

## CAMBIOS EN LA VELOCIDAD DE NADO COMO INDICADOR DEL EFECTO TÓXICO DEL CADMIO EN *Astyanax fasciatus* y *Australoheros facetum*

B. L. EISSA<sup>1, 2</sup>, N. A. OSSANA<sup>1, 3</sup>, A. SALIBIÁN<sup>1, 2</sup>,  
L. FERRARI<sup>1, 2</sup> & R. H. PEREZ<sup>2</sup>

<sup>1</sup> PRODEA-INEDES, Univ. Nac. de Luján, CC 221, 6700-Luján.  
prodea@mail.unlu.edu.ar

<sup>2</sup> CIC Prov. Buenos Aires, 1900-La Plata, Argentina.

<sup>3</sup> CONICET

**ABSTRACT.** Numerous studies have shown that the swimming performance parameters of fish may be useful indicators of their environmental stress. The swimming speed was evaluated in two Pampean species and its alteration as a result of their exposure to sublethal Cadmium concentrations. The swimming speed was calculated from a daily registry of the distance and the time of displacement of fish by means of special software. Juveniles specimens of *Astyanax fasciatus* and *Australoheros facetum* were used in the assays; fish were acclimated during 7 days in aerated fresh-water (FW), at constant temperature ( $20 \pm 1^\circ\text{C}$ ) and photoperiod (12D:12N). The experimental design contemplated three successive periods: Control (4 days in FW), Exposure (4 days in FW + 0.3 and 0.5 mg Cd L<sup>-1</sup>) and Recovery (7 days in FW); simultaneously the speed of individuals maintained in FW during 15 days (CoP) was determined. The swimming speed in both species increased in the Exposure period. After transfer to clean media (Recovery period), the altered values in *A. facetum*, exhibited a slight tendency to recovery (but without reaching the basal values registered in the Control period). In *A. fasciatus* a clear cut recovery response was registered in fish exposed to 0.3 mg. L<sup>-1</sup> while in animals exposed to the highest concentration of Cd no recovery was registered. These differences were interpreted as evidences of dissimilar uptake and depuration rates of the toxic.

**Key words:** swimming speed, sublethal Cadmium, stress, *Astyanax fasciatus*, *Australoheros facetum*.

**Palabras clave:** velocidad de nado, Cadmio subletal, estrés, *Astyanax fasciatus*, *Australoheros facetum*.

### INTRODUCCIÓN

El Cd<sup>2+</sup> se encuentra entre los metales pesados hallados comúnmente en ecosistemas acuáticos perturbados por acción antrópica, habiendo adquirido gran importancia toxicológica (Kasuba y Rozgaj, 2000) y ecotoxicológica (Salibián, 2004; US EPA, 2007; WHO, 1992). Su toxicidad para los organismos acuáticos es muy varia-

ble aún entre especies filogenéticamente cercanas (US EPA, 1985, 2001); su susceptibilidad está relacionada con la especiación, en particular con la concentración del metal libre siendo numerosos los factores determinantes de la biodisponibilidad y bioconcentración (Erickson y col., 2008; Köck y Hofer, 1998; van der Oost y col., 2003).

Un efecto frecuentemente observado en los vertebrados expuestos al Cd es la hipocalcemia, la cual puede ser acompañada por hipermagnesemia. En los peces, ese efecto se atribuye a la inhibición de la captación branquial de  $\text{Ca}^{+2}$  (Wright y Welbourn, 1994) lo que se manifiesta en deformidades del esqueleto, aun con bajos niveles del tóxico en el medio. Además, el Cd afecta diversos sistemas enzimáticos relacionados con la neurotransmisión, transporte iónico transepitelial, metabolismo intermedio y la actividad de las oxidasas de función mixta (Almeida y col., 2001). En el hígado de peces intoxicados, induce la síntesis de metalotioneínas que son proteínas involucradas en su homeostasis y desintoxicación (Fernandes y col., 2008); también se han observado alteraciones en su actividad natatoria y en sus preferencias y distribuciones espaciales (Eissa y col., 2006 a, b).

