



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

ALTERACIONES PRODUCIDAS POR EL
NITRITO EN LA CARPA HERBIVORA

Ctenopharyngodon idella.

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE
DOCTOR EN CIENCIAS (BIOLOGIA)

p r e s e n t a

GUILLERMINA ALCARAZ ZUBELDIA

Director de Tesis: Dra. Sonia Sofía Espino Aguilera

MEXICO, D. F.

1993

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

CONTENIDO

RESUMEN

ABSTRACT

INTRODUCCION	1
OBJETIVOS	15
MATERIALES Y METODOS	17
I. CAPTURA Y MANTENIMIENTO	17
II. ACLIMATACION	18
III. FASE EXPERIMENTAL	18
A) PRUEBAS DE TOXICIDAD	18
B) EFECTO DEL CLORURO EN PECES EXPUESTOS AL NITRITO	21
C) RESPUESTA RESPIRATORIA	22
D) PARAMETROS SANGUINEOS	24
E) EXPOSICIONES CRONICAS	25
a) INGESTION (I)	26
b) HECES (H)	27
c) EFICIENCIA DE ASIMILACION Y ASIMILACION	27
d) CONSUMO DE OXIGENO (R)	28
e) EXCRECION NITROGENADA (N)	28
f) CAMPO DE CRECIMIENTO (P)	29
g) ANALISIS ESTADISTICO	29

RESULTADOS Y DISCUSION	31
A) PRUEBAS DE TOXICIDAD (CL50-96h)	32
B) EFECTO DEL CLORURO EN PECES EXPUESTOS AL NITRITO	39
a) MORTALIDAD	39
b) RESPIRACION	46
C) PARAMETROS SANGUINEOS	57
a) NITRITO PLASMATICO	57
b) CLORURO PLASMATICO	62
c) EFECTO DEL CLORURO SOBRE LA ACUMULACION DE NITRITO	64
D) EXPOSICIONES CRONICAS (CAMPO DE CRECIMIENTO)	67
1) SOBREVIVENCIA	67
2) CAMPO DE CRECIMIENTO	68
a) INGESTION	68
b) EFICIENCIA DE ASIMILACION Y ASIMILACION	70
c) RESPIRACION	74
d) EXCRECION NITROGENADA (N)	80
e) CAMPO DE CRECIMIENTO (P)	84
3) EFICIENCIAS DE CRECIMIENTO BRUTA Y NETA	87
INTEGRACION Y CONCLUSIONES	91
LITERATURA CITADA	98
AGRADECIMIENTOS	115

RESUMEN

El nitrito es un contaminante endógeno, intermediario del proceso de nitrificación, cuya acumulación en el medio puede causar alteraciones críticas en el estado fisiológico de los peces, así como en la sobrevivencia de los mismos. En este estudio, los peces más pequeños fueron más sensibles al nitrito que los mayores, lo cual aunado al efecto protector de la temperatura, permitió suponer que la eficiencia de detoxificación de los juveniles de C. idella se incrementa con la talla de los peces.

En las carpas expuestas por 96 horas al contaminante, la presencia de cloruro disminuyó la toxicidad del nitrito, al disminuir la acumulación de éste en el plasma y con ello la mortalidad de las carpas. Asimismo, la modificación de la respuesta respiratoria de los juveniles de C. idella en las diferentes razones de cloruro/nitrito permitieron demostrar que el efecto tóxico del contaminante se atribuye a la proporción relativa de ambos iones, más que a la acción individual del nitrito.

Las respuestas de ingestión, de asimilación, de respiración y de excreción nitrogenada, obtenidas en organismos expuestos a nitrito durante dos semanas, se integraron en el campo de crecimiento. En esta fase experimental, se observó que aunque los valores más altos del campo de crecimiento se registraron en 32 °C, las bajas eficiencias de crecimiento (K_1 y K_2) y de asimilación en esta condición, son reflejo del estrés producido por el contaminante.

La comparación de las respuestas fisiológicas de las carpas expuestas a corto (96 h) y mediano plazo (2 semanas), así como la evaluación del daño producido por el nitrito a través de la integración de varias respuestas indicadoras de estrés, permitió profundizar en el conocimiento del efecto producido por el nitrito en los juveniles de la carpa herbívora.

ABSTRACT

Nitrite is an intermediary compound of nitrification process. However, in disturbed aquatic systems nitrite can be accumulated and can be responsible for mortality or critical alterations in freshwater fishes.

In this study the smaller juveniles of grass carp, Ctenopharyngodon idella were more sensitive to nitrite than the bigger ones; this results and the protective effect of temperature indicated that the efficiency of detoxification system of C. idella increases with fish weight.

In the carps exposed 96 h to nitrite, the increase of chloride concentration decrease the nitrite toxicity. When chloride was added to aquaria the nitrite accumulation in plasma of C. idella decreased, and so the mortality of carps. In the same sense, the modification of respiratory response of juveniles of grass carp exposed to different combination of nitrite and chloride indicated that the toxic effect of nitrite was attributed to the chloride/nitrite ratio more than the single action of nitrite.

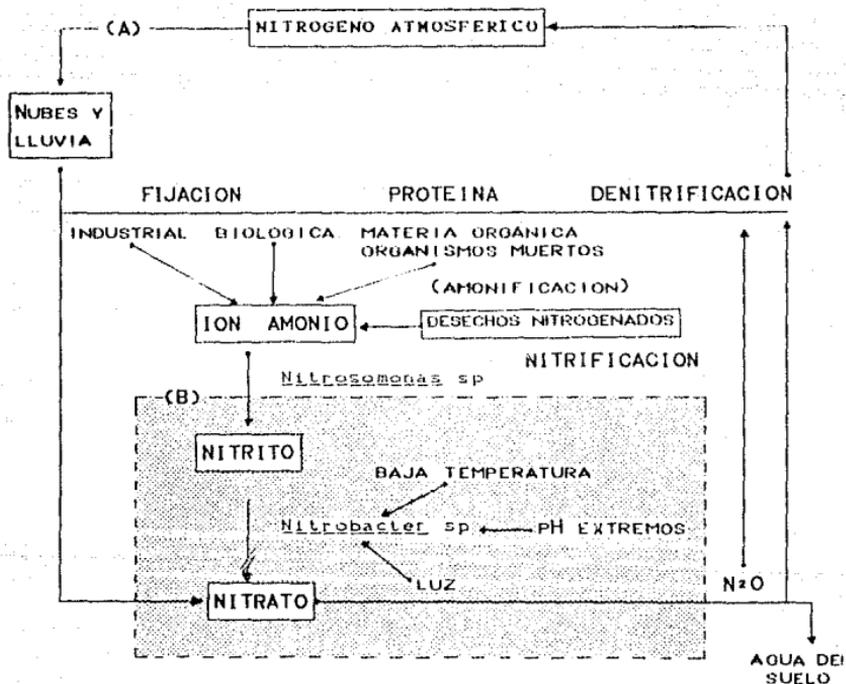
The ingestion, assimilation, respiration and excretion responses of carps exposed two weeks to nitrite were integrated in the scope of growth. The highest values of the scope of growth were observed in control groups (without nitrite) at 29 °C. In contrast, in the experimental groups (exposed to nitrite) the highest values were observed in carps acclimated at 32 °C; however, the low growth efficiency (K₁ and K₂) and the low assimilation efficiency indicated the stress caused by nitrite.

The integration of the physiological responses of the grass carps exposed during short-term (96 h) and during two weeks to nitrite contributes for more information about the nitrite effect in juveniles of grass carp.

INTRODUCCION

La acumulación de amonio y de nitrito se considera como uno de los principales problemas de contaminación en los estanques y en las pozas de cultivo. La acumulación de nitrito en los sistemas acuáticos se puede atribuir a la incorporación directa de este elemento a partir del alimento suministrado (Mires *et al.*, 1990; Milstein, 1990) o por la adición de compuestos nitrogenados como amonio y urea producto de la excreción de los animales. Estos compuestos así como el nitrato también se pueden incorporar a los estanque en forma de fertilizantes (Collins *et al.*, 1975).

La acumulación de nitrógeno se puede deber al proceso de amonificación mediante el cual los compuestos nitrogenados orgánicos se oxidan a amonio. El amonio es eliminado del sistema a través del proceso de nitrificación, es decir, la oxidación del amonio a nitrito y la oxidación de este último a nitrato. El proceso de nitrificación depende de la capacidad de las bacterias nitrificantes, Nitrosomonas y Nitrobacter, de oxidar el amonio a nitrato; sin embargo, debido a que este proceso depende de muchos factores se puede interrumpir, con la subsecuente acumulación de nitrito en el medio. Entre los principales factores controladores del proceso de nitrificación destacan la presencia de compuestos que inhiben la actividad de las bacterias nitrificantes, el pH, la temperatura y la concentración de oxígeno en el medio, así como la dinámica del establecimiento de las poblaciones de Nitrosomonas y Nitrobacter. En la siguiente figura se presenta una breve descripción del ciclo del nitrógeno donde se señalan algunos factores capaces de alterar el proceso de nitrificación.



CICLO DEL NITROGENO (A). FACTORES QUE PUEDEN MODIFICAR EL PROCESO DE NITRIFICACION (B) EN UN SISTEMA ACUATICO (MODIFICACION DE DELWICHE, 1970 Y SPOTTE, 1970).

Las elevadas concentraciones de amonio no ionizado (NH_3) y de ácido nitroso (HNO_2) pueden inhibir la actividad de Nitrobacter, acumulándose nitrito en el medio (Anthoniesen, et al., 1978). El pH también puede modificar el proceso de nitrificación ya que de la acidez ó alcalinidad del medio depende el equilibrio entre los compuestos nitrogenados (NH_3 , NH_4^+ , HNO_2). En un medio básico, la concentración de amonio no ionizado se incrementa y cuando el medio es ácido los niveles de ácido nitroso aumentan, favoreciendo la acumulación y persistencia de nitrito (Anthoniesen, et al., 1978).

La tensión de oxígeno modifica también la nitrificación; el proceso es más eficiente cuando los niveles de oxígeno son elevados, en tanto que en bajos niveles de oxígeno, el nitrito se puede acumular en el sistema debido a que las bacterias del género Nitrobacter son más sensibles que las Nitrosomonas a condiciones hipóxicas (Spotte, 1970). Por otra parte, aunque el oxígeno es un factor limitante para el mantenimiento de los organismos y para la nitrificación, la aireación de los sistemas y la consecuente mezcla de sedimentos puede incrementar la concentración de nitrito en el agua ya que este compuesto se encuentra en las capas superficiales del sedimento (Sun y Klontz, 1990; Thomforde y Boyd, 1991).

La intensidad lumínica puede ser determinante en la acumulación de nitrito en el medio; en aguas claras poco profundas la fotooxidación puede disminuir la población de Nitrobacter, ya que este género de bacterias es más sensible a la luz que las Nitrosomonas (Diab y Shilo, 1988).

Otros factores que pueden promover la acumulación de nitrito en los sistemas acuáticos son el incremento brusco de la cantidad y peso de los organismos, así como el aumento de la cantidad de alimento suministrado al sistema; bajo estas condiciones los niveles de amonio y nitrito pueden alcanzar niveles críticos que persisten hasta que las poblaciones de bacterias se equilibren a las nuevas condiciones ambientales (Collins, et al., 1975; Mires et al., 1990). El tiempo requerido por el sistema para alcanzar el equilibrio depende de la carga asociada a éste; si la carga adicional sobrepasa la capacidad máxima del sistema los niveles de amonio y nitrito pueden permanecer sobre niveles críticos por largos periodos (Spotte, 1970). La temperatura del medio influye considerablemente en el tiempo requerido para alcanzar el equilibrio; en temperaturas bajas el establecimiento de las poblaciones de Nitrobacter es más lento que en las temperaturas altas.

Aunque en los sistemas dulceacuicolas estables los niveles de nitrito rara vez son mayores a $0.5 \text{ mg N-NO}_2^-/\text{L}$, en condiciones de cultivo y en medios acuáticos alterados los niveles del contaminante pueden alcanzar altas concentraciones. Algunos autores reportan concentraciones mayores de $16 \text{ mg N-NO}_2^-/\text{L}$ en sistemas de recirculación y en los efluentes de las industrias textiles (Collins et al., 1975; Walsh, et al., 1980). Mc Coy (1972, citado por Eddy y Williams, 1987) registró concentraciones superiores a $180 \text{ mg N-NO}_2^-/\text{L}$ en cuerpos de aguas con densa vegetación acuática. Debido a lo anterior el nitrito es considerado como un elemento peligroso, especialmente para las especies herbívoras y también para los organismos con hábitos bentónicos.

Los organismos acuáticos pueden estar expuestos a altas concentraciones de nitrito por lapsos cortos debido a las variaciones diurnas del proceso de nitrificación o por largos periodos cuando la población o la actividad oxidativa de las bacterias del género Nitrobacter es reducida por la influencia de los factores del medio mencionados.

La toxicidad del nitrito en peces de agua dulce ha sido intensamente estudiada en los últimos años, debido a la importancia que tiene el compuesto tanto en el medio natural, como en los sistemas de cultivo. El nitrito es tóxico para muchos animales acuáticos (vertebrados, anfibios y peces), sin embargo, la toxicidad varía en las diferentes especies (Watenpaugh y Beitinger, 1986). Lewis y Morris (1986) dividen a las especies de peces dulceacuicolas en sensibles, tolerantes e insensibles a las diferentes concentraciones del nitrito; entre los organismos sensibles mencionan los salmónidos y el bagre de canal; entre los tolerantes señalan a los ciprinidos y catostómidos y consideran los centrárquidos como organismos muy tolerantes a este contaminante. Sin embargo, se conoce que aún organismos híbridos intraespecíficos presentan diferente sensibilidad al nitrito (Tomasso y Carmichael, 1991). Al respecto, se señalan concentraciones letales medias (CL50-96h) que varían desde 0.3 mg de $N-NO_2^-/L$ para Salmo gairdneri hasta 460.4 mg de $N-NO_2^-/L$ para Micropterus salmoides (Gutzmer y Tomasso, 1985).

Debido al tamaño y carga del ión nitrito (NO_2^-), este puede penetrar al organismo por las células del cloro, mediante el mecanismo de intercambio branquial del cloruro por el

bicarbonato (Maetz, 1971). Así, el nitrito actúa como un inhibidor competitivo del transporte del cloro en peces (Bath y Eddy, 1980; Krous et al., 1982; Gaino et al., 1984; Williams y Eddy, 1985). Margiocco et al. (1983) reportan que Salmogairdneri acumula iones nitrito en contra de un gradiente de concentración, en niveles de hasta 60 veces la concentración del anión en el medio. La acumulación de nitrito en el plasma de los peces depende de la especie, por ejemplo los salmónidos, las tilapias y el bagre de canal muestran una alta tasa de acumulación (Eddy y Williams, 1987); mientras que la concentración de nitrito en el plasma de Micropterus salmoides, M. dolomei y Lepomis cyanellus se incrementa sólo ligeramente (Palachek y Tomasso, 1984a). Algunos autores han reportado que en general se requiere una exposición de 24 horas para alcanzar la acumulación máxima de nitrito en los peces (Huey et al., 1980; Eddy et al. 1983).

El transporte de oxígeno desde la superficie respiratoria a los tejidos depende de la unión reversible de la hemoglobina con el oxígeno. Las hemoglobinas funcionales contienen una molécula de hierro en forma divalente (Fe^{2+}), la cual se asocia al oxígeno libre que es transportado en la sangre. El nitrito presente en el sistema circulatorio del organismo oxida la molécula de hierro a su forma trivalente (Fe^{3+}), la metahemoglobina. Este es el mecanismo de acción tóxica del nitrito que mejor se conoce, donde la hemoglobina oxidada es incapaz de unirse al oxígeno en forma reversible (Bodanski, 1951). Varios autores han observado formación de metahemoglobina en peces expuestos a nitrito (Smith y Williams, 1974; Brown y McLeay, 1975; Eddy et al. 1983; Huey y Beltinger, 1981).

Debido a lo anterior el nitrito modifica directamente la función respiratoria de los peces; algunos autores consideran que la muerte de los animales se debe principalmente a la hipoxia de los tejidos generada por la disminución de la capacidad de la sangre para transportar oxígeno (Bartlett et al., 1987). Sin embargo, no existen evidencias que permitan asociar los niveles de metahemoglobina con la muerte de los animales (Huey et al., 1984). Algunos autores señalan que existe un mecanismo tóxico diferente a la metahemoglobinemia, que causa la muerte de los peces expuestos a nitrito (Smith y Williams, 1974; Crowford y Allen, 1977; Brown y McLeay, 1975). Al respecto, se conoce que el nitrito puede reaccionar con algunas hemoproteínas, como sucede con el complejo microsomal citocromo P-450 y con la enzima citocromo oxidasa; el nitrito también puede oxidar la mioglobina a metamioglobina (Eddy y Williams, 1987; Nichols y Weber, 1989). Por otra parte, es posible que el efecto letal producido por el nitrito se deba al daño tisular y enzimático que provoca en los tejidos hepático y branquial de los peces (Margiocco, et al., 1983; Arillo et al., 1984). Lewis y Morris (1986) señalan que una concentración de 50% de metahemoglobina se considera riesgosa para la sobrevivencia de los animales.

Las alteraciones producidas por el nitrito en los peces se manifiestan rápidamente a través de la modificación de algunos parámetros bioquímicos. La presencia de nitrito en el medio produce desbalance iónico en los fluidos extracelulares de los organismos acuáticos. Al respecto, Jensen et al. (1987) observaron un incremento de la concentración de nitrito en el plasma de Cyprinus carpio, asociado a una pérdida masiva de

cloro; al mismo tiempo la concentración de potasio en el plasma se incrementó significativamente. Resultados similares han sido señalados por Harris y Coley (1991) para el crustáceo *Pacifastacus leniusculus*. Asimismo, es posible observar incremento en los niveles de metahemoglobina de *Samaprochilodus insignis* y *S. gairdneri* después de una y cuatro horas de exposición al nitrito (Bartlett *et al.*, 1987; Eddy *et al.*, 1983). También se han detectado cambios en el balance de electrolitos después de 24 h de exposición. Arillo *et al.* (1984) mencionan alteraciones en la estructura y función del tejido branquial de *S. gairdneri* después de 48 horas de exposición al nitrito.

El daño agudo causado por el nitrito es reversible; Huey *et al.* (1980) señalan que *lctalurus punctatus* recobra la concentración normal de hemoglobina en 24 h, cuando los peces se transfieren al agua libre del contaminante. Resultados similares han sido observados en *Chanos chanos* y en *Salmo gairdneri* (Almendras, 1987). Este proceso de desintoxicación, es decir la conversión de metahemoglobina a hemoglobina se atribuye a un sistema enzimático reductor de metahemoglobina (Freeman *et al.* 1983). La hemoglobina funcional es una molécula termodinámicamente inestable, a diferencia de la metahemoglobina (forma inactiva). Los vertebrados han desarrollado un sistema capaz de reducir la molécula evitando así niveles altos de metahemoglobina en sangre.

Scott y Harrington (1985) señalan que la actividad de la NADH metahemoglobina reductasa de *S. gairdneri* es comparable con el sistema reductor de metahemoglobina en eritrocitos humanos.

