



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**

**Centro de Ciências Biológicas e da Saúde**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA E RECURSOS**  
**NATURAIS**

Via Washington Luiz, Km. 235 - Caixa Postal 676

Telefax: (016) 260-8305

CEP 13.565-905 - São Carlos - SP - Brasil

Home page : <http://www.ufscar.br/~ppgern/>

E-mail : [ppgern@power.ufscar.br](mailto:ppgern@power.ufscar.br)

---



**Influência de substâncias húmicas nas características  
bionômicas, toxicidade e bioacumulação de cobre por  
*Ceriodaphnia silvestrii* Daday (Crustacea, Cladocera).**

Maria Alice Penna Firme dos Santos

SÃO CARLOS

2004

---

---



---

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**  
**Centro de Ciências Biológicas e da Saúde**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA E RECURSOS**  
**NATURAIS**

Via Washington Luiz, Km. 235 - Caixa Postal 676  
Telefax: (016) 260-8305  
CEP 13.565-905 - São Carlos - SP - Brasil  
Home page : <http://www.ufscar.br/~ppgern/>  
E-mail : [ppgern@power.ufscar.br](mailto:ppgern@power.ufscar.br)

---



**Influência de substâncias húmicas nas características  
bionômicas, toxicidade e bioacumulação de cobre por  
*Ceriodaphnia silvestrii* Daday (Crustacea, Cladocera).**

Maria Alice Penna Firme dos Santos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ecologia e Recursos Naturais.

SÃO CARLOS

2004

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da  
Biblioteca Comunitária da UFSCar**

S237is

Santos, Maria Alice Penna Firme dos.

Influências de substâncias húmicas nas características bionômicas, toxicidade e bioacumulação de cobre por *Ceriodaphnia silvestrii* Daday (Crustacea, Cladocera) / Maria Alice Penna Firme dos Santos. – São Carlos : UFSCar, 2004.

126 p.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de São Carlos, 2004.

1. Ecologia aquática. 2. Área ambiental - toxicologia. 3. Zooplâncton. I. Título.

CDD: 574.5263 (20ª)

---

Orientadora: Prof. Dra. Maria da Graça Gama Melão

---

Co-orientadora: Prof. Dra. Ana Teresa Lombardi

“O segundo passo para nos familiarizarmos com a virtude da paciência é pensar na adversidade não tanto como uma ameaça à nossa paz de espírito, mas como o próprio meio pelo qual se adquire paciência. Se nos colocarmos nessa perspectiva, veremos aqueles que nos podem prejudicar como sendo, de certa forma, professores de paciência. Essas pessoas nos ensinam o que jamais aprenderíamos simplesmente ouvindo alguém falar, por mais sábios ou santos que fossem. Muito menos o leitor pode esperar aprender a ser virtuoso meramente lendo este livro – a não ser que o ache tão tedioso que exija perseverança! Com a adversidade, porém, podemos aprender o valor da paciência, da tolerância. E aqueles que nos prejudicam são, em especial, os que nos oferecem oportunidades sem paralelo para praticar a disciplina de nosso comportamento.”

Sua Santidade, o décimo quarto Dalai Lama, em “Uma ética para o novo milênio”.

*A todos aqueles que, de alguma forma, me ajudaram a crescer.*

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus pais que fornecem todos os alicerces para minha vida.

À professora Dra. Maria da Graça Gama Melão, pela orientação e pelos ensinamentos sobre Biologia do zooplâncton.

À professora Dra. Ana Teresa Lombardi, pela co-orientação e pelos ensinamentos em metais pesados.

Ao professor Dr. Ivã Moreno, por suas conversas divertidas nos momentos de stress.

Aos colegas de laboratório, Rodrigo, Irene, Paloma, Gabi, Patrícia, que, sempre que possível, me ajudaram.

Aos amigos João Carlos, Douglas, Vitelo, Carolina, Alexandre, Sadao, Pedrinho, Gabi, pela amizade.

Aos amigos Miguel, Danilo, Márcio, Kil, Anand, Iara, e Thaís que, mesmo de longe, me acompanharam pelo caminho até aqui.

Ao amigo Vitor, que sempre compartilhou comigo a paixão pelos pássaros.

Ao amigo Davi, pelas muitas risadas e algumas lágrimas, que resultaram em muito aprendizado.

Aos professores Dr. Antonio Mozeto, Dr. Irineu Bianchini e Dra. Odete Rocha pelas excelentes sugestões e contribuições quando do Exame de Qualificação.

Aos funcionários do Departamento de Hidrobiologia, pela colaboração e amizade.

Ao pessoal Laboratório de Ficologia da UFSCar, pelas análises de cobre total e pela colaboração.

Ao PPG-ERN/UFSCar, pelo suporte e colaboração no desenvolvimento deste trabalho.

À FAPESP, pelo financiamento do projeto e ao CNPq pela concessão da bolsa de mestrado.

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	12
1.1. Bioacumulação de metais .....	13
1.2. O metal cobre .....	14
1.3. Metais e organismos aquáticos .....	15
1.4. O papel da matéria orgânica dissolvida (MOD) .....	17
1.5. Formas tóxicas de um metal .....	20
1.6. O zooplâncton: uma importante comunidade.....	22
1.7. Organização da dissertação .....	23
2. OBJETIVOS	
Principais ... ..	25
Específicos .....	25
3. MATERIAL E MÉTODOS .....	27
3.1. Espécie zooplancônica estudada .....	27
3.2. Manutenção das culturas de <i>Ceriodaphnia silvestrii</i> .....	30
3.2.1. Culturas-estoque .....	30
3.2.2. Cultivo de microalgas para alimentação de <i>C. silvestrii</i> .....	31
3.3. Caracterização bionômica de <i>C. silvestrii</i> .....	33
3.3.1. Estudo bionômico de <i>C. silvestrii</i> .....	33
3.3.2. Relação comprimento / peso de <i>C. silvestrii</i> .....	36
3.3.3. Determinação da taxa instantânea de crescimento da população (r) .....	37
3.4. Influência das substâncias húmicas na toxicidade e bioacumulação do cobre em <i>C. silvestrii</i> .....	38
3.4.1. Testes de toxicidade .....	38
3.4.2. Determinação dos valores de LC <sub>50</sub> .....	39
3.4.3. Determinação de cobre livre na água .....	39
3.4.3.1. Calibração do ISE .....	40



3.4.4. Determinação de cobre total nos animais .....	41
3.4.5. Determinação de cobre total na água .....	42

#### 4. CAPÍTULOS

4.1. Life history responses of <i>Ceriodaphnia silvestrii</i> Daday (Crustacea, Cladocera) to variation in food source, culture medium, hardness and presence of humic substances .....	43
4.2. The effects of humic substances on ionic copper toxicity and accumulation by <i>Ceriodaphnia silvestrii</i> Daday (Crustacea, Cladocera) .....	81
5. CONCLUSÕES GERAIS .....	107
6. REFERÊNCIAS .....	109
7. NORMAS PARA PUBLICAÇÃO .....	120

## RESUMO

Foram estudados os efeitos de cinco diferentes tratamentos nas características bionômicas de *Ceriodaphnia silvestrii*: (1) água do ambiente natural autoclavada e filtrada através de rede de plâncton de (20µm) com fornecimento de *Chlorella lacustris* como alimento; (2) água do ambiente natural filtrada e autoclavada através de rede de plâncton de (20µm) com fornecimento de *Scenedesmus bijugus*; (3) meio de cultivo artificial (água reconstituída mole) com fornecimento de *Scenedesmus bijugus*; (4) meio de cultivo artificial (água reconstituída) com fornecimento de *S. bijugus* mais substâncias húmicas (20mg L<sup>-1</sup>); e (5) meio de cultivo artificial (água reconstituída dura) com fornecimento de *S. bijugus*. Características de crescimento e reprodução foram observadas a cada 12 horas desde o nascimento dos organismos até o momento de sua morte natural. A temperatura de cultivo para todos os tratamentos foi de 25±1 °C. A taxa instantânea de crescimento populacional (r) foi calculada para cada tratamento. A relação peso-comprimento foi também estabelecida para *C. silvestrii*. Os resultados mostraram maior longevidade no tratamento com *Chlorella lacustris*, e maior fecundidade no tratamento com água natural e *S. bijugus*. No tratamento com meio artificial, os parâmetros de fecundidade e crescimento foram menores que no tratamento com água natural. O aumento na dureza não afetou o crescimento e a reprodução de *C. silvestrii*. A adição de substâncias húmicas resultou em valores maiores de fecundidade e sobrevivência. A toxicidade aguda do cobre para o cladóceros *Ceriodaphnia silvestrii* também foi estudada tanto na presença quanto na ausência de substâncias húmicas (SH). Grupos de 20 fêmeas adultas de tamanhos semelhantes foram expostas à diversas concentrações de cobre (10<sup>-8</sup>M a 10<sup>-5</sup>M) durante 24 horas. Os valores de LC<sub>50</sub> foram estimados através do método "Trimmed Spearman-Kärber". A presença de substâncias húmicas (20mg L<sup>-1</sup>) alterou o valor de LC<sub>50</sub> de 4,46x10<sup>-8</sup>M (sem SH) para 1,08x10<sup>-6</sup>M (com SH). A concentração de cobre livre foi determinada através de eletrodo sensível ao íon cobre: verificou-se que a presença de SH diminuiu a concentração de íons livres presentes no meio. Os valores de LC<sub>50</sub> estimados baseando-se na concentração nominal de cobre variaram significativamente entre os dois tratamentos, mas quando foram estimados utilizando-se as leituras de cobre livre, os valores mostraram-se muito similares: 3,31x10<sup>-8</sup>M na ausência de SH, e 2,84x10<sup>-8</sup>M na presença de substâncias húmicas. Os resultados obtidos neste estudo sugerem que *C. silvestrii* apresenta como estratégia de acumulação de cobre a regulação, apresentando a mesma quantidade de cobre quando exposta a diferentes concentrações deste metal na água. A presença de substâncias húmicas no meio aquático parece também não influenciar a bioacumulação de cobre por *C. silvestrii*. Em ambos os tratamentos, as concentrações do metal em *C. silvestrii* apresentaram-se similares.

## ABSTRACT

Effects of different food sources and culture medium on life history traits of *Ceriodaphnia silvestrii* were studied under controlled conditions. Animals were submitted to five different treatments: (1) autoclaved natural water filtered through plankton net of 20 $\mu$ m mesh size, supplied with *Chlorella lacustris* as food source; (2) autoclaved natural water filtered through plankton net of 20 $\mu$ m mesh size, supplied with *Scenedesmus bijugus*; (3) soft reconstituted water supplied with *S. bijugus*; (4) soft reconstituted water supplied with *S. bijugus* plus humic substances (20mg L<sup>-1</sup>); and (5) hard reconstituted water supplied with *S. bijugus*. Observations were performed at 12 hours intervals from organism birth until its natural death. All treatments were kept in a 25 $\pm$ 1 °C temperature. Instantaneous rate of population increase (r) was calculated for all treatments. Body length-dry weight relationship was also established. Results showed longer longevity in *C. lacustris* treatment, and better fecundity on treatment with natural water and *S. bijugus*. In the treatment with artificial medium, fecundity and growing parameters were lower than in natural water treatment. Increased hardness did not affect reproduction and growth values. Humic substances addition resulted in greater fecundity and survival values. Copper acute toxicity to *Ceriodaphnia silvestrii* (Cladocera, Daphnidae), was also studied in the absence and presence of humic substances (HS). Groups of 20 adult females of similar sizes were exposed to copper (total concentration range from 10<sup>-8</sup> to 10<sup>-5</sup> M) for a period of 24h. LC<sub>50</sub> was estimated by the Trimmed Spearman-Kärber method. It revealed that humic substances altered LC<sub>50</sub> from 4.4 x 10<sup>-8</sup> M without humic substances to 1.1x10<sup>-6</sup> M with 20mg HS L<sup>-1</sup> in the medium. Free copper ions were determined in test media and it showed that humic substances reduced Cu<sup>2+</sup> concentration. LC<sub>50</sub> values based on total copper concentration varied significantly between the two treatments. However, when lethality was estimated based on free ion concentrations, the values were similar: 3.3 x 10<sup>-8</sup> M without humic substances, and 2.8 x 10<sup>-8</sup> M when HS were present in the medium. Moreover, *C. silvestrii* is capable of regulating its body copper levels over a range of copper availabilities, as so many other crustaceans. As also reported, humic substances did not influence copper bioaccumulation by *C. silvestrii*.

## 1. INTRODUÇÃO

O constante avanço da tecnologia nos últimos séculos tem possibilitado ao homem modificar a natureza, utilizando-se dos recursos naturais disponíveis para inúmeros propósitos. Como consequência, observam-se descargas de resíduos dos mais diversos tipos no ar, no solo e na água, que acabam por acumular substâncias nocivas aos seres vivos em toda a biosfera. Dentre essas substâncias, podemos destacar os chamados elementos-traço, que, segundo Odum (1983) são elementos e seus compostos necessários em quantidades diminutas para a perfeita operação de sistemas vivos. Uma de suas funções é a participação em sistemas enzimáticos, como por exemplo o zinco, um cofator enzimático.

Antes da era industrial, estes elementos estavam presentes em baixas concentrações na água dos ecossistemas aquáticos. Entretanto, a partir desse período, os ciclos biogeoquímicos dos elementos-traço foram fortemente alterados, tornando-os mais presentes nestes ambientes.

Sabe-se que o descarte inadequado de elementos-traço em concentrações acima das que ocorrem naturalmente no ambiente implica em riscos à saúde pública. Isto ocorre devido à alta toxicidade aos seres humanos e à longa persistência no ambiente. No organismo humano o acúmulo de metais acaba por causar efeitos carcinogênicos, mutagênicos, degenerativos, dentre outros. Pode-se citar como exemplo, as doenças de

Minamata, em 1956, e Itai-Itai, em 1955, causadas por contaminação por mercúrio e cádmio, respectivamente, no Japão (Laws, 2000).

### **1.1. BIOACUMULAÇÃO DE METAIS**

O ponto de partida dos processos de bioacumulação e biomagnificação é a tomada e acúmulo de metais tóxicos a partir dos níveis tróficos mais baixos: são os organismos produtores que estão na base das teias alimentares que, através de diversos mecanismos, concentram tais elementos em seus corpos (Woodwell, 1964). Através dos processos de bioacumulação e biomagnificação, os metais podem se apresentar em concentrações elevadas nos organismos de níveis tróficos mais altos, podendo, neste caso, ser duas, três ou até mesmo mil vezes maior do que na água ou no ar (Laws, 2000). Logo, o homem situa-se em um dos pontos de concentração destas substâncias.

Atualmente, alguns autores preferem separar os conceitos de bioacumulação (ou bioconcentração) e biomagnificação. Segundo Esser (1986), o primeiro trata da capacidade de acumulação de uma substância, através do meio circundante (água ou ar) ou de seu alimento, por um dado organismo. Já a biomagnificação consiste da transferência de uma substância química de um nível trófico inferior para um superior, resultando em um fator, relacionando a quantidade daquela substância presente no nível trófico superior e a quantidade presente no nível trófico inferior.

## 1.2. O METAL COBRE

O cobre é um elemento-traço encontrado naturalmente no meio ambiente, e necessário em pequenas concentrações para os seres vivos, constituindo, portanto, um micronutriente (O'Kelley, 1974; Eysink *et al*, 1988; Wetzel, 1993 e Esteves, 1998). Segundo Eysink *et al* (1988), o cobre é essencial para os animais no processo de síntese da hemoglobina. Para as plantas, sua presença se faz necessária em várias enzimas para realização de funções vitais, além de exercer um importante papel na síntese da clorofila, e portanto no processo fotossintético (O'Kelley, 1974). Ainda segundo Esteves (1998), o cobre (assim como o ferro) faz parte de citocromos, na cadeia respiratória.

Algumas das atividades humanas responsáveis pela introdução de cobre nos ecossistemas aquáticos são: corrosão de tubos de cobre e de latão por águas ácidas, uso de algicidas e fungicidas usados na preservação da madeira, resíduos provenientes da indústria de mineração, fundição, galvanoplastia e refino (Alexandre & Szikszay, 1999). Óxidos e sulfatos de cobre são usados como pesticidas, fungicidas e algicidas (Eysink *et al*, 1988). O cobre está ainda presente nas principais minas de extração de outros metais, associados a estes, na forma de sulfetos, óxidos e carbonatos (EPA – apud Eysink *et al*, 1976).

O cobre é um micro-nutriente para plantas e animais, mas em concentrações pouco mais elevadas causa efeitos deletérios à biota (Esteves, 1998; Luoma, 1983; Stuijzand *et al*, 1999). Segundo Heath (1995),

vários metais como chumbo, mercúrio, cádmio, cromo, prata e cobre podem alterar, aumentando ou diminuindo, a atividade de muitas enzimas presentes em diversos órgãos de peixes, tais como cérebro, coração, fígado, rins, intestino, brânquias, estômago, dentre outros.

A ingestão de altas doses de cobre pode acarretar, no homem, irritação e corrosão da mucosa, problemas hepáticos, renais, depressão e irritação do sistema nervoso (Alexandre & Szikszay, 1999). Segundo Bennet & Plum (1997), o homem é capaz de eliminar o excesso de cobre através da bile. Entretanto, portadores da Doença de Wilson têm essa capacidade comprometida, e acumulam o metal no corpo progressivamente. Em estágio avançado, o cobre se acumula no cérebro, e são identificados sintomas neurológicos e psiquiátricos, dentre outros.

### **1.3. METAIS E ORGANISMOS AQUÁTICOS**

O estudo da acumulação de metais em organismos aquáticos vem do interesse de se conhecer o destino e os caminhos traçados pelos metais até o topo das cadeias tróficas. Muitos estudos já publicados (Giesy et al, 1983; Rainbow & White, 1989; Rainbow & Dallinger, 1991; Wren & Stephenson, 1991; Borgmann et al, 1993; Bat et al, 1998; Reinfelder, 1998; Rainbow, 2002) têm ressaltado a acumulação de metais em organismos aquáticos como conseqüência da poluição de corpos d'água. Estes apresentam como principais objetivos: (i) compreender o destino destes poluentes nos ecossistemas, (ii) identificar o efeito destes poluentes na dinâmica das

cadeias alimentares e (iii) avaliar o grau de alteração sofrido pelos ciclos biogeoquímicos.

A acumulação de metais em invertebrados aquáticos pode ser dividida em três fases: (1) ingestão do metal; (2) transporte, distribuição e seqüestro do metal dentro do corpo do animal; e (3) excreção do metal – que, em algumas espécies, é ausente. O inter-relacionamento destes três processos define a estratégia de acumulação de um determinado invertebrado (Rainbow & Dallinger, 1991).

Segundo Rainbow & Dallinger (1991), as estratégias de acumulação variam dentro de uma mesma espécie para diferentes metais, e entre diferentes espécies para o mesmo metal, até para táxons estreitamente aparentados. Estas estratégias apresentam um gradiente, desde uma forte acumulação líquida, passando por uma acumulação líquida fraca (regulação parcial) até a regulação completa. A acumulação líquida é o resultado do balanço entre a ingestão e a excreção, podendo ou não envolver a excreção do metal.

Animais considerados acumuladores para um determinado metal apresentam valores de ingestão maiores que os de excreção. Animais denominados reguladores são os que mantêm a concentração total de metal em seus corpos em um nível aproximadamente constante sob grandes variações de metal biodisponível no ambiente ao longo do tempo (Rainbow & White, 1989; Rainbow & Dallinger, 1991).



A acumulação de metais por organismos aquáticos pode ser influenciada por diversos fatores, tais como: qualidade da alimentação e disponibilidade de alimento (Gorbi et al, 2002; Rainbow & Dallinger, 1991), temperatura da água e comprimento da cadeia alimentar (Boudou & Ribeire, 1989), relação superfície-volume (Koivisto et al, 1992), tempo de exposição, concentração do metal na água (Borgmann et al, 1993), tamanho das presas contaminadas (Twiss et al, 1996), condições físico-químicas do ambiente, estágio fisiológico e de desenvolvimento do organismo (Rainbow & Dallinger, 1991), e estratégias de acumulação de metais particulares de cada espécie (Rainbow & White, 1989; Borgmann et al, 1993).

#### **1.4. O PAPEL DA MATÉRIA ORGÂNICA DISSOLVIDA (MOD)**

Dentre as condições físicas e químicas do ambiente citadas acima, está compreendida a matéria orgânica dissolvida, que é capaz de alterar a especiação de metais como mercúrio (Sjöblom et al, 2000), cobre e zinco (Wilson, 1978; Eriksen et al., 2001; Gundersen & Steinnes, 2003; Cao et al., 2004).

Muitos estudos (Giesy et al, 1983; Winner, 1984; Winner, 1985; Winner & Gauss, 1986; Wang, 1987; Oikari et al, 1992; Porta & Ronco, 1993; Ashley, 1996; Lores & Pennock, 1998; Kim et al., 1999; Ma *et al.*, 1999; Stuijzand et al, 1999; Lores & Pennock, 1999; Sjöblom et al, 2000;) indicam que as substâncias orgânicas denominadas substâncias húmicas (e suas frações) exercem influência sobre a especiação, biodisponibilidade e

toxicidade do metal cobre para os organismos aquáticos: elas podem também diminuir a biomagnificação de metais no zooplâncton, e assim, influenciar nas rotas e na dinâmica dos elementos-traço através das cadeias tróficas.