En los teleósteos en particular el comportamiento es un bioindicador de exposición en estudios ecotoxicológicos de estrés subletal, ya que constituye un modelo ecológicamente relevante, cuyas respuestas son cuantificables y observables precozmente, a veces aún antes de la de biomarcadores bioquímicos (Scott y Sloman, 2004). Los bioensayos de toxicidad realizados con peces cuyos puntos finales son parámetros etológicos permiten determinar si un estresor ambiental provoca un cambio adverso que excede el rango normal de variabilidad tolerada (u homeostasis) que puede afectar algún aspecto fisiológico crítico (supervivencia, crecimiento, reproducción, etc.) (Gilmour y col., 2005).

La *performance* del comportamiento natatorio normal de los peces resulta de una secuencia de eventos fisiológicos específicos, los cuales son activados por estímulos externos que actúan en un par de neuronas ubicadas en el bulbo raquídeo denominadas *Neuronas Gigantes de Mauthner* (sólo presentes en peces), que son responsables de la coordinación de los movi-

mientos natatorios y del reflejo de huida (Hill y col., 2004). Es probable que la interrupción de esas secuencias por acción del Cd explique algunas de las alteraciones etológicas mencionadas (Grue y col., 2002).

Entre las diferentes *performances* de nado pueden ser descritas cuantitativamente, se halla la *velocidad de nado* crítica (Kolok y col., 1998; Nelson y col., 2002; Plaut, 2001;). El objetivo de este trabajo fue evaluar en condiciones de laboratorio, el efecto de dos concentraciones subletales de Cd sobre ese parámetro en dos teleósteos autóctonos, ampliamente distribuidos en la Pampa Húmeda.

## MATERIALES Y METODOS

### a) *Organismos test:*

Los bioensayos se llevaron a cabo con ejemplares juveniles de *Astyanax fasciatus* (1.0-1.1 g; longitud total 3.2-3.4 cm) (N = 22) y *Australoheros facetum* (1.3-1.6 g; 3.4-3.6 cm) (N = 31). Los peces fueron recolectados de ambientes libres de contaminación antropogénica y fueron mantenidos en laboratorio no menos de 30 días, a temperatura y fotoperíodo constantes, con flujo abierto continuo de agua potable aireada y alimentación *ad libitum*.

### b) *Equipo experimental:*

Se utilizó un equipo basado en el descrito por Shirer y col (1968) (Eissa y col., 2005); el mismo estuvo constituido por un conjunto de acuarios de vidrio de 20 (ancho) x 40 (largo) x 30 (alto) cm, en cuyo exterior se fijaron 40 sensores infrarrojos, que emiten señales con una frecuencia de  $1 \text{ seg}^{-1}$  y permiten el registro de la ubicación espacial de los peces mediante coordenadas. La información se almacenó en una computadora dotada de un sistema de adquisición de datos y recolectada en un *software* desarrollado especialmente (Jonas 10.1).

c) *Diseño experimental:*

Las condiciones ambientales fueron constantes en todos los ensayos: fotoperíodo de 12D:12N, temperatura en los acuarios de  $21 \pm 2^\circ \text{C}$  y aireación permanente. El volumen de los medios contenidos en los acuarios fue de 20-24 L. El flujo fue continuo (*flow through*) a una velocidad de 20-25 ml.  $\text{min}^{-1}$ , regulado mediante una bomba peristáltica multicanal Cole Palmer y controlado diariamente.

Los peces seleccionados del "stock" se pesaron y fueron colocados individualmente en cada acuario; se les administró alimento para peces "Tetra Animin", de la siguiente composición (g/100g): Hidratos de carbono: 30,0; Proteínas: 42,7; Lípidos: 10,5; Cenizas: 10,5; Humedad: 6,3.