Sin embargo, el sistema metahemoglobina reductasa de los peces no es tan eficiente como el de los mamíferos (Cameron, 1971). La reducción de la metahemoglobina a hemoglobina determina la sobrevivencia de los organismos en el medio donde el nitrito puede estar presente. Con base en los resultados obtenidos en su estudio, Huey *et al.* (1980) indicaron que el nitrito es capaz de producir cambios en algunos parámetros hemáticos de los peces. Sin embargo, dichos autores señalan que el nitrito, aparentemente, no estimula la producción adicional de hemoglobina lo cual podría compensar el problema respiratorio asociado a la presencia de nitrito en el medio. Por su parte, Hilmy *et al.* (1987) observaron una disminución de la concentración de eritrocitos, así como en los niveles del hematocrito en Clarias lazera expuesta a concentraciones subletales de nitrito. Por su parte Jensen *et al.* (1987) demostraron que la presencia de nitrito en el plasma de Cyprinus carpio disminuye la afinidad al oxígeno de las hemoglobinas funcionales de los peces.

Aunque menos estudiadas, también se conocen otras alteraciones causadas por el nitrito en los peces. El nitrito puede oxidar otras moléculas diferentes a la hemoglobina. Nichol y Weber (1989) reportan que el nitrito oxida la molécula de mioglobina a metamioglobina, lo que resulta en una oxigenación deficiente del sistema muscular esquelético de los organismos. Por otra parte, el nitrito puede modificar la estructura y la función de las proteínas estructurales de las membranas, debido a lo cual la fragilidad de los lisosomas aumenta (Mensi *et al.*, 1982). Asimismo se han reportado alteraciones en la función mitocondrial y microsomal en el hígado de salmónidos expuestos a nitrito (Arillo *et al.*, 1984). Estos autores observaron

también que el nitrito produce hipoxia en el tejido hepático y neural de Salmo gairdneri. También, se ha demostrado el efecto hepatotóxico de este contaminante (Eddy y Williams, 1987; Michael et al., 1987). Wedemeyer y Yasutake (1978) observaron alteraciones en el tejido branquial de Salmo gairdneri cuando se expuso por 28 semanas a concentraciones subletales de nitrito. Resultados similares han sido señalados por Krous et al. (1982) y Michael et al. (1987). También se han descrito alteraciones enzimáticas producidas por la presencia de nitrito en el medio. Al respecto, Gaino et al. (1984) observaron una disminución de la actividad específica de la anhidrasa carbónica cuando los peces (S. gairdneri) fueron expuestos al nitrito. Con respecto al efecto crónico causado por el nitrito, Colt et al. (1981) encontraron que concentraciones relativamente bajas de este contaminante producen una disminución en el crecimiento de Ictalurus punctatus. Resultados similares han sido reportados por Bowser, et al. (1983) para la misma especie.

Al parecer, la talla de los organismos modifica la toxicidad del nitrito en peces de agua dulce. La mayor parte de los estudios realizados, donde se determina el efecto producido por el nitrito en relación a la talla de los organismos muestran que en la mayoría de los teleósteos dulceacuícolas, los peces de menor tamaño son más tolerantes al nitrito que los de tallas mayores (Smith y Williams, 1974; Russo, et al. 1974; Perrone y Meade, 1977; Palachek y Tomasso, 1984b). En contraste, Wedemeyer y Yasutake (1978) e Hilmy et al. (1987) reportan que en S. gairdneri y Clarias lazera los organismos de mayor talla resultan más tolerantes a exposiciones agudas de este contaminante.

Se conoce que la calidad del agua determina la toxicidad del nitrito en los organismos acuáticos. La toxicidad del nitrito se relaciona de manera inversa con la concentración de cloruro, el pH y la dureza del agua (Huey et al., 1982; Schweder y Tucker, 1983; Watenpaugh y Beltlinger, 1986). Sin embargo, es bien conocido que la presencia de cloruro es el factor principal que determina el nivel de toxicidad del nitrito en peces.

El efecto protector del cloruro ante la toxicidad del nitrito se atribuye a la competencia que se establece entre los iones (Cl^- y NO_2^-) por el sitio de intercambio $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$, en el epitelio branquial (Bath y Eddy, 1980). Así, debido a la acción antagónica de ambos iones, las alteraciones provocadas por este contaminante, pueden ser predictivas sólo cuando se considera la proporción que existe entre la concentración de cloruro y nitrito en el medio ($\text{Cl}^-/\text{NO}_2^-$). Al respecto, Perrone y Meade (1977) señalan que una razón de 17.3 ($15.6 \text{ mg Cl}^-/0.9 \text{ mg N-NO}_2^-$) es suficiente para proteger a Oncorhynchus kitsuch del efecto del nitrito en 48 h (Bath y Eddy, 1980). Tomasso et al. (1979) reportan que una razón de 40 ($30.3 \text{ mg Cl}^-/0.8 \text{ mg N-NO}_2^-$ y $60.7 \text{ mg Cl}^-/1.5 \text{ mg N-NO}_2^-$) evita un incremento significativo de los niveles de metahemoglobina de Ictalurus punctatus. Asimismo, una razón de 14.5 ($142 \text{ mg Cl}^-/9.8 \text{ mg N-NO}_2^-$) disminuye la concentración de nitrito en plasma de Salmo gairdneri expuesta al contaminante por 48 horas. En muchos otros estudios se ha comprobado el efecto protector del cloruro (Wedemeyer y Yasutake, 1978; Bath y Eddy, 1980; Russo, et al., 1981; Bowser et al., 1983) con base en lo cual se ha sugerido adicionar cloruro a los estanques de cultivo para alcanzar la razón mínima que proteja a los peces del contaminante.

Existe poca información en relación al efecto que producen otros aniones, diferentes al cloruro, sobre la toxicidad del nitrito. Eddy y Williams (1987) señalan que la eficiencia de los haluros para disminuir la toxicidad del nitrito sigue el siguiente patrón: $Br \geq Cl^- > I^- > F^-$. Sin embargo, es importante considerar que entre estos aniones sólo el cloruro se encuentra presente en el medio en concentraciones relativamente altas. El nitrato y el bicarbonato disminuyen significativamente la toxicidad, aunque su efecto protector no es tan evidente como el producido por el cloro (Bowser *et al.*, 1983). Los aniones divalentes y trivalentes como los sulfatos y fosfatos tienen un efecto mínimo sobre la toxicidad del nitrito en salmónidos (Huey *et al.*, 1980; Russo *et al.*, 1981). Con respecto al efecto producido por los cationes sobre la toxicidad del nitrito, algunos autores reportan que la presencia de calcio en el medio reduce la toxicidad (Mazik *et al.*, 1991). El calcio disminuye sólo ligeramente la toxicidad del nitrito en *I. punctatus* (Tomasso *et al.*, 1980). En contraste, la presencia de calcio en el medio reduce significativamente la toxicidad del nitrito en *Salmo gairdneri* (Wedemeyer y Yasutake, 1978). Crowford y Allen (1977) señalan que el calcio reduce la mortalidad producida por el nitrito, pero no el nivel de metahemoglobinemia en *Oncorhynchus tshawytsch*. Es posible que el efecto protector del calcio se atribuya a la capacidad de este catión para disminuir la permeabilidad de las membranas celulares (Potts y Fleming, 1970) y con ello la penetración del nitrito al interior del organismo.

A pesar de la importancia que se atribuye a la temperatura, poco es lo que se conoce acerca de la interacción de los

factores ambientales con respecto a la sensibilidad de los peces a los tóxicos en general. Cairns *et al.* (1975) señalan que la interacción entre la temperatura y la toxicidad de los químicos es una respuesta compleja, puesto que una modificación de la temperatura puede incrementar, disminuir o no producir cambios en la toxicidad. La temperatura determina la tasa de las funciones bioquímicas y fisiológicas de los ectotermos acuáticos, tiene un efecto directo sobre la permeabilidad branquial y determina la tasa metabólica de los peces. Por otra parte existe una relación directa entre el *preferendum* final de temperatura, la tasa óptima de crecimiento y la máxima eficiencia de los procesos bioquímicos y fisiológicos de los organismos (Beitinger y Fitzpatric, 1979; Jobling, 1981).

En particular, el efecto de la temperatura sobre la toxicidad del nitrito se ha señalado en algunos trabajos experimentales; Colt y Tchobanoglous (1976) indican que la temperatura (22-30°C) no afecta significativamente la toxicidad en *I. punctatus*. Por su parte, Huey *et al.* (1984) demostraron que la temperatura (10, 20 y 30°C) aumenta el porcentaje de metahemoglobinemia en peces expuestos a 0.91 mg N-NO₂⁻/L, en tanto que Watenpaugh *et al.* (1985) encontraron que en *I. punctatus* la tolerancia a la temperatura, evaluada a través de la temperatura crítica máxima (TCM), disminuyó de 38°C en los organismos testigo a 35.9 °C en peces expuestos a 0.43 mg N-NO₂⁻/L.

La toxicidad del nitrito en peces se ha estudiado frecuentemente a través de exposiciones agudas (de 1 a 4 días). Sin embargo, existe poca información en relación al efecto producido en periodos prolongados de exposición al

contaminante. Hasta la fecha, en la mayor parte de los estudios de toxicidad se han seleccionado organismos muy sensibles a los contaminantes y no se han considerado aquellos organismos tolerantes, como las carpas. En este trabajo se seleccionó la carpa herbívora Ctenopharyngodon idella por ser una de las principales especies cultivadas en México. Debido a sus hábitos alimenticios, la carpa es útil como control biológico de malezas acuáticas, tanto en México como en otros países del mundo. Además, las carpas son bien aceptadas como alimento, sobre todo en la Meseta Central de nuestro país (Arredondo y Juárez, 1986).

Como se ha señalado, aún los contaminantes endógenos como el nitrito, desencadenan reacciones de estrés en los organismos, lo cual puede conducirlos a la muerte o causar modificaciones en su estado fisiológico. Las alteraciones causadas por los contaminantes producen cambios en la estructura y fisiología de los organismos, las cuales se manifiestan a través de alteraciones bioquímicas, citológicas, tisulares, de órganos e incluso fisiológicas y conductuales. Los peces tienen la capacidad de compensar estas alteraciones a través de procesos de detoxificación, regulación y adaptación de sus funciones bioquímicas y fisiológicas. Estos procesos demandan energía, lo cual se puede manifestar como disminución en el crecimiento, reproducción o resistencia a factores del medio.

La capacidad de predecir el impacto de algunos contaminantes potenciales es de gran importancia para determinar la cantidad máxima que se puede liberar en el medio sin afectar de manera drástica a la biota. Entre los objetivos de las pruebas de

toxicidad se menciona la determinación de las concentraciones umbrales tóxicas de algunas sustancias (Pickering, 1988). El uso de estas pruebas (CL50) se remonta a algunas décadas, si bien el desarrollo de la metodología actual ha permitido gran precisión y repetibilidad de los resultados (US EPA, 1989).

Por otra parte, el estado fisiológico de los organismos se puede medir a través de la sobrevivencia, la tasa de crecimiento, la tasa respiratoria y otras (Sprague, 1971; Hughes, 1981). Es importante destacar que los organismos tolerantes a exposiciones agudas de un contaminante, son más sensibles de lo que se espera cuando son expuestos a un factor estresante por períodos prolongados. Debido a esto y al papel que desempeña la carpa herbívora en la piscicultura nacional, se consideró importante realizar estudios que permitan conocer los efectos agudos y crónicos de contaminantes endógenos como el nitrito sobre C. idella.

Así, el objetivo de este estudio fue estimar el efecto causado por el nitrito en juveniles de la carpa herbívora (Ctenopharyngodon idella), aclimatadas a tres temperaturas, a través de la integración de diferentes respuestas indicadoras de estrés.

En exposiciones agudas se determinó: a) la concentración letal media de nitrito (CL50-96 h) para los juveniles de C. idella de diferente tamaño; b) el efecto protector del cloruro en peces expuestos a nitrito y c) la acumulación de nitrito y los niveles de cloruro en el plasma de juveniles de carpa herbívora expuestos a diferentes concentraciones de nitrito.

En exposiciones a concentraciones subletales del nitrito se midió el efecto del nitrito sobre: a) la tasa de ingestión, b) la asimilación, c) la tasa respiratoria, d) la excreción nitrogenada, e) el campo de crecimiento y f) las eficiencias bruta y neta de crecimiento de los juveniles de C. idella.

MATERIALES Y METODOS

I. CAPTURA Y MANTENIMIENTO

Los juveniles de la carpa herbivora (Ctenopharyngodon idella) utilizados en este estudio se obtuvieron en el Centro de Producción Piscícola de Tezontepec de Aldama, ubicado en el Estado de Hidalgo, México. Los peces se capturaron directamente en los estanques con ayuda de una red. Inmediatamente se colocaron en bolsas de polietileno, las cuales se llenaron con oxígeno y se transportaron al Laboratorio.

En el laboratorio, los peces se mantuvieron en acuarios de 80 L de capacidad con agua del sitio de captura. Paulatinamente el agua fue sustituida por agua filtrada por carbón activado y aireada por 24 horas cuyas características fueron: pH 7.8-8.2, alcalinidad de 136-139 mg de CaCO_3/L , 5.2-5.8 mg de O_2/L disuelto 80-115 mg de Cl^-/L y temperatura de 24 °C. El fotoperiodo se fijó en 12 horas luz y 12 de obscuridad. Durante este período de mantenimiento se mantuvo una aireación constante en los acuarios, así como durante las fases de aclimatación y experimental. Los organismos se alimentaron con una dieta de espinaca (*Lactuca sp*) y Purina para trucha proporcionada al 10% del peso corporal; el alimento sobrante se retiró después de tres horas y se recambió una tercera parte del agua, diariamente.

II. ACLIMATACION

Durante el periodo de aclimatación se mantuvieron las características de la calidad del agua de la fase de mantenimiento, así como el fotoperiodo y el régimen de alimentación. La temperatura del agua se incrementó a una tasa de $1^{\circ}\text{C}/\text{día}$ hasta alcanzar las temperaturas experimentales de 24, 29 y 32°C . La aclimatación de los animales tuvo una duración de 15 días.

III. FASE EXPERIMENTAL

A) PRUEBAS DE TOXICIDAD

Debido a que la presencia de cloruro en el medio modifica la toxicidad del nitrito en peces dulceacuicolas, en este estudio se utilizaron dos medios de dilución del nitrito: a) agua destilada comercial (ADC) y b) Agua dulce artificial (ADAD) moderadamente dura (Environmental Protection Agency, U.S.; EPA, 1989).

Los peces sin alimentar se colocaron en acuarios de 20L con agua aireada y de las mismas características a las cuales se llevarian a cabo los experimentos; en estas condiciones permanecieron por 24 horas. Las características químicas del los diferentes medios se presentan en la Tabla 1 (pag. 32).

El nitrito, se empleó en forma de sal sódica (NaNO_2 ; Merck, 99% pureza). Se hizo una solución patrón y se adicionó a los

acuarios en un volumen suficiente para obtener las concentraciones deseadas. Las concentraciones de nitrito, se midieron constantemente durante el periodo de exposición.

Las pruebas de toxicidad aguda se iniciaron con el desarrollo de experimentos preliminares, los cuales permitieron determinar los intervalos de concentración del contaminante que se utilizarían en los ensayos de toxicidad definitivos.

Durante el desarrollo de los experimentos, se midieron algunas características de la calidad del agua tales como la temperatura (termómetro digital Corning $\pm 0.1^{\circ}\text{C}$), la concentración de oxígeno disuelto (electrodo de oxígeno YSI, S4 ARC ± 0.1 mg) el pH (potenciómetro Whatmann ± 0.1). Asimismo, al iniciar y al finalizar cada fase experimental, se midió la concentración real de nitrito utilizando la técnica Azo-dye cuya sensibilidad es de $1 \mu\text{g N/L}$ y se corroboró también la concentración de cloruro en el agua de cada acuario experimental mediante la titulación con nitrato de plata (error de precisión = 1.7 %) (APHA, 1985).

Los experimentos agudos realizados en ADC se llevaron a cabo con organismos de 0.45 ± 0.05 g de peso húmedo. Se determinó la CL50 en peces aclimatados a 24, 29 y 32°C . La exposición al contaminante se realizó en acuarios de 5 L de capacidad. Se colocaron diez peces en cada concentración de nitrito y se efectuaron dos repeticiones para cada uno de los experimentos. Las observaciones se llevaron a cabo cada 24 horas y se registró el porcentaje de mortalidad en cada acuario. Los

peces muertos durante el experimento y los que sobrevivieron al periodo de exposición al nitrito (96 hrs) se pesaron en balanza de plato (OHAUS, \pm 0.01g). Las concentraciones utilizadas en las pruebas de toxicidad fueron: 0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 6.0 y 8.0 mg de $N-NO_2^-/L$. Se consideró como testigo un grupo de diez carpas expuestas a ADC en ausencia del contaminante. Se efectuó una repetición por cada concentración.

En los ensayos realizados en ADA, se midió la CL50-96h en organismos de tres tallas 0.02 \pm 0.002 g, 0.45 \pm 0.05 g y 7.6 \pm 0.5 g de peso húmedo. Se utilizaron acuarios de 1, 5 y 37 L dependiendo del tamaño de los peces.

En las pruebas de toxicidad definitivas se colocaron diez organismos por cada concentración del contaminante, con dos repeticiones por cada concentración. Las observaciones se realizaron cada 24 horas y se registró el porcentaje de mortalidad de los peces en cada condición experimental. Los peces muertos se pesaron en balanza analítica (Sauter \pm 0.5 mg) o de plato (OHAUS, \pm 0.01 g), dependiendo de la talla de los animales. Las concentraciones de nitrito utilizadas en estos ensayos de toxicidad cubrieron un intervalo de 2 a 24 mg de $N-NO_2^-/L$. Se consideró como control un grupo de diez organismos (con repetición) expuestos a ADA, en ausencia de nitrito.

-Análisis estadístico. Los resultados obtenidos se analizaron de acuerdo al procedimiento propuesto por la EPA (Environmental Protection Agency; U.S. EPA, 1989). Este análisis incluyó, la

determinación de la concentración letal media (CL50-96h) para lo cual se utilizó el programa de computo DORES (Ramírez, 1989).

B) EFECTO DEL PROTECTOR DEL CLORURO EN PECES EXPUESTOS AL NITRITO

Una vez conocidas las curvas de toxicidad de nitrito para los juveniles de carpa herbívora aclimatados a las tres temperaturas experimentales, se probó la combinación nitrito-cloruro que produjera la máxima protección al contaminante. Con este fin se midió el efecto de tres concentraciones de cloruro (4, 5 y 6 mg de Cl^-/L) sobre la mortalidad de las carpas expuestas a tres concentraciones de nitrito correspondientes a la CL50, CL70 y la CL90 de $N-NO_2^-$ por 96 horas.

La exposición de los organismos ($N = 10$) al contaminante se realizó en acuarios de 12 L con agua destilada comercial (ADC). Los organismos permanecieron 24 horas en ADC sin nitrito antes de iniciar el experimento. Durante este tiempo los acuarios se mantuvieron con aireación suave. Las concentraciones de nitrito y cloruro así como la concentración de oxígeno disuelto se midieron al inicio y final de los experimentos; la temperatura se registró constantemente.

Análisis Estadístico. Los datos obtenidos en este ensayo (%) se codificaron mediante la transformación angular. En seguida,

con los datos transformados se calculó un polinomio de segundo grado de la forma:

$$\hat{Y} = \beta_0 + \beta_1X_1 + \beta_2X_2 + \beta_3X_1^2 + \beta_4X_2^2 + \beta_5X_1X_2$$

donde \hat{Y} es la mortalidad esperada, β_0 es la constante del modelo, β_1 a β_5 son los coeficientes parciales, X_1 es la concentración de nitrito ($\text{mg N-NO}_2^-/\text{L}$) y X_2 es el cloruro ($\text{mg Cl}^-/\text{L}$) contenido en el medio.