Segundo Rocha & Rosa (2003), apenas nos últimos trinta anos o interesse pelo estudo das substâncias húmicas aquáticas (SHA) aumentou, principalmente em razão da conscientização sobre a importância da qualidade química da água para consumo humano. Neste contexto, o entendimento das propriedades das SHA associadas ao transporte, labilidade e complexação de espécies metálicas no sistema aquático é relevante do ponto de vista ambiental.

Segundo Hatcher et al (1983), os compostos orgânicos naturais encontrados no solo ou nos sedimentos podem ser classificados tanto como húmicos quanto como não-húmicos. Os compostos húmicos são considerados como sendo o produto quase resistente à degradação durante o processo de decomposição da matéria vegetal terrestre e aquática. São substâncias orgânicas quimicamente complexas, com um alto grau de aromaticidade, que podem ter sua massa molecular variando de poucas centenas a milhares de Daltons. São compostos por ácido húmico, ácido fúlvico e humina. A diferença entre estes tipos está na solubilidade em ácidos ou álcalis. Os ácidos húmicos são solúveis em álcalis e insolúveis em ácidos ou água. Estruturalmente, os ácidos húmicos variam muito dependendo de sua origem. Uma grande diferença está na abundância de estruturas

aromáticas nos ácidos húmicos de origem terrestre, quando comparados com os encontrados em ambientes aquáticos. Hatcher et al – *apud* Ashley (1996) atribuem esta diferença ao fato de que os ácidos húmicos de origem terrestre são, na sua maioria, derivados de resíduos de lignina (material com alto teor de anéis aromáticos polifenólicos) dos vegetais superiores.

As moléculas de ácido fúlvico têm a propriedade de se associarem a íons metálicos, como cálcio, magnésio, cobre, ferro, cádmio, zinco, vanádio e níquel. Enquanto que cátions monovalentes, como sódio e potássio, formam ligações eletrostáticas fracas com grupos simples nas moléculas de ácido fúlvico, os íons metálicos divalentes (como o cobre, o cádmio e o zinco) podem se ligar a dois sítios adjacentes, formando um “anel” de complexação, que geralmente é muito mais forte do que o formado por apenas um sítio de ligação. Em valores intermediários de pH, as ligações metal-ácido fúlvico são favorecidas.

Saar & Weber (1982) destacam ainda a importância do estudo sobre as interações metal-ácido fúlvico: (1) a complexação de metais por AF modifica a biodisponibilidade e a conseqüente toxicidade destes metais para a biota; (2) o AF pode modificar a mobilidade geoquímica de íons metálicos, atuando como tampão; (3) o AF é capaz de mudar a habilidade dos tratamentos de água em remover os íons metálicos, aumentando a quantidade de metais removidos da água sob tratamento. É importante ressaltar que tais propriedades dos ácidos fúlvicos podem ser extrapoladas para as substâncias húmicas.

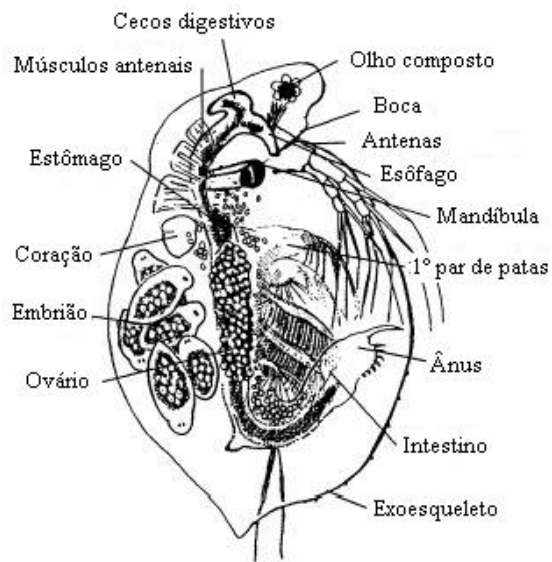
## 1.5. FORMAS TÓXICAS DE UM METAL

Está bem descrito na literatura que a toxicidade de um metal está mais relacionada com sua forma química (especiação) do que com a concentração total no meio aquático (Sunda & Guillard, 1976; Andrew *et al.*, 1977; Bresnahan *et al.*, 1978; Giesy *et al.*, 1983; Luoma, 1983; Wang, 1987; Meador, 1991; Allen & Hansen, 1996; Kim *et al.*, 1999; Ma *et al.*, 1999; Gagneten & Vila, 2001; Lombardi *et al.*, 2001). Estes autores demonstram que a toxicidade do metal cobre está diretamente relacionada com a concentração de íons livres de cobre no meio aquático, e não com a concentração total deste metal. Demonstram também que a matéria orgânica dissolvida, dentre elas as substâncias húmicas (e suas frações), reduzem a concentração de íons livres no meio, desta maneira atenuando a toxicidade do cobre para os organismos aquáticos.

Um dos parâmetros mais comuns para quantificação da toxicidade de um determinado íon metálico é a toxicidade aguda – LC50 – i.e., uma determinada concentração do metal capaz de matar 50% dos organismos expostos a este metal durante um certo tempo de exposição. Em investigações sobre toxicidade de metais, diversos autores não levam em conta a forma química do metal (Winner & Farrell, 1976; Adema, 1978; Koivisto *et al.*, 1992; Oikari *et al.*, 1992; Borgamnn *et al.*, 1993; Porta & Ronco *et al.*, 1993; Zou & Bu, 1994; Arambasic *et al.*, 1995; Koivisto & Ketola, 1995), considerando, desta maneira, que todas as formas químicas exercem

o mesmo efeito tóxico. Conseqüentemente, corre-se o risco de avaliar, de maneira equivocada, a toxicidade do metal estudado.

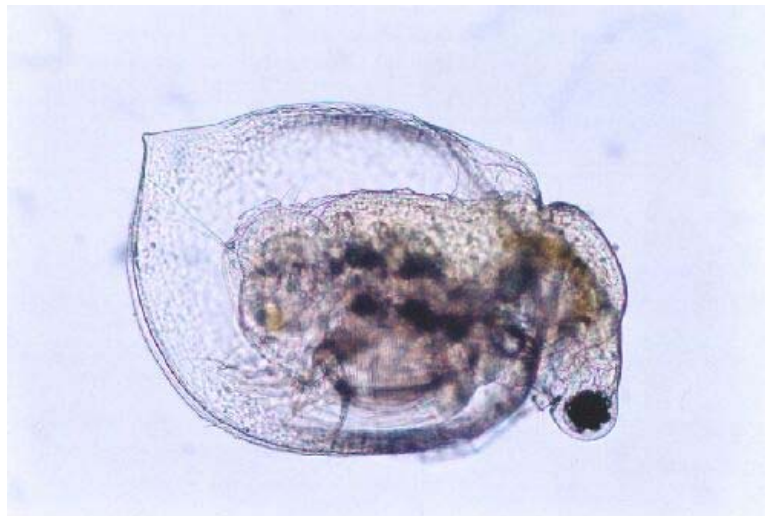
Neste contexto, o presente estudo pretende avaliar o papel das substâncias húmicas na especiação, toxicidade e acumulação do metal cobre para uma espécie de zooplâncton lacustre herbívoro comumente presente nos lagos e reservatórios brasileiros: a *Ceriodaphnia silvestrii* (FIGURAS 1 e 2).



**FIGURA 1.** Desenho esquemático de *Ceriodaphnia sp.* Retirado e modificado a partir de Munger et al. (1999).

## 1.6. O ZOOPLÂNCTON: UMA IMPORTANTE COMUNIDADE

Espécies zooplanctônicas são consideradas uma comunidade importante dentro dos ecossistemas aquáticos por conta de seu papel na cadeia trófica. Elas representam a via de passagem dos fluxos de matéria e energia dos produtores primários para os consumidores de topo de cadeia (Abrantes & Gonçalves, 2003). Logo, é de grande interesse o estudo dos mecanismos que afetam suas populações, com implicações em sua reprodução e sobrevivência.



**FIGURA 2.** Aspecto geral de uma fêmea de *Ceriodaphnia silvestrii*. Aumento de 100x.

Alguns dos fatores ambientais mais importantes que controlam o crescimento e a reprodução das espécies zooplanctônicas são temperatura, qualidade e quantidade de alimento, e a água de cultivo (Abrantes & Gonçalves, 2003; Vijverberg, 1989). Os efeitos destes fatores estão bem descritos na literatura para muitas espécies de Cladocera (Abrantes &

Gonçalves, 2003; Díaz-castro & Hardy, 1998; Hardy & Duncan, 1994; Infante & Litt, 1985; Lundstedt & Brett, 1991; Vijverberg, 1989). No entanto, sabe-se pouco sobre a bionomia de *Ceriodaphnia silvestrii*, uma espécie zooplanctônica comum em reservatórios neotropicais (Rietzler, 1998; Fonseca, 1991; Fonseca, 1998).

Pretendeu-se também, neste estudo, avaliar a influência das substâncias húmicas nas características bionômicas dessa espécie de cladóceros. Para tanto, foram acompanhados os ciclos de vida de animais cultivados em laboratório sob diferentes condições experimentais (qualidade do alimento, meio de cultivo, presença e ausência de substâncias húmicas) para fins comparativos. A contribuição com informações a respeito da biologia da espécie também foi tida com objetivo, já que instituições como a ABNT e CETESB pretendem substituir espécies exóticas atualmente utilizadas em ensaios ecotoxicológicos no Brasil por *C. silvestrii*, uma espécie nativa e comum em ambientes aquáticos brasileiros.

### **1.7. ORGANIZAÇÃO DA DISSERTAÇÃO**

Esta dissertação está dividida em capítulos, na forma de artigos científicos, os quais estão apresentados nas normas das revistas nas quais se pretende submetê-los para publicação.

O primeiro capítulo intitulado “Life history responses of *Ceriodaphnia silvestrii* Daday (Crustacea, Cladocera) to variation in food source, culture medium, hardness and presence of humic substances” trata da

caracterização da espécie de Cladocera *C. silvestrii* (Crustacea, Cladocera), quanto ao seu ciclo de vida em condições controladas em laboratório. Foram observados os efeitos de diversos fatores, tais como a água de cultivo, a qualidade do alimento e a presença de substâncias húmicas, nas características bionômicas desta espécie. Pretende-se submeter este manuscrito para publicação no periódico *Hydrobiologia* (normas em Anexo).

O segundo capítulo intitulado “The effects of humic substances on ionic copper acute toxicity and accumulation by *Ceriodaphnia silvestrii* (Crustacea, Cladocera)” trata da influência das substâncias húmicas na toxicidade aguda do metal cobre para a espécie de Cladocera *C. silvestrii*. Avalia, também, o papel das substâncias húmicas na bioacumulação do metal pela espécie estudada. Pretende-se submeter este trabalho para publicação no periódico *Freshwater Biology* (normas em Anexo).



## 2. OBJETIVOS

### OBJETIVOS PRINCIPAIS

1. Verificar a influência das substâncias húmicas em duas espécies do metal cobre, na sua toxicidade e bioacumulação em *C. silvestrii*.
2. Verificar uma possível relação entre a toxicidade aguda do cobre para *C. silvestrii* e a concentração de íons livres no meio aquático.
3. Obter informações sobre a bionomia da espécie zooplanctônica *C. silvestrii*, cultivada em diferentes condições laboratoriais, variando água de cultivo, alimento, dureza total, e presença e ausência de substâncias húmicas.

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Verificar qual a estratégia de bioacumulação do metal cobre adotada por *C. silvestrii*.
2. Verificar se há diferenças entre os valores de  $LC_{50}$  calculados baseando-se na concentração de cobre total e na de cobre livre.

3. Cultivar, em laboratório, espécies de cladóceros presentes no reservatório de Barra Bonita para a obtenção de organismos a serem utilizados nos experimentos do presente estudo.

4. Cultivar, em laboratório, microalgas planctônicas, a serem utilizadas como fonte alimentar para as espécies zooplanctônicas herbívoras cultivadas.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1. ESPÉCIE ZOOPLANCTÔNICA ESTUDADA**

A maioria das espécies pertencentes à ordem Cladocera é filtradora obrigatória, tendo, para isto, estruturas especializadas para a respiração e coleta de alimentos, apresentando um certo grau de seleção e rejeição de partículas (Arnold, 1971). Segundo El Moor-Loureiro (1997), a filtração da água em Cladocera ocorre da seguinte maneira: uma corrente contínua de água é criada através das valvas do animal pelas suas patas (de 4 a 6 pares, localizados ventralmente). As partículas de alimento presentes na água são retidas pelas cerdas das patas, e recolhidas em um sulco ventral mediano e misturadas à secreção de uma glândula que se abre na base do quarto par de patas. O alimento é, então, empurrado em direção à boca. Massas de secreção e alimento são trituradas pelas mandíbulas e, depois, ingeridas. O alimento é, na sua maior parte, constituído por algas, protozoários, detritos orgânicos e bactérias. A distância entre as cerdas presentes nas patas dos animais é que condiciona o tipo de alimento que é filtrado. Segundo Arnold (1971), o alimento pode ser rejeitado quando: (1) a quantidade coletada é maior do que a que pode ser ingerida; (2) quando o alimento é fisicamente inaceitável (e.g. colônias ou filamentos muito grandes); (3) quando o alimento é quimicamente inaceitável. Alguns tipos de alimentos podem passar pelo trato digestivo dos animais e não serem digeridos.

A espécie estudada no presente trabalho é *Ceriodaphnia silvestrii* (FIGURAS 1 a 3), da família Daphniidae. Alimenta-se principalmente de algas, bactérias e detritos orgânicos. Foi escolhida por ser uma espécie de fácil cultivo em laboratório (reprodução partenogenética e ciclo de vida curto), pelo fato de ser uma espécie de ocorrência comum na represa de Barra Bonita (Barra Bonita, SP), ser filtradora obrigatória, podendo estar sujeita às influências da matéria orgânica dissolvida (como as substâncias húmicas utilizadas no presente trabalho), e ser utilizada rotineiramente em testes de toxicidade no Brasil.



FIGURA 3. Detalhe do pós-abdômen de uma fêmea de *C. silvestrii*. Aumento de 200x.

Segundo El Moor-Loureiro (1997), *Ceriodaphnia silvestrii* é descrita pelas seguintes características: Forma da carapaça arredondada, com a margem ventral muito arqueada; projeção do ângulo posterior-dorsal muito desenvolvida. Sinus cervical profundo, cabeça anteriormente globosa. Olho grande, preenchendo quase toda a porção anterior da cabeça. Fórnices

projetados lateralmente, mas não formando uma ponta aguda. Antênula muito curta e inchada medianamente. Antena com dois tufo de espículas no último segmento do exopodito. Pós-abdómen um pouco estreitado distalmente, com 9-12 espinhos anais e delicados tufo de espículas laterais. Garra com pecten proximal de espículas finas. Fêmeas adultas medindo entre 0,86 e 0,88mm.

## 3.2. MANUTENÇÃO DAS CULTURAS DE *C. silvestrii*

### 3.2.1. Culturas-estoque

As culturas da espécie zooplanctônica estudada foram formadas a partir de exemplares coletados na represa de Barra Bonita, previamente triados e identificados. A identificação foi feita com auxílio de literatura especializada (Matsumura-Tundisi, 1983; El Moor-Loureiro, 1997). Os animais identificados como sendo da mesma espécie foram colocados juntos em cubas com capacidade de 2 a 5 litros, para evitar a formação de populações monoclonais.

Inicialmente, as culturas-estoque foram mantidas em água do próprio ambiente, filtrada em rede de 20µm de abertura de malha e autoclavada a 120°C por 30 minutos, para a retirada de qualquer outra fonte alimentar e morte de predadores. Gradualmente, a água de cultivo foi sendo substituída por água dos tanques da Área experimental do Departamento de Ecologia e Biologia Evolutiva (UFSCar), autoclavada a 120°C por 30 minutos, e finalmente por água reconstituída, segundo as normas da U.S. EPA (1991). A água das cubas das culturas-estoque foi trocada uma vez por semana.

A alimentação das culturas-estoque foi feita através do fornecimento de soluções unialgais de *Scenedesmus bijugus*, e complementada com o fornecimento de alimento composto de ração de peixe fermentada e fermento biológico, como descrito em Sipaúba-Tavares & Rocha (2001). A alimentação com as algas e a ração foi fornecida aos animais três vezes por

semana, numa concentração na ordem de  $10^5$  células.mL<sup>-1</sup> e de três a quatro gotas por cuba, respectivamente.

### **3.2.2. Cultivo de microalgas para alimentação de *C. silvestrii***

Para a alimentação dos cladóceros mantidos em laboratório, foram feitos cultivos unialgais da espécie *S. bijugus* em meio WC modificado por Lombardi & Vieira (2000), a partir de Guillard & Lorenzen (1972) (TABELA 1). A escolha da espécie algal foi determinada pela facilidade de cultivo e por ser considerado um alimento de boa qualidade (Vijverberg, 1989).

Para o cultivo de *S. bijugus*, 600 mL de meio de cultivo WC eram autoclavados a 120° C por 30 minutos, e inoculado com a alga após, pelo menos, 24 horas. As culturas unialgais foram mantidas em sala aclimatada em temperatura de 21° C ( $\pm 1^\circ\text{C}$ ). Após atingir a fase exponencial de crescimento, o meio contendo a cultura era centrifugado a 1800 RPM por 20 minutos e ressuspendido no mesmo meio de cultivo de *C. silvestrii*, previamente autoclavada a 120° C por 30 minutos.

O número de células algais foi contado com a ajuda de uma câmara de Neubauer, a fim de se determinar o volume de solução algal a ser fornecido aos cladóceros numa concentração da ordem de  $10^5$  células.mL<sup>-1</sup>. Até seu término, a solução algal foi mantida em geladeira por um período máximo de 15 dias.

*Chlorella lacustris*, uma das espécies de alga utilizada nos experimentos de caracterização bionômica de *C. silvestrii*, foi cultivada seguindo os mesmos métodos que foram utilizados para *S. bijugus*.

**TABELA 1.** Composição do meio WC, a partir de Guillard & Lorenzen, 1972, e modificado por Lombardi & Vieira (2000).

Composto	Concentração (mg L <sup>-1</sup> )	Concentração (10 <sup>-6</sup> M)
CaCl <sub>2</sub> . 2H <sub>2</sub> O	36,76	250
MgSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	36,97	150
NaHCO <sub>3</sub>	12,6	150
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	8,71	50
NaNO <sub>3</sub>	85,01	1000
Na <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub> . 9H <sub>2</sub> O	28,42	100
FeCl <sub>3</sub> . 6H <sub>2</sub> O	3,15	11,7
CuSO <sub>4</sub> . 5H <sub>2</sub> O	0,01	0,04
ZnSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	0,022	0,08
CoCl <sub>2</sub> . 6H <sub>2</sub> O	0,01	0,05
MnCl <sub>2</sub> . 4H <sub>2</sub> O	0,18	0,9
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> . 2H <sub>2</sub> O	0,006	0,03
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	1,0	16,0
<i>Vitaminas</i>		
Thiamina HCl	0,1	
Biotina	5 x 10 <sup>-4</sup>	
B <sub>12</sub>	5 x 10 <sup>-4</sup>	



### 3.3. CARACTERIZAÇÃO BIONÔMICA DE *C. silvestrii*

#### 3.3.1. Estudo bionômico de *Ceriodaphnia silvestrii*

O estudo do ciclo de vida de *Ceriodaphnia silvestrii* foi realizado em câmara incubadora, marca FANEM, modelo 347 CD, na temperatura de 25°C ( $\pm 1^\circ\text{C}$ ), com fotoperíodo de 12 horas claro: 12 horas escuro. Os animais foram cultivados individualmente em tubos de ensaio, com volume experimental de 50mL. A água contendo cada indivíduo foi trocada diariamente, pela manhã, e o tubo de ensaio enxaguado com água destilada. Alimento fresco era adicionado a cada manhã. Foram feitas duas observações diárias, a cada 12 horas. A água de cultivo usada foi água reconstituída, seguindo norma da U.S. EPA (U.S. EPA, 1991).

Para o início dos experimentos, foram separadas fêmeas ovadas de *C. silvestrii*. Periodicamente, as neonatas recém-eclodidas com até 12 horas de vida eram recolhidas e cada indivíduo colocado em um tubo de ensaio contendo água de cultivo. Assim, teve-se uma idéia aproximada da idade de cada indivíduo, com uma margem de erro de, no máximo, 6 horas.

As variáveis bionômicas observadas e suas definições seguem Bottrell (1975) e Vijverberg (1989):

- **Comprimento do corpo:** Medida tomada apenas após o aparecimento de uma exúvia. O comprimento total do corpo foi

tomado com a ajuda de uma lupa Leica, modelo MZ6, indo do topo da cabeça até a extremidade posterior da carapaça.

- **Período embrionário:** intervalo de tempo entre o aparecimento de um ovo na câmara incubadora e o nascimento de um neonato proveniente daquele ovo. (= duração de desenvolvimento do ovo/embrionário).
- **Fecundidade:** Número de ovos depositados na câmara incubadora em uma dada cria ou para uma dada fêmea.
- **Número de neonatas eclodidas:** Este valor por ser dado ou por cria ou por fêmea (considerando todo o seu período reprodutivo).
- **Porcentagem de eclosão:** Relação entre o número de neonatos eclodidos numa dada cria ou para uma dada fêmea e o número de ovos depositados na câmara incubadora numa dada cria ou para uma dada fêmea.
- **Idade primípara:** Idade em que o juvenil atinge a maturidade sexual, que se dá pela deposição dos primeiros ovos na câmara incubadora.
- **Número de estádios até a idade primípara:** Número de estádios (instares) decorridos até a deposição dos primeiros ovos na câmara incubadora (=instares da fase juvenil).
- **Número total de estádios:** Número de instares apresentados pelo indivíduo desde o momento de seu nascimento até sua morte.
- **Longevidade:** Intervalo de tempo decorrido desde seu nascimento até sua morte.