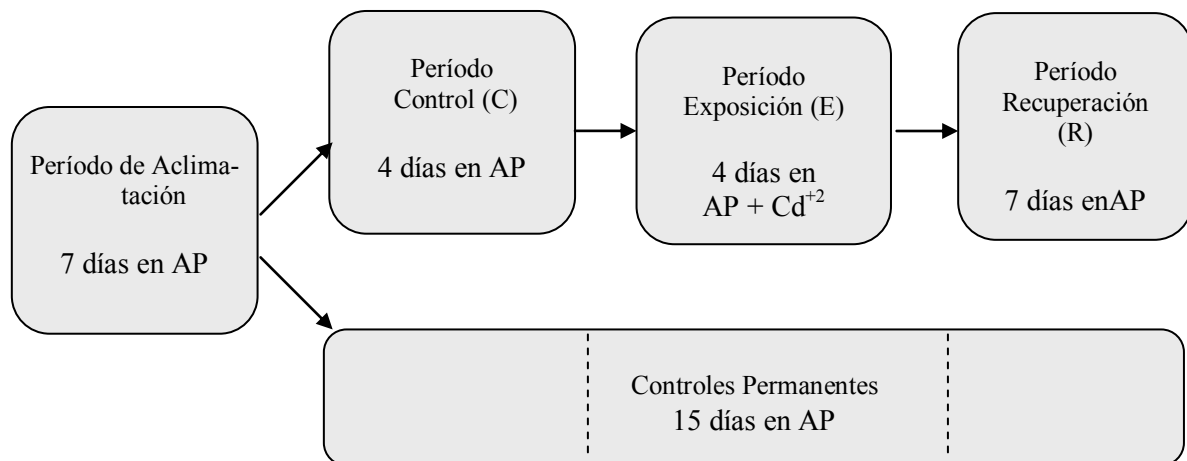
Cada experimento se inició con un período de *Aclimatación* [7 días en agua potable (AP) y alimentación *ad libitum*]. Luego siguió una fase de tres períodos sucesivos: 1) *Control* [C]: 4 días en AP; 2) *Exposición* [E]: 4 días en solución de  $\text{Cl}_2\text{Cd}$  (0.3 y 0.5 mg Cd  $\text{L}^{-1}$  como Cl-) en AP; 3) *Recuperación* [R]: 7 días en AP. De esta forma cada animal

fue control de sí mismo. En todos los casos se corrió en paralelo un segundo Control (*Control Permanente* [CoP]) "externo" en el cual un espécimen permaneció en forma continua durante 15 días (tiempo equivalente a C + E + R) en AP. Durante los ensayos el alimento ofrecido a los peces fue equivalente al 2% de su peso corporal inicial.

En la Figura 1 se representa esquemáticamente el protocolo descrito.

En los períodos C, E y R (en sus paralelos en la serie CoP) se realizaron registros focales diarios de 4 horas (de 10 a 14); esta modalidad se adoptó para obviar el efecto de las variaciones circadianas de la velocidad (Cazenave y col., 2008; Weber y Spieler, 1994).

El cálculo de la velocidad se efectuó a partir del registro diario de la distancia y el tiempo de desplazamiento de los animales mediante el *software* mencionado. El mismo brinda la posición del animal y la hora, con lo cual se puede conocer entre qué puntos se desplazó y el tiempo que requirió para ello.



**Figura 1:** Diagrama del diseño experimental utilizado.

Se calcularon:

- 1) la *distancia media de recorrido* (cm), como promedio de las distancias parciales, según la fórmula:

$$dn - m = \sqrt{(Xn - Xm)^2 + (Yn - Ym)^2}$$

- y 2) la *velocidad media de natación* (cm.s<sup>-1</sup>) aplicando la fórmula siguiente:

$$V = \frac{dn - m}{dt}$$

donde: *n*, punto de partida; *m*, punto de llegada; *X*, posición horizontal (abscisas); *Y*, posición vertical (ordenada); *t*, tiempo.

- d) *Métodos químico-analíticos:*

Diariamente se tomaron muestras de los medios de cada acuario; en ellas se determinaron oxígeno disuelto (OD), dureza total, pH, temperatura y concentración de Cadmio; en este último caso las muestras se acidificaron con HNO<sub>3</sub> (pH ≤ 2). El OD se midió mediante la técnica de Winkler, la dureza total con un *kit* de reactivos Merck (108039), el pH en un equipo digital Orion 701 A y la concentración de Cd<sup>2+</sup> total por espectrometría de absorción atómica.