Se obtuvo un polinomio para cada temperatura de aclimatación. Con los valores obtenidos de cada ecuación se construyeron las superficies de respuesta. En el análisis estadístico se utilizó el programa de computo STATGRAPHICS, V-2.1 (Stat. Graph. Syst., 1985-86).

C) RESPUESTA RESPIRATORIA

Se midió el consumo de oxígeno de los juveniles de carpa herbívora (0.45 ± 0.05 g) aclimatados en ADC $\text{mg Cl}^-/\text{L}$ a tres temperaturas (24 , 29 y 32°C). Los peces se expusieron por 24 y 48 h a la CL50-96h del nitrito en combinación con 3 , 4 , 5 y 6 mg de Cl^-/L . Los grupos testigo se expusieron únicamente a ADC.

Al término de cada periodo de exposición se midió el consumo de oxígeno de los peces individualmente ($N=10-20$ organismos) en respirómetros cerrados de 250 ml. Los animales permanecieron

en las cámaras respirométricas, con aireación, durante 30 minutos antes de iniciar los experimentos. En seguida se suspendió la aireación, se tomó una muestra inicial de agua, se cerraron los respirómetros y después de media hora se tomó la muestra final. La concentración de oxígeno de las muestras se midió con un electrodo de oxígeno (YSI-ARCS4 \pm 0.1 mg O₂/L). La tasa de consumo del gas se calculó por diferencia entre las concentraciones de oxígeno de las muestras inicial y final y se expresó en mg O₂/h. La tasa de extracción de oxígeno se calculó como el porcentaje de oxígeno utilizado, del disponible en el medio en el momento inicial. Se registró el peso húmedo de los organismos y las tasas respiratorias se relacionaron con el peso corporal.

Análisis Estadístico. La regresión logarítmica del consumo de oxígeno y el peso corporal se ajustó por mínimos cuadrados y el ajuste se obtuvo mediante el análisis de residuos. Similarmente se analizó la tasa de extracción de oxígeno previa codificación de los datos mediante la transformación angular (Zar, 1974). Para determinar las diferencias significativas entre los grupo experimentales se utilizaron las pruebas no paramétricos de Kruskal-Wallis y de Newman-Keuls ($\alpha = 0.05$). Las diferencias ($P < 0.05$) en el consumo de oxígeno después de 24 y 48 horas de exposición al nitrito se estimaron utilizando la prueba de Newman-Keuls (Zar, 1974). La influencia del peso corporal y la concentración de cloruro sobre el consumo de oxígeno de los peces expuestos a la CL50 de N-NO₂⁻ (mg/L) se determinó a través de un polinomio de segundo grado (Montgomery y Peck, 1982). Como anteriormente, se empleó el programa de computo STATGRAPHICS.

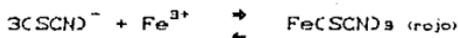
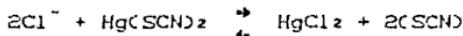
D) PARAMETROS SANGUINEOS

La concentración de nitrito en el plasma de C. idella (7.6 ± 0.5 g de peso húmedo) se midió en organismos aclimatados a 24, 29 y 32 °C y expuestos por 48 horas a 1.5, 3.0 6.0 y 9.0 mg $N-NO_2^-/L$; como medio de dilución del contaminante se utilizó agua dulce artificial (ADA). Los experimentos se llevaron a cabo en acuarios de vidrio de 37 L, en los cuales los peces permanecieron por 24 horas antes de agregar el contaminante. Una vez finalizado el periodo de exposición, los peces se se sacrificaron; se practicó una incisión por detrás de la cabeza y se colectó la sangre de la hemorragia con una jeringa heparinizada y se centrifugó a 1000 rev/min. El plasma obtenido, 50-100 μ l se extrajo con una micropipeta (Corning, 50-250 μ l).

La concentración de nitrito en las muestras se midió por medio de la técnica Azo-dye acorde a Palacheck y Tomasso (1984 a). También se midieron los niveles de cloruro en el plasma de los peces procedentes de los grupos testigo y de los grupos experimentales.

Con el fin de relacionar los niveles de cloruro en el plasma de las carpas expuestas al nitrito (6 mg $N-NO_2^-/L$) con el aumento de la concentración de cloruro en el medio, se siguió un procedimiento similar al anterior. Las concentraciones de cloruro utilizadas fueron 7, 9 y 12 mg Cl^-/L . Para la cuantificación del cloruro en las muestras de plasma de los especímenes se utilizó la técnica de diagnóstico clínico (Sigma

No. 461, St. Louis Mis., USA). La técnica se basa en el desplazamiento cuantitativo del tiocianato de mercurio por el cloruro. El tiocianato liberado forma un complejo con iones férricos. La intensidad del color de este compuesto medido a 460 nm es directamente proporcional a la concentración de cloruro en la muestra:



Análisis Estadístico. Los datos provenientes de los diferentes grupos se contrastaron mediante la prueba de Kruskal Wallis y la prueba de Newman-Keuls (Zar, 1974), con el fin de comprobar si las diferencias eran estadísticamente significativas ($P < 0.05$). Se empleó el programa de computo STATGRAPHICS (Stat. Graph. Syst. V-2.1, 1985-86).

E) EXPOSICIONES CRONICAS

En los juveniles de C. idella de 0.45 ± 0.05 g de peso húmedo corporal, aclimatados a 24, 29 y 32°C, se midieron las tasas fisiológicas necesarias para calcular el balance energético de los animales expuestos a diferentes concentraciones de nitrito.

Las concentraciones de nitrógeno de nitrito utilizadas en los experimentos fueron 1.0, 1.8, 2.5 y 4.0 mg de $\text{N-NO}_2^-/\text{L}$. Los peces se expusieron al contaminante durante 15 días, en

acuarios de 20 L con aireación constante y calentadores de inmersión (Hagen) que mantuvieron la temperatura deseada (24, 29 ó 32°C). Se llevó un registro continuo de temperatura, oxígeno disuelto, pH, concentración de cloruro y la concentración de nitrito.

Antes de exponer a los organismos al contaminante y después de finalizados los experimentos, se midió el peso húmedo en una balanza de plato (OHAUS \pm 0.01 g).

a) Ingestión (I)

Para medir la tasa de ingestión de los peces se suministró diariamente una cantidad conocida de alimento, correspondiente al 8% del peso húmedo corporal. El alimento permaneció tres horas en los acuarios, después de lo cual, el alimento remanente se retiró por sifón con una manguera (0.5 cm de diámetro) en cuyo extremo se colocó una red de plancton (abertura de malla de 500 μ) de peso conocido. Las redes, con el alimento se secaron en una estufa (Blue M) a 60°C, hasta peso constante (aproximadamente 48 horas) y por diferencia se cuantificó el peso del alimento.

El alimento ingerido por los animales, se calculó por diferencia entre el alimento suministrado y el alimento remanente, en peso seco (PS). En seguida se midió el valor calórico del alimento utilizado. Este análisis se realizó en el Laboratorio de Bromatología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la U.N.A.M. Los datos se expresaron en $\text{cal día}^{-1}\text{g}^{-1}$ PS.

b) Heces

Las heces producidas por las carpas se recolectaron, diariamente, 24 horas después de haber retirado el alimento de los acuarios. La recolecta de heces se realizó mediante sifón, filtrando el agua a través de una red de plancton (500 μ m). Las heces se secaron en una estufa (BLUE MD) a 60°C, hasta peso constante. De cada condición experimental se tomaron cinco muestras de heces de las cuales se calculó la relación entre el peso seco libre de cenizas y el peso seco de las heces colectadas (PSLC/PS). El mismo procedimiento se repitió con cinco muestras de alimento.

c) Eficiencia de Asimilación (U') y Asimilación (A)

La eficiencia de asimilación del alimento de las carpas se calculó utilizando la ecuación propuesta por Conover (1966)

$$U' (\%) = \frac{I - H}{(I - H) I}$$

donde U' es la eficiencia de asimilación; I y H representan las razones entre el PSLC y el PS del alimento suministrado (I = PSLCa/PSa) y de las heces producidas por los peces (H = PSLCh/PSH), respectivamente.

La asimilación de los peces se calculó del producto de la ingestión por la eficiencia de asimilación en los diferentes grupos experimentales ($A = I * U'$).

d) Consumo de oxígeno (R)

Después de 15 días de exposición a las diferentes condiciones experimentales, se midió el consumo de oxígeno de las juveniles de Ctenopharyngodon idella como anteriormente.

La tasa respiratoria (mg O₂/h) se relacionó con el peso seco (PS) de los animales, utilizando el modelo potencial (Schmidt-Nielsen, 1984) previa transformación logarítmica de los datos (Zar, 1974).

La energía utilizada en la respiración por las carpas expuestas a las diferentes condiciones experimentales, se calculó transformando los datos esperados en sus equivalentes calóricos (Elliot y Davison, 1975). Los valores del consumo de oxígeno se reportaron en cal/día⁻¹g⁻¹ PS.

e) Excreción nitrogenada (N)

La tasa de excreción nitrogenada de los juveniles de carpa herbívora, se midió en el mismo dispositivo usado para cuantificar el consumo de oxígeno de los organismos. La concentración de amonio de las muestras iniciales y finales de cada cámara se midió utilizando un electrodo de amonio

conectado a un multianalizador (CORION). La excreción amoniacal ($\text{mg NH}_4 \text{ h}^{-1}$) se calculó por la diferencia entre la concentración de las muestras iniciales y finales de cada cámara. Los datos de la tasa de excreción de amonio ($\text{mg NH}_4 \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1}$ PS) se transformaron en $\text{cal día}^{-1} \text{ g}^{-1}$ PS utilizando el coeficiente calórico correspondiente de $5.94 \text{ cal mg NH}_4^+$ (Wootton, 1991).

f) Campo de Crecimiento (P)

Los datos correspondientes a las distintas tasas fisiológicas de C. idella en las diferentes condiciones experimentales, se integraron en la ecuación del balance energético (Ivlev, 1939; Warren y Davis, 1967) con el fin de calcular el campo de crecimiento de los animales (P):

$$P = I - (R + H + N)$$

donde P es la producción, I, la ingestión; R, el consumo de oxígeno; H, la producción de heces y N, la excreción amoniacal. Los valores de las tasas se expresaron en unidades de energía/tiempo (cal/día).

Análisis Estadístico.

La relación entre el peso húmedo (PH, g) y el peso seco (PS, g) de los juveniles de C. idella se determinó através del análisis de regresión lineal (Zar, 1974).

La tasa de consumo de oxígeno (VO_2 , mg/h) se relacionó con el peso seco de los peces de acuerdo al modelo potencial ($VO_2 = a P^b$) en su forma lineal:

$$\ln VO_2 = \ln a + b \ln PS$$

donde a y b representan los parámetros del modelo y PS (g) es el peso seco de los animales. Con el fin de conocer si las diferencias entre las pendientes de las ecuaciones eran significativas se empleó el análisis de covarianza (Zar, 1974).

Para el análisis de la tasa de ingestión, la tasa respiratoria y la tasa de excreción nitrogenada se empleó el diagrama de cajas en paralelo que utiliza a la mediana (M) como medida de tendencia central. Las diferencias entre las respuestas se establecieron mediante la comparación de los intervalos de confianza ($\alpha = 0.05$) de la mediana (Tuckey, 1977).

RESULTADOS Y DISCUSION

Durante el periodo de mantenimiento y aclimatación a las condiciones de laboratorio de los juveniles de Ctenopharyngodon idella, se registró un alto porcentaje de sobrevivencia (> 90%). Las características del agua utilizada en la fase de mantenimiento y de aclimatación (agua filtrada por carbón activado) se presentan en la Tabla 1.

En este trabajo se utilizaron dos tipos de agua; la primera denominada agua destilada comercial (ADC), con bajos niveles de cloruro y la segunda agua dulce artificial (ADA), con mayor concentración de cloruro que la anterior (Tabla 1). Existe una marcada diferencia en los valores de dureza y de alcalinidad en los diferentes tipos de agua utilizada; sin embargo, algunos autores señalan que la concentración de cloruros es el principal factor que determina la toxicidad del nitrito en los organismos acuáticos (Huey *et al.*, 1982; Schwedler y Tucker, 1983; Watenpaugh y Beltinger, 1986). La adición de las diferentes concentraciones de nitrito no alteraron significativamente las características de los diferentes medios de dilución del contaminante.

Tabla 1. Características físico-químicas del agua utilizada en las diferentes fases experimentales.

Características	MANTENIMIENTO	ADC	ADA
Alcalinidad (mgCaCO ₃ /L)	136 - 139	10 - 13	60 - 70
Dureza (mgCaCO ₃ /L)	180 - 190	10 - 13	80 - 100
pH	7.8 - 8.4	7.0 - 7.4	7.4 - 7.8
Oxígeno (mgO ₂ /L)	5.2 - 5.8	5.6 - 5.8	5.6 - 5.9
Cloruro (mgCl /L)	80 - 115	2.8 - 3.0	6.0 - 7.0

ADC = agua destilada comercial y ADA = agua dulce artificial.

A) PRUEBAS DE TOXICIDAD (CL50-98 h)

Entre los factores que modifican la toxicidad del nitrito se encuentra la calidad de agua, como se mencionó anteriormente. Se ha reportado que la presencia del cloruro protege a los organismos de la acción tóxica del nitrito (Perrone y Meade, 1977; Wedemeyer y Yasutake, 1978; Bath y Eddy, 1980; Bowser et al., 1983). En el presente estudio se encontró que el agua utilizada en la fase de mantenimiento contenía altas concentraciones de cloruro. En consecuencia, para poder aislar

el efecto antagónico de los iones se utilizó agua destilada comercial (ADC) como medio de dilución del contaminante (Tabla 1). Dichos experimentos se realizaron con juveniles de C. idella de 0.45 ± 0.05 g de peso húmedo, aclimatados a tres temperaturas (24, 29 y 32°C).

En las tres temperaturas de aclimatación, la mortalidad aumentó al incrementarse la concentración de nitrito y el tiempo de exposición al contaminante. Con base en los resultados obtenidos se estimó la concentración letal media (CL50-96h) de N-NO_2^- para juveniles de carpa herbívora. Los valores de la CL50, así como los errores estándar asociados se presentan en la Tabla 2.

En referencia al efecto de la temperatura de aclimatación sobre la toxicidad del contaminante, los peces en 29°C toleran mayores concentraciones de nitrito que los organismos aclimatados a 24 y 32°C (74 % y 33 %, respectivamente). Las carpas aclimatadas a la mayor temperatura (32°C), a su vez, resisten concentraciones 61% más altas que las aclimatadas a 24°C (Tabla 2).

Debido a que las características químicas del agua utilizada en la primera fase experimental no son comunes en los sistemas acuáticos, los ensayos realizados en esta fase se realizaron también utilizando agua dulce artificial, moderadamente dura (U.S. EPA, 1989). Se utilizaron juveniles de carpa herbívora de tres grupos de peso: 0.02 ± 0.002 g, 0.45 ± 0.05 g y 7.8 ± 0.5 g. En estos ensayos, se observó que la mortalidad de

las carpas se incrementó al aumentar la concentración de nitrito en el medio. Asimismo se observó que al extenderse el tiempo de exposición al contaminante la mortalidad aumentó independientemente de la talla de los peces.

Con respecto a los peces aclimatados a 24°C, no se observaron diferencias significativas en la CL50-96h de los organismos de los tres grupos de peso mencionados ($P > 0.05$). Sin embargo, en los peces aclimatados a 29°C, los de mayor talla (7.6 g) toleraron mayores concentraciones de nitrito que los organismos de 0.02 y 0.45 g (71 y 20% respectivamente); a su vez, los peces de 0.45 g fueron más tolerantes que los organismos más pequeños ($P < 0.05$). Con respecto a las carpas aclimatadas a 32°C, no se observaron diferencias significativas en la CL50-96h de nitrito de los peces de 0.45 y 7.6 g ($P > 0.05$); no obstante la tolerancia de ambos grupos al nitrito fué mayor que la de los organismos de menor talla ($P < 0.05$) (Tabla 2, Fig. 1).

En relación con la temperatura de aclimatación, los peces de 0.02 g aclimatados a 24°C toleraron una mayor concentración de nitrito que los aclimatados a 29 y 32°C (58% y 49%, respectivamente). La tolerancia de los organismos de 0.45 g aclimatados a 32°C fué menor que la de los grupos en 24 y 29°C, entre los cuales no existieron diferencias significativas ($P > 0.05$). En cuanto a los peces de mayor talla (7.6 g), los aclimatados a 29°C resultaron más tolerantes a nitrito que los de 24 y 32°C (29 y 47% respectivamente); en esta talla, los peces aclimatados a 24°C, a su vez, resultaron menos sensibles al nitrito que los aclimatados a 32°C (28%) (Tabla 2, Fig. 1).

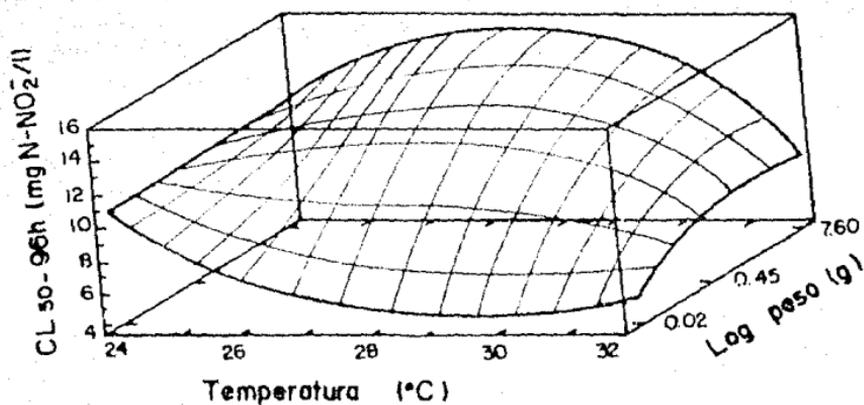


FIG. 1. RELACION ENTRE EL PESO Y LA TEMPERATURA DE ACLIMATAION SOBRE LA CONCENTRACION LETAL MEDIA DE NITRITO (CL_{50-96h}) PARA LOS JUVENILES DE C. idella

Con respecto a la calidad del agua utilizada, la toxicidad del nitrito en los organismos de 0.45 g se modificó considerablemente en relación al tipo de agua utilizada; mientras la CL50-96h en ADC fue de 1.75 mg N-NO₂⁻/L en el ADA fué de 10.56 mg N-NO₂⁻/L. Asimismo, en los peces aclimatados a 29 y 32°C, la CL50-96h de nitrógeno de nitrito en ADA fué 45 % mayor respecto al ADC (Tabla 2). Algunos autores sugieren que la presencia de cloruro en el medio, es el factor principal que modifica el efecto tóxico causado por el nitrito, como se discutirá más adelante (Perrone y Meade, 1977; Eddy y Williams, 1987).

Tabla 2. Mortalidad de los juveniles de C. idella (CL50-96h) de diferente peso, aclimatados a tres temperaturas y expuestas al nitrito (mg N-NO₂⁻/L) en diferentes medios de dilución.