- **Intervalo na produção de ovos:** Intervalo de tempo entre duas deposições de ovos consecutivas na câmara incubadora de uma fêmea.

Outros parâmetros também foram observados, para posterior comparação entre os diferentes tratamentos, como p. ex. sobrevivência, número médio de neonatos por fêmea por instar, proporção de ovos não viáveis, e número médio de neonatos acumulados por fêmea.

Neonatos com até 12 horas de vida foram submetidos à quatro diferentes tratamentos: 1. (BBChI) água do ambiente natural autoclavada e filtrada através de rede de plâncton de 20µm de abertura de malha, com fornecimento de *Chlorella lacustris* como alimento; 2. (BBScen) água do ambiente natural autoclavada e filtrada através de rede de plâncton de 20µm de abertura de malha, com fornecimento de *S. bijugus* como alimento; 3. (AR) meio de cultivo artificial (água reconstituída mole) com fornecimento de *S. bijugus* como alimento; 4. (ARSH) meio de cultivo artificial (água reconstituída) com fornecimento de *S. bijugus* como alimento, mais substâncias húmicas (20mg L<sup>-1</sup>); e 5. (ARHard) meio de cultivo artificial (água reconstituída dura) com fornecimento de *S. bijugus* como alimento. A concentração de substâncias húmicas utilizada equivale a 10mg C L<sup>-1</sup>, concentração média encontrada no reservatório de Barra Bonita, SP (Gouvêa et al, em prep.).

### 3.3.2. Relação comprimento / peso de *Ceriodaphnia silvestrii*.

Paralelamente ao experimento bionômico, foi determinada a relação comprimento-peso para *C. silvestrii*. Para isso, foram utilizados indivíduos provenientes das culturas-estoque mantidas em laboratório. Para a determinação da relação comprimento/peso, foi feita a determinação do peso seco dos animais descrito na literatura (Bottrell et al, 1976; Masundire, 1994), como o método mais preciso e indicado para tais cálculos. Animais em três classes de tamanho foram medidos e pesados: neonatas com até 24 horas de vida, jovens e fêmeas adultas grandes, sem ovos. Para cada uma das categorias de tamanho, foram feitas pelo menos 3 réplicas. Em cada réplica, foram utilizados de 20 a 40 indivíduos de *C. silvestrii*. Após medição para determinação do comprimento (do topo da cabeça até a base do espinho caudal) com auxílio de uma lupa Leica modelo MZ6, os animais foram colocados em cadinhos de alumínio previamente secos em estufa a 65°C por 24 horas e pesados (P1) com auxílio de uma balança microanalítica Mettler Toledo, modelo UMT2 (legibilidade de 0,1µg). Os cadinhos contendo os animais foram colocados novamente em estufa a 65°C por pelo menos 24 horas, e pesados novamente (P2). A diferença entre P2 e P1 representa o peso total dos indivíduos.

Através destes dados, obteve-se uma curva do tipo potência, do tipo

$$W = a.L^b, \text{ onde:}$$

$W$  é o peso seco do animal (em  $\mu\text{g}$ ),  $a$  e  $b$  são constantes, e  $L$  é o comprimento do animal (em mm). Através de regressão, chega-se a uma relação peso-comprimento para *C. silvestrii*. As regressões foram realizadas com a utilização do software Origin 6.0.

### 3.3.3. Determinação da taxa instantânea de crescimento da população ( $r$ ).

A taxa instantânea de crescimento populacional ( $r$ ) pode ser considerada um bom parâmetro para se ter uma estimativa dos diferentes efeitos dos tratamentos realizados no estudo bionômico sobre *C. silvestrii*. Ele pode indicar a capacidade de uma dada população de aumentar seu tamanho ao longo do tempo (Ricklefs, 1990), e é calculado utilizando-se a seguinte fórmula:

$$\sum_{i=1}^n P_i \cdot m_i \cdot e^{-r \cdot i} = 1,$$

onde  $e$  é a base do logaritmo natural;  $P_i$  é a proporção de fêmeas vivas na idade  $i$ ;  $m_i$  é o número médio de neonatos por fêmea na idade  $i$ ; e  $i$  é dado em instars (1...n).

### **3.4. INFLUÊNCIA DAS SUBSTÂNCIAS HÚMICAS NA TOXICIDADE E BIOACUMULAÇÃO DO COBRE EM *C. silvestrii*.**

#### **3.4.1. Testes de toxicidade**

Para verificar a influência das substâncias húmicas na toxicidade e bioacumulação de cobre em *C. silvestrii*, foi utilizada a concentração de 20 mg L<sup>-1</sup> de SH, e as seguintes concentrações de cobre (M): 10<sup>-8</sup>; 1,6x10<sup>-8</sup>; 4x10<sup>-8</sup>; 10<sup>-7</sup>; 10<sup>-6</sup>; 2x10<sup>-6</sup>; 5x10<sup>-6</sup> e 10<sup>-5</sup>. A água utilizada no experimento é a mesma utilizada no cultivo das culturas-estoque (água reconstituída, segundo as normas da USEPA, 1991). As soluções contendo o metal e as substâncias húmicas eram feitas duas horas antes do início do período de incubação dos animais. Todos os experimentos foram feitos em três réplicas.

Vinte indivíduos adultos de tamanhos semelhantes foram medidos (quanto ao comprimento) e deixados em um frasco com água reconstituída por aproximadamente 1 hora sem alimento, para que o trato digestivo fosse esvaziado. Os animais foram, então, colocados em frascos de policarbonato previamente lavados com HNO<sub>3</sub> 1M, contendo 60mL de solução de cobre com ou sem adição de substâncias húmicas. Os frascos contendo os animais foram, então, incubados em sala com temperatura e fotoperíodo controlados, na temperatura de 25°C (±1°C), com fotoperíodo de 12 horas claro: 12 horas escuro, durante 24 horas. Os frascos de incubação foram mantidos tampados para evitar perdas por evaporação. Depois de decorrido este período de tempo, os animais vivos e mortos foram separados e contados, e

colocados em filtros de acetato-celulose previamente lavados em  $\text{HNO}_3$  0,1M por 24 horas, secos e pesados em balança microanalítica Mettler Toledo UMT2 (legibilidade de 0,1  $\mu\text{g}$ ). Os filtros, então, foram deixados em estufa a  $60^\circ\text{C}$  por 24 horas, e pesados novamente para determinação do peso seco.

#### **3.4.2. Determinação dos valores de $\text{LC}_{50}$ .**

A partir dos dados de mortalidade dos indivíduos de *C. silvestrii* expostos às diferentes concentrações de cobre (com e sem a adição de substâncias húmicas), foram feitas determinações dos valores de  $\text{LC}_{50}$  baseadas tanto nos valores de cobre nominal, quanto nos valores de cobre livre obtidos através das leituras do ISE. Para tal, utilizou-se o método “Trimmed Spearman-Kärber”, descrito por Hamilton (1977).

#### **3.4.3. Determinação de cobre livre na água.**

Para as determinações de cobre livre, as amostras preparadas para leitura tiveram sua força iônica ajustada para 0,1M através da adição de  $\text{NaNO}_3$  1M, e o pH ajustado para 6,8 através da adição de tampão PIPES. As leituras foram realizadas antes e depois do período de incubação dos animais, e cada amostra tinha o volume final de 60mL, sendo que 50mL era constituída por uma alíquota da água na qual os organismos foram incubados.

Saar & Weber (1982) citam alguns fatores que podem modificar os resultados obtidos em experimentos com ácidos fúlvicos (AF): a fonte da qual

se extraiu o AF, o método de isolamento, a concentração utilizada, a força iônica, a temperatura, o pH, métodos de análise dos complexos formados e métodos de manipulação de dados. Portanto, todas estas variáveis do sistema devem estar controladas o máximo possível durante os experimentos, para se produzir resultados comparáveis com a literatura e que possam ser interpretados corretamente.

#### 3.4.3.1. Calibração do ISE.

Geralmente, o eletrodo sensível a cobre é capaz de detectar concentrações de cobre livre até cerca de  $10^{-7}$  M ( $pCu = 7$ ). Entretanto, é possível detectar concentrações de até  $10^{-11}$  M ( $pCu = 11$ ) (Jardim *et al.*, 1986). A metodologia para calibração do ISE encontra-se descrita em Lombardi & Vieira (2000). A FIGURA 4 mostra uma curva típica de calibração deste equipamento. As calibrações eram realizadas diariamente, no início do dia, com padrões de cobre ( $CuCl_2$ , Merck) preparados também diariamente.

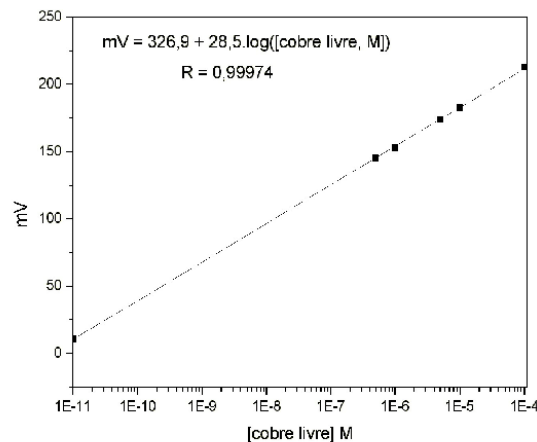


FIGURA 4. Típica curva de calibração do ISE. R = 0,99974.



#### 3.4.4. Determinação de cobre total nos animais.

A digestão dos animais, para análise de cobre total, foi feita através da adição de 200 $\mu$ L de HNO<sub>3</sub> ultra-puro (J.T. Baker) a cada amostra, a qual foi colocada em um frasco de Teflon (com tampa de rosca) previamente lavado com HNO<sub>3</sub> (15,76M). Após a adição de HNO<sub>3</sub>, os frascos foram levados à estufa a 90°C por 48 horas. A leitura das amostras foi realizada em um polarógrafo, marca EG&G Instruments, modelo 303A SMDE, através da técnica DPASV (Polarografia anódica de pulso diferencial).

Para as determinações de cobre no polarógrafo, o pH das amostras foi ajustado para 2,0 e utilizado tampão inorgânico KCl/HCl (0,09/0,01M), que também foi empregado como eletrólito de suporte, fornecendo uma força iônica de 0,2M. Todas as determinações foram feitas através do método de “adição de padrão”. Dessa maneira, consegue-se minimizar problemas de variação entre amostras e os erros experimentais são menores que os do procedimento clássico, do uso de curvas de calibração. O potencial inicial foi de -0,7V e o final de -0,09V. Altura do pulso de 50mV. Os valores, obtidos em intensidade de corrente (nA), foram transformados para concentração molar através da curva de calibração das adições.

A partir das leituras de metal total presente nos animais, foi calculada a quantidade de metal acumulado por unidade de peso seco de *C. silvestrii* ( $\mu$ gCu  $\mu$ gPS<sup>-1</sup>).

#### **3.4.5. Determinação de cobre total na água.**

Para a determinação de metal total presente na água, uma alíquota inicial (antes da incubação) foi retirada e fixada com  $\text{HNO}_3$  (concentração final de 2M), para posterior leitura em um polarógrafo, marca EG&G Instruments, modelo 303A SMDE. Até o momento das leituras, as amostras foram mantidas refrigeradas. O tratamento dado às amostras para leitura no polarógrafo é semelhante ao dado às amostras de cobre total nos animais.

**LIFE HISTORY RESPONSES OF *CERIODAPHNIA SILVESTRII*  
DADAY (CRUSTACEA, CLADOCERA) TO VARIATION IN  
FOOD SOURCE, CULTURE MEDIUM, HARDNESS AND  
PRESENCE OF HUMIC SUBSTANCES.**

MARIA ALICE P. F. DOS SANTOS<sup>1,2</sup>, MARIA DA GRAÇA GAMA  
MELÃO<sup>1,2,3</sup>, ANA TERESA LOMBARDI<sup>4</sup>

1Universidade Federal de São Carlos, Departamento de Hidrobiologia, Laboratório de Plâncton, P.O. Box 676, Zip code 13.565-905 - São Carlos, SP - Brazil. [maria.alice.santos@globo.com](mailto:maria.alice.santos@globo.com).

2 Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais.

3 [dmgm@power.ufscar.br](mailto:dmgm@power.ufscar.br)

4 Universidade Federal do Paraná, Centro de Estudos do Mar. P.O. Box 50.002, Zip code 83255-000 - Pontal do Paraná, PR - Brazil. [lombardi@cem.ufpr.br](mailto:lombardi@cem.ufpr.br)

**Keywords:** Cladocera; *Ceriodaphnia silvestrii*; Life history; development; reproduction.

**Abstract**

Effects of different food sources and culture medium on life history traits of *Ceriodaphnia silvestrii* were studied under controlled conditions. Animals were submitted to five different treatments: (1) autoclaved natural water filtered through plankton net of 20 $\mu$ m mesh size, supplied with *Chlorella lacustris* as food source; (2) autoclaved natural water filtered through plankton net of 20 $\mu$ m mesh size, supplied with *Scenedesmus bijugus*; (3) soft reconstituted water supplied with *S. bijugus*; (4) soft reconstituted water supplied with *S. bijugus* plus humic substances (20mg L<sup>-1</sup>); and (5) hard reconstituted water supplied with *S. bijugus*. Observations were performed at 12 hours intervals from organism birth until its natural death. All treatments were kept in a 25 $\pm$ 1 °C temperature. Instantaneous rate of population increase (r) was calculated for all treatments. Body length-dry weight relationship was also established. Results showed longer longevity in *C. lacustris* treatment, and better fecundity on treatment with natural water and *S. bijugus*. In the treatment with artificial medium, fecundity and growing parameters were lower than in natural water treatment. Humic substances addition resulted in greater fecundity and survival values. Increasing in water hardness did not result in better suitability of reconstituted water to *C. silvestrii*.

## Introduction

Zooplankton has an important role in trophic chains of aquatic ecosystems, significantly contributing to matter and energy flux from the primary producers to the top consumers (Abrantes & Gonçalves, 2003). Particularly cladoceran zooplankters, as efficient filters, take a relevant part on this flux. As generalist herbivores, these animals do not feed only on algae, but also on bacteria, organic detritus and dissolved organic matter (Arnold, 1971; Sarnelle, 1986; Vijverberg, 1989; Boersma & Vijverberg, 1996; Abrantes & Gonçalves, 2003). Besides the importance of cladoceran species on aquatic food webs, they are also commonly used as test organisms in aquatic toxicology in order to evaluate the effects of a wide range of chemicals on aquatic biota (Winner et al., 1977; Adema, 1978; Oikari et al, 1992; Koivisto et al, 1992; Arambasic, 1995; Koivisto & Ketola, 1995; Versteeg et al, 1997; Heijerick et al, 2003). For these reasons, it is of great interest to study mechanisms affecting its population dynamics, energy allocation strategies, reproduction and survival.

Some of the most important environment factors controlling zooplankton growing and reproduction are temperature, food quantity and quality, and suitability of the physical environment (Vijverberg, 1989; Fonseca, 1998). Effects of these factors are well known in the literature. Temperature is responsible for decreasing development time, instar intervals, time between clutches, and longevity (Rietzler, 1998). It was verified by Vanni & Lampert (1992) that *Daphnia* species appears to react similarly to resource

depression, regardless if this arises from low food quantity or low food quality. The observed effects of relatively lower quality and quantity of food on cladoceran species generally are delayed age at maturity, decreased size at maturity, decreased production of eggs and neonates, and also reduced intrinsic rate of population increase (Hall, 1964; Infante & Litt, 1985; Vanni & Lampert, 1992; Boersma & Vijverberg, 1996; Amarasinghe et al., 1997; Díaz-Castro & Hardy, 1998; Rose et al, 2000; Abrantes & Gonçalves, 2003). Ryther (1954) described toxicity and inhibitory effects of *Chlorella* species on filtering rates, survival, growth and reproduction of *Daphnia magna*.

In a classical study dealing with cladoceran life histories, Lynch (1980) pointed out life history strategies evolved by species of different sizes to avoid two main kinds of predators: invertebrates and vertebrates. Certain large species (e.g. large *Daphnia*) are able to grow to a size at which they are relatively invulnerable to invertebrate predators. The juveniles of these species maximize energy input into early growth and postpone reproduction until they have attained such a size. Such a strategy is of little value to the small-sized species that remain vulnerable to invertebrates throughout their lives. Instead, small species minimize the impact of invertebrate predation by initiating reproduction at an early age. Following the onset of reproduction they continue to grow, and thereby reduce predation by invertebrates. On the other hand, their continued growth simultaneously increases their exposure to vertebrate predators in their later instars.

Food quality and/or quantity can alter life history strategies of cladoceran species, leading to a greater vulnerability of some size classes to predators (Lynch, 1980; Vanni & Lampert, 1992). These factors can also affect reproduction patterns. Schwartz & Ballinger (1980) demonstrated that low food quality may result in a longer longevity and lower fecundity, allowing that individuals remain in the environment longer to have eventually the opportunity to reproduce later when condition become more favorable. This flexible reproductive pattern may be an adaptation to a variable environment imposed by fluctuations of dominant algal species presenting different food quality characteristics. (Schwartz & Ballinger, *op. cit.*).

It can be observed that poor results due to poor culture medium for cladocerans are very similar to those obtained from low quality food fed cultures (see Girling & Garforth, 1989 and Abrantes & Gonçalves, 2003 for culture medium effects, and Schwartz & Ballinger, 1980 and Vanni & Lampert, 1992 for food quality effects).

However, there is little information about environment factors influence on life history traits of *Ceriodaphnia silvestrii*, a common neotropical cladoceran species (El Moor-Loureiro, 1997; Joly & Bicudo, 1999). Fonseca (1991) studied life history traits of *C. silvestrii* at laboratory cultures, regarding some selected growing and reproduction parameters. Rietzler (1998) evaluated temperature effects on development time, reproduction and survival of *C. silvestrii* reared in natural water fed natural seston.

Moreover, *C. silvestrii* is currently being tested to become a tropical standardized species for ecotoxicological bioassays by Brazilian pollution monitoring institutions, CETESB, intending to substitute foreign species such as *Daphnia similis* and *Ceriodaphnia dubia* in ecotoxicological studies.

This paper evaluates the effects of culture medium, food quality, and the presence of natural dissolved organic matter (humic substances) on some selected life history traits of *C. silvestrii*, such as age and size at first reproduction, clutch size, fecundity, longevity, maximum body size, among others. The kind of DOC tested in this study was humic substances (IHSS Suwanee River Humic Substances). It was also obtained the body length-dry weight relationship of *C. silvestrii*, and its intrinsic rate of population increase ( $r$ ).



## Material and Methods

*C. silvestrii* neonates were harvested as soon as they were born from females cultured in laboratory controlled conditions. Each neonate was measured by a micrometer eyepiece fitted to a Leica MZ6 optical microscope, and individually placed in test tubes vessels containing 50mL of water. The animals were maintained at a temperature of  $25 \pm 1$  °C, with a light/dark regime of 12/12h. Algae were supplied as food source in a concentration of  $10^5$  cells mL<sup>-1</sup>. Daily, the medium was replaced by a fresh one, containing fresh food. The animals were observed every 12 hours since its birth until natural death, except for the treatment with humic substances, which was carried out for a period of 15 days. Stock cultures of *C. silvestrii* were maintained in the same experimental conditions for acclimation to each treatment.

Algal species used as cladocerans food source in this study (*Scenedesmus bijugus* and *Chlorella lacustris*) were cultured in WC medium (Guillard & Lorenzen, 1972), modified by Lombardi & Vieira (2000). Algal cultures were maintained in laboratory controlled conditions, under a light:dark regime of 12:12h and at  $25 \pm 1$ °C.

Growing and reproduction parameters of *C. silvestrii* were daily recorded during the time of experiment, and were defined based on Vijverberg (1989) and Bottrell (1975). Life history parameters were: body length, age at primipara, size at primipara, number of instars, instar of primipara, longevity, number of eggs per female, number of neonates per

female, percentage of eclosion, embryonic period, and time between clutches.

Animals were submitted to five different treatments with at least 9 replicates for each treatment: (BBChl) autoclaved natural water filtered through plankton net of 20 $\mu$ m mesh size, supplied with *Chlorella lacustris* (12 replicates); (BBScen) autoclaved natural water filtered through plankton net of 20 $\mu$ m mesh size, supplied with *Scenedesmus bijugus* (15 replicates); (AR) soft reconstituted water supplied with *S. bijugus* (17 replicates); (ARSH) soft reconstituted water supplied with *S. bijugus* plus humic substances in a concentration of 20mg L<sup>-1</sup> (9 replicates); and (ARHard) hard reconstituted water supplied with *S. bijugus* (16 replicates). For the last treatment, it was used IHSS Suwannee River Humic Substances (7.0% ash, 52.47% C, 4.19% H, 42.69% O, 1.10% N, 0.65% S, and 0.02% P).