- e) *Análisis estadísticos:*

Para evaluar las diferencias entre los resultados correspondientes a los períodos experimentales se utilizó ANOVA de un factor para muestras pareadas. El supuesto de normalidad se probó con el *test* de Kolmogorov-Smirnov y el de homogeneidad de varianzas con el de Bartlett (Zar, 1996). Los análisis estadísticos se realizaron con el programa InfoStat para Windows.

## RESULTADOS

- a) *Parámetros fisicoquímicos:*

Los valores que se indican son medias ± ESM, para el total de las determinaciones efectuadas (indicado entre paréntesis) con excepción del Cd, que corresponde a los valores efectivos registrados durante el período de exposición. Los resultados fueron: pH 8,53 ± 0,02 (n = 107); dureza total (mM CO<sub>3</sub>Ca.L<sup>-1</sup>) 0,76 ± 0,01 (n = 63); OD (mg.L<sup>-1</sup>) 7,74 ± 0,12 (n = 76); Cadmio efectivo (mg.L<sup>-1</sup>) durante Exposición 0,28 ± 0,01 (116) y 0,48 ± 0,01 (n = 55). En los períodos Control y Recuperación se registró <0,02 mg Cd. L<sup>-1</sup> (n = 119).

- b) *Velocidad media de nado:*

En la Tabla 1 se muestran los valores de velocidad media de *Australoheros facetum*. No se registraron variaciones significativas en la *velocidad media* durante todo el tiempo de ensayo en el grupo CoP ni en el expuesto a 0.3 mg .L<sup>-1</sup>. En cambio, hubieron aumentos estadísticamente significativos respecto de los Controles en los peces Expuestos a 0,5 mg.L<sup>-1</sup>. En los períodos de Recuperación se apreció una tendencia incipiente al retorno a los valores Control.

En la Tabla 2 se presentan los valores determinados en *Astyanax fasciatus*. No se observaron cambios significativos en el grupo CoP; el análisis estadístico mostró aumentos importantes y significativos entre Controles y Expuestos a las dos concentraciones del metal. En el período de Recuperación la velocidad retornó a los valores basales en las mojarra expuestas a 0.3 mg. L<sup>-1</sup>, mientras que en las de 0,5 mg. L<sup>-1</sup> hubo una reducción sólo parcial de la velocidad registrada en el período Exposición.

**Tabla 1.** Velocidad media de nado ( $\text{cm. s}^{-1}$ ) durante el registro de 4 horas de *Australoheros facetum*. Valores promedio  $\pm$  ESM; entre paréntesis, número de peces. El asterisco indica diferencias significativas entre períodos experimentales.

[mg Cd <sup>2+</sup> .L <sup>-1</sup> ]	Período experimental		
	Control	Exposición	Recuperación
0.0 (CoP)	6,5 $\pm$ 1,21 (N=9)	5,0 $\pm$ 0,55 (N=9)	4,39 $\pm$ 0,81 (N=9)
0.3	4,1 $\pm$ 0,30 (N=15)	5,9 $\pm$ 0,30 (N=15)	5,7 $\pm$ 0,10 (N=15)
0.5	3,9 $\pm$ 0,04 (N=7)	7,9 $\pm$ 0,01 (N=7)*	6,5 $\pm$ 0,02 (N=7)

**Tabla 2.** Velocidad media ( $\text{cm/s}$ ) durante el registro de 4 horas de *Astyanax fasciatus*. Valores promedio  $\pm$  ESM; entre paréntesis, número de peces. Los asteriscos indican diferencias significativas entre períodos experimentales.