T °C	Peso (g)	ADC	ADA
24	0.02 ± 0.00		10.56 ± 1.50
	0.45 ± 0.05	1.75 ± 0.21	10.56 ± 1.02
	7.60 ± 0.50		10.79 ± 1.28
29	0.02 ± 0.00		4.46 ± 0.63
	0.45 ± 0.05	6.68 ± 1.22	12.06 ± 0.51
	7.60 ± 0.50		15.14 ± 0.95
32	0.02 ± 0.00		5.41 ± 0.60
	0.45 ± 0.05	4.47 ± 0.47	8.11 ± 1.02
	7.60 ± 0.50		8.00 ± 1.52

ADC = agua destilada comercial, ADA = agua dulce artificial

La talla de los organismos es un factor importante en la toxicidad del nitrito, sin embargo existe controversia al respecto (Lewis y Morris, 1986). Los resultados mostraron que las carpas de mayor talla toleraron mayores concentraciones de nitrito que las más pequeñas (Tabla 2, Fig. 1). Resultados similares han sido reportados por Wedemeyer y Yasutake (1978), quienes señalan que en Salmo gairdneri los organismos de 5 g son más sensibles al nitrito que los de mayor tamaño (10 g). Asimismo, la CL50-96h de nitrógeno de nitrito para Clarias lazera de 65 g es 28 mg $N-NO_2^-/L$, mientras que para organismos de 166 g es 32 mg $N-NO_2^-/L$ (Hilmy et al., 1987). Por otra parte, Russo y Thurston (1977) reportan que la talla no influye la tolerancia al nitrito de Salmo clarkii. Sin embargo, la mayor parte de los estudios realizados reportan que los peces más pequeños son más tolerantes al nitrito que los de mayor tamaño (Russo et al., 1974; Perrone y Meade, 1977; Almendras, 1987). Al respecto, es importante considerar que los trabajos referentes al efecto producido por el nitrito en peces de diferente talla, contemplan organismos mayores a 2 g; mientras que en este estudio las carpas más pequeñas tuvieron un promedio de 0.02 g.

La tolerancia de los peces al nitrito depende, entre otros factores, de la eficiencia del sistema reductor de metahemoglobina (Perrone y Meade, 1977). De esta manera, es posible que en las carpas herbívoras de menor talla el sistema de la metahemoglobina reductasa no sea tan eficiente como en las de mayor tamaño, mientras que en los organismos más grandes, la reducción de la metahemoglobina puede ser más efectiva.

Por otra parte, la temperatura se considera como uno de las características más importantes del medio, ya que es un factor modulador de los procesos fisiológicos de los organismos. Cairns et al. (1975) discuten que los resultados de la interacción temperatura-toxicidad no son predictivos, debido a que este factor puede aumentar, disminuir o no producir cambio en la toxicidad de los contaminantes. Con respecto al nitrito, Colt y Tchobanoglous (1976) no observaron relación entre la toxicidad del nitrito y la temperatura en Ictalurus punctatus; sin embargo, los resultados obtenidos en el presente estudio no coinciden con lo reportado por estos autores.

En este trabajo se observó que en los peces de menor talla (0.02 g) los organismos aclimatados a 24°C toleraron mayor concentración de nitrito que los aclimatados a 29 y 32°C (Tabla 2). Resultados similares han sido reportados por Huey et al. (1984), quienes observaron un aumento en la toxicidad del nitrito en I. punctatus en presencia de mayor temperatura (10-30°C). Por otra parte, en los organismos de mayor talla (0.45 y 7.6 g) los peces aclimatados a 29°C toleraron mayores niveles de nitrito que los peces aclimatados a 24 y 32°C. Como se sabe, la temperatura puede incrementar tanto la permeabilidad branquial, como la tasa metabólica de los organismos, incrementándose así la demanda de oxígeno y el flujo de sangre en las lamelas branquiales de los peces (Prosser, 1973). De esta manera, el aumento de la toxicidad del nitrito al aumentar la temperatura se puede atribuir a un incremento en la tasa de captación de nitrito. Este fenómeno puede explicar la mayor sensibilidad al nitrito de los peces de menor talla aclimatados a temperaturas altas (29 y 32°C).

Por otra parte, en los peces de mayor talla, la mayor tolerancia al nitrito de los peces aclimatados a 29°C se puede explicar considerando que esta temperatura corresponde al *preferendum* final de temperatura de los juveniles de C. idella (Ceniceros y Rodríguez, 1985). Como se sabe, en esta temperatura (característica de cada especie) los procesos bioquímicos y fisiológicos de los organismos son óptimos (Jobling, 1981; Kellog y Gift, 1983). La toxicidad del nitrito, depende del equilibrio entre la penetración y su eliminación. Así, es posible que en los juveniles de C. idella aclimatados a 29°C la eficiencia de la actividad de la metahemoglobina reductasa sea mayor que en 24 y 32°C, lo cual se traduciría en un menor nivel de metahemoglobina en sangre y en consecuencia, disminuiría la toxicidad del contaminante.

En los peces de menor talla (0.02 g) probablemente el sistema metahemoglobina-reductasa sea poco eficiente de manera que la toxicidad del nitrito dependería únicamente de la tasa de penetración del contaminante al interior del organismo, por lo que la toxicidad se incrementaría al aumentar la temperatura del medio. En contraste, los peces de mayor talla pueden tener un sistema reductor de metahemoglobina más eficiente lo que compensaría el incremento de la penetración de nitrito a la mayor temperatura. Es decir, aunque la penetración de nitrito sea mayor en 29°C, el sistema enzimático metahemoglobina reductasa puede funcionar de manera más eficiente en esta temperatura, reduciendo los niveles de metahemoglobina a hemoglobina, con la subsecuente disminución del efecto tóxico del nitrito. Por lo tanto, la toxicidad del nitrito dependerá de la temperatura, en función del peso corporal de los organismos.

B) EFECTO PROTECTOR DEL CLORURO EN PECES EXPUESTOS AL NITRITO

a) MORTALIDAD

El efecto del cloruro sobre la toxicidad del nitrito se determinó a través de la mortalidad de los juveniles de Ctenopharyngodon idella aclimatados a las diferentes temperaturas y expuestos a la combinación de tres concentraciones letales de nitrito (CL50, CL70 y CL70-96h) en combinación con tres concentraciones de cloruro, en agua destilada comercial (Tabla 3). Al respecto, no se observó mortalidad en los organismos de los grupos testigos, expuestos al agua destilada, que contenía 3 mg Cl^-/L , en ausencia del contaminante, en las diferentes temperaturas de aclimatación.

En los peces aclimatados a 24°C, después de 96 horas de exposición a 2.0 mg de $\text{N-NO}_2^-/\text{L}$ en combinación con 5 mg de cloruro, no se observó mortalidad en las carpas; sin embargo la mortalidad aumentó 10 y 20% cuando los peces se expusieron al nitrito en combinación con 6 y 6.5 mg Cl^-/L . En los peces expuestos a la CL70-96h de nitrito (2.7 mg $\text{N-NO}_2^-/\text{L}$) en presencia de 5 mg Cl^-/L la mortalidad fué de 80%. Sin embargo con 6.0 y 6.5 mg Cl^-/L la mortalidad se redujo 10 y 40% respectivamente. Cuando los peces se expusieron a la CL90-96h y 5 mg Cl^-/L se registró un porcentaje de mortalidad de 100%, mientras que en presencia de 6.0 y 6.5 mg Cl^-/L la mortalidad observada fué de 40 y 10% respectivamente (Tabla 3).

TABLA 3. Mortalidad (M, %) de *C. idella* aclimatadas a tres temperaturas y expuestas a concentraciones letales (CL-96h) de nitrito en combinación con cloruro. (ADC).

T (°C)	N-NO ₂ (mg/L)	Cloruro (mg Cl ⁻ /L)	M (%)	M'		
24	CL ₅₀	2.0	5.0	0	0.00	
				6.0	10	18.44
				6.5	20	26.57
	CL ₇₀	2.7	5.0	80	63.44	
			6.0	70	56.79	
			6.5	20	26.56	
	CL ₉₀	4.5	5.0	100	90.00	
			6.0	40	39.23	
			6.5	10	18.44	
29	CL ₅₀	6.7	5.0	30	33.21	
				6.0	20	26.57
				7.0	10	18.44
	CL ₇₀	9.3	5.0	70	56.79	
			6.0	60	50.77	
			7.0	10	18.44	
	CL ₉₀	12.7	5.0	100	90.00	
			6.0	90	71.46	
			7.0	50	45.00	
32	CL ₅₀	4.5	5.0	0	0.00	
				6.0	10	18.44
				7.0	20	26.56
	CL ₇₀	6.8	5.0	80	63.44	
			6.0	60	50.77	
			7.0	10	18.44	
	CL ₉₀	9.5	5.0	100	90.00	
			6.0	40	39.23	
			7.0	10	18.44	

M' = transformación angular de los valores de mortalidad.

En los peces aclimatados a 29°C, la mortalidad se redujo cuando la concentración de cloruro en el medio aumentó. Así, en presencia de 6.7 mg N-NO₂⁻/L (CL50-96h) la mortalidad disminuyó de 30 a 20 y 10% con 5, 6 y 7 mg Cl⁻/L respectivamente. En las carpas expuestas a 9.3 y 12.7 mg N-NO₂⁻/L (CL50 y CL70-96h) y 5 mg Cl⁻/L, la mortalidad fué de 70 y 100% respectivamente. Sin embargo, en ambos casos, en presencia de 6 mg Cl⁻/L la mortalidad se redujo en 10, 60 y 90% respetivamente, en tanto que, en los peces expuestos a las mayores concentraciones de nitrito (9.3 y 12.7 mg N-NO₂⁻/L) en combinación con 6.5 mg Cl⁻/L la mortalidad fué de 10 y 50% respectivamente (Tabla 3).

En los peces aclimatados a 32°C y expuestos a 4.5 mg N-NO₂⁻/L la mortalidad observada se incrementó a 10 y 20% en presencia de 5, 6 y 7 mg Cl⁻/L, desde cero. Asimismo, la mortalidad se redujo de 80% en los peces expuestos a 6.8 mg N-NO₂⁻/L (CL70-96h) y 5 mg Cl⁻/L a 60 y 10% cuando el cloruro fué de 6 a 7 mg Cl⁻/L. Se registró 100% de mortalidad en las carpas expuestas a la CL90-96h de nitrito (9.5 mg N-NO₂⁻/L) en combinación con 5 mg Cl⁻/L. Sin embargo cuando la concentración de cloruro en el medio aumentó de 6 a 7 mg Cl⁻/L, la mortalidad se redujo en 60 y 90% respectivamente (Tabla 3).

Los porcentajes de mortalidad observada, después de 96 horas de exposición al contaminante, se codificaron utilizando la transformación angular. A partir de los datos transformados se realizó una regresión múltiple para cada temperatura de aclimatación. El modelo utilizado fué un polinomio cuadrático, cuya bondad de ajuste se obtuvo mediante el análisis de

residuos (Zar, 1974). La visualización de los resultados se presenta a través de un diagrama de superficie de respuesta (Fig. 2 y 3), las ecuaciones obtenidas fueron:

$$\hat{Y}_{(24)} = 261.2 X_1 - 115.3 X_2 - 18.1 X_1^2 + 14.5 X_2^2 - 22.3 X_1 X_2$$

$$\hat{Y}_{(29)} = -1096.2 + 50.0 X_1 + 326.1 X_2 - 0.3 X_1^2 - 25 X_2^2 - 6.4 X_1 X_2$$

$$\hat{Y}_{(32)} = 109.2 X_1 - 97.8 X_2 - 3.1 X_1^2 + 11.8 X_2^2 - 9.7 X_1 X_2$$

donde \hat{Y} representa la mortalidad esperada de los organismos a 24, 29 y 32 °C, X_1 es la concentración de nitrito (mg N-NO₂⁻/L) y X_2 es la concentración de cloruro (mg Cl⁻/L) en el medio. Los coeficientes y estimadores que describen la mortalidad de los juveniles de C. idella, después de 96 horas de exposición a las condiciones experimentales, se presentan en la Tabla 4.

Los resultados obtenidos muestran que en las tres temperaturas de aclimatación, la mortalidad de los juveniles de Ctenopharyngodon idella aumenta con la concentración de nitrito en el medio y disminuye en presencia de mayores concentraciones de cloruro; esto último hace evidente el efecto protector del cloruro sobre la toxicidad del nitrito en la carpa herbívora (Fig. 3 y 4). Algunos autores han demostrado que el efecto tóxico del nitrito disminuye cuando la concentración de cloruro en el medio aumenta. A este respecto, Perrone y Meade (1977) demostraron que 15.6 mg Cl⁻/L son suficientes para prevenir la

mortalidad de Onchorynchus kisutch expuestos a 0.9 mg N-NO₂⁻/L. Asimismo, Hasan y Macintosh (1986) observaron que la presencia de cloro evita la mortalidad de alevines de Cyprinus carpio expuestos a nitrito. Resultados similares han sido reportados para S. gairdneri (Wedemeyer y Yasutake, 1978; Bath y Eddy, 1980; Russo et al., 1981) y para Ictalurus punctatus (Bowser et al., 1983).

TABLA 4. Coeficientes y estimadores del polinomio cuadrático que describen la relación entre la mortalidad (X), la concentración de nitrito (mg N-NO₂⁻/L) y cloruro (mg Cl⁻/L) en el medio en los juveniles de C. idella aclimatadas a tres temperaturas.

T (°C)	Variables	Coeficiente	E. S.	P	ESTIMADORES
24	[N-NO ₂ ⁻]	261.20	67.68	0.02	R ² = 0.96 DW = 2.02 α = 0.01
	[Cl ⁻]	-115.33	37.50	0.04	
	[N-NO ₂ ⁻] ²	-18.10	8.19	0.09	
	[Cl ⁻] ²	14.50	4.81	0.04	
	[N-NO ₂ *Cl ⁻]	-22.31	7.10	0.04	
29	Constante	-1098.15	414.75	0.05	R ² = 0.90 DW = 2.64 α = 0.01
	[N-NO ₂ ⁻]	326.13	141.49	0.04	
	[Cl ⁻]	50.02	17.23	0.05	
	[N-NO ₂ ⁻] ²	-25.01	12.28	0.13	
	[Cl ⁻] ²	-0.28	0.68	0.71	
[N-NO ₂ *Cl ⁻]	-8.39	1.85	0.04		
32	[N-NO ₂ ⁻]	109.19	31.86	0.03	R ² = 0.90 DW = 2.24 α = 0.01
	[Cl ⁻]	-97.79	36.88	0.04	
	[N-NO ₂ ⁻] ²	-3.09	1.89	0.18	
	[Cl ⁻] ²	11.75	4.49	0.05	
	[N-NO ₂ *Cl ⁻]	-9.69	3.21	0.04	

E.S. = error estandar DW = Durbin-Watson
 Agua Destilada Comercial, ADC.

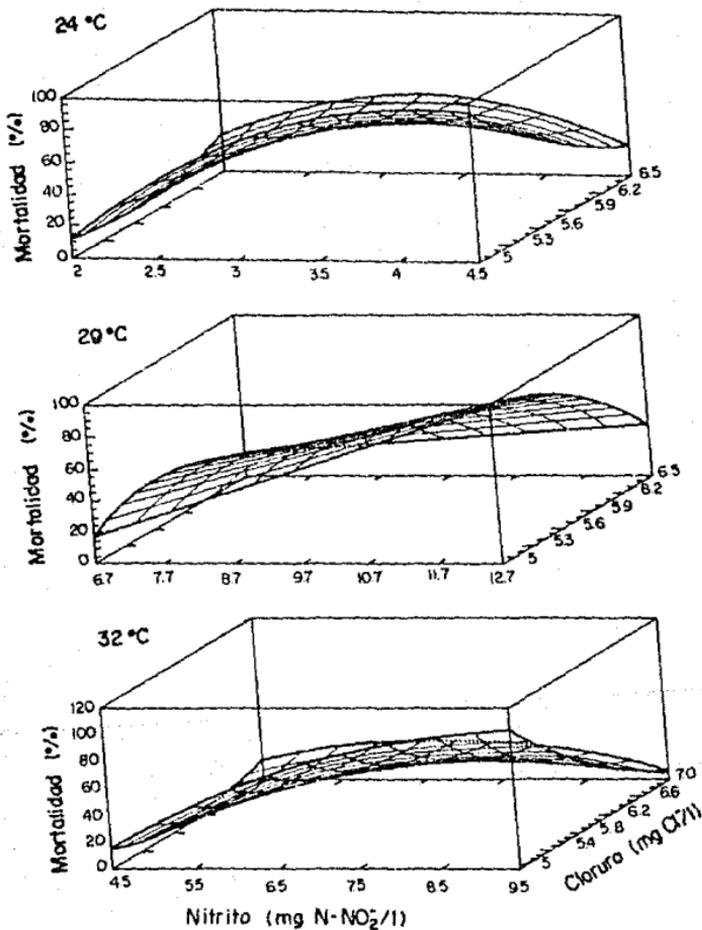


FIG. 2. SUPERFICIE DE RESPUESTA QUE DESCRIBE LA RELACION ENTRE LA MORTALIDAD, LA CONCENTRACION DE NITRITO Y DE CLORURO DE LOS JUVENILES DE CARPA HERBIVORA ACLIMATADOS A 24, 29 Y 32 °C.

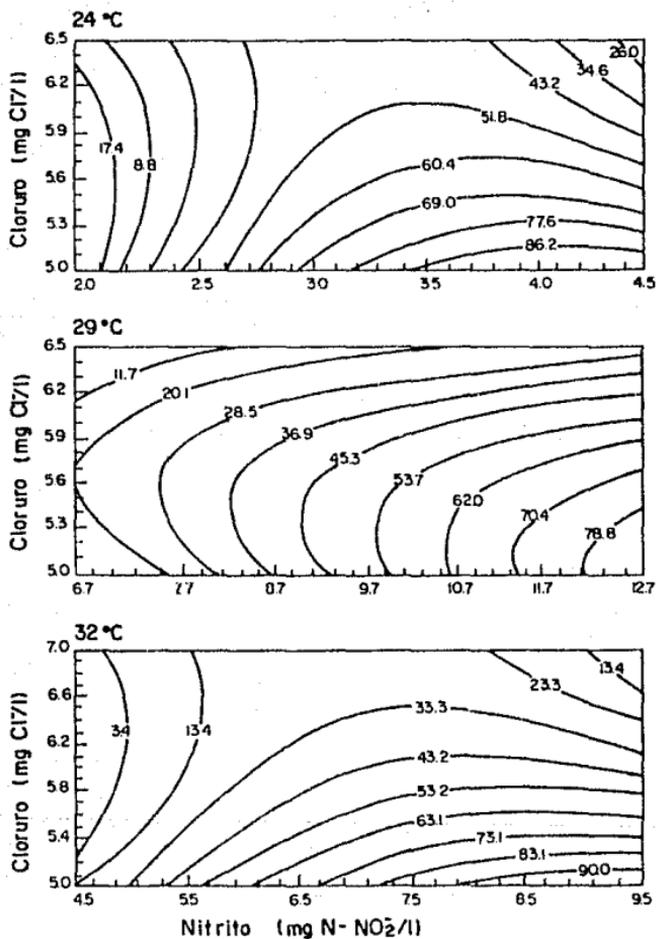


FIG. 3. SUPERFICIE DE RESPUESTA (CONTORNO) QUE DESCRIBE LA RELACION ENTRE LA MORTALIDAD (%), LA CONCENTRACION DE NITRITO Y DE CLORURO DE Cl^- de la ACIMATADOS A 24, 29 Y 32 °C .