Artificial medium used was U.S. EPA reconstituted soft fresh water (U.S. EPA, 1991), with hardness as 44.0mg CaCO<sub>3</sub> L<sup>-1</sup> and hard water, with hardness as 150.0mg CaCO<sub>3</sub> L<sup>-1</sup>. Natural water and animals which initiated stock cultures were collected at Barra Bonita reservoir (22° 29' S e 48° 34' W, Barra Bonita, São Paulo state, Brazil).

Differences among the five treatments were analysed with one-way ANOVA followed by the Tukey multiple comparison test when parameters were parametric and with Kruskal-Wallis (non-parametric ANOVA) followed by Dunn's multiple comparison test when they are not (Zar, 1999).

To find out body length-dry weight relationship for *C. silvestrii*, 20-40 non-preserved individuals of similar sizes from stock cultures were harvested, measured by a micrometer eyepiece fitted to a Leica MZ6 microscope, and placed inside aluminum “boats”, previously dried (60°C for 24 hours), and weighed on a Mettler Toledo UMT2 microbalance (legibility of 0.1 µg). Three size classes were chosen: neonates up to 24 hours of age; juveniles; and adult females (without eggs). There were at least three replicates for each size class. This method is similar to those described in Bottrell et al. (1976) and Mansudire (1994).

Mean dry weights and body length measurements were used to obtain length-weight relationship, as follow:

$$W = a.L^b, \text{ where}$$

$W$  is dry weight (µg),  $L$  is body length (mm), ‘ $a$ ’ and ‘ $b$ ’ are constants. Regression equation was derived using Origin 6.0™ software.

The instantaneous rate of population increase ( $r$ ) was used to estimate the effects that different treatments had on daphnids capacity to increase in numbers. Rate of population increase ( $r$ ) was calculated based on Ricklefs (1990) by the equation:

$$\sum_{i=1}^n P_i.m_i.e^{-r.i} = 1, \text{ where}$$

$e$  is the base of the natural logarithm;  $P_i$  is the proportion of females survivors at age  $i$ ;  $m_i$  is the mean number of neonates per female at age  $i$ ; and  $i$  is given in instars (1...n).

## Results

Development, growing and reproduction parameters of *C. silvestrii* were significantly affected by the five different treatments (as shown in Table 1). Animals reared in the BBScen treatment produced eggs before any other (mean of 2.63 days), followed by ARSH (2.89 days), AR (3.09 days), ARHARD (3.21 days) and BBChI (4.21 days) (as shown in Table 2).

BBScen treatment showed the highest value for mean neonates female<sup>-1</sup> (see Fig. 1). During all life cycle, females of this treatment produced the highest mean number of neonates, 107.07 (as shown in Table 2). The lowest mean number of neonates per female was in the AR treatment, with just 7.41 neonates. BBChI and BBScen showed the highest values for eclosion percentage, which were very similar (89.30% and 85.65%, respectively). ARHARD had an eclosion of 78.06%, followed by ARSH, with 74.42%, and AR treatment, with 52.92% (as shown in Table 2).

Mean body lengths per instar is given in Figure 2. BBScen treatment showed the greater body length and faster growth. Animals reared in BBChI grew more slowly, and showed the greatest mean longevity (36.0 days), followed by BBScen (28.8 days) (as shown in Table 2). Mean number of molts of these two treatments showed similar values: 18.3 for BBScen and 23.0 for BBChI. BBChI treatment was responsible for the greatest survival, and AR treatment for the lowest (see Fig. 3). The maximum mean body length registered was in BBScen treatment (1.02 mm), and lowest in AR and ARHARD treatments (0.74 and 0.75mm, respectively) (as shown in Table 2).

Food source did not result in statistically significant differences between BBScen and BBChl treatment in relation to time between clutches: 1.66 and 1.64 days, respectively (as shown in Table 2). AR treatment showed a slightly longer time (1.90 days).

Figure 4 illustrates the influence of the five tested treatments on proportion of aborted eggs by females of *C. silvestrii*. Females submitted to AR and ARSH treatments had faster increasing of proportion of aborted eggs early in their lives. Females from BBScen and BBChl had a similar lower proportion up to old age, when just before senescence and death they had an increasing of aborted eggs. The increasing in hardness postponed high proportion of aborted eggs.

Figure 5 illustrates the influence of environmental conditions on fecundity parameters, such as accumulated number of neonates female<sup>-1</sup>. BBScen treatment showed better values of neonates born per female, followed by BBChl.

Adult females of *C. silvestrii* vary in mean body length from 0.719 to 0.753mm and in mean individual dry weight from 4.81 to 5.85 $\mu$ g. The range of similar measurements for other size classes is also given in Table 3. The length-weight regression equation and plots of dry weight against body length are shown in Figure 6.

Rate of population increase ( $r$ ) values calculated to the five different treatments were: 0.78 d<sup>-1</sup> for AR treatment, 0.68 d<sup>-1</sup> for BBScen, 0.62 d<sup>-1</sup> for ARSH, 0.60 d<sup>-1</sup> for ARHARD, and 0.53 d<sup>-1</sup> for BBChl.

### **Effects of the presence of humic substances**

Between the selected life history parameters which were statistically analyzed, just embryonic period and mean body length were significantly different between AR and ARSH treatments (see Tab. 1). Other parameters such as age at first reproduction, size at first reproduction and instar of primipara showed statistically similar values. Even so, it is noteworthy that ARSH treatment showed greater values of eggs and neonates female<sup>-1</sup> (as shown in Table 2).

### **Effects of food quality**

Between BBScen and BBChl treatments, which the only difference was the algae supplied as food, some parameters showed significant differences. Females fed *S. bijugus* (BBScen) had its first reproduction at an early age and at an early instar, showed a greater size at primipara and mean body length (as shown in Table 2). Fecundity parameters were affected by food quality, but statistical analysis did not show significant differences (as shown in Table 1).

### **Effects of culture medium**

Culture medium comparisons produced the most pronounceable differences on both growing and reproduction parameters of *C. slivestrii* submitted to BBScen and AR treatments (as shown in Table 2). All parameters showed statistically significant differences (as shown in Table 1):

females of BBScen treatment reproduced at an early age and instar, had a greater size at primipara and mean body length, had greater longevity, production of eggs and neonates female<sup>-1</sup>, eclosion percentage, number of instars, and had lower time between clutches and embryonic period in comparison to females of AR treatment.

### **Effects of hardness**

The increasing in water hardness produced statistically significant differences on size at primipara (0.66mm and 0.56mm ), embryonic period (1.73d and 1.54d), and time between clutches (1.90d and 1.65d) for females of *C. silvestrii* submitted to AR and ARHARD treatments, respectively (see Tab. 1 and Tab. 2). All other observed parameters did not show significant differences.



## Discussion

In all treatments, as described by Bottrell (1975) for eight cladoceran species, adult females of *C. silvestrii* passed through the following cycle of events: development of eggs and release of fully developed neonates from the brood chamber; molting accompanied by an increase in body size; and release of a new set of eggs from the ovaries into the brood chamber. Moreover, the duration of adult instars was very similar to time between clutches and embryonic period.

It is well established that some species of *Chlorella* can liberate toxins in the water, thus altering growing and reproduction of cladocerans (Ryther, 1954; McMahon & Rigler, 1965; Infante & Litt, 1985). Greater longevity and lower fecundity are some of the responses in reaction to the presence of toxic substances in the water, as it can be seen in the BBChl treatment in comparison with BBScen - a treatment with a considered high quality food (Vijverberg, 1989). The relatively high quality *Scenedesmus bijugus* permitted to animals to have more eggs per clutch, more neonates per clutch, greater body length, sooner primipara, and a greater size at first reproduction (as shown in Table 2). Lower longevity is adopted in favor of a greater reproduction when organisms are fed on high quality food (Vijverberg, 1989). Other authors obtained similar results when feeding cladoceran species with *Chlorella*. Lundstedt & Brett (1991) concluded that *Scenedesmus acutus* is a higher quality food than *Chlorella homosphaera* to *Daphnia longispina*, *Bosmina longispina* and *Chydorus sphaericus*. Infante & Litt (1985) obtained

poor growth and reproduction results culturing *Daphnia pulicaria* and *Daphnia thorata* with *Chlorella sp.* These poor results are attributed to inhibitory effects and decreasing of filtering rates caused by *Chlorella* toxins (Ryther, 1954; McMahon & Rigler, 1965; Infante & Litt, 1985).

Two patterns of reproduction became apparent from food quality experiment in this study. The first one, early maturity with high fecundity and shorter longevity was found in the *C. silvestrii* fed *S. bijugus*. In the *C. silvestrii* fed *Chlorella lacustris*, reproductive maturity was delayed and brood size was smaller, but a longer longevity was observed. Thus, *C. silvestrii* in a rich environment would be able to take advantage of high quality sources available. In a less favorable environment (lower quality food), *C. silvestrii* cannot reproduce at the same rate, but its life is lengthened perhaps due to decreased reproductive stress. Similar results were found by Schwartz & Ballinger (1980) to *Daphnia pulex* fed on *Pediastrum duplex* (relatively high quality) and *Melosira ambigua* (relatively low quality), and by Vanni & Lampert (1992) to *Daphnia galeata* fed on *Scenedesmus acutus* (relatively high quality) and *Oocystis lacustris* (relatively low quality).

The present results are in accordance with life history strategies described by Lynch (1980) for small-sized cladoceran species: They initiate reproduction at an early age, and continue to grow until later instars simultaneously to reproduction.

The addition of humic substances in reconstituted water (ARSH treatment) resulted in better values of reproduction and survivorship, as

neonates per clutch, mean longevity, survival, number of eggs per female during all its life, percentage of eclosion, and body length (as shown in Table 2), in comparison with AR treatment. Perhaps any addition of dissolved organic matter would be sufficient to obtain better growing and reproduction results of *C. silvestrii*, since dissolved organic matter can also be utilized as food source for cladocerans (Arnold, 1971; Vijverberg, 1989; Boersma & Vijverberg, 1996). This result could also be explained by an addition of nutrients (7.0% ash present in humic substances samples) in the synthetic medium, or the ability of humic substances of buffering some potential toxins (Girling & Garforth, 1989). Salonen & Hammar (1986) demonstrated the importance of dissolved organic matter (DOM) in the nutrition of zooplankton in highly humic lakes. They showed that several cladocerans species are able to utilize allochthonous organic matter as food source, either directly or via other organisms (e.g., bacteria). They obtained good growth and reproduction results for planktonic crustaceans in the absence of photosynthetic production. Although allochthonous DOM is generally considered refractory or of little value as an energy source, it is a composition of numerous compounds. Since the concentration of allochthonous DOM is very high in some lakes, even a small biologically available proportion might be quantitatively important as a source of carbon for food webs (Salonen & Hammar, *op. cit.*).

But maybe the major differences revealed in this study were between BBSen and AR treatments. Reconstituted water is less adequate to the

culturing of this cladoceran species, as it is shown in all observed life history parameters.

Abrantes & Gonçalves (2003) found similar results when culturing *Ceriodaphnia pulchella* both in natural and synthetic medium. *C. pulchella* reared in ASTM hard water fed on *Selenastrum capricornutum* had lower mean body length and grew more slowly. Moreover, animals delayed to reach the first reproduction and showed the smallest size at first reproduction. Girling & Garforth (1989) tested the influence on variations in culture medium on the survival and reproduction of *Daphnia magna*. These authors compared EPA reconstituted water with filtered river water to *D. magna* during 28 days. They registered a greater number of neonates per female and survival rate on river water treatment. When blends of both waters were tested, better results for these two parameters were obtained when there was more percentage of natural water (1, 5, 10, 50 and 100%). Vijverberg (1989) also pointed out that artificial waters prepared using distilled water can give poor culture results.

However, there are many arguments for the use of a synthetic medium for culture zooplankton at laboratory-controlled conditions: the most important is that a synthetic medium has a known and reproducible composition. This cannot be guaranteed if natural waters (surface-, spring-, well, tap-water) are used for zooplankton culturing. Each laboratory has its own natural water, which further complicates the interpretation of results. Moreover, a synthetic medium is more certainly free from pesticides, pollutants and dissolved

organic matter than most of natural waters, which can be undesirable to the purposes of zooplankton cultures.

Increases in water hardness did not result in significant differences on growing and reproduction parameters (as shown in Table 1), among AR and ARHARD treatments. Fonseca (1998) observed that *C. silvestrii* showed better survival and fecundity reared in soft water ( $4.0 \text{ mg CaCO}_3 \text{ L}^{-1}$ ) than in hard water ( $143.0 \text{ mg CaCO}_3 \text{ L}^{-1}$ ). Lewis & Maki (1981) studied the effects of water hardness on productivity of *Daphnia magna*. There were no significant differences in fecundity and survival when soft water ( $50.0 \text{ mg CaCO}_3 \text{ L}^{-1}$ ) and hard water ( $125.0 \text{ mg CaCO}_3 \text{ L}^{-1}$ ) were compared. But when harder waters were tested ( $225.0$  and  $350.0 \text{ mg CaCO}_3 \text{ L}^{-1}$ ), it was observed significant differences in fecundity, survival, age at primipara and mean brood size among treatments. In any case were observed significant effects on mean number of generations nor on adult survival. Treatments tested in the present study suggest that greater water hardness could not result in better reproduction and growth to *C. silvestrii* reared in laboratory cultures, nor in an improvement of the suitability of U.S. EPA (2002) reconstituted water to this cladoceran species.

Females reared in BBScen treatment showed low proportion of aborted eggs until its senescence and natural death, as well as females from BBChI treatment (see Fig. 4). In spite of a longer longevity, which delayed the increasing aborted eggs rate of BBChI females by some instars, this parameter was similar to both treatments. AR females showed the worst

curve, which was attenuated by the presence of humic substances (ARSH). Vijverberg (1989) affirms this is a typical reproductive behavior of Cladocera, which generally produce large broods up to old age, and before senescence and death there may be a short period with smaller broods and a high proportion of aborted eggs. Such phenomena can be observed also in Figure 1.

Length-weight regression equation is in agreement with other studies, which establish this relationship between body length and dry weight (Dumont et al., 1975; Bottrell et al., 1976; Persson and Ekbohm, 1980; Vijverberg, 1989). As expected,  $b$  constant varied near 3.00 (2.52 in this study), indicating this proportion between body length and dry weight to *C. silvestrii*. Dumont et al. (1975) reported very similar results for *Ceriodaphnia quadrangula* ( $W = 1.7 \times L^{2.26}$ ) and *Ceriodaphnia reticulata* ( $W = 5.91 \times L^{2.02}$ )

Values of intrinsic rate of population increase ( $r$ ) for BBScen treatment were greater than BBChl ( $0.68 \text{ d}^{-1}$  and  $0.53 \text{ d}^{-1}$ , respectively). Food quality is supposed to influence ability of a population to increase in numbers, as can be seen between these two treatments. Relatively higher quality food resulted in higher  $r$  values for other species, as described by Boersma & Vijverberg (1996) for *Ceriodaphnia pulchella* fed on *Chlamydomonas globosa* ( $r = 0.25 \text{ d}^{-1}$ ) and fed on *Scenedesmus obliquos* ( $r = 0.05 \text{ d}^{-1}$ ). Higher food concentrations also are able to raise  $r$  values, as reported by Hall (1964) for *Daphnia galeata* and Rose et al. (2000) for *Ceriodaphnia dubia*. Abrantes & Gonçalves (2003) obtained greater  $r$  values for *Ceriodaphnia pulchella* reared

in natural water than the ones reared in ASTM reconstituted water ( $r = 0.42 \text{ d}^{-1}$  and  $0.19 \text{ d}^{-1}$ , respectively). The results of the present study do not agree with this one. It is not clear why the greatest value of  $r$  was in AR treatment ( $0.78 \text{ d}^{-1}$ ), which had the poorest results in reproduction parameters. Moreover, ARSH had a greater value than BBChI ( $0.62 \text{ d}^{-1}$  and  $0.53 \text{ d}^{-1}$ , respectively).

Table 2 shows a comparison of results of the present study with other authors, which also investigated life history of *C. silvestrii* under controlled conditions. Rietzler (1998) studied life histories responses of *C. silvestrii* under the following conditions: water from the natural habitat of the tested organisms (Barra Bonita reservoir, Barra Bonita city, São Paulo state, located at  $22^{\circ} 29' \text{ S}$  e  $48^{\circ} 34' \text{ W}$ ), fed on natural seston, at  $25^{\circ}\text{C}$ . Water hardness and pH were not considered by this author. *C. silvestrii* fed on natural seston had its primipara later, were smallest at first reproduction, had lower body length, production of eggs and neonates female<sup>-1</sup> than in natural water treatments of the present study (BBScen and BBChI). Abrantes & Gonçalves (2003) demonstrated that food conditions altered all these life history parameters, as it can be seen in Table 2 between BBScen and BBChI results from the present study and Rietzler (1998) data.

Fonseca (1991) cultured *C. silvestrii* in natural water (pH  $\sim 7.0$ , water hardness as  $\sim 150.0 \text{ mg CaCO}_3 \text{ L}^{-1}$ ), fed on *Monoraphidium dybowskii* ( $10^5$  cells  $\text{mL}^{-1}$ ), at  $25^{\circ}\text{C}$ . Females submitted to this culture condition had greater fecundity, size at primipara and body length when compared to Rietzler

(1998) data. Fonseca (1991) growing and longevity data were similar to data from BBScen treatment of the present study, except that fecundity parameter was lower (85 neonates female<sup>-1</sup> against 107 neonates female<sup>-1</sup> in BBScen).



## Conclusion

Through the present study, it is possible to conclude that *S. bijugus* is a relatively better food source for *C. silvestrii* than *C. lacustris* on laboratory cultures, based on the observed life history parameters. The two food sources tested were capable of shift the reproductive strategy of *C. silvestrii*. The relatively higher quality food provided an early primipara, higher production of neonates, and a shorter longevity, while the relatively lower quality food allowed *C. silvestrii* females to live longer, have a lower neonate production, and have primipara latter. It was also possible to find out that the addition of humic substances resulted in better development, growing, reproduction and survival values for *C. silvestrii*. Natural water proved to be a better water culture for *C. silvestrii* than artificial reconstituted water, as shown by the observed life history parameters. An increasing of water hardness did not result in a better suitability of U.S.EPA reconstituted water to *C. silvestrii*.

*C. silvestrii* also fits into small-sized life history strategies: it initiates reproduction at an early age and small size, and continue to grow until later instars simultaneously to reproduction, thus sharing energy allocation between growth and reproduction.

## Acknowledgements

This work was supported by FAPESP (projects under contracts 2002/04275-0, and 2002/11582-6) and CNPq (grant under contract 130496/2002-2).

## References

Abrantes, N. & F. Gonçalves, 2003. The dynamics of *Ceriodaphnia pulchella* (Cladocera) in laboratory. *Acta Oecologica*, 24: S245-S249.

Adema, D.M.M., 1978. *Daphnia magna* as a test animal in acute and chronic toxicity tests. *Hydrobiologia*, 59: 125-134.

Amarasingue, P.B., M. Boersma, & J. Vijverberg, 1997. The effect of temperature, and food quantity and quality on the growth and development rates in laboratory-cultured copepods and cladocerans from a Sri Lankan reservoir. *Hydrobiologia*, 350: 131-144.

Arambasic, M.B., S. Bjeli, & G. Subakov, 1995. Acute toxicity of heavy metals (copper, lead, zinc), phenol and sodium on *Allium cepa* L., *Lepidium sativum* L. and *Daphnia magna* st.: comparative investigations and the practical applications. *Wat. Res.*, 29: 497-503.

Arnold, D.E., 1971. Ingestion, assimilation, survival, and reproduction by *Daphnia pulex* fed seven species of blue-green algae. *Limnol. Oceanogr.*, 16: 906-920.

Boersma, M. & J. Vijverberg, 1996. Food effects on life history traits and seasonal dynamics of *Ceriodaphnia pulchella*. *Freshwat. Biol.*, 35: 25-34.

Bottrell, H.H., 1975. Generation time, length of life, instar duration and frequency of moulting, and their relationship to temperature in eight species of Cladocera from the River Thames, Reading. *Oecologia*, 19: 129-140.

Bottrell, H.H., A. Duncan, Z.M. Gliwics, E. Grygierek, A. Herzig, A. Hillbricht-Ilkowska, H. Kurasawa, P. Larsson & T. Weglenska, 1976. A review of some problems in zooplankton production studies. *Norw. J. Zool.*, 24: 419-456.

Díaz-Castro, J.G. & E.R. Hardy, 1998. Life history of *Moina micrura* (Kurz) fed with three algae species, in the laboratory. *Amazoniana*, 15: 25-34.

Dumont, H.J., I. Van de Velde & S. Dumont, S., 1975. The dry weight estimate of biomass in a selection of Cladocera, Copepoda and Rotifera from the plankton, periphyton and benthos of continental waters. *Oecologia*, 19: 75-97.

El-Moor Loureiro, M.A., 1997. Manual de identificação de Cladóceros límnicos do Brasil. Ed. Universa. Brasília, 220 pp. (In portuguese).

Fonseca, A.L., 1991. A biologia das espécies *Daphnia laevis*, *C. silvestrii* (Cladocera) e *Poecilia reticulata* (Poeciliidae) e o comportamento destes em testes de toxicidade aquática com efluentes industriais. Dissertation. University of São Paulo: 210 pp. (in Portuguese).

