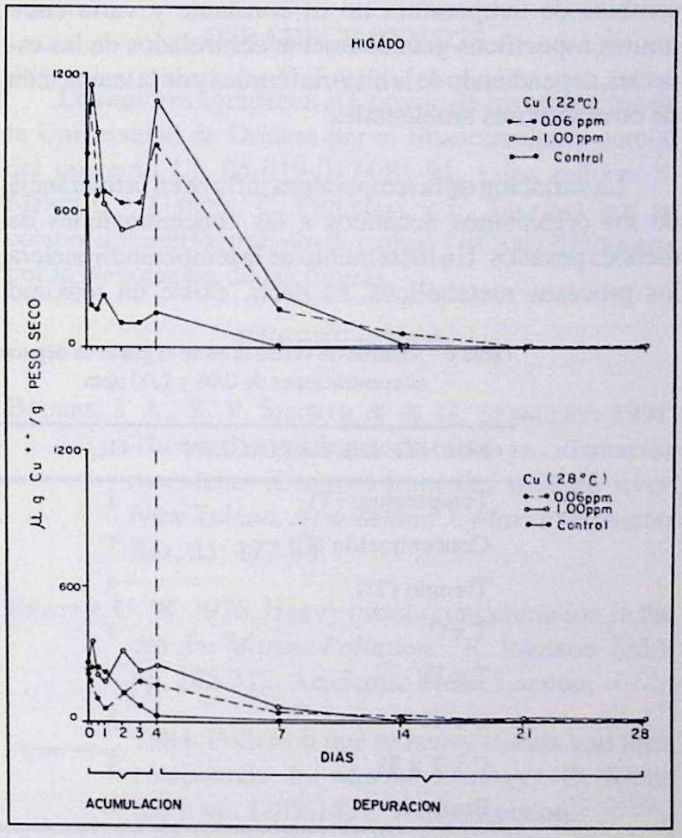


Fig. 4.- Acumulación y depuración de cobre en hígado de juveniles de *Mugil curema* expuestos a concentraciones de 0,06 y 1,00 ppm y temperaturas de 22°C y 28°C.

Tabla 5.- Análisis de varianza entre el grado de depuración de cobre en branquias de *Mugil curema* pre-expuestos a concentraciones de 0,06 y 1,00 ppm.

FUENTE DE VARIACION	GL	SC	MS	Fs
Temperatura (T)	1	10,79	10,79	89,92 **
Concentración (C)	1	10,79	10,79	89,92 **
Tiempo (Ti)	3	134,90	44,97	374,75 **
T x C	1	66,34	66,34	552,83 **
T x Ti	3	12,77	4,26	35,30 **
C x Ti	3	12,77	4,26	35,30 **
C x T x Ti	3	134,90	44,97	374,75 **
Error	48	5,53	0,12	
Totales	63			

**: 1% de Significación

22°C por si solo implica una adaptación metabólica del organismo, que aunado a la presencia del metal, afectaría más rápidamente a los ejemplares. En este sentido FRAY (1976), sugiere que las respuestas de un organismo a los cambios de temperatura no es constante y varía entre límites específicos genéticamente controlados de las especies, dependiendo de la historia térmica y de la interacción de otros factores ambientales.

La variación de la temperatura influye en la tolerancia de los organismos acuáticos a las concentraciones de metales pesados. Un incremento de la temperatura acelera los procesos metabólicos, es decir, existe un máximo consumo energético (ELLIOT, 1982) y el grado de irrigación de los tejidos los que trae como consecuencia que los organismos acuáticos mueran más rápidamente expuestos a sustancias tóxicas a temperaturas moderadamente más altas que a bajas. Los límites de tolerancia media determinados durante períodos de exposición cortos generalmente decrecen con un incremento de la temperatura, sin embargo, un incremento en la temperatura puede acelerar las respuestas adaptativas de un organismo, incluyendo la eliminación del elemento tóxico; por lo que las exposiciones a determinados tóxicos puede no ser necesariamente más peligrosa a temperaturas altas que a temperaturas bajas (WARREN, 1971).