En este estudio, en las carpas expuestas a bajas concentraciones de nitrito, la adición de cloruro disminuyó la mortalidad de los peces en 20%, mientras que en las mayores concentraciones del contaminante la mortalidad disminuyó de manera más evidente (90 y 50%) cuando se agregó cloruro al medio. Estos resultados apoyan la hipótesis propuesta por Williams y Eddy (1986) quienes consideran al nitrito como un inhibidor competitivo del transporte de cloro en el sistema branquial de los peces. Así, un incremento de la concentración de nitrito disminuye la probabilidad de transportar cloro e incrementa el transporte de nitrito al interior del organismo. La toxicidad del nitrito no está determinada únicamente por la concentración de este contaminante, sino que depende de la razón en la que se encuentren ambos iones en el medio. El efecto tóxico del nitrito disminuye cuando la concentración de cloruro en el medio aumenta, es decir, cuando aumenta la razón cloruro/nitrito. De esta manera, es posible explicar que el porcentaje de mortalidad más bajo se presentó en la menor concentración de nitrito en combinación con la mayor concentración de cloruro, es decir cuando la razón cloruro/nitrito era alta; mientras que los mayores porcentajes de mortalidad en las carpas se observan en concentraciones más altas de nitrito y las menores de cloruro. Así, el efecto protector de cloruro depende de la concentración de nitrito en el medio (Crowford y Allen, 1977; Tomasso et al., 1979; Russo et al., 1981; Bowser et al., 1983).

Es importante destacar que la proporción $Cl^-/N-NO_2^-$ necesaria para evitar mortalidad en las carpas es mayor en ADC que en

ADA. Esto último puede atribuirse a la protección que ejercen algunos componentes de ADA, diferentes al cloruro, sobre la toxicidad del nitrito. En este sentido, es importante considerar que el ADA presenta mayor concentración iónica que el ADC, lo cual puede determinar la diferencia en la razón cloruro-nitrito que protege a los juveniles de C. idella del contaminante. Al respecto, se conoce que los bicarbonatos, así como la presencia de calcio reducen significativamente la toxicidad del nitrito en la trucha arcoiris y en el bagre de canal (Wedemeyer y Yasutake, 1978; Crowford y Allen, 1977; Bowser *et al.*, 1983). Hasan y Macintosh (1986) señalan que una razón de 5 es suficiente para evitar mortalidad en los alevines de C. carpio expuestas a nitrito por 96 horas. Esto es, cuando la concentración de cloruro es alta, el transporte de cloruro es sólo ligeramente modificado por el nitrito, mientras que cuando la concentración de cloruro es baja el transporte de este ión es inhibido de manera significativa por el nitrito, lo cual resulta en un mayor porcentaje de mortalidad de las carpas.

b) RESPIRACION

La modificación más evidente producida por el nitrito en los peces de agua dulce es la oxidación de la hemoglobina. Así, debido a que la metahemoglobina es incapaz de transportar oxígeno de manera reversible, una de las principales alteraciones causadas por el nitrito se manifiesta en la respuesta respiratoria de los organismos (Davalos, 1992), sin embargo existen pocos trabajos al respecto. Así, con el fin de evaluar el efecto del nitrito sobre la respuesta respiratoria de los juveniles de Ctenopharyngodon idella (0.45 ± 0.05 g), los organismos se expusieron por 24 y 48 horas a la concentración letal media de nitrito (CL50-96h) en combinación con cloruro, ya que este ión se encuentra generalmente en aguas naturales y aún en agua destilada ($3.0 \text{ mg Cl}^-/\text{L}$). Las concentraciones de cloruro utilizadas fueron 3, 4, 5 y 6 $\text{mg Cl}^-/\text{L}$, en agua destilada. Los valores de la CL50 de nitrito, variaron con la temperatura de aclimatación, de tal manera que en 24°C la concentración del contaminante utilizada fué de $1.71 \text{ mg N-NO}_2^-/\text{L}$; de 6.7 y $4.5 \text{ mg N-NO}_2^-/\text{L}$ para 29 y 32°C , respectivamente (Tabla 5).

Durante el desarrollo experimental, la concentración de oxígeno disuelto en los respirómetros se mantuvo entre 5.0 y $5.5 \text{ mg O}_2/\text{L}$ y no se registró mortalidad durante el período en que los peces permanecieron en las cámaras respirométricas. Los valores del consumo de oxígeno se relacionaron con el peso húmedo corporal de los peces de acuerdo al modelo potencial; todos los modelos resultaron significativos ($P < 0.05$). Los valores de la eficiencia de extracción del gas (%) se codificaron utilizando la transformación angular.

El tiempo de exposición (24 o 48 horas) no modificó la tasa respiratoria de los peces del grupo testigo ni la de los expuestos a las diferentes combinaciones de nitrito y cloruro ($P > 0.05$), por esta razón los datos se agruparon.

Tabla 5. Valores esperados de la tasa de consumo de oxígeno (VO_2 , mg/h) y de la extracción de oxígeno (TE' , %) de *C. idella* expuestas a la combinación de la concentración letal media de nitrito (CL_{50-96h}) con diferentes concentraciones de cloruro (mg/L).

T (°C)	N-NO ₂ (mg/L)	Cl (mg/L)	n	VO ₂		TE'	
				\bar{x}	ES	\bar{x}	ES
24	0	3	18	0.63	0.04	9.86	0.67
	1.7	3	13	0.43*	0.02	6.82*	0.39
	1.7	4	11	0.50*	0.03	7.94*	0.53
	1.7	5	18	0.64*	0.05	10.22	0.86
	1.7	6	18	0.67	0.04	10.69	0.68
29	0	3	18	0.70	0.07	20.48	3.05
	6.7	3	17	0.59*	0.04	14.25*	1.14
	6.7	4	17	0.67*	0.04	13.35*	0.87
	6.7	5	14	0.68	0.04	13.41*	1.28
	6.7	6	14	0.70	0.05	17.38	1.38
32	0	3	20	1.80	0.07	37.82	1.98
	4.5	3	18	0.52*	0.05	12.13*	0.35
	4.5	4	18	0.58*	0.06	12.66*	2.15
	4.5	5	19	1.06*	0.09	23.58*	2.85
	4.5	6	19	1.89	0.13	41.43	3.89

Testigos en agua destilada comercial con 3 mg Cl⁻/L. Se presentan los valores promedio ($\bar{x} \pm ES$); n = número de organismos.

* dif. sign. respecto al testigo ($P < 0.05$)

La tasa metabólica y la eficiencia de extracción de oxígeno de las carpas del grupo testigo en agua destilada comercial, se incrementaron con el aumento de la temperatura. Aunque no se observaron diferencias en la tasa respiratoria de los peces aclimatados a 24 y 29°C, la tasa de extracción de oxígeno de los peces aclimatados a 29°C se incrementó 107.7 % respecto a los valores de los aclimatados a 24°C (Tabla 5).

En las carpas aclimatadas a 32°C el consumo de oxígeno fue 2.85 y 2.57 veces mayor con respecto a 24 y 29°C. En relación a la tasa de extracción de oxígeno, los valores obtenidos en 32°C fueron 3.84 y 1.85 veces mayores que los estimados en los peces testigo (ADC) aclimatados a 24 y 29°C respectivamente. Este comportamiento de los datos, concuerda con la literatura, donde se señala que la tasa respiratoria de los peces se incrementa con la temperatura del medio (Anderson *et al.*, 1980; Schmidt-Nielsen, 1984).

En los experimentos realizados a 24°C, la tasa de consumo de oxígeno de los peces expuestos a la CL50-96h de nitrito en combinación con 3 y 4 mg Cl⁻/L disminuyó 32 % y 21% en relación a los peces expuestos al agua destilada (con 3 mg Cl⁻/L) en ausencia de nitrito (P < 0.05); mientras que los peces expuestos al contaminante con 5 y 6 mg Cl⁻/L no fueron diferentes al testigo (P > 0.05) (Tabla 5).

En los peces aclimatados a 29°C, el consumo de oxígeno disminuyó 16 % y 4 % en los peces expuestos a la CL50-96h de N-NO₂⁻ en combinación con 3 y 4 mg Cl⁻/L. Sin embargo en presencia de 5 y 6 mg de cloruro no se observaron diferencias

significativas en la tasa respiratoria de los peces expuestos al nitrito en relación al testigo ($P > 0.05$). En relación a las carpas aclimatadas a 32°C , el consumo de oxígeno de los juveniles de *C. idella* disminuyó 71 %, 69 % y 41 % cuando se expusieron al nitrito en presencia de 3, 4 y 5 mg Cl^{-}/L ($P < 0.05$) y no se observaron diferencias en los peces expuestos a la CL50-96h de nitrito cuando la concentración de cloruro fue 6 mg Cl^{-}/L ($P > 0.05$) (Tabla 5).

En los peces aclimatados a las tres temperaturas se observó que en presencia de mayores concentraciones de cloruro, el consumo de oxígeno de las carpas se recuperó hasta alcanzar valores similares a los de los grupos testigo en ADC ($P > 0.05$). Así, la recuperación de la respuesta respiratoria de los organismos expuestos a nitrito depende de la concentración del cloruro presente en el medio.

Las ecuaciones que describen la relación entre la tasa metabólica (consumo de oxígeno), el peso húmedo de los organismos y la concentración de cloruro en el medio, para los peces expuestos a la CL50-96h de nitrito en las diferentes temperaturas de aclimatación fueron:

$$\hat{Y}_{24} = -3.16 + 1.44 X_1 - 1.01 X_2 - 1.56 X_1^2 + 0.33 X_1 X_2 \quad *$$

$$\hat{Y}_{29} = 0.53 + 0.15 X_1 + 2.31 X_2 + 0.02 X_1^2 - 2.93 X_2^2 + 0.13 X_1 X_2$$

$$\hat{Y}_{32} = 2.20 - 1.03 X_1 - 1.24 X_2 + 0.11 X_1^2 - 2.03 X_2^2 + 0.95 X_1 X_2$$

* X_2^2 NO FUE SIGNIFICATIVA ($P > 0.05$).

donde \hat{Y} representa la tasa de consumo de oxígeno esperada ($\text{mg O}_2 \text{ h}^{-1}$), X_1 es la concentración de cloruro presente en el medio ($\text{mg Cl}^-/\text{L}$) y X_2 es el peso húmedo (g) de los peces. Los modelos explican el 99% de las variaciones observadas en el consumo de oxígeno de los organismos. Los parámetros y estimadores del polinomio cuadrático se presentan en la Tabla 6.

Tabla 6. Coeficientes y estimadores del polinomio cuadrático que describe la relación entre el consumo de oxígeno ($\text{mg O}_2/\text{h}$), el peso húmedo (g) y la concentración de cloruro ($\text{mg Cl}^-/\text{L}$) de C. idella expuestas a la CL50 96 h de nitrito.

T°C	Variables	Coef.	E.S.	P	
24	Constante	-3.16	0.13	0.000	$R^2 = 0.99$ DW = 1.94
	$[\text{Cl}^-]$	1.44	0.05	0.000	
	$[\text{Cl}^-]^2$	-1.16	0.01	0.000	
	$[\text{Peso}]^2$	-1.01	0.17	0.000	
	$[\text{Cl}^-][\text{Peso}]$	0.33	0.03	0.000	
29	Constante	0.53	0.16	0.003	$R^2 = 0.99$ DW = 2.50
	$[\text{Cl}^-]$	-0.15	0.04	0.002	
	$[\text{Peso}]$	2.31	0.69	0.003	
	$[\text{Cl}^-]^2$	0.02	0.00	0.000	
	$[\text{Peso}]^2$	-2.93	0.71	0.001	
	$[\text{Cl}^-][\text{Peso}]$	0.13	0.09	0.157	
32	Constante	2.20	0.27	0.000	$R^2 = 0.99$ DW = 2.23
	$[\text{Cl}^-]$	-1.03	0.09	0.000	
	$[\text{Peso}]$	-1.24	0.28	0.000	
	$[\text{Cl}^-]^2$	0.11	0.01	0.000	
	$[\text{Peso}]^2$	-2.03	0.28	0.000	
	$[\text{Cl}^-][\text{Peso}]$	0.95	0.04	0.000	

Tiempo de exposición: 48 horas.

Tipo de agua: ADC.

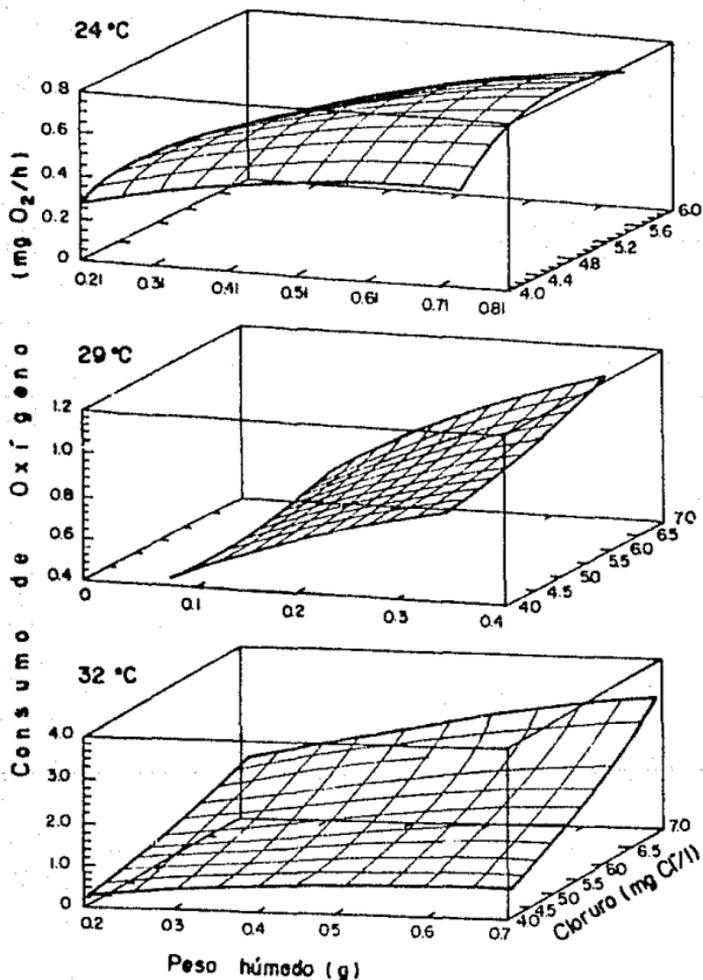


FIG. 4. SUPERFICIE DE RESPUESTA QUE DESCRIBE LA RELACION ENTRE EL CONSUMO DE OXIGENO, EL PESO HUMEDO Y LA CONCENTRACION DE CLORURO DE *C. idella* ACLIMATADOS A TRES TEMPERATURAS.

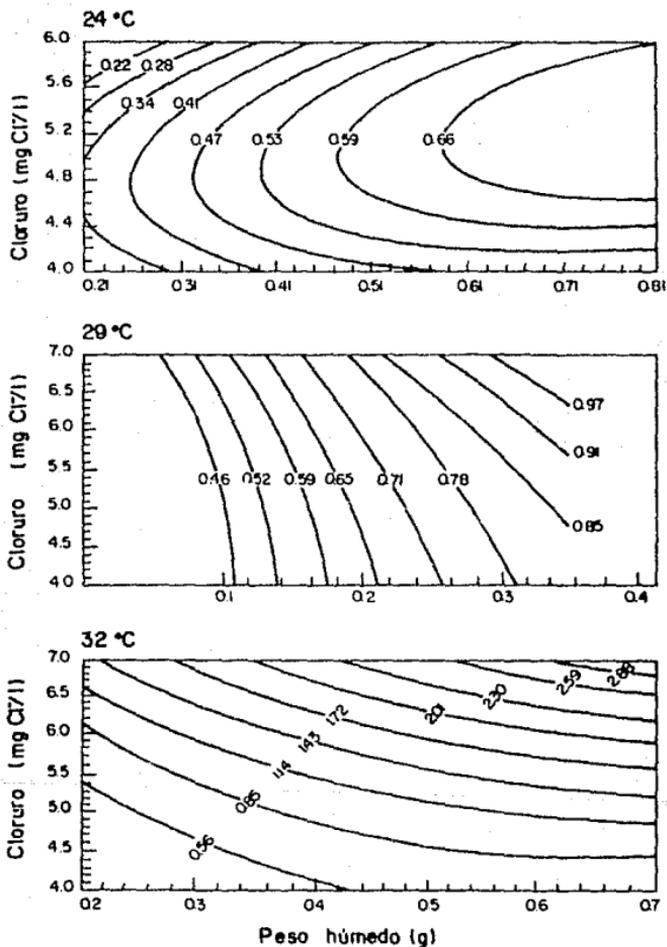


FIG. 5. SUPERFICIE DE RESPUESTA (CONTORNO) QUE DESCRIBE LA RELACION ENTRE EL CONSUMO DE OXIGENO (MG O₂/H), EL PESO HUMEDO Y LA CONCENTRACION DE CLORURO DE C. idella.

En los peces aclimatados a 24°C la tasa respiratoria más alta se presentó cuando la concentración de cloruro fue de 4.6 a 5.9 mg Cl⁻/L en los peces de mayor talla (> 0.54 g) como se observa en la superficie de respuesta correspondiente (Fig. 4 y 5).

Con respecto a los organismos aclimatados a 29°C los valores de consumo de oxígeno más altos correspondieron a los peces de mayor talla expuestos a las concentraciones más altas de cloruro (6.5-7.0 mg Cl⁻/L); mientras que en 32°C los niveles más altos de la tasa respiratoria se presentaron cuando la concentración de cloruro fue alta (> 6.7 mg Cl⁻/L) en los peces de mayor talla (0.6-0.7 g) (Fig. 4 y 5).

Es importante señalar que los valores más altos de las tasas fisiológicas no fueron diferentes a los valores de los grupos testigo (P > 0.05). Esto es, la adición de cloruro en el medio se manifestó en la recuperación de la respuesta respiratoria de los juveniles de carpa herbívora expuestas a nitrito.

En relación a la tasa de extracción de oxígeno, esta respuesta siguió un patrón de comportamiento similar a la tasa metabólica; es decir, la eficiencia de extracción del gas de los juveniles de C. idella disminuyó cuando se agregó nitrito al medio y se recuperó en presencia de mayores concentraciones de cloruro. No se observaron diferencias en la eficiencia de extracción del gas de los peces expuestos a las diferentes condiciones experimentales en función del tiempo de exposición (P > 0.05) (Tabla 5).

Así, en los juveniles de carpa herbívora aclimatados a 24°C la tasa de extracción de oxígeno disminuyó 31 y 20% en el grupos expuestos a nitrito en presencia de 3 y 4 mg de cloruro en relación a los peces expuestos en agua destilada en ausencia del contaminante (grupo testigo). Asimismo, se observó que la tasa de extracción del gas se recuperó en presencia de mayores concentraciones de cloruro; de tal manera que cuando la concentración de cloruro fué mayor de 5 mg Cl⁻/L no se observaron diferencias significativas en la eficiencia de extracción del gas de los peces expuestos al nitrito en relación al testigo (P > 0.05) (Tabla 5).

En las carpas aclimatadas a 29°C, la eficiencia de extracción de oxígeno disminuyó 30% en los organismos expuestos a la CL50-96h de nitrito (6.7 mg N-NO₂⁻/L) en combinación con 3 mg Cl⁻/L con respecto al testigo (3 mg Cl⁻, en ausencia del contaminante). Asimismo, la tasa de extracción disminuyó 35 % en los peces expuestos al nitrito en presencia de 4 y 5 mg Cl⁻/L y no se observaron diferencias en los peces expuestos al nitrito y 6 mg Cl⁻/L (P > 0.05). Con respecto a los organismos aclimatados a 32°C la tasa de extracción de oxígeno disminuyó 68, 67 y 38% cuando se agregó 4.5 mg N-NO₂⁻/L (CL50-96h) en combinación con 3, 4 y 5 mg Cl⁻/L, respectivamente. Sin embargo, la eficiencia de extracción del gas se recuperó hasta alcanzar un valor similar al testigo (P > 0.05) cuando el cloruro se incrementó a 6 mg/L (Tabla 5, Fig. 6).