Fonseca, A.L. 1998. The life cycle of *Ceriodaphnia silvestrii* (Daday 1902) and *Daphnia laevis* (Birge 1878) (Crustacea, Cladocera) reared under different pH conditions. *Verh. Internat. Verein. Limnol.*, 26: 1918-1921.

Girling, A.E. & B.M. Garforth, 1989. Influence of variations in culture medium on the survival and reproduction of *Daphnia magna*. Bull. envir. Contam. Toxicol., 42: 119-125.

Guillard R. R. L. & C.J. Lorenzen, 1972. Yellow-green algae with chlorophyllide-c. J. Phycol., 8: 10-14.

Hall, D.J., 1964. An experimental approach to the dynamics of a natural population of *Daphnia galeata* Mendotae. Ecology, 45: 94-112.

Hardy, E.R., & A. Duncan, 1994. Food concentration and temperature effects on life cycle characteristics of tropical cladocera (*Daphnia gessneri*, *Diaphanosoma sarsi*, *Moina reticulata*). 1. Development time. Acta Amazonica, 24: 119-134.

Heijerick, D.G., C.R. Janssen & W.M. Coen, 2003. The combined effects of hardness, pH, and dissolved organic carbon on the chronic toxicity of Zn to *Daphnia magna*: development of a surface response model. Arch. envir. Contam. Toxicol., 44: 210-217.

Infante, A. & A.H. Litt, 1985. Differences between two species of *Daphnia* in the use of 10 species of algae in Lake Washington. Limnol. Oceanogr., 30: 1053-1059.

Joly, C.A. & C.E.M. Bicudo, 1999. Biodiversidade do Estado de São Paulo. 4: Invertebrados de água doce. FAPESP: São Paulo. 176 pp. (In Portuguese).

Koivisto, S., & M. Ketola, 1995. Effects of copper on life-history traits of *Daphnia pulex* and *Bosmina longirostris*. Aquat. Toxicol., 32: 255-269.

Koivisto, S., M. Ketola, & M. Walls, 1992. Comparison of five cladoceran species in short- and long-term copper exposure. *Hydrobiologia*, 248: 125-136.

Lewis, M.A. & A.W. Maki, 1981. Effects of water hardness and diet on productivity of *Daphnia magna* Strauss in laboratory culture. *Hydrobiologia*, 85: 175-179.

Lombardi, A. T. & A.A.H. Vieira, 2000. Copper complexation by Cyanophyta and Chlorophyta exudates. *Phycologia*, 39: 118-125.

Lundstedt, L. & M.T. Brett, 1991. Differential growth rates of three cladoceran species in response to mono- and mixed-algal cultures. *Limnol. Oceanogr.*, 36: 159-165.

Lynch, M., 1980. The evolution of cladoceran life histories. *The Quarterly Review of Biology*, 55: 23-42.

Mansudire, H.M., 1994. Mean individual dry weight and length regressions of some zooplankton of Lake Kariba. *Hydrobiologia*, 272: 231-238.

McMahon, J.W. & F.H. Rigler, 1965. Feeding rate of *Daphnia magna* Straus in different food labeled with radioactive phosphorus. *Limnol. Oceanogr.*, 10: 105-113.

Oikari, A., J. Kukkonen, & V. Virtanen, 1992. Acute toxicity of chemicals to *Daphnia Magna* in humic waters. *Science of the Total Environment*, 117/118: 367-377.

Persson, G., & G. Ekbohm, 1980. Estimation of dry-weight in zooplankton populations – methods applied to crustacean populations from lakes in the Kuokkel area, Northern Sweden. *Archiv fur Hydrobiologie*, 89: 225-246.

Ricklefs, R.E., 1990. *Ecology*. W.H. Freeman and Company, New York. 896pp.

Rietzler, A. C., 1998. Tempo de desenvolvimento, reprodução e longevidade de *Diaphanosoma birgei* Korinek e *Ceriodaphnia silvestrii* Daday em condições naturais de alimentação. *Anais do VIII Semin. Reg. de Ecol.*, 8: 1159-1171. (In Portuguese)

Rose, R.M., M. St. J. Warne, & R.P. Lim, 2000. Life history responses of the cladoceran *Ceriodaphnia cf. dubia* to variation in food concentration. *Hydrobiologia*, 427: 59-64.

Ryther, J.H., 1954. Inhibitory effects of phytoplankton upon the feeding of *Daphnia magna* with reference to growth, reproduction and survival. *Ecology*, 35: 522-533.

Salonen, K. & T. Hammar, 1986. On the importance of dissolved organic matter in the nutrition of zooplankton in some lake waters. *Oecologia*, 68: 246-253.

Schwartz, S.S. & R.E. Ballinger, 1980. Variations in life history characteristics of *Daphnia pulex* fed different algal species. *Oecologia*, 44: 181-184.

U.S. Environmental Protection Agency, 1991. *Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms*. 4<sup>th</sup> ed. Edited by C.I. Weber. EPA-600/4-90/027.

Vanni, M.J. & W. Lampert, 1992. Food quality effects on life history traits and fitness in the generalist herbivore *Daphnia*. *Oecologia*, 92: 48-57.

Versteeg, D.J., M. Stalmans, S.D. Dyer, & C. Janssen, 1997. *Ceriodaphnia* and *Daphnia*: a comparison of their sensitivity to xenobiotics and utility as a test species. *Chemosphere*, 34: 869-892.

Vijverberg, J., 1989. Culture techniques for studies on the growth, development and reproduction of copepods and cladocerans under laboratory and *in situ* conditions: a review. *Freshwat. Biol.*, 21: 317-373.

Winner, R.W., T. Keeling, R. Yeager, & M.P. Farrell, 1977. Effects of food type on the acute and chronic toxicity of copper to *Daphnia magna*. *Freshwat. Biol.*, 7: 343-349.

Zar, J. H., 1999. *Biostatistical Analysis*. Prentice Hall, New Jersey. 663 pp.

Table 1. Statistical analysis of selected life-history parameters of *C. silvestrii* at five different treatments.

Parameter	Test applied (**)	P	Treatment				
			AR	ARSH(*)	BBScen	BBChI	ARHARD
Age at primipara (days)	KW / D	< 0,0001	a	ab	b	c	a
Size at primipara (mm)	KW / D	< 0,0001	bcd	bcd	cd	ab	a
Instar of primipara	KW / D	< 0,0001	a	a	b	a	a
Total number of instars	KW / D	< 0,0001	a	nd*	b	b	a
Longevity (days)	KW / D	< 0,0001	a	nd*	b	b	a
Number of eggs / female	KW / D	< 0,0001	a	nd*	b	b	a
Number of neonates / female	KW / D	< 0,0001	a	nd*	b	b	a
Embryonic period (days)	A / TK	< 0,0001	d	nd*	ab	b	bc
Time between clutches (days)	A / TK	< 0,0001	a	nd*	b	b	b
Maximum body length (mm)	KW / D	< 0,0001	a	nd*	b	b	a

(\*) nd: not determined up to the end of experiment; (\*\*) A = Anova, KW = Kruskal-Wallis; TK = Tukey-Kramer; D = Dunn's.



Table 2. *C. silvestrii* development, growing and reproduction parameters found in life history experiments, from five different treatments: AR, ARSH, ARHard, BBScen and BBChI. The last four columns present data from *C. silvestrii* obtained by other authors.

	AR (N=17)		ARSH (N=9)		ARHard (N=16)		BBScen (N=15)		BBChI (N=12)		Fonseca, 1991		Rietzler, 1998	
	Means	S.D.	Means	S.D.	Means	S.D.	Means	S.D.	Means	S.D.	Means	S.D.	Means	S.D.
Age at primipara (days)	3.09	0.32	2.89	0.22	3.21	0.51	2.63	0.23	4.21	0.58	-	-	4.50	0.53
Size at primipara (mm)	0.66	0.03	0.64	0.02	0.56	0.04	0.72	0.05	0.61	0.03	0.77	-	0.59	0.04
Instar of primipara	3.94	0.24	4.00	0.00	4.00	0.51	3.27	0.46	4.17	0.39	-	-	-	-
Number of instars	9.29	0.59	11.33 *	0.50	10.12	1.66	18.33	3.06	23.00	2.52	-	-	-	-
Longevity (days)	14.76	1.03	15	-	15.59	3.14	28.80	4.82	36.00	3.64	29.8	5.89	17.22	2.86
Number of eggs / female	14.41	2.55	36.66 *	6.71	15.25	4.49	124.53	32.87	101.08	41.27	-	-	32.00	17.14
Number of neonates / female	7.41	1.91	27.77 *	8.70	12.00	4.58	107.07	29.71	91.83	41.42	85.00	-	4.13**	2.21
Eclosion (%)	52.92	16.89	74.42 *	15.87	78.06	16.01	85.65	5.90	89.30	9.64	-	-	-	-
Embryonic period (days)	1.73	0.09	1.61 *	0.05	1.54	0.11	1.62	0.04	1.55	0.06	-	-	1.33	0.47
Time between clutches (days)	1.90	0.28	1.60 *	0.04	1.65	0.12	1.66	0.06	1.64	0.09	-	-	-	-
Maximum body length (mm)	0.74	0.02	0.82 *	0.05	0.75	0.03	1.02	0.03	0.91	0.05	1.04	0.04	0.66	-

\* Data obtained until 15 days since birth; \*\* Mean number of neonates produced per female per instar. Data marked with "-" weren't registered by the authors.

**Table 3.** Mean body length (mm) and mean individual dry weight ( $\mu\text{g}$ ) of *Ceriodaphnia silvestrii* from Barra Bonita reservoir at three life stages (neonate, juvenile and adult).

	<b>N*</b>	<b>MEAN BODY LENGTH (mm)</b>	<b>MEAN INDIV. WEIGHT (<math>\mu\text{g}</math>)</b>
<b>NEONATES</b>	3(120)	0.341 $\pm$ 0.006	1.337 $\pm$ 0.169
<b>JUVENILES</b>	3(60)	0.561 $\pm$ 0.013	2.113 $\pm$ 0.159
<b>ADULTS</b>	5(100)	0.736 $\pm$ 0.017	5.335 $\pm$ 0.523

\* Number of replicates. In parenthesis, total number of individuals measured.

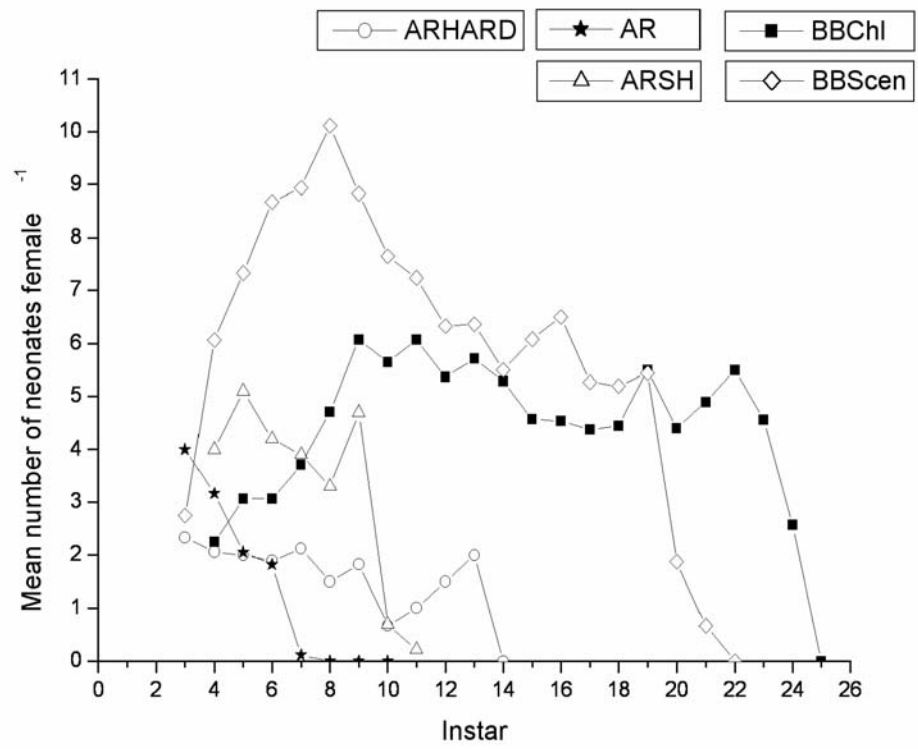


Figure 1. Mean number of neonates per female per instar of *C. silvestrii* from five different treatments: AR, ARSH, ARHard, BBScen, and BBChI.

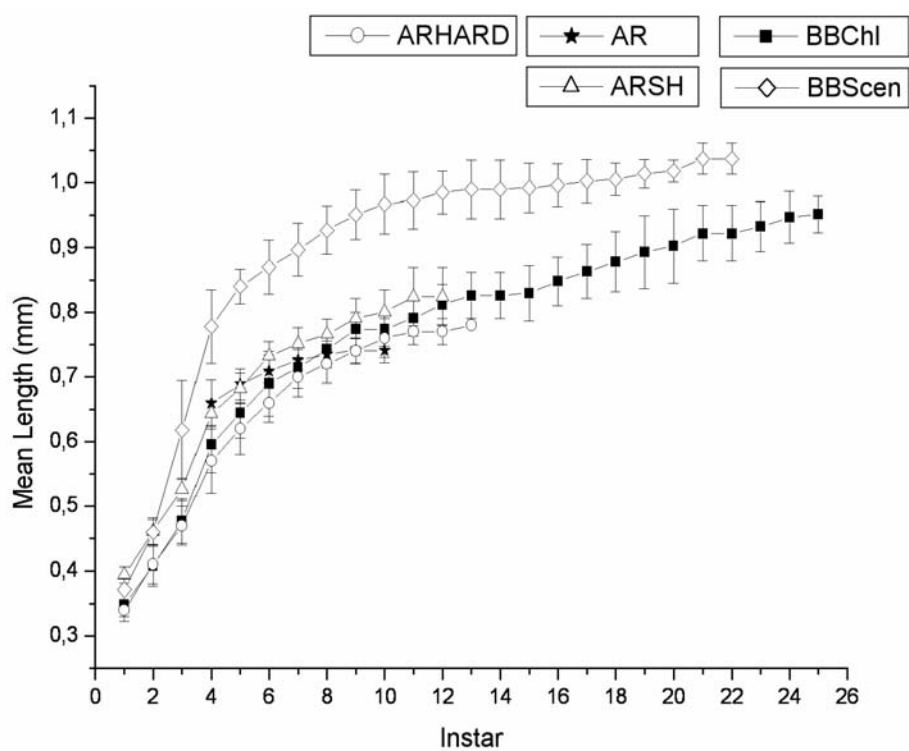


Figure 2. Mean body length (mm) per instar of *Ceriodaphnia silvestrii* submitted to five different treatments: AR, ARSH, ARHard, BBScen, and BBChI. The error bars give the S.D.

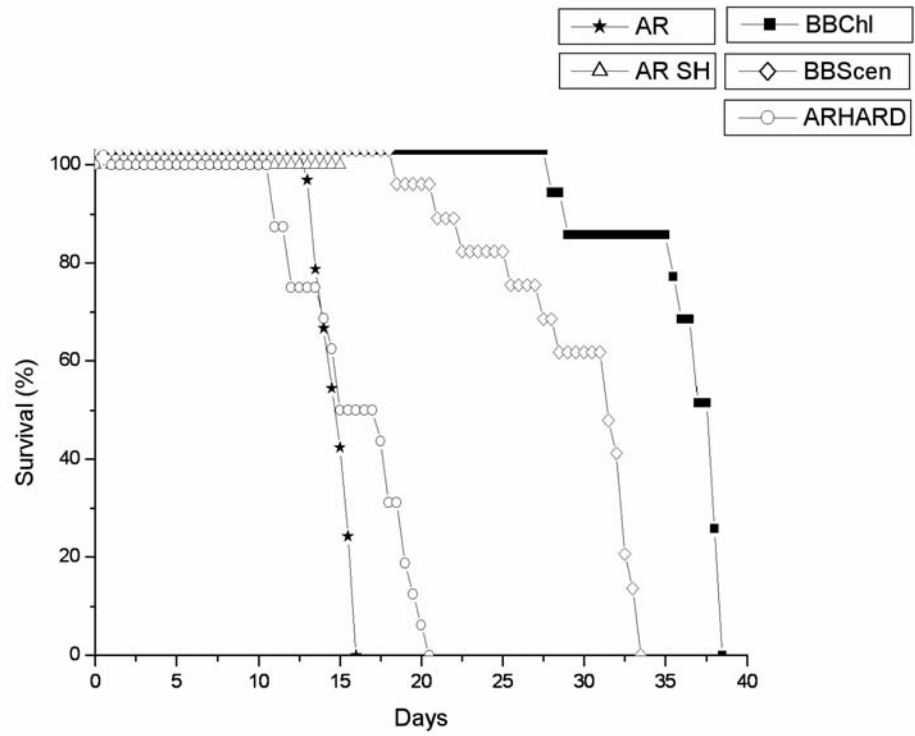


Figure 3. Survival (%) of individuals of *C. silvestrii* submitted to five different treatments: AR, ARSH, ARHard, BBScen, and BBChI.

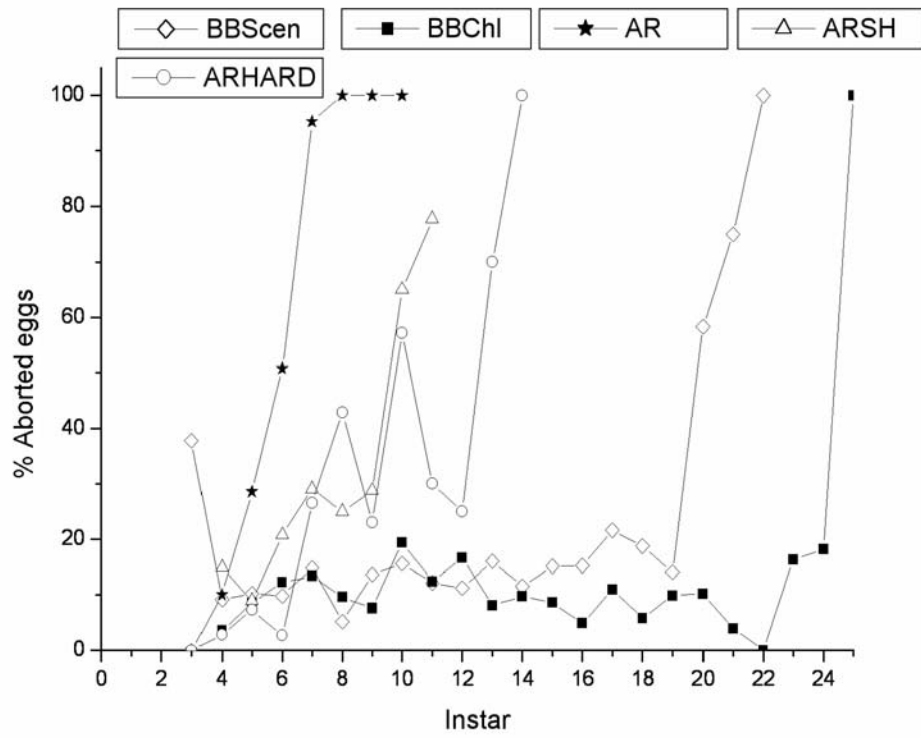


Figure 4. Proportion of aborted eggs (%) in relation to instar of females of *C. silvestrii* submitted to five different treatments (AR, ARSH, ARHard BBSceN, and BBChI).

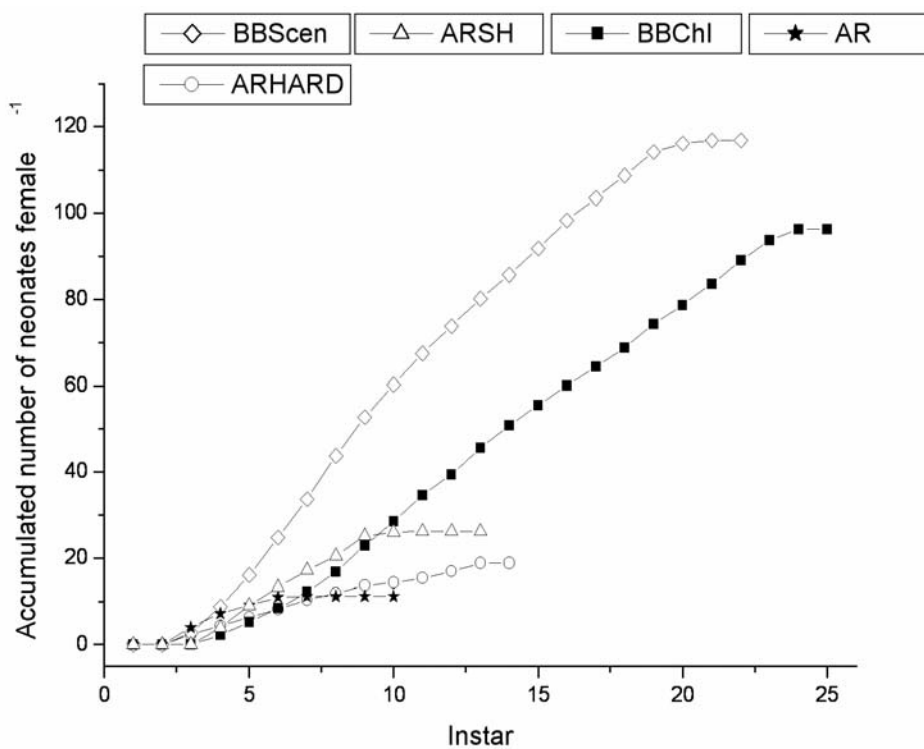


Figure 5. Accumulated number of neonates female<sup>-1</sup> in relation to instars of individuals of *C. silvestrii* submitted to five different treatments: BBScen, BBChI, ARHard, ARSH and AR.