Tabla 6.- Análisis de varianza entre el grado de depuración de cobre en músculo de *Mugil curema,* pre-expuestos a concentraciones de 0,06 y 1,00 ppm.

FUENTE DE VARIACION	GL	SC	MS	Fs
Temperatura (T)	1	11,09	11,09	184,83 **
Concentración (C)	1	6,76	6,76	112,67 **
Tiempo (Ti)	3	44,41	14,90	248,33 **
T x C	1	3,84	3,84	64,00 **
T x Ti	3	17,21	5,74	95,67 **
C x Ti	3	5,14	1,71	28,50 **
C x T x Ti	3	4,13	1,38	23,00 **
Error	48	2,88	0,06	
Totales	63			

**: 1% de Significación

El comportamiento bifásico observado durante la acumulación de cobre en branquias de *M. curema*, indica que el cobre asimilado parece ser excretado, para luego volver a acumularlo, ya que se ha demostrado que este elemento bioesencial a concentraciones bajas puede ser regulado por los organismos (DELPLEDGE y RAINBOW, 1990). Muchos autores sugieren que el mucus branquial juega un papel importante en la eliminación del elemento, y que además sirve a su vez como controlador de la permeabilidad de elementos tóxicos, no obstante este elemento puede entrar a través de las branquias a los órganos más internos, como el hígado y el músculo; las branquias, por su comunicación directa con el medio donde se encuentra el tóxico, representa el blanco más importante de vía de acceso para la asimilación de los tóxicos, sin descartar la vía alimenticia que también es muy importante (BRYAN, 1984).

Las curvas demuestran que 1,00 ppm de cobre induce una mayor acumulación del metal en las branquias cuando se compara con 0,06 ppm a ambas temperaturas ensayadas (Fig. 2), lo que indica que la acumulación está directamente relacionada con la biodisponibilidad del elemento en el medio, también es evidente que temperaturas cálidas de 28°C permiten una mayor acumulación de este elemento traza a ambas dosis.

En el tejido muscular la acumulación siempre fue progresiva hasta el cuarto día de exposición, se hace evidente que a 28°C se observó una mayor acumulación a dosis de 1,00 ppm, que a 0,06 ppm. Probablemente este tejido por su poca irrigación sanguínea y la diferencia metabólica con respecto a otros tejidos su capacidad de asimilación esté ubicada en los últimos eslabones, ya que existen otros tejidos que pueden asimilar más rápidamente el tóxico y depurarlo con más facilidad como son el hígado, el intestino y los riñones. Gran cantidad de trabajos sobre acumulación de sustancias tóxicas en ensayos estáticos y monitoreos han demostrado que el tejido muscular es el que siempre presenta menor concentración de tóxico (DEVINEAU & TRIQUET, 1985; LEMUS *et al.* 1989).

En el tejido hepático las concentraciones iniciales de los ejemplares expuestos a 22°C fue muy superior a la de los ejemplares sometidos a 28°C (Fig. 4), lo que indica que la temperatura juega un papel muy importante en la distribución de este elemento bioesencial en el organismo, probablemente el cobre cumpla un papel muy importante en procesos metabólicos, cuando *M. curema* se encuentra expuesta a bajas temperaturas. Los valores basales a 28°C fueron bastante bajos a ambas concentraciones, probablemente podría ser que los procesos de depuración se estimulan a temperaturas altas, como lo sugiere WARREN (1971).

Los ejemplares juveniles de *M. curema* cuando son transferidos a agua limpia después del proceso de acumulación pueden depurar el contenido de cobre en hígado y branquias a los siete días mientras que el tejido muscular requiere de por lo menos 14 días, lo que indica que este último tejido tiene poca capacidad de depuración cuando se compara con el hígado y las branquias.