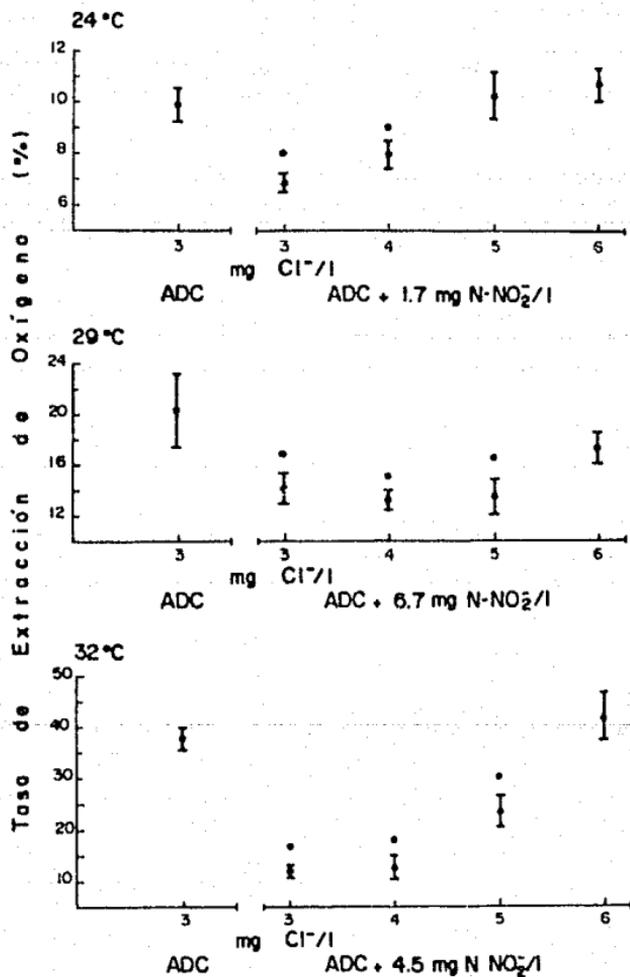


FIG. 6. TASA DE EXTRACCION DE OXIGENO DE *C. idella* EXPUESTOS A LA CL50-96H DE N-NO₂⁻ (1.7, 6.7 Y 4.5 MG/L). ADC = AGUA DESTILADA COMERCIAL. ° = DIF. SIGN. RESPECTO AL TESTIGO

Aunque el consumo de oxígeno fue mayor en los peces aclimatados a la mayor temperatura (32°C), el efecto del nitrito fue más evidente que en los peces aclimatados a 24 y 29°C. Esto es, en la temperatura más alta, la inhibición de la respuesta respiratoria como resultado de la exposición al nitrito, fue más evidente que en las otras temperaturas de aclimatación. Esto puede atribuirse a que esta temperatura (32°C) está próxima al límite superior de temperatura de esta especie (Alcaraz, 1989), lo cual representa un estrés extra para el pez. Jacobs *et al.* (1983, citado por McCauley y Pond, 1971) observaron que S. gairdneri expuestas a temperaturas cercanas a su límite de tolerancia presentan modificaciones en los surcos branquiales, lo cual dificulta la difusión de oxígeno. En los juveniles de C. idella, es probable que el efecto combinado de la alta temperatura y la presencia de nitrito tengan un efecto aditivo.

Por otra parte, las razones cloruro/nitrito más bajas que protegen a C. idella de la acción del nitrito se observaron en los peces aclimatados a 29°C (Tabla 5). Como se ha mencionado anteriormente, esto se puede atribuir a que dicha temperatura es la óptima para los juveniles de carpa herbívora. Así, es posible que en 29°C el mecanismo de desintoxicación del nitrito (sistema metahemoglobina reductasa) funcione de manera más eficiente respecto a 24 y 32°C.

Se conoce que algunas alteraciones causadas por el nitrito se manifiestan rápidamente en los peces. Así, el hecho de no observar diferencias significativas en el consumo de oxígeno de

las carpas después de 24 y 48 horas de exposición al nitrito, puede atribuirse a que la acumulación de nitrito y la formación de metahemoglobina alcanzan su máximo dentro de las primeras 24 horas de exposición al contaminante. Bartlett et al. (1987) observaron la formación de metahemoglobina después de exponer por una hora a Semaprochilodus insignis a 9.1 mg N-NO₂⁻/L. Asimismo, Bath y Eddy (1980) señalan que después de 24 horas de exposición a 9.8 mg N-NO₂⁻/L el 80% de la hemoglobina de la trucha arcoiris se oxida a metahemoglobina. En Ictalurus punctatus, la formación de metahemoglobina alcanza su máximo dentro de las primeras 24 horas de exposición al nitrito (Huey et al., 1980; Bowser, et al., 1983).

A través del epitelio branquial, los peces realizan las funciones de intercambio de gases, de regulación iónica, y de excreción de productos nitrogenados (Hoar y Randall, 1984; Schmidt-Nielsen, 1984). Sin embargo, debido a que el epitelio branquial se encuentra en íntima relación con el medio acuático, la presencia de sustancias tóxicas pueden modificar la estructura y función de estos órganos. Al respecto, Mallat (1985) señala que las alteraciones en el epitelio branquial son reflejo de la respuesta del estrés generalizado del pez y con frecuencia estas alteraciones en las branquias se relacionan con modificaciones de los procesos respiratorios y de osmoregulación (Skidmore, 1970; Evans, 1987). La modificación de tasa respiratoria es reconocida como un indicador del estrés producido por la presencia de sustancias tóxicas en el medio acuático (Sprague, 1971; Hughes, 1981). Así, cualquier modificación en la respuesta respiratoria de los peces puede.

por una parte ser resultado de un daño tisular, o por otra, ser una respuesta adaptativa del organismo que le permita compensar una modificación del medio. La disminución en el consumo y la tasa de extracción de oxígeno de los juveniles de carpa herbívora expuestas al nitrito se puede explicar a través de la oxidación de la hemoglobina. Debido a que la metahemoglobina se une al oxígeno de manera irreversible (Bodanski, 1951), cuando los niveles de metahemoglobinemia son altos el consumo de oxígeno disminuye. Aunque los organismos desplegaran algún mecanismo que permitiera contrarrestar el déficit de oxígeno (Prosser, 1973; Bailey et al., 1990) la metahemoglobina es incapaz de captar el gas y transportarlo a los tejidos. Por otra parte, se han reportado cambios ultraestructurales en el sistema branquial de peces expuestos a nitrito (Krous et al., 1982; Arillo et al., 1984; Galno et al., 1984) lo cual puede alterar la difusión del gas a través de las branquias.

Asimismo, la recuperación de la tasa respiratoria, en presencia de las mayores concentraciones de cloruro se puede atribuir a la capacidad del anión de revertir la metahemoglobinemia causada por el contaminante. Perrone y Meade (1977) fueron los primeros en reportar el efecto protector del cloruro contra la toxicidad del nitrito en peces. A partir de esta fecha, el efecto antagonico del cloruro respecto al nitrito ha sido estudiado por varios autores; Bath y Eddy (1980) mencionan que Salmo gairdneri no presenta niveles tóxicos de metahemoglobina en la sangre cuando se expone a altas concentraciones de cloruro, en tanto que en niveles bajos la concentración de nitrito en la sangre puede alcanzar concentraciones varias veces más altas que la del medio.

Bowser *et al.* (1983) señalan que una concentración de 25 mg Cl^-/L es suficiente para proteger a Ictalurus punctatus de la toxicidad de concentraciones bajas del contaminante; esto es, de 1 mg de NO_2^-/L . En este estudio, 6 mg Cl^-/L fueron suficientes para proteger a los juveniles de C. idella del efecto adverso producido por la CL50-96h de nitrito sobre la tasa respiratoria de los peces. Así, las razones iónicas ($\text{Cl}^-/\text{N-NO}_2^-$) que resultaron más eficientes en la protección de las carpas fueron 3.5, 0.9 y 1.3 para 24, 29 y 32°C respectivamente. En este sentido, Schweder y Tucker (1983) señalan que razones de estos iones, similares a la reportadas en este estudio, son suficientes para mantener las concentraciones de metahemoglobina en niveles seguros para los organismos.

C) PARAMETROS SANGUINEOS

En esta fase experimental se midieron las concentraciones de nitrito y de cloruro en el plasma de juveniles de la carpa herbívora (Ctenopharyngodon idella) aclimatados a 24, 29 y 32 °C y expuestos a diferentes concentraciones de nitrito, las cuales se seleccionaron con base en los resultados obtenidos en las pruebas de toxicidad aguda en organismos de 7.6 g (en ADA).

a) NITRITO PLASMÁTICO

La concentración de nitrito en el plasma de los peces aclimatados a 24 °C aumentó en presencia de las mayores concentraciones del contaminante. Los niveles de nitrito se incrementaron de 0.04 mg N-NO₂⁻/L en el grupo testigo a 8.53, 11.95, 25.27 y 34.23 N-NO₂⁻/L en los peces expuestos a 1.5, 3.0, 6.0 y 9.0 mg N-NO₂⁻/L respectivamente. Es importante señalar que en estas concentraciones los niveles de nitrito plasmático fueron mayores que la concentración de nitrito en el medio. Por ejemplo, en los peces expuestos a 1.5 mg N-NO₂⁻/L el nitrito se acumuló 5.7 veces en relación con la concentración en el medio; mientras que en los peces expuestos a 6.0 y 9.0 mg N-NO₂⁻/L la concentración de nitrito en el plasma de C. idella fue 4.2 y 3.8 veces mayor que la concentración del contaminante (Tabla 7, Fig. 7).

En las carpas aclimatadas a 29°C y expuestas a 1.5 y 3.0 mg N-NO₂⁻/L concentración de nitrito en el plasma aumentó de 0.03 a 0.28 y 0.62 mg N-NO₂⁻/L, respectivamente. En los peces expuestos a 6.0 y 9.0 mg N-NO₂⁻/L la concentración de

nitrito alcanzó 4.24 y 5.93 mg N-NO₂⁻/L respectivamente. Aunque la concentración de nitrito en el plasma de los peces se incrementó en niveles significativos, la concentración del contaminante en el plasma, en ningún caso, fué mayor a la concentración de nitrito en el medio (Tabla 7, Fig. 7).

Tabla 7. Concentración de nitrito (mg N-NO₂⁻/L) y de cloruro (mg Cl⁻/L) en el plasma de C. idella expuestas a diferentes concentraciones de nitrito.

MEDIO EXTERNO			M E D I O I N T E R N O				
T (°C)	N-NO ₂ ⁻ (mg/L)	N	NITRITO		CLORURO		
			\bar{x}	ES	N	\bar{x}	ES
24	0	6	0.04 ± 0.02		5	3709 ± 25.3	
	1.5	7	8.53 ± 1.21		5	3651 ± 12.8	
	3.0	6	11.95 ± 0.97		5	2751 ± 37.0	
	6.0	6	25.27 ± 3.44		8	2654 ± 20.2	
	9.0	6	34.23 ± 4.13		5	2172 ± 20.2	
29	0	6	0.03 ± 0.01		6	3588 ± 45.1	
	1.5	5	0.28 ± 0.14		5	3632 ± 39.2	
	3.0	5	0.62 ± 0.14		5	3914 ± 39.9	
	6.0	5	4.24 ± 1.00		5	3166 ± 52.9	
	9.0	4	5.93 ± 1.03		4	3099 ± 37.4	
32	0	5	0.02 ± 0.02		5	3434 ± 30.1	
	1.5	5	8.78 ± 1.17		5	3294 ± 54.1	
	3.0	4	19.09 ± 3.78		4	2692 ± 20.2	
	6.0	5	27.51 ± 2.39		5	2235 ± 27.7	
	9.0	5	34.40 ± 2.71		5	2200 ± 9.5	

N = número de organismos. $\bar{x} \pm ES$.

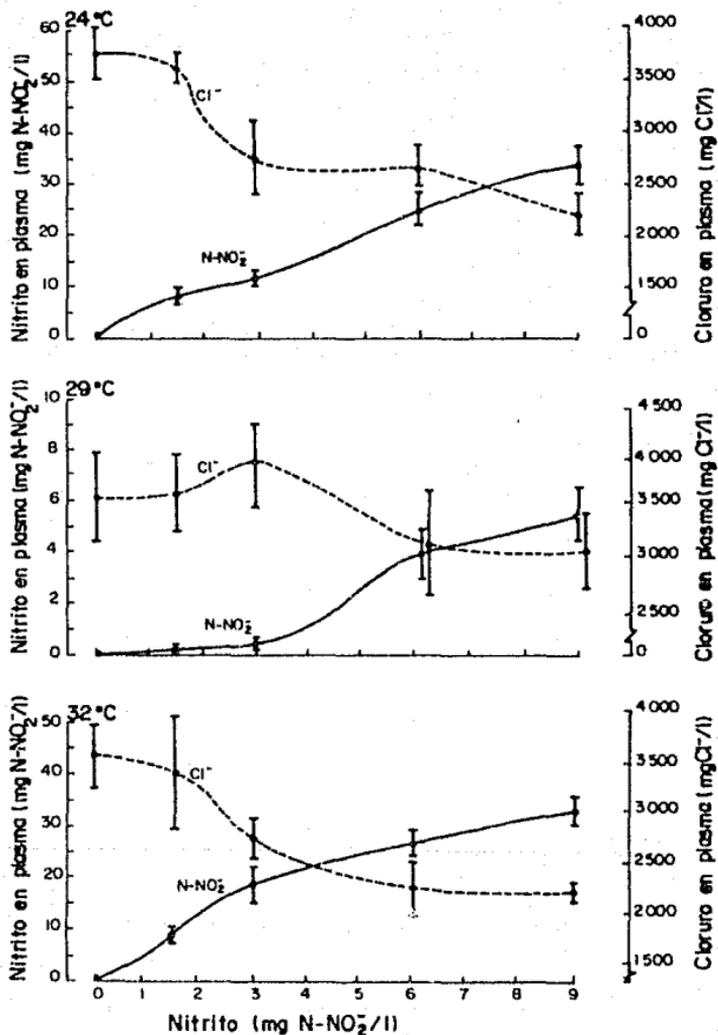


FIG. 7. CONCENTRACION DE NITRITO Y DE CLORURO EN EL PLASMA DE *C. idella* EXPUESTOS A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE NITRITO Y ACLIMATADOS A TRES 24, 29 Y 32 °C. SE SEÑALAN VALORES $\bar{X} \pm ES$.

En los peces aclimatados a 32 °C, la concentración de nitrito en el plasma se incrementó de 0.02 mg N-NO₂⁻/L en el grupo testigo a 8.78 y 19.09 mg N-NO₂⁻/L en los peces expuestos a 1.5 y 3.0 mg N-NO₂⁻/L, esto es, el nitrito se acumuló 5.9 y 6.4 veces con respecto a la concentración en el medio. En los organismos expuestos a 6.0 y 9.0 mg N-NO₂⁻/L, la concentración de nitrito en el plasma fué 27.51 y 34.40 mg N-NO₂⁻/L, así, el nitrito se acumuló a razón de 4.6 y 3.8 veces. La concentración de nitrito en el plasma de los peces fué mayor, en todos los casos a la concentración externa del contaminante (Tabla 7, Fig. 7).

La presencia del nitrito en el medio causa la acumulación de este ión en el plasma de los peces, debido a la diferente permeabilidad de la branquia a este ión, lo cual permite que el nitrito penetre al organismo más rápido de lo éste es eliminado (Bath y Eddy, 1980). Araki *et al.* (1961) señalan que el cloruro tiene mayor habilidad relativa para penetrar las membranas celulares en relación al nitrito, lo cual contribuye a la acumulación del contaminante en los organismos. Algunos autores han reportado altas concentraciones de nitrito en branquias, hígado, cerebro y músculo de peces expuestos a este tóxico, sin embargo, la acumulación de este contaminante alcanza mayor concentración en el plasma de los peces (Eddy y Williams, 1987). Los resultados obtenidos muestran que la acumulación de nitrito en el plasma de *C. idella* se relaciona a la concentración de nitrito en el medio, lo cual concuerda con los resultados reportados por Bath y Eddy (1980) y Jensen *et al.* (1987).

La concentración de nitrito en el plasma de los juveniles de carpa herbívora aclimatados a 32°C alcanzó un gradiente de concentración de hasta 6.4 veces la concentración de nitrito presente en el medio (3.0 mg N-NO₂⁻/L). Margiocco *et al.* (1983) reportaron que Salmo gairdneri acumula iones nitrito en el plasma hasta 60 veces la concentración en medio. Sin embargo, la acumulación de nitrito en la sangre de los peces es dependiente de la especie. Los salmónidos, las tilapias y el bagre de canal acumulan nitrito rápidamente (Eddy y Williams, 1987), mientras que en Micropterus salmoides, M. dolomieu y Lepomis macrochirus el nitrito se acumula en el plasma solo cuando la concentración de este contaminante en el medio es muy elevada (Palacheck y Tomasso, 1984). De esta manera, la respuesta de la carpa herbívora al nitrito presenta mayor semejanza a la observada en los peces de la familia Centrarchidae en comparación con la respuesta de los salmónidos al nitrito. Jensen *et al.* (1987) observaron que después de 48 horas de exposición a 14 mg N-NO₂⁻/L, la concentración de nitrito en el plasma de Cyprinus carpio fue de 75.6 mg N-NO₂⁻/L; esto es, el nitrito se acumuló 5.4 veces en relación a la concentración de nitrito en el medio. La acumulación de nitrito en el plasma de C. idella fue similar a la reportada para la carpa común (Cyprinus carpio). Es importante destacar que la acumulación de nitrito en el plasma de los peces determina el porcentaje de metahemoglobina presente en el plasma de los animales. Rangel (en preparación) observó que la formación de metahemoglobina en juveniles de carpa herbívora se relaciona de manera potencial a la concentración de nitrito en el plasma de los peces. Es por esto que la acumulación de nitrito es un indicador del daño producido por el contaminante.

La temperatura del medio tuvo un papel importante en la acumulación del contaminante. Los niveles más altos de nitrito en el plasma de las carpas se observaron en 24 y 32 °C; en ambos casos la concentración de nitrito en el plasma fué mayor a la concentración del contaminante en el medio. En contraste, en los peces aclimatados a 29 °C, los niveles de nitrito en el plasma de los peces nunca fueron mayores a las concentraciones del medio.

El incremento en los niveles de nitrito y metahemoglobina en los organismos de una misma especie, depende por una parte de la tasa de transporte de nitrito a los fluidos extracelulares y por otra de la eficiencia de desintoxicación de los organismos, lo cual depende a su vez del sistema metahemoglobina-reductasa (Freeman *et al.*, 1983). La temperatura del medio influye directamente en ambos factores. Así, se podría esperar que al aumentar la temperatura del medio el transporte de nitrito al plasma de los peces se aumente, incrementandose la toxicidad del contaminante. Sin embargo, los resultados muestran que los niveles de nitrito en los peces aclimatados a 29°C son menores que los valores de los organismos en 24 y 32°C. Esto se podría explicar, considerando que si bien los peces pueden vivir en un intervalo amplio de temperatura sólo en un pequeño intervalo del factor, la actividad bioquímica y fisiológica es óptima. Para los juveniles de la carpa herbívora, la temperatura óptima corresponde a 29°C (Ceniceros y Rodríguez, 1985). Esto es, aunque el transporte de nitrito se incrementa en presencia de una temperatura más alta, este fenómeno puede compensarse por la mayor eficiencia de desintoxicación de las carpas

aclimatadas a 29°C; así es probable que la actividad metahemoglobina-reductasa funcione de manera más eficiente a 29°C en relación a las otras temperaturas utilizadas.

b) CLORURO PLASMÁTICO

En relación al efecto causado por el nitrito sobre los niveles de cloruro, se observó que en los peces aclimatados a 24 °C, los niveles de cloruro en el plasma disminuyeron cuando la concentración de nitrito en el medio aumentó. Aunque no se observaron diferencias significativas ($P > 0.05$) en los niveles de cloruro de los peces expuestos a 1.5 y 3.0 mg $N-NO_2^-/L$, en los organismos expuestos a 6.0 y 9.0 mg $N-NO_2^-/L$ la concentración de cloruro disminuyó en 30 % y 43 % respecto al testigo (Tabla 7; Fig. 7).