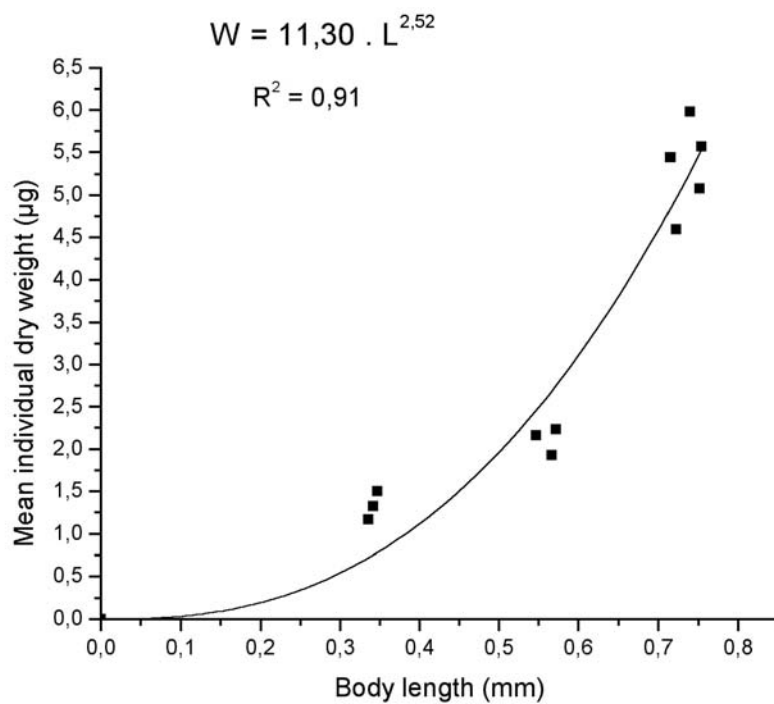


Figure 6. Relationship between body length (mm) and dry weight (µg) of *C. silvestrii* from Barra Bonita reservoir (SP, Brazil).



THE EFFECTS OF HUMIC SUBSTANCES ON IONIC  
COPPER TOXICITY AND ACCUMULATION BY  
*CERIODAPHNIA SILVESTRII* DADAY (CRUSTACEA,  
CLADOCERA)

Maria Alice Penna Firme dos Santos<sup>1,2</sup>, Maria da Graça Gama Melão<sup>1,2</sup>,  
Ana Teresa Lombardi<sup>3</sup>.

<sup>1</sup> Federal University of São Carlos, Department of Hydrobiology, Laboratory of Plankton, P.O. Box 676, 13565-905, São Carlos-SP, Brazil.

<sup>2</sup> Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais (PPG-ERN/UFSCar).

<sup>3</sup> Federal University of Paraná, Center for Marine Studies, P.O. Box 50002, 83255-000, Pontal do Paraná-PR, Brazil.

Correspondence: Maria Alice Santos, R. Dr. Luverci Pereira de Sousa, 21, Cidade Universitária, Campinas-SP, Brazil. Zip code 13084-030. E-mail: [maria.alice.santos@globo.com](mailto:maria.alice.santos@globo.com).

Abbreviated title: Humic substances and copper toxicity to *C. silvestrii*.

**Keywords:** humic substances, *Ceriodaphnia silvestrii*, toxicity, copper, bioavailability, bioaccumulation.

## Summary

1. Copper acute toxicity and bioaccumulation by *Ceriodaphnia silvestrii* (Cladocera, Daphnidae), was studied in the absence and presence of humic substances (HS).
2. Groups of 20 adult females of similar sizes were exposed to varying total copper concentration (from  $10^{-8}$  to  $10^{-5}$  M) for a period of 24h.  $LC_{50}$  was estimated by Trimmed Spearman-Kärber method. Based on total copper concentration,  $LC_{50}$ , in the absence of HS was  $4.4 \times 10^{-8}$  M, whereas with  $20 \text{ mg L}^{-1}$  HS,  $LC_{50}$  was  $1.1 \times 10^{-6}$  M.
3.  $LC_{50}$  values based on free ion concentration were similar:  $3.3 \times 10^{-8}$  M without humic substances, and  $2.8 \times 10^{-8}$  M when HS were present in the medium. These results suggest that copper toxicity evaluations based on free ions instead of total concentration values are more accurate.
4. Free copper ions were determined in test media and it showed that humic substances reduced  $\text{Cu}^{2+}$  concentration.
5. *C. silvestrii* is capable of regulating body copper concentrations over a range of copper availabilities, as so many other crustaceans. As also reported, humic substances did not influence copper bioaccumulation by *C. silvestrii*.

## Introduction

Trace metals are natural components of the biosphere. Although metals are essential for life, several are toxic at high concentrations; for some of them, there is a narrow window between what is essential and what is toxic (Luoma, 1983).

It is well established that in aquatic environments, copper toxicity depends more on the chemical form of the metal than on its total concentration. Toxicity to aquatic organisms has been directly correlated to  $\text{Cu}^{2+}$  concentration (Andrew, Biesinger & Glass, 1977; Giesy, Newell & Leverage, 1983; Wangersky & Maass, 1991; Kim *et al.*, 1999; Ma *et al.*, 1999, Lombardi *et al.*, 2002).

A number of environmental and biological processes may influence the accessibility of metals to organisms, thus affecting metal bioavailability and toxicity (Luoma, 1983). Environmental factors such as salinity (Lores & Pennock, 1998), pH (Schubauer-Berigan *et al.* 1993; Gagneten & Vila, 2001; Heijerick, Janssen & Coen, 2003), ionic strength (Cao *et al.*, 2004), water hardness (Heijerick *et al.*, 2003), and naturally occurring organic materials (Lombardi & Jardim, 1997; Lores & Pennock, 1999; Lombardi & Vieira, 2000; Gorbi *et al.*, 2002), are able to alter bioavailability and consequently toxicity of metals in aquatic environments.

McKnight (1981), studying a reservoir in northeastern United States, concluded that humic substances controlled the chemistry of copper added to that reservoir. Reuter & Perdue (1977) point out that substantial quantities of copper may be complexed by fulvic acids even in the presence of high concentrations of competing cations. Saar & Weber (1982) emphasize the role of fulvic acids (FA) in the toxicity of metal ions, such as copper. The authors reported that it can reduce biological availability or toxicity, and that they can act as metal-ion buffer. Heijerick

*et al.* (2003) demonstrated that an increase in DOC decreased zinc toxicity to *Daphnia magna*. Porta & Ronco (1993) evaluated the reduction of Cu(II) toxicity to the rotifer *Brachionus calyciflorus*, in the presence of natural freshwater fulvic acids.

Several authors have demonstrated the reduction of acute copper toxicity to daphnid species by natural humic waters: Giesy *et al.* (1983) found a reduction of toxicity to *Simocephalus serrulatus* (values from 0.5 to 15.6 mg TOC L<sup>-1</sup>), Winner (1985) to *D. pulex* (0.75 and 1.5mg HA L<sup>-1</sup>), Oikari *et al.* (1992) to *Daphnia magna* (values from 14 and 20mg HS L<sup>-1</sup>), Kim *et al.* (1999) to *Ceriodaphnia dubia* (2.5 to 10 mg DOC L<sup>-1</sup>), and Ma *et al.* (1999) to *C. dubia* (5 to 20mg HA L<sup>-1</sup>),

Toxicity evaluation of a chemical is commonly verified by its lethality, which indicates the concentration that kills 50% of the test organisms (LC<sub>50</sub>). In spite of the importance of dissolved organic matter (DOM) on metal dynamics in aquatic environments (Wang, 1987), most of the experiments that determine LC<sub>50</sub> are conducted without its consideration (Koivisto, Ketola & Walls, 1992; Borgmann, Norwood & Clarke, 1993; Koivisto & Ketola, 1995). As we demonstrate in the present investigation, this practice is subject to errors if we consider that several water bodies contain variable amounts of naturally occurring DOM.

A study on the effects of DOM on the toxicity of metals such as copper is of interest to the understanding of processes controlling the biological availability of metals in aquatic systems. In this context, the purpose of the present study was to investigate the effects of humic substances (HS) on copper bioavailability, toxicity, and bioaccumulation to a common herbivorous zooplankter present in subtropical eutrophic reservoirs, *Ceriodaphnia silvestrii* (Joly & Bicudo, 1999).

Several authors have demonstrated copper regulation patterns as accumulation strategy for some crustaceans species, whereas others showed accumulation patterns for other species (Rainbow & Dallinger, 1991). Borgmann *et al.* (1993) showed that the amphipod *Hyalella azteca* completely regulates copper body concentration over a range of dissolved copper concentrations. Rainbow & White (1989) compared copper accumulation strategies between different crustacean taxa: a decapod (*Palaemon elegans*), an amphipod (*Echinogammarus pirloti*) and a barnacle (*Elminius modestus*). The first organism was capable of regulating body copper levels to a constant value over a range of dissolved environmental copper, whereas the amphipod and the barnacle accumulated copper at all dissolved copper exposures with no evidence of regulation. Zia & Alikhan (1989) showed that the decapod *Cambarus bartoni* are capable of regulating body copper concentration. Ahsanullah *et al.* (1981) demonstrated that the shrimp *Callinassa australiensis* accumulated copper, showing no regulation pattern. Rainbow & Moore (1986) showed a variety of amphipod species that accumulate or regulate body copper concentrations.

The effects of humic substances (and some of its fractions) on bioaccumulation of copper by several organisms has been shown by Winner (1985), who reported a decrease of copper bioconcentration factor (BCF) by the same *Daphnia* species in the presence of humic acids. However, Winner (1984) demonstrated that humic acids had no influence on bioaccumulation of copper by *Daphnia magna*. Giesy *et al.* (1983) found that in humic waters, the cladoceran *Simocephalus serrulatus* accumulated less copper than when they were grown in waters free from humic substances.

The test species chosen in this study, *C. silvestrii*, is currently being tested to become a tropical standardized species for ecotoxicological bioassays by Brazilian pollution monitoring institutions and methodological designer institutions (CETESB, ABNT), for, in a near future, substitute foreign species such as *Daphnia similis* and *Ceriodaphnia dubia*. This study intends also to contribute to obtain more information regarding this test species, *C. silvestrii*, which has scarce biological and toxicological data about it (Fonseca, 1998; Rietlzer, 1998).

## Methods

Females of *C. silvestrii* used in the experiments were reared in U.S. EPA reconstituted fresh water (U.S. EPA, 1991) (hardness as  $44.0\text{mg CaCO}_3\text{ L}^{-1}$ , and pH 6,8) at a temperature of  $25 \pm 1\text{ }^\circ\text{C}$ , with a light:dark cycle of 12:12 h. The green algae *Scenedesmus bijugus* was used as food source ( $10^5\text{ cells mL}^{-1}$ ). Laboratory cultures were initiated from females collected at Barra Bonita Reservoir, located at  $22^\circ 29' \text{ S e } 48^\circ 34' \text{ W}$ , at the city of Barra Bonita, SP (Brazil).

Prior to incubation, the animals were kept in reconstituted water for one hour to empty their guts. Groups of 20 adult females of similar sizes were separated, put into 60mL vessels, and exposed (24h,  $25^\circ\text{C} \pm 1$ ) to several copper ( $\text{CuCl}_2$ ) concentrations with and without the addition of humic substances (nominal concentration of  $20\text{mg L}^{-1}$ ). Copper concentrations were:  $10^{-8}$ ;  $1.6 \times 10^{-8}$ ;  $4 \times 10^{-8}$ ;  $10^{-7}$ ,  $10^{-6}$ ,  $2 \times 10^{-6}$ ;  $5 \times 10^{-6}$  and  $10^{-5}$  M. Three replicates were performed for each copper concentration. Experimental vessels were capped to avoid losses by evaporation.

Free copper ion concentration was determined before and after organisms exposition, using a cupric ion-selective electrode (ISE, ANALION model Cu-641) and a reference glass double-junction electrode (ANALION, model R-684). pH measurements were performed using an ANALION pHmeter (model pm-608). After 24 hours of incubation, dead and living animals from the experiments were counted of and  $\text{LC}_{50}$  estimated by Trimmed Spearman-Kärber method (Hamilton *et al*, 1977).  $\text{LC}_{50}$  values were estimated both based on total nominal concentrations and on free ion concentration for the two treatments. It was considered dead those animals that did not show any leg, antenna and heart movements over a short period (e.g., 5 seconds) of observation through an optical microscope.

Copper accumulation was determined in living animals, which were dried (60°C, 48h) in previously acid (1M HNO<sub>3</sub>, 24h) washed membrane filters.

Digestion of samples was performed on Teflon® screw-capped vials to which 200µL of concentrated ultra-pure HNO<sub>3</sub> (J.T. Baker) was added and kept at 90°C for 48h. Details of such procedures may be encountered in Lores *et al.* (1999). Copper concentrations was further determined in the liquid samples by DP-ASV using a Eg&G Instruments polarograph (model 303A SMDE).

In the present study, we have used standardized Suwannee River Humic substances, from International Humic Substances Society (Cat. N° 1R101N, 7.0% ash, 52.47% C, 4.19% H, 42.69% O, 1.10% N, 0.65% S, and 0.02% P).



## Results

Free copper measurements obtained by ISE showed that the presence of humic substances ( $20\text{mg L}^{-1}$ ) in the test environment decreased free copper ion concentration, as shown in Fig. 1.

Survival of the organisms decreased with increasing copper concentrations in test medium both with humic substances and without it, but *C. silvestrii* was less affected by copper when humic substances were present. Fig. 2 shows that the addition of  $20\text{mg L}^{-1}$  HS to the test water (a mixture of reconstituted water and copper solution) shifted the copper toxicity curve to considerably higher total copper concentrations.

$\text{LC}_{50}$  (24h) values were estimated both based on total nominal concentration (M) and free ion concentration, obtained by ISE. These results, which are presented in Tab. 1, show that  $\text{LC}_{50}$  based on total copper concentration varied significantly between the treatment without HS and that with  $20\text{mg L}^{-1}$  HS:  $4.4 \times 10^{-8}$  M ( $7.6\mu\text{g L}^{-1}$ ) and  $1.1 \times 10^{-6}$  M ( $185.0\mu\text{g L}^{-1}$ ), respectively.

Copper toxicity evaluation using free ion concentrations resulted in similar values of  $\text{LC}_{50}$  (24h):  $3.3 \times 10^{-8}$  M ( $5.6\mu\text{g L}^{-1}$ ) with HS present in the test medium and  $2.8 \times 10^{-8}$  M ( $4.8\mu\text{g L}^{-1}$ ) without humic substances (Tab. 1). The data were fitted to a sigmoidal curve, and a single toxicity curve (Fig. 3), with a correlation coefficient,  $R^2 = 0.98$  ( $n = 33$ ), was obtained.

Mean body copper accumulation results for all tests performed are showed in Fig. 4. Body copper values for animals were similar between the treatments (with and without HS). Copper content in dead animals was also determined, and it is shown in Fig. 4 by the “★” symbol. They appear to have slightly superior body

copper contents than living animals. Inside each treatment, copper values are similar over a range of dissolved copper availabilities. These results suggest a regulation pattern adopted by *C. silvestrii*.

## Discussion

The reduction of free copper ion concentration in the presence of humic substances (Fig. 1) is in agreement with other studies that investigate the effects of DOM on copper speciation (Giesy *et al.*, 1983; Cao *et al.*, 2004). This observed reduction is explained by Saar & Weber (1982), which report the ability of adjacent anionic sites of fulvic acids to form strong complexes with divalent metal ion, such as  $\text{Cu}^{++}$ . Reuter & Perdue (1977) also point out that the acidic character of humic substances enables them to interact with cations of heavy metals, forming complex linkages of various kinds by ion-exchange, surface adsorption and chelating, and also making stabilities constants of the metal-humic complexes in natural waters higher than those of the corresponding inorganic metal complexes.

The present results showed a shift of copper  $\text{LC}_{50}$  by humic substances from  $4.4 \times 10^{-8} \text{ M}$  ( $7.6 \mu\text{g L}^{-1}$ ) to  $1.1 \times 10^{-6} \text{ M}$  ( $185.0 \mu\text{g L}^{-1}$ ) to *C. silvestrii*. These results confirm others from literature, where a reduction of copper acute toxicity is observed in the presence of several kinds of DOM (Tab. 2). Giesy *et al.* (1983) found a negative correlation between toxicity and total dissolved organic carbon (DOC) concentration for the daphnid *Simocephalus serrulatus*.  $\text{LC}_{50}$  (24h) values shifted from  $7.2 \mu\text{g L}^{-1}$  ( $3 \text{ mg DOC L}^{-1}$ ) to  $43 \mu\text{g L}^{-1}$  ( $12.4 \text{ mg DOC L}^{-1}$ ). Winner (1985) obtained a reduction of  $\text{LC}_{50}$  (72h) from  $25.9 \mu\text{g L}^{-1}$  to  $67.3 \mu\text{g L}^{-1}$  in the presence of humic acids to *D. pulex*. Oikari *et al.* (1992) demonstrated that humic waters, as compared to humus-free control water, altered copper toxicity to *Daphnia magna*. They report a  $\text{LC}_{50}$  (48h) of  $7.0 \mu\text{g L}^{-1}$  for organisms exposed to copper in the absence of humic substances and  $45.0 \mu\text{g L}^{-1}$  in the presence of HS. Kim *et al.* (1999) showed that an increase in DOM concentration (0, 2.5 and  $10.0 \text{ mg L}^{-1}$ ) reduced copper toxicity to *C. dubia* to 20.1, 87.2 and  $190.0 \mu\text{g L}^{-1}$ , respectively.

The observed lower  $\text{Cu}^{2+}$  concentration in the presence of humic substances may explain the reduction in copper toxicity to *C. silvestrii*. The single toxicity curve showed in Fig. 3 relating survival of *C. silvestrii* and free copper ion concentration (M) demonstrate that acute toxicity of copper is directly correlated to  $\text{Cu}^{2+}$  concentration rather than the total copper concentration. All these studies cited above have reported lower toxicity of some chelated or complexed forms of copper. However, they have failed to show a direct relationship between toxicity and  $\text{Cu}^{2+}$  concentrations.

Several authors also obtained a single toxicity curve based on hydrated free copper ion concentrations, regarding different speciation influencing factors. Sunda & Guillard (1976) obtained a single growth curve for the diatom *Thalassiosira pseudonana* based on pCu, varying pH and ligand concentration (Tris cupric ion- and hydrogen ion- buffer) between treatments. Meador (1991) showed through regression models a very high correlation between measured ionic copper and *Daphnia magna* mortality, concluding that cupric ion concentration was a major determinant of acute copper toxicity to this cladoceran. Both Kim *et al.* (1999) and Ma *et al.* (1999) testing a number of DOC and humic acids concentrations, respectively, found a single acute toxicity curve to *Ceriodaphnia dubia* based on free copper concentration, rather than total copper concentration. Eriksen *et al.* (2001) demonstrated a very strong correlation between the concentration of free copper measured by ISE and the reduction of algal growth (*Nitzschia closterium*) at two salinity values. Lorenzo *et al.* (2002) explained better the toxicity of copper to sea-urchin larvae (*Paracentrotus lividus*) by measures of labile copper concentration, rather than total copper concentration, both in the presence and absence of humic acids on seawater.

The evaluation of  $LC_{50}$  estimated based on free copper ion concentration confirms that what causes toxicity to *C. silvestrii* is the ionic form of the metal: both  $LC_{50}$  values (in the presence and absence of humic substances) are very similar ( $5.65\mu\text{g L}^{-1}$  and  $4.85\mu\text{g L}^{-1}$ , respectively).

Tab. 2 shows the comparison of  $LC_{50}$  values for copper obtained for *C. silvestrii* with those for other cladocerans. It shows that the  $LC_{50}$  values cited were different from each other. However, as animal's response to heavy metals can be changed by a number of factors, such as: species-specific sensibility, pH, temperature, water hardness, exposure time, and the presence of natural organic matter in water (and its concentration).

In these environments, the significance of DOM on metal toxicity can be as large as or even larger than that of many other abiotic factors (e.g. temperature, oxygen, salinity) or intraspecies factors, like the phase of organism reproductive cycle (Oikari *et al.*, 1992). Even minute amounts of natural organic matter can markedly alter the toxicity of pollutants (Winner, 1985). Moreover, even in the presence of excesses of major competing cations, such as  $\text{Ca}^{2+}$ , the complexation of metal ions by humic substances can be significant (Reuter & Perdue, 1977).

The present study emphasizes that DOM must be taken into account when conducting toxicity tests. DOM-free ecotoxicological tests may overestimate trace metal toxicity in eutrophic aquatic ecosystems, when water quality criteria and standards are being designed taking into account only total metal concentrations rather than its inorganic forms (Allen & Hansen, 1996).