[mg Cd <sup>2+</sup> .L <sup>-1</sup> ]	Período experimental		
	Control	Exposición	Recuperación
0.0 (CoP)	7,4 $\pm$ 0,41 (N=6)	7,0 $\pm$ 1,07 (N=6)	7,2 $\pm$ 1,16 (N=6)
0.3	7,6 $\pm$ 0,12 (N=9)	12,0 $\pm$ 0,10 (N=9)*	7,2 $\pm$ 0,14 (N=9)
0.5	8,0 $\pm$ 0,16 (N=7)	13,1 $\pm$ 0,16 (N=7)*	12,1 $\pm$ 0,21 (N=7)*

## DISCUSIÓN

*Australoheros facetum* (chanchita) es una especie sudamericana que presenta hábitos más bien sedentarios. *Astyanax fasciatus* es la mojarra más común en toda el área platense; se la encuentra en aguas mansas de arroyos y ríos, y en ambientes cerrados (López y col., 2005). Ello ofrece la posibilidad de extender los estudios comparativos a los efectos del metal en especies nativas de hábitos disímiles. Las dos especies se adaptan fácilmente a las condiciones de cautiverio propias de los ensayos de laboratorio.

Los estudios referentes a la locomoción de especies de la ictiofauna de nuestro país no son muchos; entre ellos merecen citarse los trabajos de Trenti y col. (1999) que determinaron en *Corydoras paleatus*, *Jenynsia lineata* y *Cnesterodon decemmaculatus* la capacidad de natación, sobre la base del tiempo de fatiga o de arrastre, concluyendo que *J. lineata* es la más veloz. Gómez y col (2003) encontraron

para *A. facetum* una relación positiva y significativa entre la longitud estándar o el peso corporal y el tiempo de arrastre. Los autores concluyeron que *A. facetum* es un especialista para maniobrar en ambientes estructuralmente complejos con cierta capacidad de aceleración. Más recientemente, Gómez y González Naya (2005) hallaron para esa especie una velocidad máxima de natación que, para ejemplares de tamaño comparable a los nuestros, osciló alrededor de 15.5  $\text{cm.s}^{-1}$ . Los valores determinados con el método que desarrollamos nosotros son comparables con aquellos, pero fueron menores.

En nuestro caso los registros de la velocidad de los peces CoP (Tablas 1 y 2) mostraron en las dos especies estudiadas una notable estabilidad temporal, aunque con valores diferentes para cada una, siendo en promedio la de *A. fasciatus* aproximadamente 35 % mayor que la de *A. facetum*. En ambas especies se observó un aumento de la velocidad de natación en el período de Exposición al Cd que osciló entre

44-103 % (*A. facetum*) y 58-64 % (*A. fasciatus*); los aumentos fueron mayores en los peces expuestos a 0.5 mg Cd. L<sup>-1</sup>.

En las mojaras las velocidades alteradas por el metal mostraron en el período de Recuperación una reversibilidad casi total hasta alcanzar los valores basales del período Control; en cambio en las chanchitas no se observó esa respuesta a pesar de que la permanencia en medio limpio (AP) se extendió por el doble de tiempo de Exposición al Cd, posiblemente debido a un mayor grado de estrés.

Estas diferencias en la velocidad de los animales cuando se los expone al Cadmio muestra un comportamiento cuya interpretación global es compleja y resultante de una respuesta integrada al estrés. Una de las causas de la reacción diferencial entre ambas especies podría vincularse con la morfología hidrodinámica y otra podría estar asociada a diferencias en las cinéticas de los mecanismos de captación y depuración del metal. Cazenave y col (2008) encontraron que los cambios observados en la natación de *Jenynsia multidentata* expuesta a microcistina, podrían ser evidencia de neurotoxicidad y de una redistribución energética. También podemos citar el trabajo de Grillitsch y col. (1999) que asociaron los cambios en la velocidad de nado de *Brachydanio rerio* expuestos a Cadmio a efectos directos (neurotoxicidad) e indirectos (disrupción de la respiración branquial y de la regulación osmótica) del metal. A este respecto es interesante mencionar resultados recientes que pusieron en evidencia que la exposición durante 96 h a medios conteniendo 0.3 mg Cd. L<sup>-1</sup> provoca de las mismas especies severas alteraciones estructurales en el epitelio branquial (Ferrari y col., 2009).