En los organismos aclimatados a 29 °C, no se observaron diferencias significativas en los niveles de cloruro de los peces expuestos a las diferentes concentraciones de nitrito en relación con el testigo). Asimismo, en 32 °C la concentración de cloruro no se modificó en los peces expuestos a 1.5 y 3.0 mg $N-NO_2^-/L$ ($P > 0.05$), mientras que en los organismos expuestos a 6.0 y 9.0 mg $N-NO_2^-/L$ la concentración de cloruro en el plasma se redujo en 35 y 36 % respectivamente con respecto al testigo ($P < 0.05$) (Tabla 7; Fig. 7).

Se conoce que el nitrito penetra al organismo a través del mecanismo de transporte del cloro en la branquia de los peces, sin embargo este mecanismo de transporte de cloro es saturable

y tiene mayor afinidad al cloro que al nitrito. Así, el nitrito es considerado como un inhibidor competitivo del transporte de cloro en los organismos acuáticos (Eddy y Williams, 1987). Debido a que el nitrito inhibe el transporte de cloro, la penetración de nitrito se acompaña de una disminución en los niveles de cloruro en el plasma de los peces (Harris y Coley, 1991). Jensen *et al.*, (1987) señalan que los niveles de cloruro en el plasma de C. carpio disminuyeron 11.8 % en presencia de 14 mg $N-NO_2^-/L$. La concentración de cloruro en C. idella expuestas a nitrito disminuyó en función de la concentración de nitrito en el medio; en las carpas aclimatadas a 24 y 32°C expuestas a 9 mg $N-NO_2^-/L$ la concentración de cloruro disminuyó 42.7 % y 35.9 % respectivamente. La pérdida de cloruro, no es compensada por la entrada de nitrito al plasma de C. idella, lo cual podría alterar el balance iónico de los peces (electroneutralidad). Sin embargo, es posible que la diferencia en el flujo de cloro y nitrito las carpas expuestas al contaminante, sea compensado por cambios en la concentración de otros iones en el plasma. Al respecto, Jensen *et al.* (1987) señalan que en C. carpio expuestos al nitrito, además de una entrada masiva de nitrito y pérdida de cloruro, se observa un flujo de bicarbonato y lactato. Asimismo, la concentración de potasio se incrementa, el sodio disminuye mientras los niveles de calcio permanecen constantes. Resultados similares han sido reportados para el crustaceo Pacifastacus leniusculus (Harris y Colley, 1991).

Aunque la temperatura de aclimatación no modificó la concentración del cloruro en el plasma de los peces de los

grupos testigo ($P > 0.05$) (Tabla 7), la disminución de los niveles de cloruro de las carpas expuestas a nitrito fué evidente únicamente en los peces aclimatados a 24 y 32 °C. Al respecto, se conoce que la presencia de nitrito aumenta la absorción de electrolitos del medio, aun incremento del número y de la actividad de las células del cloro del epitelio branquial de los peces (Gaino et al., 1984). Es probable que en las carpas aclimatadas a 29°C, esta respuesta adaptativa se manifieste de manera más eficiente que en las otras temperaturas, lo cual permite que la concentración de cloruro en el plasma permanezca constante a pesar de la entrada de nitrito. Por otra parte, es posible que en los peces aclimatados a 24 y 32°C el incremento en la actividad de las células del cloro permita mantener los niveles fisiológicos de cloruro sólo en presencia de concentraciones bajas de nitrito.

c) EFECTO DEL CLORURO SOBRE LA ACUMULACION DEL NITRITO

Debido a la acción antagónica del cloruro respecto a la toxicidad del nitrito, en esta fase experimental se midió el efecto del cloruro sobre la acumulación de nitrito en el plasma de los peces expuestos a 6.0 mg de $N-NO_2^-/L$. La menor concentración de cloruro (6.0 mg Cl^-/L) corresponde al agua dulce artificial (ADA); para las concentraciones mayores se adicionó cloruro de sodio suficiente para obtener las concentraciones deseadas (7.0, 9.0 y 12.0 mg Cl^-/L).

Tabla 8. Concentraciones de nitrito en el plasma de *C. idella*, expuestas a nitrito (6 mg N-NO₂/L) en diferentes concentraciones de cloruro.

MEDIO EXTERNO		MEDIO INTERNO		
T (°C)	Cl ⁻ (mg/L)	N	NITRITO x	ES
24	0	6	0.04 ±	0.02
	6.0	7	25.27 ±	3.44
	7.0	5	21.82 ±	3.27
	9.0	5	9.50 ±	1.30
	12.0	5	1.30 ±	0.40
29	0	6	0.03 ±	0.02
	6.0	5	4.24 ±	1.01
	7.0	6	0.64 ±	0.12
	9.0	5	0.10 ±	0.06
	12.0	5	0.04 ±	0.03
32	0	5	0.02 ±	0.02
	6.0	5	27.51 ±	2.39
	7.0	6	12.06 ±	1.34
	9.0	5	10.33 ±	1.24
	12.0	5	2.76 ±	0.71

Tiempo de exposición: 48 horas.

Tipo de agua: Agua Dulce Artificial

N = número de organismos. $\bar{x} \pm ES$.

En las tres temperaturas de aclimatación los niveles de nitrito en el plasma de las carpas se incrementaron considerablemente respecto al testigo, cuando la concentración de nitrito en el plasma fué baja (6 mg Cl⁻/L); sin embargo, el incremento de la concentración de cloruro en el medio redujo la acumulación del contaminante en los organismos. En los peces aclimatados a

24 °C, la acumulación de nitrito en las carpas expuestas a 7.0, 9.0 y 12.0 mg Cl⁻/L disminuyó 16, 60 y 95 % respectivamente, en relación a la concentración de nitrito observada en los peces expuestos a nitrito y 6 mg Cl⁻/L. Asimismo, en los peces aclimatados a 29°C la concentración de nitrito en el plasma de los peces disminuyó 85, 98 y 99%; mientras que en los peces aclimatados a 32°C la concentración de nitrito en el plasma de C. idella en presencia de 7.0, 9.0 y 12.0 mg Cl⁻/L, fué 56, 63 y 90% menor a los valores observados en los peces expuestos al nitrito (6 mg N-NO₂⁻/L) en combinación con 6 mg Cl⁻/L (Tabla B, Fig. 8).

La entrada de nitrito a los fluidos extracelulares de los peces puede ser inhibida competitivamente por la concentración de cloruro en el medio (Williams y Eddy, 1986). En las carpas herbívoras expuestas a nitrito, la concentración de nitrito en el plasma disminuyó en presencia de mayores concentraciones de cloruro externo (Tabla B; Fig. 8). Así, debido a que la acción tóxica del nitrito depende de la acumulación de este ión y del porcentaje de metahemoglobina presente en el plasma de los peces, la presencia de cloruro disminuyó la toxicidad del nitrito en C. idella. Resultados similares han sido reportados por Bath y Eddy (1980) quienes observaron que la adición de cloruro disminuyó la concentración de nitrito en el plasma de Salmo gairdneri expuestas a nitrito. Asimismo, Jensen et al. (1987) reportan que en presencia de cloruro la acumulación de nitrito en el plasma de C. carpio disminuye significativamente.

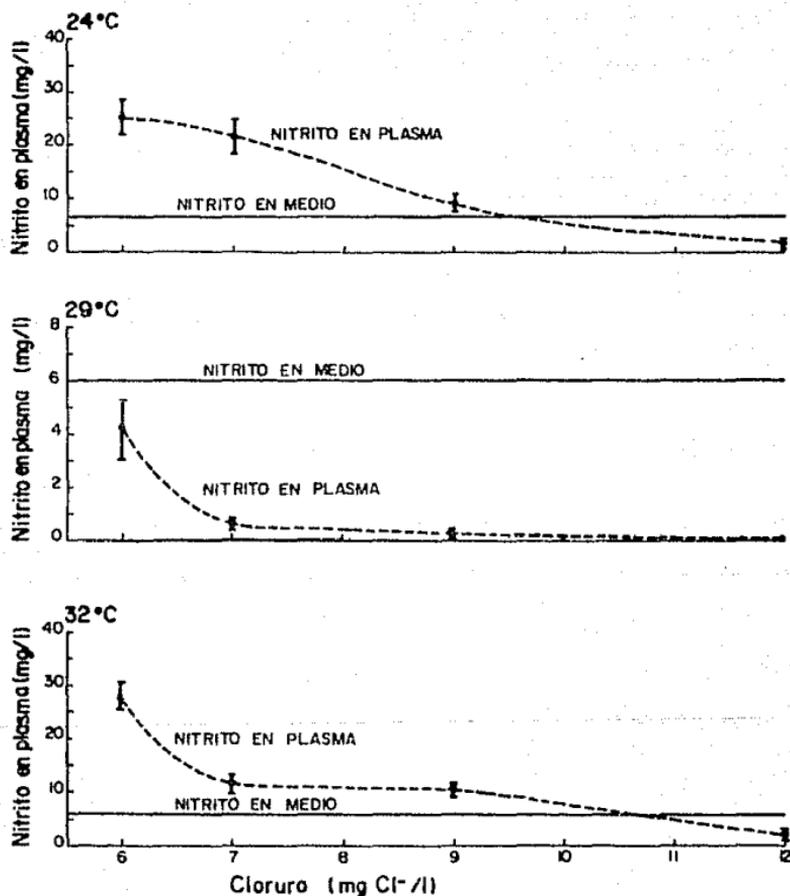


FIG. 8. CONCENTRACION DE NITRITO EN EL PLASMA (MG N-NO²⁻/L) DE *C. idella* EXPUESTOS A LA COMBINACION DE NITRITO Y DIFERENTES CONCENTRACIONES DE CLORURO. SE SENALAN VALORES DE $\bar{X} \pm ES$.

D) EXPOSICIONES CRONICAS (CAMPO DE CRECIMIENTO)

1) SOBREVIVENCIA

Las concentraciones de nitrito utilizadas en esta fase experimental (1.0, 1.6 y 2.5 mg N-NO₂⁻/L) en ningún caso excedieron la CL10-96h para los juveniles de C. idella. La sobrevivencia de las carpas expuestas a nitrito por dos semanas disminuyó al aumentar la concentración del contaminante en el medio (Tabla 9). La mortalidad más alta se observó en los organismos expuestos a la mayor concentración de nitrito (2.5 mg N-NO₂⁻/L) donde el porcentaje de mortalidad fué de 75.0, 77.8 y 61.1 % en los peces aclimatados a 24, 29 y 32°C respectivamente. La mortalidad de los peces testigo aclimatados a 32 °C fue alta (23.5 %) respecto a la observada en 24 y 29 °C; probablemente debido a que esta temperatura es cercana a la última temperatura de aclimatación de los juveniles de esta especie (Alcaraz, *et al.*, 1993) (Tabla 9).

Tabla 9. Porcentaje de sobrevivencia (%) de C. idella expuestos a diferentes concentraciones de nitrito (mg N-NO₂⁻/L) aclimatados a tres temperaturas.

N-NITRITO mg/L	TEMPERATURA, °C		
	24	29	32
0	93.8	94.7	76.5
1.0	93.8	94.7	62.2
1.6	93.8	84.2	57.9
2.5	75.0	77.8	61.1

2) CAMPO DE CRECIMIENTO

El campo de crecimiento (P) de los juveniles de C. idella se evaluó en función del nitrito y de la temperatura utilizando la ecuación del balance energético (Ivlev, 1939) dentro del esquema propuesto por Warren y Davis (1966):

$$P = I - (R + H + N)$$

donde cada uno de los componentes se refieren a las tasas fisiológicas ($\text{cal d}^{-1}\text{g}^{-1}\text{PS}$) de los peces; I es la ingestión, H es la producción de heces y N es la excreción nitrogenada que se discuten a continuación.

a) Ingestión (I)

En cuanto al alimento ingerido por los juveniles de C. idella, esta respuesta no se modificó en función de la concentración de nitrito en el medio, independientemente de la temperatura de aclimatación de los peces ($P > 0.05$). Sin embargo, es importante destacar que en las tres temperaturas se observó una tendencia a disminuir al aumentar la concentración del contaminante (Tabla 10, Fig. 9).

También es necesario destacar que la dispersión de los datos de la tasa de ingestión fué considerablemente más alta en 32°C que en las temperaturas de aclimatación menores (Tabla 10, Fig. 9). Esto último se puede relacionar con la respuesta de los organismos a la temperatura ya que ésta se encuentra cercana al

límite de sobrevivencia de los juveniles de C. idella. La alta dispersión de los datos de la tasa de ingestión es similar a la observada en Phoxinus phoxinus por Cui y Woolton (1988).

Tabla 10. Elementos del diagrama (E) de cajas en paralelo de la ingestión de alimento (cal d⁻¹g⁻¹PS) de los juveniles de carpa herbívora expuestos a diferentes concentraciones de nitrito.

T (°C)	E	O	NITRITO (mg N-NO ₂ ⁻ /L)		
			1.0	1.6	2.5
24	M	1619.27	1227.83	1441.68	1340.35
	Hi	1307.01	1123.86	1373.90	995.42
	H _a	1950.00	1464.71	1722.64	1394.96
	C _i	1100.30	835.66	850.79	833.69
	C _a	2550.08	1616.71	2245.75	1516.03
	IC	1114.00 2124.15	(1065.45 1390.21)	(1275.55 1607.82)	(1130.96 1549.74)
29	M	2368.14	2596.14	2392.49	2083.23
	Hi	2177.98	3008.15	2083.23	1847.66
	H _a	2757.68	2250.03	2787.62	2399.07
	C _i	1620.65	1702.01	1813.45	1406.80
	C _a	3412.39	3350.03	3293.29	3153.79
	IC	(2114.11 2622.17)	(2201.30 3014.00)	(2071.22 2713.76)	(1931.60 2324.37)
32	M	4904.99	4782.34	4614.42	3901.94
	Hi	3836.93	3224.20	3716.38	2494.43
	H _a	5444.03	5233.36	5192.94	4167.11
	C _i	2189.30	2666.22	3941.16	2186.00
	C _a	6230.49	6106.90	5287.69	4357.90
	IC	(4172.78 5638.00)	(3864.43 5700.25)	(3941.16 5281.69)	(3140.84 4663.04)

Tiempo de exposición: 15 días

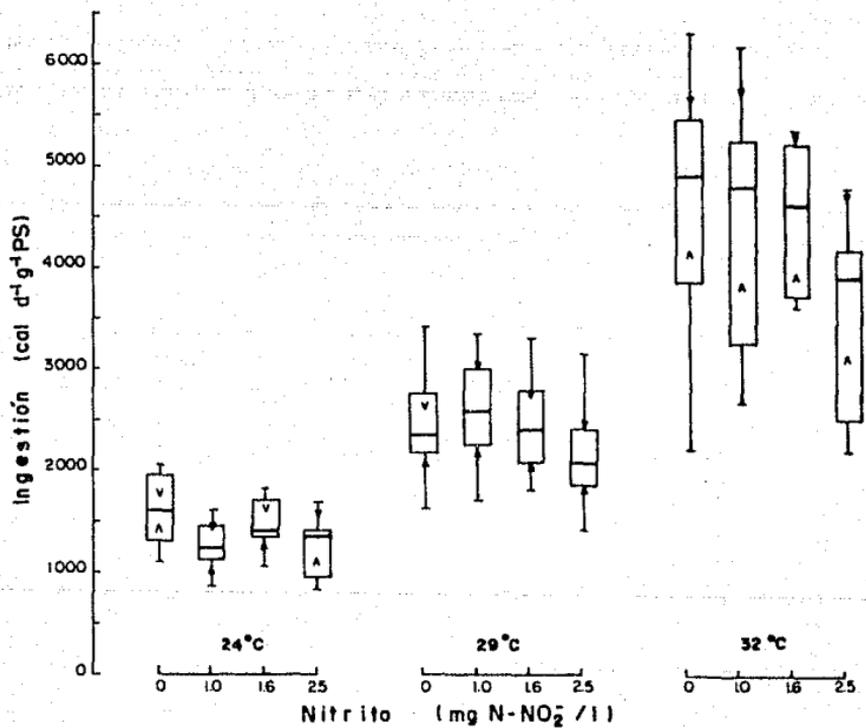


FIG. 9. DIAGRAMA DE CAJAS EN PARALELO DE LA INGESTION DE ALIMENTO DE *C. idella* EXPUESTOS A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE NITRITO, EN TRES TEMPERATURAS DE ACLIMATACION.

La temperatura modificó la tasa de ingestión tanto en los peces del grupo testigo como en los de los grupos experimentales; la ingestión de ambos grupos se incrementó al aumentar la temperatura ($P < 0.05$). En los grupos testigo, la tasa de ingestión se incrementó 31.7 y 67.0 % en los peces aclimatados a 29 y 32 °C respecto a los aclimatados a la menor temperatura ($P < 0.05$) (Tabla 10, Fig. 9). El incremento de la tasa de ingestión al aumentar la temperatura se puede asociar al incremento en el metabolismo de las carpas ya que en muchos animales, la incorporación de energía a través de la ingestión es regulada con base en las necesidades energéticas de los organismos (Schmidt-Nielsen, 1984). Así, en Carasius auratus un incremento de 10 °C en la temperatura produce un aumento del 50 % en la tasa de ingestión de los peces (Rozin y Mayer, 1961).

b) Eficiencia de Asimilación (U') y Asimilación (CA)

La eficiencia de asimilación del alimento ingerido (U' , %) se calculó utilizando el método indirecto propuesto por Conover (1966), a partir de la relación entre el contenido de materia orgánica y el peso seco del alimento y de las heces recolectadas.

La eficiencia de asimilación de las carpas aclimatadas a 24°C y expuestas a 1.0, 1.6 y 2.5 mg $N-NO_2^-/L$ disminuyó 9.91 y 27.2 % respecto al testigo. Sin embargo, en los peces aclimatados a 29 y 32°C la U' no se modificó en función de la concentración de nitrito en el medio (Tabla 11, Fig. 10).

Tabla 11. Eficiencia de asimilación (U, %) y Asimilación (A, cal d⁻¹g⁻¹PS) de *C. idella* expuestos a diferentes concentraciones de nitrito.