Regulation pattern of body copper concentrations in *C. silvestrii* suggested by the present results was also described for other species of crustaceans, by several authors, which exposed these animals over a range of dissolved copper

concentrations. Rainbow & White (1989) demonstrated that the decapod *Palaemon elegans* regulated copper at exposures up to and including  $100\mu\text{g Cu L}^{-1}$ . Borgmann et al. (1993) showed that the amphipod *Hyaella azteca* is capable of regulating copper over long periods of time (10 weeks), presenting the same body copper concentration of control animals. Amiard et al. (1987) verified that the crustaceans *Palaemonetes varians*, *Carcinus maenas* and *Crangon crangon* maintained body copper concentration constant up to exposures of  $200\mu\text{g Cu L}^{-1}$ .

Humic substances influence on bioaccumulation appears as a contradictory subject. The present study reports that humic substances had no significant effect on bioaccumulation of copper in *C. silvestrii*. Giesy et al. (1983) concluded that the presence of dissolved organic matter decreased the accumulation of copper by *Simocephalus serrulatus*. Winner (1985) found that humic acids reduced copper bioaccumulation by *Daphnia magna*. It is not clear whether other factors must be taken into account when verifying humic substances presence and bioaccumulation of copper by cladocerans.

## Conclusion

Our results confirmed others from literature, showing that humic substances are able to reduce free copper ion concentration in aquatic environment, consequently reducing copper toxicity. These results demonstrate that acute copper toxicity to *C. silvestrii* is directly related to free copper ion concentration. The present study emphasizes the importance of considering the influence of humic substances on metal bioavailability and toxicity assessments in aquatic environments. This is particularly important if eutrophic environments (usually DOM-rich) are evaluated. As also reported, humic substances appears to not influence copper bioaccumulation by *C. silvestrii*. Moreover, *C. silvestrii* regulates body copper concentrations over a range of copper availabilities, so as many other crustaceans.

## Acknowledgments

This work was supported by FAPESP (project under contract 2002/04275-0) and CNPq (grant under contract 130496/2002-2).

## References

Allen, H.E.; Hansen, D.J. (1996) The importance of trace metal speciation to water quality criteria. *Water Environment Research*, 68, 42-54.

Amiard, J.C.; Amiard-Triquet, C.; Berthet, B.; Metayer, C. (1987) Comparative study of the patterns of bioaccumulation of essential (Cu, Zn) and non-essential (Cd, Pb) trace metals in various estuarine and coastal organisms. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 106, 73-89.

Andrew, R.W.; Biesinger, K.E.; Glass, G.E. (1977) Effects of inorganic complexing on the toxicity of copper to *Daphnia magna*. *Water Research*, 11, 309-315.

Ahsanullah, M.; Negilski, D.S.; Mobley, M.C. (1981) Toxicity of zinc, cadmium and copper to the shrimp *Callinassa australiensis*. III. Accumulation of metals. *Marine Biology*, 64, 311-316.

Borgmann, U., Norwood, W.P., Clarke, C. (1993) Accumulation, regulation and toxicity of copper, zinc, lead and mercury in *Hyalella azteca*. *Hydrobiologia*, 259, 79-89.

Cao, J.; Lam K.C.; Dawson, R.W.; Liu, W.X. & Tao S. (2004) The effect of pH, ion strength and reactant content on the complexation of Cu<sup>+2</sup> by various natural organic ligands from water and soil in Hong Kong. *Chemosphere*, 54, 507-514.

Eriksen, R.S.; Mackey, D.J.; Van Dam, R.; Nowak, B. (2001) Copper speciation and toxicity in Macquarie Harbour, Tasmania: an investigation using a copper ion selective electrode. *Marine Chemistry*, 74, 99-113.



Fonseca, A.L. (1998) The life cycle of *Ceriodaphnia silvestrii* (Daday 1902) and *Daphnia laevis* (Birge 1878) (Crustacea, Cladocera) reared under different pH conditions. Verh. Internat. Verein. Limnol., 26, 1918-1921.

Gagneten, A.M. & Vila, L. (2001) Effects of  $\text{Cu}^{+2}$  and pH on the fitness of *Ceriodaphnia dubia* (Richard 1894) (Crustacea, Cladocera) in microcosm experiments. Environmental Toxicology, 16, 428-438.

Giesy, J.P.; Newell, A. & Leversee, G.J. (1983) Copper speciation in soft, acid, humic waters: effects on copper bioaccumulation by and toxicity to *Simocephalus serrulatus* (Daphnidae). The Science of the Total Environment, 28, 23-36.

Gorbi, G. Corradi, M.G., Invidia, M., Rivara, L., Bassi, M. (2002) Is Cr(VI) toxicity to *Daphnia magna* modified by food availability or algal exudates? The hypothesis of a specific chromium/algae/exudates interaction. Water Research, 36, 1917-1926.

Hamilton, M.A.; Russo, R.C.; & Thurston, R.V. (1977) Trimmed Spearman-Kärber method for estimating median lethal concentration in toxicity bioassays, Environmental Science and Technology, 11, 714-719; Correction (1978), 12, 417.

Heijerick, D.G.; Janssen, C.R.; & Coen, W.M. (2003) The combined effects of hardness, pH, and dissolved organic carbon on the chronic toxicity of Zn to *Daphnia magna*: development of a surface response model. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 44, 210-217.

Joly, C.A. & Bicudo, C.E.M. 1999. Biodiversidade do Estado de São Paulo. 4: Invertebrados de água doce. Edited by Ismael, D.; Valenti, W.C.; Matsumura-Tundisi, T.; Rocha, O. São Paulo – FAPESP. 176p.

Kim, S.D.; Ma, H.Z.; Allen, H.E.; Cha, D.K. (1999) Influence of dissolved organic matter on the toxicity of copper to *Ceriodaphnia dubia*: Effect of complexation kinetics. Environmental Toxicology and Chemistry, 18, 2433-2437.

- Koivisto, S., Ketola, M. (1995) Effects of copper on life-history traits of *Daphnia pulex* and *Bosmina longirostris*. *Aquatic Toxicology*, 32, 255-269.
- Koivisto, S., Ketola, M., Walls, M. (1992) Comparison of five cladoceran species in short- and long-term copper exposure. *Hydrobiologia*, 248, 125-136.
- Lombardi, A. T. & Jardim, W. F. (1997) The complexation of marine and terrestrial organic materials with copper (II) ions as determined by fluorescence quenching. *Chemical Speciation and Bioavailability*, 9, 27-34.
- Lombardi, A. T. & Vieira, A. A. H. (2000) Copper complexation by Cyanophyta and Chlorophyta exudates. *Phycologia*, 39, 118-125.
- Lorenzo, J.I.; Nieto, O.; Beiras, R. (2002) Effect of humic acids on speciation and toxicity of copper to *Paracentrotus lividus* in seawater. *Aquatic Toxicology*, 58, 27-41.
- Lores, E.M. & Pennock, J.R. (1998) The effect of salinity on binding of Cd, Cr, Cu and Zn to dissolved organic matter. *Chemosphere*, 37, 861-874.
- Lores, E.M.; & Pennock, J.R. (1999) Bioavailability and trophic transfer of humic-bound copper from bacteria to zooplankton. *Marine Ecology progress Series*, 187, 67-75.
- Lores, E.M.; Snyder, R.A.; & Pennock, J.R. (1999) The effect of humic acid on uptake / adsorption of copper by a marine bacterium and two marine ciliates. *Chemosphere*, 38, 293-310.
- Luoma, S.N. (1983) Bioavailability of trace metals to aquatic organisms: a review. *Science of the Total Environment*, 28, 1-22.
- Ma, H.Z.; Kim, S.D.; Cha, D.K.; Allen, H.E. (1999) Effect of kinetics of complexation by humic acid on toxicity of copper to *Ceriodaphnia dubia*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 18, 828-837.

McKnight, D. M. (1981). Chemical and biological processes controlling the response of a freshwater ecosystem to copper stress: A field study of the  $\text{CuSO}_4$  treatment of Mill Pond Reservoir, Burlington, Massachusetts. *Limnology and Oceanography*, 26, 518-531.

Meador, J.P. (1991) The interaction of pH, dissolved organic carbon, and total copper in the determination of ionic copper and toxicity. *Aquatic Toxicology*, 19, 13-32.

Oikari, A.; Kukkonen, J.; Virtanen, V. (1992) Acute toxicity of chemicals to *Daphnia Magna* in humic waters. *Science of the Total Environment*, 117/118, 367-377.

Porta, A.A. & Ronco, A.E. (1993) Cu(II) acute toxicity to the rotifer *Brachionus calyciflorus*, as affected by fulvic acids of freshwater origin. *Environmental Pollution*, 82, 263-267.

Rainbow, P.S. & Dallinger R. (1991) Accumulation and effects of trace metals in freshwater invertebrates. In: Dallinger R.; Rainbow P.S., editors. *Ecotoxicology of metal in invertebrates*. Boca Raton, FL: Lewis publishers. p. 119-131.

Rainbow, P.S. & Moore, P.G. (1986) Comparative metal analysis in amphipod crustaceans. *Hydrobiologia*, 141, 273-289.

Rainbow, P.S. & White, S.L. (1989) Comparative strategies of heavy metal accumulation by crustaceans: Zn, Cu, and Cd in a decapod, an amphipod and a barnacle. *Hydrobiologia*, 174, 245-262.

Reuter, J.H. & Perdue, E.M. (1977) Importance of heavy metal-organic matter interactions in natural waters. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 41, 325-334.

Rietlzer, A. (1998) Development time, reproduction and survival of *Diaphanosoma birgei* Korinek and *Ceriodaphnia silvestrii* Daday in food natural conditions. *Anais do VIII Seminário Regional de Ecologia*, 8, 1159-1171. (In Portuguese).

Saar, R.A. & Weber, J.H. (1982) Fulvic acid: modifier of metal-ion chemistry. *Environmental Science and Technology*, 16, 510A-517A.

Schubauer-Berigan, M.K.; Dierkes, J.R.; Monson, P.D. & Ankley, G.T. (1993) pH-dependent toxicity of Cd, Cu, Ni, Pb and Zn to *Ceriodaphnia dubia*, *Pimephales promelas*, *Hyalella azteca* and *Lumbriculus variegatus*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 12, 1261-1266.

Sunda, W. & Guillard, R.R.L. (1976) The relationship between cupric ion activity and the toxicity of copper to phytoplankton. *Journal of Marine Research*, 34, 511-529.

U.S. Environmental Protection Agency (1991) Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms. 4<sup>th</sup> ed. Edited by C.I. Weber. EPA-600/4-90/027.

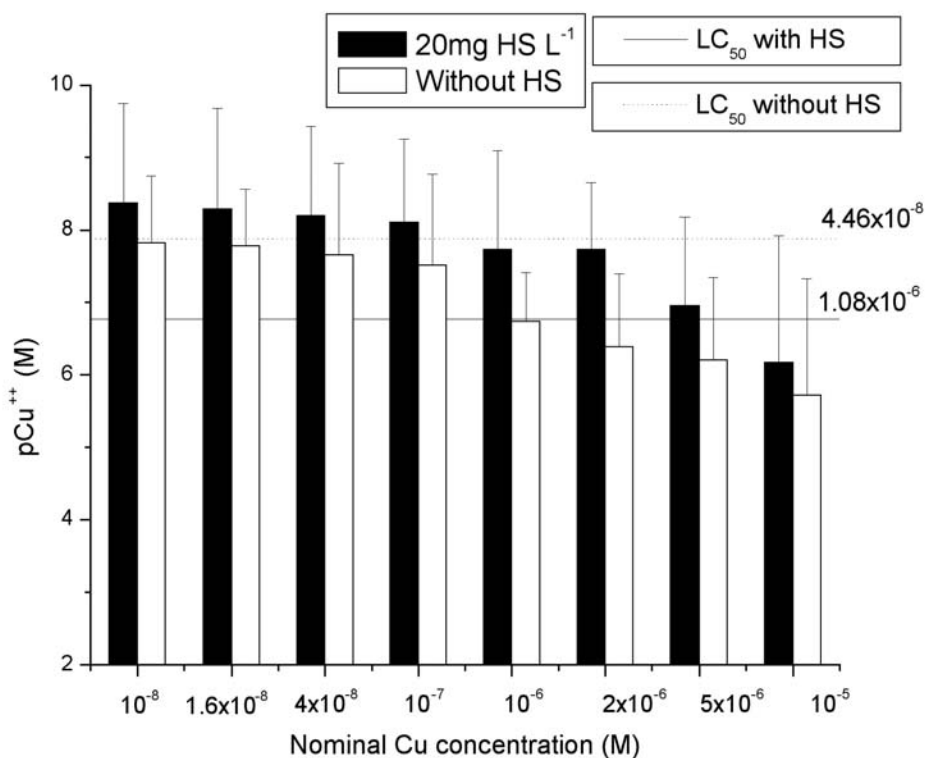
Wangersky, P.J. & Maass, R. (1991) Bioavailability: the organism as sensor. *Marine Chemistry*, 36, 199-213.

Wang, W. (1987) Factors affecting metal toxicity to (and bioaccumulation by) aquatic organisms – overview. *Environment International*, 13, 437-457.

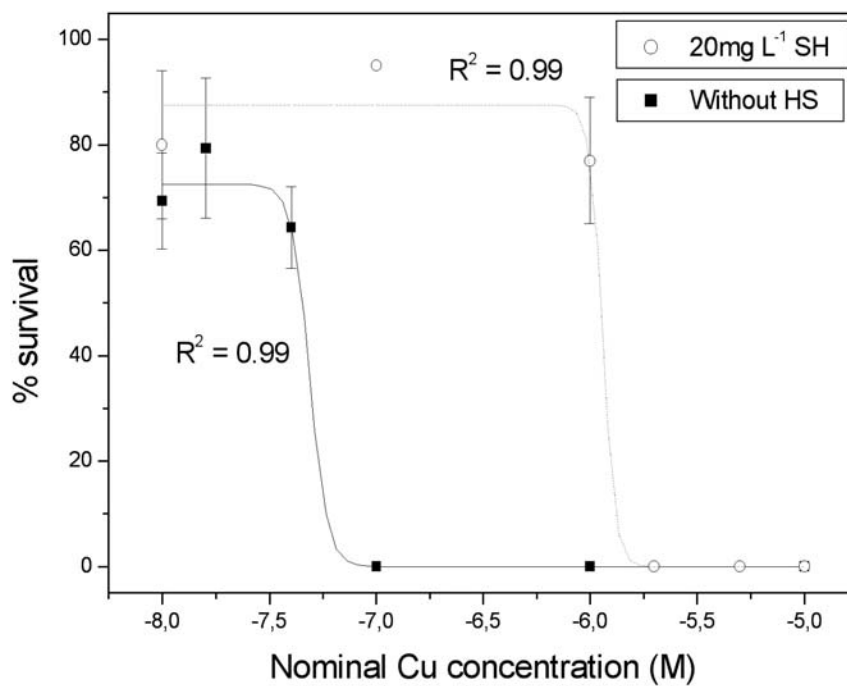
Winner, R.W. (1984) The toxicity and bioaccumulation of cadmium and copper as affected by humic acid. *Aquatic Toxicology*, 5, 267-274.

Winner, R.W. (1985) Bioaccumulation and toxicity of copper as affected by interactions between humic acid and water hardness. *Water Research*, 19, 449-455.

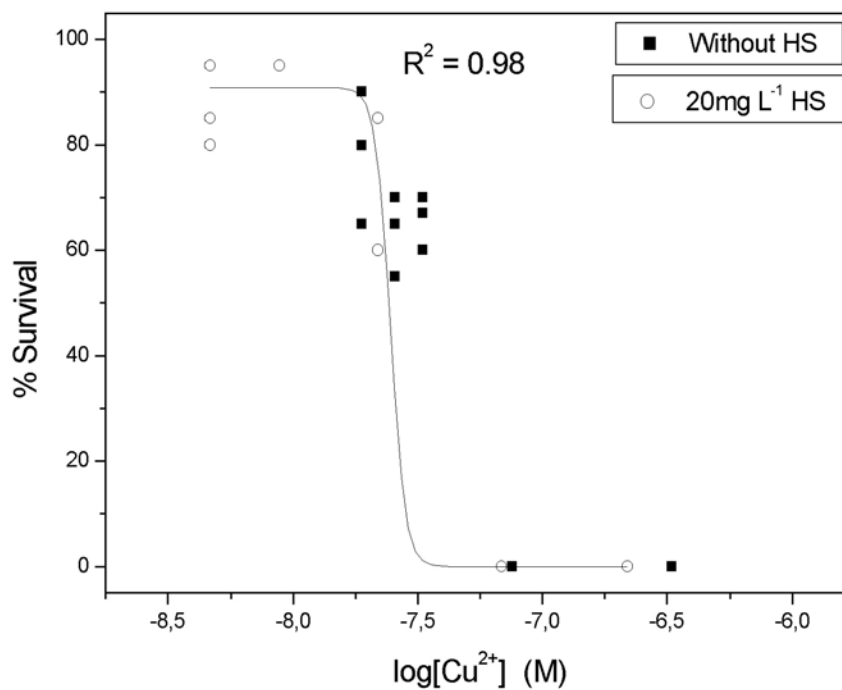
Zia, S. & Alikhan, M.A. (1989) Copper uptake and regulation in a copper-tolerant decapod *Cambarus bartoni* (Fabricius) (Decapoda, Crustacea). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 42, 103-110.



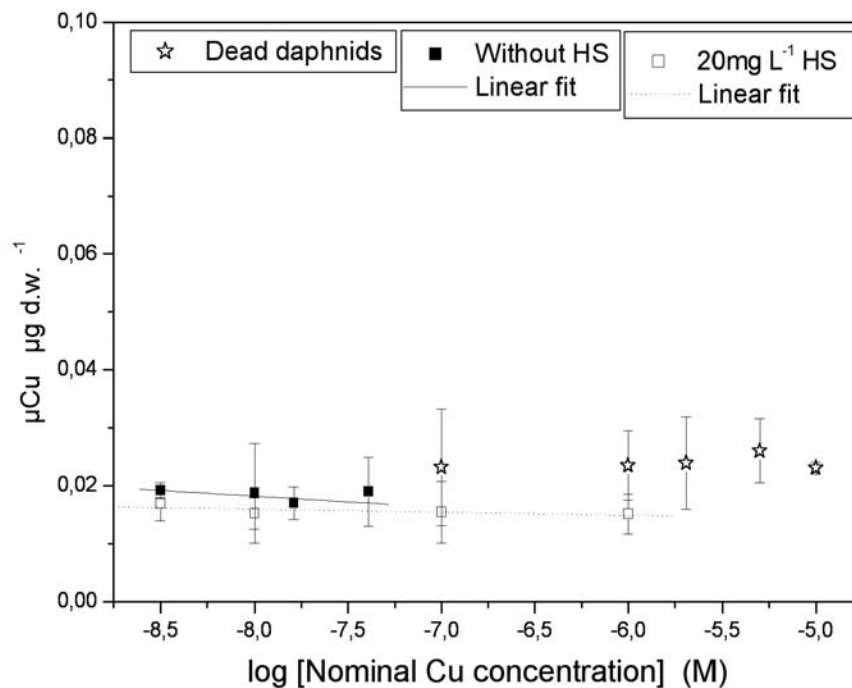
**FIGURE 1** – pCu<sup>++</sup> (-log free ion copper concentration, M) versus total (nominal) copper concentration in the test environment with 20mg L<sup>-1</sup> of humic substances (dark columns) and without humic substances (white columns). Horizontal lines represent average LC<sub>50</sub> values based on nominal copper concentrations obtained from toxicity tests performed without HS (dashed line) and with HS (straight line).



**FIGURE 2** – Survival rate (%) of *C. silvestrii* in relation to total nominal copper concentration (M), modified by presence of 20mg HS L<sup>-1</sup> (○) and absence of HS (■). Each value represents the mean and standard deviation of three replicates for 20 daphnids.



**FIGURE 3.** Effect of free copper ions concentration (M) on % survival of *C. silvestrii* in toxicity tests both in the presence and absence of humic substances (n = 33, R<sup>2</sup> = 0.98).



**FIGURE 4.** Mean body copper concentrations ( $\mu\text{Cu } \mu\text{g dry weight}^{-1}$ ) of *C. silvestrii* exposed to a range of nominal copper concentrations, both in the presence (white squares) and absence (dark squares) of humic substances. Each value represents the mean and standard deviation of three replicates for a variable numbers of live daphnids at the end of exposure time (24h) except for values represented by “★”, which show mean body copper concentrations in dead animals.



**TABLE 1.** LC<sub>50</sub> values (M) for *C. silvestrii* exposed to copper in U.S. EPA reconstituted water with 20mg HS L<sup>-1</sup> and without HS. LC<sub>50</sub> values were estimated based both on total copper concentration and on free Cu<sup>2+</sup> concentration. In parenthesis, values are given in µg L<sup>-1</sup>. 95% confidence limits (CL) are given only in µg L<sup>-1</sup>.

		20mg L <sup>-1</sup> HS	Without HS
Total copper	LC50	1.08 x 10 <sup>-6</sup> (185.02)	4.46 x 10 <sup>-8</sup> (7.62)
	95% CL	144.00 - 238.00	5.94 - 9.77
Free copper	LC50	2.84 x 10 <sup>-8</sup> (4.85)	3.31 x 10 <sup>-8</sup> (5.65)
	95% CL	4.24 - 5.54	5.31 - 6.02

TABLE 2 – Comparison of copper acute toxicity for some cladocerans.