Los resultados que de aquí se desprenden, sugieren que juveniles de *M. curema* son más tolerantes al efecto del cobre en ambientes cálidos, lo cual le proporciona una ventaja desde el punto de vista ecológico, porque la especie generalmente en los primeros estadios de su vida se encuentra distribuida en las zonas costeras donde las temperaturas son más cálidas asegurándole una mayor sobrevivencia, crecimiento y desarrollo de la especie.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Consejo de Investigación de la Universidad de Oriente por el financiamiento parcial del proyecto CI: 05-019-0174/81-91, a los señores S. MÉNDEZ, J. GARCÍA, C. FIGUEROA y F. SALAZAR por su colaboración en los trabajos de campo y a CARLOS FIGUEROA por la elaboración de las figuras.

REFERENCIAS

BOUBBE, J. A., K. P. SHICKER & A. G. STANCLIFF. 1991. Thermal avoidance in inanga. *Galaxias maculatus* (Lenyns) from the waikato river, New Zeland. *New Zeland J. Mar Freshwater Res.* 25: 177-88.

BRAYAN, G. W. 1976. Heavy metals contamination in the sea. In: *Marine Pollution.* R. Johnson (ed.). pp. 185-312. Academic Press, London.

_____ 1984. Pollution due to heavy metals and their compounds. In: *Marine Ecology.* O. Kinne (ed.). pp. 1289-1431. Wiley, London.

CHÓPITE, J. A & O. NUSSETTI. 1989. Efectos del zinc y la salinidad sobre el crecimiento y el metabolis-

mo energético de músculo blanco e hígado de juveniles de coro-coro *Orthopristis ruber* (Cuvier, 1930 Pisces: Haemulidae). *Bol. Inst. Oceanogr. Univ. Oriente*, 28:146-151.

DEPLEDGE. M. H. & P. S. RAINBOW. 1990. Models of regulation and accumulation of trace element (Zn) in marine vertebrates. *Comp. Biochem. Physiol.* , 97C(1):1-7.

DEVINEAU J. & C. A. TRIQUET. 1985. Patterns of bioaccumulation and essential trace element (Zn) and a pollutan metal (Cd) in larva of the prawn *Palaemon serratus. Mar. Biol.*, 86:139-143.

ELLIOT, J. M. 1982. The effects of temperature and ration size of the growth and energetics of salmonids in captivity. *Comp. Biochem. Physiol.*, 77B(1): 81-91.

FRAY, F. 1967. Responses of vertebrate poikilotherms to temperature. In: *Thermobiology*. A. Rose (ed.). pp 375-406. Academic Press, London.

HUDSON, P. & J. SPRAGUE. 1975. Temperature induced changes in acute toxicity of Zn to Atlantic salmon (*Salmo salar*). *J. Fish. Res. Bd. Can.*, 32:1-10.

LEMUS, M., J, CHÓPITE & B. GAMBOA. 1989. Efecto de la salinidad en la acumulación de zinc y en las concentraciones de Na^+, K^+ y Ca^{++} en tejidos de coro-coro *Orthopristis ruber*, Pisces: Pomadasyidae. *Bol. Inst. Oceanogr. Univ. Oriente*, 28:152-159.

MACLEOD, J. & E. PESSAH. 1973. Temperature effects on mercury accumulation toxicity and metabolic rate in rainbow trout. (*Salmo gairdneri*). *J. Fish. Res. Bd. Can.*, 30(4) : 435-492.

MORENO, J. J., M. C. CASTELLOTE & J. QUERALT. 1989. Effects in vitro of copper and zinc on hepatic citocromo P-450 activities. *Comp. Biochem. Physiol.*, 93:355-357.

SPRAGUE, J. B. 1973. The ABC's of pollutant bioassay using fish. In Biological methods for assessment of water quaility. J. Cairns Jr. y K. L. Dickson (ed.). ASTM Spec. Techn., 528:6-30.

STEELER, C. W. 1983. Comparison of behavioral and acuatic toxicity of copper to sheepshead, Atlantic croaker and pinfish. *Mar. Poll. Bull.*, 14:425-428.

WARREN, C. 1971. *Biology and water pollution control.* W. B. Saunders. Ed. London. New York. 434 p.

WHITE, S. L. & R. S. RAINBOW. 1985. On the metabolic requirements for copper and zinc in mollusc and crustaceans. *Mar. Environ. Res.*, 16:215-229.