Se sabe que la actividad de organismos acuáticos ectotérmicos puede estar afectada por una serie de factores abióticos (temperatura, oxígeno disuelto, salinidad, dureza, pH) (Vogl y col., 1999). Teniendo en cuenta que en

nuestros ensayos las variables ambientales fueron controladas y estables en todos los períodos, los cambios observados en la velocidad de nado pueden ser interpretados como respuestas compensatorias de los peces al estrés atribuible a las concentraciones subletales de Cd.

Por último, se confirma que las especies nativas utilizadas pueden ser consideradas aptas para su utilización en bioensayos de toxicidad con puntos finales conductuales, pudiendo ser incorporados a la batería de tests de evaluación de calidad ecotoxicológica de cuerpos de agua continentales.

## AGRADECIMIENTOS

A la CIC-Prov. de Bs. As., a la Universidad Nacional de Luján y a Paula González.

## BIBLIOGRAFÍA

- Almeida, J. A., Novelli, E. L. B., Dal Pai Silva, M., Alves Junior, R.** (2001) Environmental cadmium exposure and metabolic responses of the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. Environ Pollut 114: 169-175
- Cazenave, J., Nores, M. L., Miceli, M., Díaz, M. P., Wunderlin, D. A., Bistoni, M. A.** (2008) Changes in the swimming activity and glutathione S-transferase activity of *Jenynsia multidentata* fed with microcystin-RR. Wat Res 42: 1299-1307.
- Eissa, B. L., Salibián, A., Ferrari, L., Borgnia, M.** (2005). Estudios sobre los efectos etológicos del Cadmio. En: *Anales de la Fundación Alberto J. Roemmers*, Volumen XVI, pp. 435-443.
- Eissa, B. L., Ferrari, L., Ossana, N. A., Salibián, A.** (2006a) Biomarcadores etológicos no invasivos de estrés ambiental: estudio comparativo en dos teleósteos de ecosistemas de la región pampeana argen-

- tina. *Revista de Toxicología (España)* 23: 11-16.
- Eissa, B. L., Salibián, A., Ferrari L.** (2006b) Behavioral alterations in juvenile *Cyprinus carpio* exposed to sublethal waterborne cadmium. *Bull Environ Contam Toxicol* 77: 931-937.
- Erickson, R. J., Nichols, J. W., Cook, P. M., Ankley, G. T.** (2008) Bioavailability of Chemical Contaminants in Aquatic Systems. En: Di Giulio RT, Hinton DE (eds), *The Toxicology of Fishes*. CRC Press, Boca Raton Fl. Pp.9-54.
- Fernandes, D., Bebianno, M. J., Porte, C.** (2008) Hepatic levels of metal and metallothioneins in two commercial fish species of the Northern Iberian shelf. *Sci Total Environ* 391: 159-167.
- Ferrari, L., Eissa, B. L., Ossana, N. A., Salibián, A.** (2009) Effects of sublethal waterborne Cadmium on gills in three teleostean species: scanning electron microscope study. *Int J Environ Health* 3: 410-426.
- Gilmour, K. M., Wilson, R. W., Slobman, K. A.** (2005). The integration of behaviour into Comparative Physiology. *Physiol Biochem Zool* 78: 669-678.
- Gómez, S., González Naya, J., Giusto, A.** (2003) Velocidad de natación de un especialista en maniobra, *Cichlasoma facetum* (Jenyns) (Pisces, Cichlidae) en condiciones experimentales. *Rev Mus Arg Cienc Nat* 5: 87-92.
- Gómez, S. E., González Naya, J.** (2005) Nuevos datos experimentales sobre la velocidad de natación de *Cichlasoma facetum* (Pisces, Cichlidae). *Rev Asoc Colomb Ictiol* 8: 19-23.
- Grillitsch, B., Vogl, C., Wytek, R.** (1999) Qualification of spontaneous indirected locomotor behaviour of fish for sublethal toxicity testing. Part II. Variability of measurement parameters under toxicant-induced stress. *Environ Toxicol Chem* 18: 2743-2750.
- Grue, C. E., Gardner, S. C., Gilbert, P. L.** (2002). On the significance of pollutant-induced alterations in the behaviour of fish and wildlife. In: Dell'Omo G (ed), *Behavioural Ecotoxicology*. Wiley, UK. Pp. 1-90.
- Hill, R. W., Wyse, G. A., Anderson, M.** (2004) *Fisiología Animal*. Ed. Médica Panamericana. Madrid.
- Kasuba, V., Rozgaj, J.** (2000). Biological effects of Cadmium. *Period. Biol.* 102: 365-371.
- Köck, G., Hofer, R.** (1998) Origin of Cadmium and Lead in clear softwater lakes of high-altitude and high-latitude, and their bioavailability and toxicity to fish. In: Braunbeck T, Hinton DE, Streit B (Eds), *Fish Ecotoxicology*. Birkhäuser Verlag, Basel. Pp 225-257.
- Kolok, A. S., Plaisance, E. P., Abdelghani, A.** (1998) Individual variation in the swimming performance of fishes: an overlooked source of variation in toxicity studies. *Environ Toxicol Chem* 17: 282-285.
- López, H. L., Menni, R. C., Cuello, M. V., Ponte Gómez, J.** (2005) Bibliografía de los peces de agua dulce de la Argentina. Suplemento 2003-2004. ProBiota – Serie Técnica y Didáctica N°7.
- Nelson, J. A., Gotwalt, P. S., Reidy, S. P., Webber, D. M.** (2002) Beyond Ucrit: matching swimming performance test to the physiological ecology of the animal, including a new fish "drag strip". *Comp Biochem Physiol* 133A: 289-302.
- Plaut, I.** (2001) Critical swimming speed: its ecological relevance. *Comp Biochem Physiol* 131A: 41-50.
- Salibián, A.** (2004) El Cadmio en el medio acuático. En: Malacalza L (Ed), *Ecología y Ambiente*. Instituto de Ecología de Luján. Pp. 135-139.
- Scott, G. S., Slobman, K. A.** (2004). The effects of environmental pollutants on complex fish behavior: integrating behavioral and physiologi-