Species	pH	Temp. (°C)	Water hardness (mg CaCO <sub>3</sub> L <sup>-1</sup> )	Exposure Time (h)	LC <sub>50</sub> (µg L <sup>-1</sup> )	T/F**	[DOM] (mg L <sup>-1</sup> )	References
<i>Ceriodaphnia silvestrii</i>	6.8	25	44.0	24	7.6	T	0	Present study
	6.8	25	44.0	24	185.0	T	20.0	
	6.8	25	44.0	24	5.65	F	0	
	6.8	25	44.0	24	4.85	F	20.0	
<i>D. pulex</i>	8.7	20	58.0	72	67.3	T	1.5	Winner (1985)
	8.6	20	58.0	72	25.9	T	0	
<i>Ceriodaphnia dubia</i>	8.0	25	85 ± 5	24	87.2	T	2.5	Kim <i>et al.</i> (1999)
	8.0	25	85 ± 5	24	190.0	T	10.0	
	8.0	25	85 ± 5	24	20.1	T	0	
<i>D. magna</i>	4.9	20	nd	48	7.0	T	0	Oikari <i>et al.</i> (1992)
	4.9	20	nd	48	45.0	T	~20.0	
<i>Simocephalus serrulatus</i>	6.1	21 - 24	nd	24	7.2	T	3.0	Giesy <i>et al.</i> (1983)
	6.1	21 - 24	nd	24	43.0	T	12.4	

\* LC50 values estimated based on total copper concentration (T) or on free copper ion concentration (F). nd: values not described by the authors

## 5. CONCLUSÕES GERAIS

Através do presente trabalho desenvolvido e descrito nesta dissertação de mestrado, é possível concluir que:

- *Scenedesmus bijugus* pode ser considerado um alimento de melhor qualidade, quando comparado a *Chlorella lacustris*, para o cladóceros *C. silvestrii* em culturas laboratoriais, através dos efeitos nas variáveis bionômicas mensuradas no presente estudo.
- Os dois alimentos testados modificaram a estratégia reprodutiva de *C. silvestrii*. Enquanto o alimento de melhor qualidade (*S. bijugus*) proporcionou uma primípara mais precoce e menor longevidade, o alimento de qualidade mais baixa (*C. lacustris*) ocasionou uma primípara mais tardia e uma maior longevidade.
- A adição de substâncias húmicas ao meio de cultivo artificial (água reconstituída) resultou em melhores valores de crescimento, reprodução e sobrevivência de *C. silvestrii*.
- A água de cultivo proveniente do ambiente natural de *C. silvestrii* provou ser mais adequada ao cultivo desta espécie que o meio de cultivo artificial (água reconstituída).
- aO aumento na dureza total da água reconstituída não foi capaz de torná-la mais adequada para o cultivo de *C. silvestrii*.
- A presença de substâncias húmicas é capaz de reduzir a concentração de íons livres de cobre no meio aquático.

- A presença de substâncias húmicas é capaz de reduzir a toxicidade aguda do metal cobre para *C. silvestrii*.
- A toxicidade aguda do metal cobre para *C. silvestrii* está diretamente relacionada com a concentração de íons livres de cobre no meio aquático.
- O presente estudo enfatiza a importância da consideração das substâncias húmicas quando da avaliação da toxicidade de metais em ambientes aquáticos naturais. A não consideração deste fator pode acarretar na super-estimativa das concentrações tóxicas, principalmente em ambientes eutrofizados (e ricos em MOD).
- Os resultados obtidos neste estudo sugerem que *C. silvestrii* apresenta como estratégia de acumulação de cobre a regulação, apresentando a mesma quantidade de cobre quando exposta a diferentes concentrações deste metal na água.
- A presença de substâncias húmicas no meio aquático parecem também não influenciar a bioacumulação de cobre por *C. silvestrii*. Em ambos os tratamentos, as concentrações do metal em *C. silvestrii* apresentaram-se similares.

## 6. REFERÊNCIAS

ABRANTES, N.; GONÇALVES, F. The dynamics of *Ceriodaphnia pulchella* (Cladocera) in laboratory. **Acta Oecologica**, v. 24, p. S245-S249. 2003.

ADEMA, D.M.M. *Daphnia magna* as a test animal in acute and chronic toxicity tests. **Hydrobiologia**, v. 59, n. 2, p. 125-134. 1978.

ALEXANDRE, G.A.L. & SZIKSZAY, M. O Comportamento Geoquímico do As, Cu, Pb e Zn em Solos com Culturas de Uvas, **Revista Brasileira de Toxicologia**, v. 12, n. 1, p. 6-13. 1999.

ALLEN, H.E.; HANSEN, D.J. The importance of trace metal speciation to water quality criteria. **Water Environment Research**, v. 68, n. 1, p.42-54. 1996.

ANDREW, R.W.; BIESINGER, K.E.; GLASS, G.E. Effects of inorganic complexing on the toxicity of copper to *Daphnia magna*. **Water Research**, v. 11, p. 309-315. 1977.

ARAMBASIC, M.B.; BJELI, S.; SUBAKOV, G. Acute toxicity of heavy metals (copper, lead, zinc), phenol and sodium on *Allium cepa* L., *Lepidium sativum* L. and *Daphnia magna* st.: comparative investigations and the practical applications. **Water Research**, v. 29, n. 2, p. 497-503. 1995.

ARNOLD, D.E. Ingestion, assimilation, survival, and reproduction by *Daphnia pulex* fed seven species of blue-green algae. **Limnology and Oceanography**, v. 16, n. 6, p. 906-920. 1971.

ASHLEY, J.T.F. Adsorption of Cu(II) and Zn(II) by estuarine, riverine and terrestrial humic acids. **Chemosphere**, v. 33, n. 11, p. 2175-2187, 1996.

BAT, L.; RAFFAELLI, D.; MARR, I.L. The accumulation of copper, zinc and cadmium by the amphipod *Corophium volutator* (Pallas). **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 223, n. 2, p. 167-184. 1998.

BENNET, J.C. & PLUM, F. **Tratado de medicina interna**. Vol. I. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara-Koogan. 1997. 1297p.

BORGMANN, U., NORWOOD, W.P., CLARK, C. Accumulation, regulation and toxicity of copper, zinc, lead and mercury in *Hyalella azteca*. **Hydrobiologia**, v. 259, p. 79-89. 1993.

BOTTRELL, H.H. Generation time, length of life, instar duration and frequency of moulting, and their relationship to temperature in eight species of Cladocera from the River Thames, Reading. **Oecologia**, v. 19, p. 129-140. 1975.

BOTTRELL, H.H.; DUNCAN, A., GLIWICS, Z.M., GRYGIEREK, E., HERZIG, A., HILLBRICHT-ILKOWSKA, A., KURASAWA, H., LARSSON, P., WEGLENSKA, T. A review of some problems in zooplankton production studies. **Norwegian Journal of Zoology**, v. 24, p. 419-456. 1976.

BOUDOU, A. & RIBEIRE, F. **Aquatic ecotoxicology**: Fundamental concepts and methodologies. Vol. II. Boca Raton, FL: CRC Press. 1989.

BRESNAHAN, W.T.; GRANT, C.L.; WEBER, J.H. Stability constants for the complexation of copper (II) ions with water and soil fulvic acids measured by an ion selective electrode. **Analytical Chemistry**, v. 50, n. 12, p. 1675-1679. 1978.

CAO, J.; LAM K.C.; DAWSON, R.W.; LIU, W.X. & TAO S. The effect of pH, ion strength and reactant content on the complexation of  $\text{Cu}^{+2}$  by

various natural organic ligands from water and soil in Hong Kong. **Chemosphere**, v. 54, p. 507-514. 2004.

DIAZ-CASTRO, J.G. & HARDY, E.R. Life history of *Moina micrura* (Kurz) fed with three algae species, in the laboratory. **Amazoniana**, v. 15, n. ½, p. 25-34. 1998.

ERIKSEN, R.S.; MACKEY, D.J.; VAN DAM, R.; NOWAK, B. Copper speciation and toxicity in Macquire Harbour, Tasmania: an investigation using a copper ion selective electrode. **Marine Chemistry**, v. 74, p. 99-113. 2001.

ESSER, H.O. A review of the correlation between physicochemical properties and bioaccumulation. **Pesticide Sciences**, v. 17, p. 265-276. 1986.

ESTEVEZ, F. A. **Fundamentos de limnologia**. 2ª Edição. Rio de Janeiro: Ed. Interciência, 1998. 602p.

EYSINK, G.J.; PADUA, H.B.; PIVA-BERTOLETTI, S.A.E.; MARTINS, M.C; PEREIRA, D.N. Metais pesados no Vale do Ribeira e em Iguape-Cananéia. **Ambiente**, v. 2, n. 1, p. 6-13. 1988.

FONSECA, A.L. A biologia das espécies *Daphnia laevis*, *Ceriodaphnia silvestrii* (Cladocera) e *Poecilia reticulata* (Poeciliidae) e o comportamento destes em testes de toxicidade aquática com efluentes industriais. São Carlos:EEESC/USP, 210p. (Dissertação). 1991.

FONSECA, A.L. The life cycle of *Ceriodaphnia silvestrii* (Daday 1902) and *Daphnia laevis* (Birge 1878) (Crustacea, Cladocera) reared under different pH conditions. **Verh. Internat. Verein. Limnol.**, v. 26, p. 1918-1921. 1998.

GAGNETEN, A.M. & VILA, L. Effects of  $\text{Cu}^{+2}$  and pH on the fitness of *Ceriodaphnia dubia* (Richard 1894) (Crustacea, Cladocera) in microcosm experiments. **Environmental Toxicology**, v. 16, n. 5, p. 428-438. 2001.

GIESY, J.P.; NEWELL, A. & LEVERSEE, G.J. Copper speciation in soft, acid, humic waters: effects on copper bioaccumulation by and toxicity to *Simocephalus serrulatus* (Daphnidae). **The Science of the Total Environment**, v. 28, p. 23-36. 1983.

GORBI, G.; CORRADI, M.G.; INVIDIA, M.; RIVARA, L.; BASSI, M. Is Cr(VI) toxicity to *Daphnia magna* modified by food availability or algal exudates? The hypothesis of a specific chromium/algae/exudates interaction. **Water Research**, v. 36, p. 1917-1926. 2002.

GOUVÊA, S.P.; VIEIRA, A.A.H.; & LOMBARDI, A.T. Cu and Cd complexation with HMWM of microalgae strains and of water from a eutrophic reservoir. **Hydrobiologia**, Em preparação.

GUILLARD R. R. L.; LORENZEN C. J. Yellow-green algae with chlorophyllide-c. **Journal of Phycology**, v. 8, p. 10-14. 1972.

GUNDERSEN, P. & STEINNES, E. Influence of pH and TOC concentration on Cu, Zn, Cd, and Al speciation in rivers. **Water Research**, v. 37, p. 307-318. 2003.

HAMILTON, M.A.; RUSSO, R.C.; THURSTON, R.V. Trimmed Spearman-Kärber method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. **Environmental Science and Technology**, v. 11, n. 7, p. 714-719. 1977. Correction, v. 12, n. 4, p.417. 1978.

HARDY, E.R., DUNCAN, A. Food concentration and temperature effects on life cycle characteristics of tropical cladocera (*Daphnia guessneri*,



*Diaphanosoma sarsi*, *Moina reticulata*). 1. Development time. **Acta Amazonica**, v. 24, n. ½, p. 119-134. 1994.

HATCHER, P.G.; SPIKER, E.C.; SZEREVENYI, E.M. & MACIEL, G.E. Selective preservation and origin of petroleum-forming aquatic kerogen. **Nature**, v. 305, p. 498-501. 1983.

HEATH, A. G. **Water pollution and fish physiology**. Boca Raton : CRC Press, 1995. 384p.

INFANTE, A. & LITT, A.H. Differences between two species of *Daphnia* in the use of 10 species of algae in Lake Washington. **Limnology and Oceanography**, v. 30, n. 5, p. 1053-1059. 1985.

JARDIM, W.; GIMENEZ, S.M.N. & NERY, J.H.S. The use of cupric buffers on the calibration of ion selective electrodes. **Anais V Simpósio Brasileiro Eletroquímica Eletroanalítica**, 226-230. 1986.

KIM, S.D.; MA, H.Z.; ALLEN, H.E.; CHA, D.K. Influence of dissolved organic matter on the toxicity of copper to *Ceriodaphnia dubia*: Effect of complexation kinetics. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 18, n. 11, p. 2433-2437. 1999.

KOIVISTO, S., KETOLA, M. Effects of copper on life-history traits of *Daphnia pulex* and *Bosmina longirostris*. **Aquatic Toxicology**, v. 32, p. 255-269. 1995.

KOIVISTO, S., KETOLA, M., WALLS, M. Comparison of five cladoceran species in short- and long-term copper exposure. **Hydrobiologia**, v. 248, p. 125-136, 1992.

LAWS, E.A. **Aquatic Pollution**: an introductory text. 3<sup>th</sup> Edition. New York: Interscience Publication, 2000.

LOMBARDI, A. T. E VIEIRA, A. A. H. Copper complexation by Cyanophyta and Chlorophyta exudates. **Phycologia**, v. 39, n. 2, p. 118-125. 2000.

LOMBARDI, A.T., VIEIRA, A.A.H., e SARTORI, A.L. Mucilaginous capsule adsorption and intracellular uptake of copper by *Kirchneriella aperta* (Chlorococcales). **Journal of Phycology**, v. 38, p. 332-337. 2002.

LORES, E.M., PENNOCK, J.R. The effect of salinity on binding of Cd, Cr, Cu and Zn to dissolved organic matter. **Chemosphere**, v. 37, n. 5, p. 861-874, 1998.

LORES, E.M., PENNOCK, J.R. Bioavailability and trophic transfer of humic-bound copper from bacteria to zooplankton. **Marine Ecology progress Series**, v. 187, p. 67-75, 1999.

LUNDSTEDT, L. & BRETT, M.T. Differential growth rates of three cladoceran species in response to mono- and mixed-algal cultures. **Limnology and Oceanography**, v. 36, n. 1, p. 159-165. 1991.

LUOMA, S.N. Bioavailability of trace metals to aquatic organisms: a review. **The Science of the Total Environment**, v. 28, p. 1-22, 1983.

MA, H.Z.; KIM, S.D.; CHA, D.K.; ALLEN, H.E. Effect of kinetics of complexation by humic acid on toxicity of copper to *Ceriodaphnia dubia*. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 18, n. 5, 828-837. 1999.

MASUNDIRE H.M. Mean individual dry-weight and length-weight regressions of some zooplankton of Lake Kariba. **Hydrobiologia**, v. 272, n.1-3, p. 231-238. 1994.

MATSUMURA-TUNDISI. **Tipologia de reservatórios do estado de São Paulo**: Ecologia do zooplâncton e do fitoplâncton. 1983. Relatório Técnico-Científico.

MEADOR, J.P. The interaction of pH, dissolved organic carbon, and total copper in the determination of ionic copper and toxicity. **Aquatic Toxicology**, v. 19, p. 13-32. 1991.

MOOR-LOUREIRO, L.M.A. **Manual de identificação de cladóceros límnicos tropicais do Brasil**. 1ª ed. Brasília: Ed. Universia, 1997. 156p.

MUNGER, C. AND HARE, L.; CRAIG, A.; CHAREST, P-M. Influence of exposure time on the distribution of cadmium within the cladocerans *Ceriodaphnia dubia*. **Aquatic Toxicology**, n. 44, p. 195-200. 1999.

ODUM, E.P. **Ecologia**. Rio de Janeiro : Ed. Guanabara-Koogan, 1983. 434pp.

OIKARI, A. et al Acute toxicity of chemicals to *Daphnia Magna* in humic waters. **Science of the Total Environment**, v. 117/118, p. 367-377, 1992.

O'KELLEY, J.C. Inorganic nutrients. In Stewart, W.D.P. (Ed.) **Algal physiology and biochemistry**. Oxford: Blackwell scientific Publications. 1974. 989p.

PORTA, A.A. & RONCO, A.E. Cu(II) acute toxicity to the rotifer *Brachionus calyciflorus*, as affected by fulvic acids of freshwater origin. **Environmental Pollution**, v. 82, p. 263-267. 1993.

RAINBOW, P.S. Trace metal concentrations in aquatic invertebrates: why and so what ? **Environmental Pollution**, v. 120, p. 497-507. 2002.

RAINBOW, P.S. & DALLINGER R. Accumulation and effects of trace metals in freshwater invertebrates. In: DALLINGER R.; RAINBOW P.S., editors. **Ecotoxicology of metal in invertebrates**. Boca Raton, FL: Lewis publishers. p. 119-131. 1991.

RAINBOW, P.S. & WHITE, S.L. Comparative strategies of heavy metal accumulation by crustaceans: Zn, Cu, and Cd in a decapod, an amphipod and a barnacle. **Hydrobiologia**, v. 174, p. 245-262. 1989.

REINFELDER, J.R.; FISHER, N.S.; LUOMA, S.N.; NICHOLS, J.W.; WANG, W.X. Trace element trophic transfer in aquatic organisms : A critique of the kinetic model approach. **The Science of the Total Environment**, v. 219, p. 117-135, 1998.

RICKLEFS, R.E. 1990. **Ecology**. 3<sup>th</sup> ed. W.H. Freeman and Company, New York. 896p.

RIETZLER, A. C. Tempo de desenvolvimento, reprodução e longevidade de *Diaphanosoma birgei* Korinek e *Ceriodaphnia silvestrii* Daday em condições naturais de alimentação. **Anais do VIII Seminário Regional de Ecologia**, v. 8, p. 1159-1171. 1998.

ROCHA, J.C. & ROSA, A.H. **Substâncias húmicas aquáticas** – Interação com espécies metálicas. Ed. Unesp, São Paulo, SP. 2003. 120pp.

SAAR, R.A. & WEBER, J.H. Fulvic acid: modifier of metal-ion chemistry. **Environmental Science and Technology**, v. 16, n. 9, p. 510A-517A. 1982.

SIPAÚBA-TAVARES, L.H. & ROCHA, O. Produção de plâncton (Fitoplâncton e Zooplâncton) para alimentação de organismos aquáticos. Rima Editora, São Carlos, SP. 2001. 106pp.

SJÖBLOM, A.; MEILI, M.; SUNDBOM, M. The influence of humic substances on the speciation and bioavailability of dissolved mercury and methylmercury, measured as uptake by *Chaoborus* larvae and loss by volatilization. **The Science of the Total Environment**, v. 261, p. 115-124, 2000.

STUIJFZAND, S.C.; JONKER, M.J.; VAN AMMELROOY, E.; ADMIRAAL, W. Species-specific responses to metals in organically enriched river water, with emphasis on effects of humic acids. **Environ. Pollution**, v. 106, p. 115-121, 1999.

SUNDA, W. & GUILLARD, R.R.L. The relationship between cupric ion activity and the toxicity of copper to phytoplankton. **Journal of Marine Research**, v. 34, n. 4, p. 511-529. 1976.

TWISS, M.R.; CAMPBELL, P.G.C.; AUCLAIR, J.C. Regeneration, recycling, and trophic transfer of trace metals by microbial food web organisms in the pelagic surface waters of Lake Erie. **Limnology and Oceanography**, v. 41, n. 7, p. 1425-1437, 1996.

U.S. Environmental Protection Agency. Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms. 4<sup>th</sup> ed. Edited by C.I. Weber. EPA-600/4-90/027. 1991.

VIJVERBERG, J. Culture techniques for studies on the growth, development and reproduction of copepods and cladocerans under laboratory and in situ conditions: a review. **Freshwater Biology**, v. 21, p. 317-373. 1989.

WANG, W. Factors affecting metal toxicity to (and accumulation by) aquatic organisms – overview. **Environment International**, v. 13, p. 437-457. 1987.

WETZEL, R.G. **Limnologia**. Lisboa: Ed. Fundação Calouste Gulbenkian, 1993. 905p.

WILSON, D.E. An equilibrium model describing the influence of humic materials on the speciation of  $\text{Cu}^{+2}$ ,  $\text{Zn}^{+2}$  and  $\text{Mn}^{+2}$  in freshwaters. **Limnology and Oceanography**, v. 23, n. 3, p. 499-507. 1978.

WINNER, R.W. The toxicity and bioaccumulation of cadmium and copper as affected by humic acid. **Aquatic Toxicology**, v. 5, p. 267-274. 1984.

WINNER, R.W. Bioaccumulation and toxicity of copper as affected by interactions between humic acid and water hardness. **Water Research**, v. 19, n. 4, p. 449-455. 1985.

WINNER, R.W.; FARRELL, M.P. Acute and chronic toxicity of copper to four species of *Daphnia*. **Journal of the Fisheries Research Board of Canada**, v. 33, p. 1685-1691. 1976.

WINNER, R.W. & GAUSS, J.D. Relationship between chronic toxicity and bioaccumulation of copper, cadmium and zinc as affected by water hardness and humic acid. **Aquatic toxicology**, v. 8, p. 149-161. 1986.

WOODWELL, G.M. Toxic substances and ecological cycles. **Scientific American**, v. 216, n. 3, p. 128-135, 1964.

WREN, C.D. & STEPHENSON, G.L. The effect of acidification on the accumulation and toxicity of metals to fresh-water invertebrates. **Environmental Pollution**, v. 71, n. 2-4, p. 205-241. 1991.

ZOU, E.; BU, S. Acute toxicity of copper, cadmium, and zinc to the water flea, *Moina irrasa* (Cladocera). **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 52, p. 742-748. 1994.