- cal indicators of toxicity. *Aquat Toxicol* 38: 369-392.
- Shirer, H., Cairns, J., Waller, W.** (1968). A simple apparatus for measuring activity patterns of fishes. *Water Res Bull* 4:27-43.
- Trenti, P. S., Gómez, S. E., Ferriz, R. A.** (1999) Capacidad de natación en tres peces pampásicos. *APRONA* 13: 2-9.
- US EPA** (1985) Ambient water quality criteria for Cadmium. National Technical Information Service, Virginia. EPA 440/5-84-032.
- US EPA** (2001) Update of ambient water quality criteria for Cadmium. US EPA Office of Water, Washington, DC. EPA 8222-R-01-001.
- US EPA** (2007) Framework for Metals Risk Assessment. Office of the Science Advisor. Risk Assessment Forum. EPA 120/R-07/001.
- van der Oost, R., Beyer, J., Vermeulen, N. P. E.** (2003). Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental assessment: a review. *Environ Toxicol Pharmacol* 13: 57-149.
- Vogl, C., Grillitsch, B., Wytek, R., Hunrich Spieser, O., Scholz, W.** (1999) Qualification of spontaneous undirected locomotor behavior of fish for sublethal toxicity testing. Part I. Variability of measurement parameters under general test conditions. *Environ Toxicol Chem* 18, 2736-2742.
- Weber, D. N., Spieler, R. E.** (1994) Behavioral mechanisms of metal toxicity in fishes. En: Malins DC, Ostrander GK (eds), *Aquatic Toxicology: Molecular, Biochemical and Cellular perspectives*. Lewis, Boca Raton FL. Pp. 427-467.
- WHO** (1992). *Environmental Health Criteria 135: Cadmium - Environmental aspects*, Geneva.
- Wright, D. A., Welbourn, P. M.** (1994) Cadmium in the aquatic environment: a review of ecological, physiological, and toxicological effects on biota. *Environ. Rev* 2: 187-214
- Zar, J.H.** (1996). *Biostatistical Analysis*. Upper Saddle River, NJ: Prentice Hall.