T (°C)	N-NITRITO (mg /L)	U (%)	A cal d ⁻¹ g ⁻¹ PS
24 °C	0	68.00	1100.66
	1.0	68.00	834.92
	1.6	61.26	883.21
	2.5	49.14	658.64*
29 °C	0	68.04	1611.28
	1.0	69.54	1805.36
	1.6	69.86	1671.39
	2.5	69.00	1437.43
32 °C	0	58.98	2892.96
	1.0	63.99	3060.22
	1.6	57.98	2675.44
	2.5	64.13	2501.31

* Dif. sign. respecto al testigo (P < 0.05)

En los grupos testigo, las eficiencias de asimilación más altas se observaron en las carpas aclimatadas a 24 y 29°C; en cambio, que en los grupos expuestos a nitrito la mayor eficiencia de asimilación se presentó en los organismos aclimatados a 29 °C (Tabla 11 Fig. 10). Esto último se puede atribuir a que en esta temperatura la digestión del alimento se realiza con alta eficiencia, independientemente de la concentración de nitrito. Es importante considerar, por una parte, que la eficiencia de asimilación del alimento, depende en gran medida de la

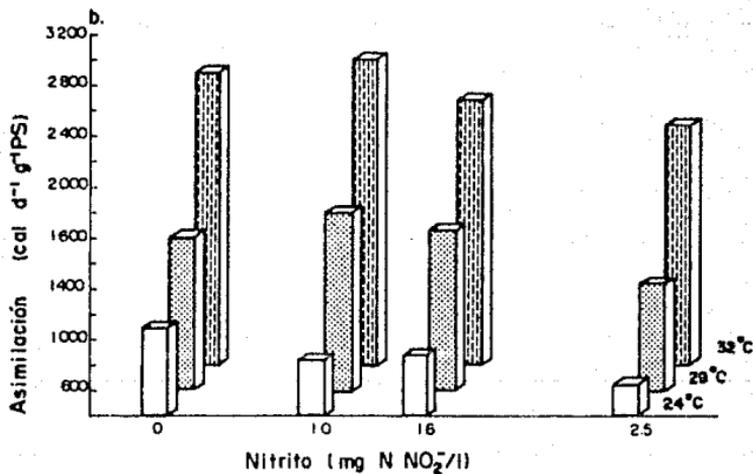
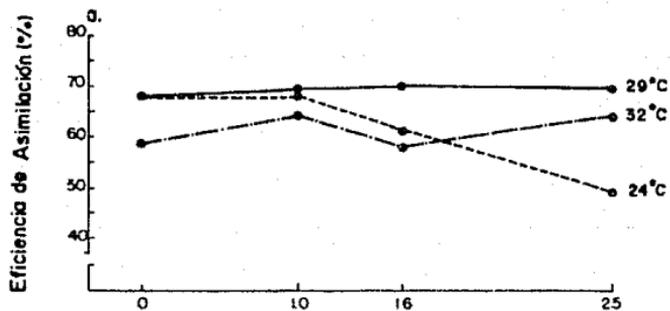


FIG. 10. EFICIENCIA DE ASIMILACION (a) Y ASIMILACION (b) DE *C. idella* EXPUESTOS A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE NITRITO, ACLIMATADOS A TRES TEMPERATURAS.

capacidad de los organismos para digerir y absorber el alimento ingerido (Prosser, 1991) y por otra, que en la temperatura óptima los peces realizan las funciones bioquímicas y fisiológicas con máxima eficiencia. Así, la alta eficiencia de asimilación observada en las carpas, independientemente de la presencia de nitrato, puede atribuirse a que en esta temperatura (óptima para la especie) la degradación enzimática y la absorción intestinal es más alta.

Beamish, et al. (1975) señalan que la eficiencia de asimilación de los organismos acuáticos, se incrementa con la temperatura del medio debido a que la asimilación responde al aumento de las necesidades energéticas de los organismos en presencia de mayores temperaturas. Sin embargo, en este estudio la U' de las carpas de los grupos testigo disminuyó al aumentar la temperatura de 29 a 32 °C.

La eficiencia de asimilación del alimento permite conocer la capacidad de los organismos para convertir el alimento ingerido en energía útil para llevar a cabo los procesos fisiológicos. La eficiencia de asimilación reportada para peces carnívoros varía de 65 a 99% (Elliot, 1979; Pandian y Vivekanandan, 1985; Du Preez y Crockraft 1988 a, b); la eficiencia de asimilación de los omnívoros y herbívoros como las carpas, es menor a la reportada para otros grupos de peces (Fisher, 1972). En algunos estudios realizados con carpa herbívora (20-70 g) se han reportado eficiencias de asimilación de la energía contenida en el alimento ingerido tan bajas como 13.2 %, cuando los organismos son alimentados con plantas (Fisher, 1970).

Asimismo, Fisher (1972) reporta que en C. idella la eficiencia de asimilación se incrementa hasta 41.8 % cuando el alimento es de origen animal (Tubifex). Si bien algunos autores consideran que la eficiencia de asimilación es una característica "particular" de cada especie, Cui y Liu (1990) señalan que la calidad del alimento suministrado, es uno de los factores principales que determinan la obtención de energía del alimento ingerido. En este estudio se proporcionó alimento balanceado comercial y la eficiencia de asimilación en las diferentes condiciones experimentales varió de 45.7 a 69.9 % (Tabla 11, Fig. 10). De esta manera, los juveniles de C. idella convirtieron la energía del alimento ingerido, en energía útil para sus funciones fisiológicas con una mayor eficiencia en relación a la reportada por Fisher (1970) para juveniles de carpa herbívora, lo cual puede atribuirse a las características del alimento suministrado.

El alimento asimilado (A, cal d⁻¹g⁻¹PS) por las carpas se calculó a partir del producto de la ingestión (I, cal d⁻¹g⁻¹PS) y la eficiencia de asimilación de alimento (U', %) en las diferentes condiciones experimentales.

El alimento asimilado por los peces aclimatados a 24 °C disminuyó considerablemente (40.2 %) en presencia de altas concentraciones de nitrito (2.5 mg N-NO₂⁻/L) con respecto al grupo testigo (P < 0.05); en contraste el nitrito no modificó la asimilación de las carpas aclimatadas a 29 y 32 °C (P > 0.05). La temperatura de aclimatación influyó significativamente en la cantidad de alimento asimilado por los

peces. Así, en los organismos del grupo testigo el alimento asimilado fué 31.7 y 62.0 % mayor en 29 y 32 °C respectivamente, en relación a la menor temperatura (Tabla 11, Fig. 10).

Es importante recordar que la asimilación del alimento depende tanto de la ingestión del mismo, como de la eficiencia con que este es incorporado al organismo como fuente de energía. Así, la modificación de la asimilación del alimento en las diferentes condiciones experimentales se atribuye al efecto producido tanto por la presencia de nitrito como por la temperatura.

c) Respiración (R)

La mayor parte de las reacciones que producen energía fisiológicamente se reflejan en el consumo de oxígeno, medida indirecta del metabolismo aerobio de los organismos. El peso corporal, es uno de los principales factores que modifican la tasa metabólica. El consumo de oxígeno (mg O₂/h) de los juveniles de C. idella se relacionó con el peso seco corporal (0.06-1.10 g PS) acorde al modelo potencial (Schmidt-Nielsen, 1984). Los parámetros del modelo se obtuvieron ajustando la ecuación logarítmica por el método de mínimos cuadrados (Zar, 1974). Los valores decodificados, así como los estimadores (R² y P) se presentan en la Tabla 12.

Tabla 12. Parámetros y estimadores de las regresiones entre el consumo de oxígeno y el peso seco de los juveniles de C. idella expuestos a diferentes concentraciones de nitrito (mg N-NO₂⁻/L).

T (°C)	NITRITO (mg/L)	a			
		a	b	R ²	P
24	0	5.87	0.76	0.00	99.66
	1.0	3.82	0.62	0.00	99.51
	1.6	3.90*	0.77	0.00	98.80
	2.5	1.95*	0.84*	0.00	97.66
29	0	7.54	0.84	0.00	99.51
	1.0	3.39*	0.36*	0.00	95.18
	1.6	3.46*	0.36*	0.00	99.37
	2.5	3.46*	0.36*	0.00	99.91
32	0	6.11	0.38	0.00	99.32
	1.0	5.37	0.32	0.01	99.37
	1.6	5.59*	0.41	0.03	99.73
	2.5	4.48*	0.33	0.03	99.80

R² = coeficiente de determinación.

P = probabilidad ($\alpha < 0.05$).

* Dif. Sign. respecto al testigo

En cuanto a los parámetros de la ecuación potencial (VO₂ = a P^b) que describe la relación entre el peso seco y la tasa metabólica de los peces (Tabla 12), en las carpas aclimatadas a la menor temperatura la presencia de 1.0 y 1.6 mg N-NO₂⁻/L disminuyeron el valor de las ordenadas (a) de las ecuaciones (P < 0.05). En esta misma temperatura (24 °C) la pendiente de la regresión fué menor en presencia de la mayor concentración el contaminante (P < 0.05). En los peces

aclimatados a 29 °C, tanto los valores de las ordenadas, como los de las pendientes disminuyeron en presencia del nitrito respecto al testigo ($P < 0.05$). Mientras que en los organismos aclimatados a la mayor temperatura las ordenadas de la regresión disminuyeron en presencia de 1.6 y 2.5 mg $N-NO_2^-/L$ y los valores de las pendientes no se modificaron en presencia del contaminante ($P > 0.05$).

Brett y Groves (1979) consideran que en promedio, la pendiente de la regresión (b) entre el consumo de oxígeno y el peso corporal (g) es de 0.80. Al respecto, Fisher (1970) encontró que en la carpa herbívora, el valor de la pendiente varió en función del tipo de alimento suministrado de 0.61 a 0.76. En este estudio, los valores de las pendientes de las regresiones entre el consumo de oxígeno y el peso seco de C. idella fueron similares a las reportadas por Brett y Groves (1979) y por Fisher (1970) para la misma especie. Por otra parte, la disminución del valor de la pendiente por efecto de la exposición al nitrito, indica que el peso de los organismos es un factor importante en cuanto a la toxicidad del nitrito y que los organismos de mayor talla fueron más sensibles a la presencia del contaminante (Tabla 12).

Por otra parte, se conoce que las temperaturas altas incrementan las respuestas bioquímicas y fisiológicas de los organismos ectotermos (Prosser, 1958, 1991). En este estudio se observó que al subir la temperatura, aumentó la tasa metabólica de las carpas (Tabla 13; Fig. 11). En los peces del grupo testigo la tasa metabólica más alta se observó en las

carpas aclimatados a la mayor temperatura. En este grupo, en las carpas aclimatadas a 32°C la tasa fisiológica de los organismos fué 71 % y 60 % mayor que en los aclimatados a 24 y a 29 °C, respectivamente.

Tabla 13. Elementos del diagrama de cajas en paralelo correspondientes a la tasa respiratoria ($\text{cal d}^{-1} \text{g}^{-1} \text{PS}$) de C. idella expuestos a diferentes concentraciones de nitrito.

T (°C)	E	0	N-NITRITO (mg N-NO ₂ ⁻ /L)		
			1.0	1.6	2.5
24	M	720.92	643.51	512.06	435.46
	Hr	672.54	574.16	456.42	405.62
	Hs	837.85	819.30	546.74	493.52
	Cr	592.70	479.00	429.01	401.59
	Cs	870.11	871.72	574.16	520.13
	IC	(641.89 799.95)	(497.55 790.27)	(464.49 559.64)	(379.01 491.90)
29	M	994.29	1637.99	1512.40	1160.41
	Hr	907.20	1474.10	1287.01	1096.70
	Hs	1053.16	2307.11	1782.95	1234.20
	Cr	877.36	1136.22	1058.00	941.07
	Cs	1129.77	3195.06	2782.89	1718.44
	IC	(917.68 1070.90)	(1199.31 2076.71)	(1264.61 1760.19)	(1078.30 1242.52)
32	M	2460.31	2604.67	2084.11	2913.52
	Hr	2100.67	2041.81	1634.98	1895.85
	Hs	3128.83	3277.21	2649.02	3142.54
	Cr	1283.79	1557.97	1362.01	1617.64
	Cs	4345.69	3897.33	2990.45	3551.39
	IC	(1946.60 2974.02)	(1987.42, 3221.93)	(1513.65 2646.57)	(2290.62 3536.42)

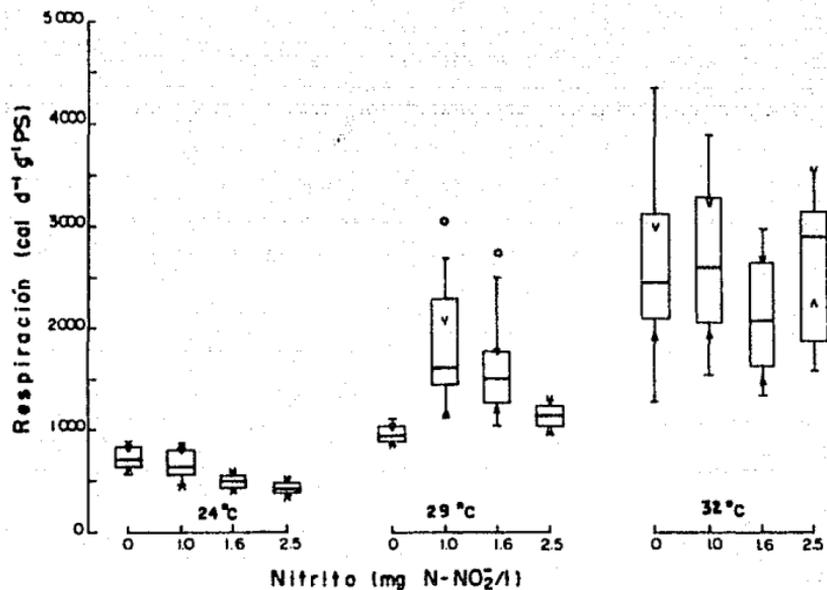


FIG. 11. DIAGRAMA DE CAJAS EN PARALELO DE LA RESPIRACION DE *G. Idella* EXPUESTOS A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE NITRITO Y ACLIMATADOS A 24, 29 Y 32 °C.

Asimismo, la temperatura de aclimatación de las carpas modificó la respuesta respiratoria de los peces a las diferentes concentraciones de nitrito. La tasa de consumo de oxígeno de los peces aclimatados a 24°C tendió a disminuir en presencia de nitrito aunque en las carpas expuestas a 1.0 mg N-NO₂⁻/L no se obtuvieron diferencias significativas (P > 0.05). La respuesta respiratoria de las carpas expuestas a 1.6 y a 2.5 mg de nitrito disminuyó 29.0 y 40.0 % respectivamente (P < 0.05), respecto al testigo. En contraste, en los organismos aclimatados a 29 °C la tasa metabólica de los peces expuestos a 1.0, 1.6 y 2.5 mg N-NO₂⁻/L se incrementó 64.7, 52.1 y 16.7 % respectivamente, en relación al testigo (P < 0.05). Como se puede observar (Fig. 11) entre los grupos experimentales el consumo de oxígeno se reduce al aumentar la concentración de nitrito en el medio, no obstante, las diferencias entre estos no fueron significativas (P > 0.05). En las carpas aclimatadas a la mayor temperatura, la presencia de nitrito no modificó el consumo de oxígeno de los animales (P > 0.05) (Tabla 13, Fig. 11).

La disminución de la respuesta respiratoria observada en estos estudios puede atribuirse a la menor captación de oxígeno por el pigmento respiratorio, debido a la oxidación de la hemoglobina (Bodanski, 1951). Asimismo, es importante recordar que el nitrito disminuye la afinidad de las moléculas de hemoglobina por el oxígeno (Jensen, et al., 1987).

También se observó que la actividad de las carpas disminuyó notoriamente en presencia de nitrito. Aún cuando no se evaluó

cuantitativamente el movimiento, esto puede explicar la disminución de la tasa metabólica de los peces expuestos al contaminante ya que la variación de dicha respuesta se puede relacionar con la actividad de los organismos. Al respecto, se conoce que el consumo de oxígeno de la carpa herbívora es modificada por la cantidad y el tipo de alimento suministrado, así como por la actividad de los animales (Fisher, 1970). Las observaciones realizadas en este estudio, son similares a las reportadas por Watenpaugh y Beitinger (1985 a) quienes señalan que la actividad de Ictalurus punctatus disminuye en presencia de nitrito. Lewis y Morris (1986) sugieren que la disminución en la actividad de los peces expuestos al nitrito es una adaptación que permite a los organismos ser más tolerantes a este contaminante.

Por otra parte, el incremento de la tasa metabólica de las carpas aclimatadas a 29 °C puede ser atribuida a algún mecanismo del animal que responda al estrés causado por el nitrito. Es probable que éste se relacione con la bioacumulación del contaminante. En las carpas aclimatadas a 29 °C la acumulación del nitrito es menor, respecto a las otras temperaturas (Tablas 7 y 8). Se conoce que el efecto tóxico del nitrito sobre los peces depende de la acumulación de éste en los organismos; así cuando la acumulación del contaminante es elevada, el daño resulta más severo. Es probable que en condiciones de baja bioacumulación los animales sean capaces de compensar la disminución de la tasa metabólica, producto de la exposición al nitrito. Es importante destacar que aun cuando el incremento de la respuesta respiratoria de los peces

expuestos a nitrito implica un mecanismo de compensación por parte del animal, la modificación de la respuesta respecto al testigo es indicador de estrés; esto es, el estrés se hace evidente a través de las modificaciones de las respuestas bioquímicas y fisiológicas de los animales.

En las carpas aclimatadas a la mayor temperatura, la amplia variabilidad de la respuesta, tanto en los peces testigo como en los experimentales, indica el efecto de estrés causado por la alta temperatura sobre los animales, como se discutió en relación a la ingestión. Respecto al nitrito, es probable que la amplia variabilidad de la respuesta respiratoria enmascare el efecto causado por el contaminante.

d) Excreción Nitrogenada (N)

En los peces el principal producto nitrogenado es el amonio, el cual es excretado fundamentalmente por las branquias. Según algunos autores el amonio representa el 80 al 98% del nitrógeno derivado de la porción proteica del alimento ingerido (Elliot, 1992). La tasa de excreción de amonio de los juveniles de C. idella se incrementó significativamente en presencia de altas concentraciones de nitrito, en los peces aclimatados a 24°C. Las mayores tasas de excreción amoniaca se observaron en las carpas expuestas a 1.6 y 2.5 mg N-NO₂⁻/L, con valores 71 y 76 % mayores que en grupo testigo. En 29°C la presencia de nitrito no modificó la excreción amoniaca de los peces (P > 0.05) y en la mayor temperatura, la producción de amonio de las carpas

expuestas a 1.6 mg N-NO₂⁻/L se incrementó 87.4 % respecto al testigo (P < 0.05). En ambas temperaturas se observó una tendencia a disminuir la tasa de excreción, en los grupos expuestos a la mayor concentración de nitrito en el medio (Tabla 14, Fig 12).

Tabla 14. Elementos del diagrama de cajas en paralelo correspondientes a la excreción nitrogenada (cal d⁻¹g⁻¹PS) de los juveniles de G. idella expuestos a diferentes concentraciones de nitrito.

T (°C)	E	0	N-NITRITO (mg N-NO ₂ ⁻ /L)		
			1.0	1.6	2.5
24	M	25.87	32.93	90.55	107.02
	HI	19.99	28.22	56.45	84.67
	Hs	30.58	33.93	102.31	138.77
	CI	14.11	24.70	49.39	37.63
	Cs	42.34	41.16	166.99	186.98
	IC	19.99	29.40	57.62	84.67
29		32.93	36.43	122.30	129.36
	M	65.86	108.15	111.72	78.79
	HI	41.14	82.32	59.98	58.80
	Hs	108.19	50.57	150.53	112.90
	CI	90.55	40.08	32.94	36.46
	Cs	108.19	180.32	286.94	127.01
32	IC	50.21	50.57	57.62	47.04
		80.03	165.74	165.82	111.72
	M	102.31	115.25	191.69	131.71
	HI	69.38	85.85	128.43	112.90
	Hs	115.25	137.59	244.28	152.88
	CI	54.10	54.10	117.81	99.96
32	Cs	165.82	154.06	254.08	212.86
	IC	75.26	85.85	134.46	109.37
		129.36	244.65	250.48	154.06

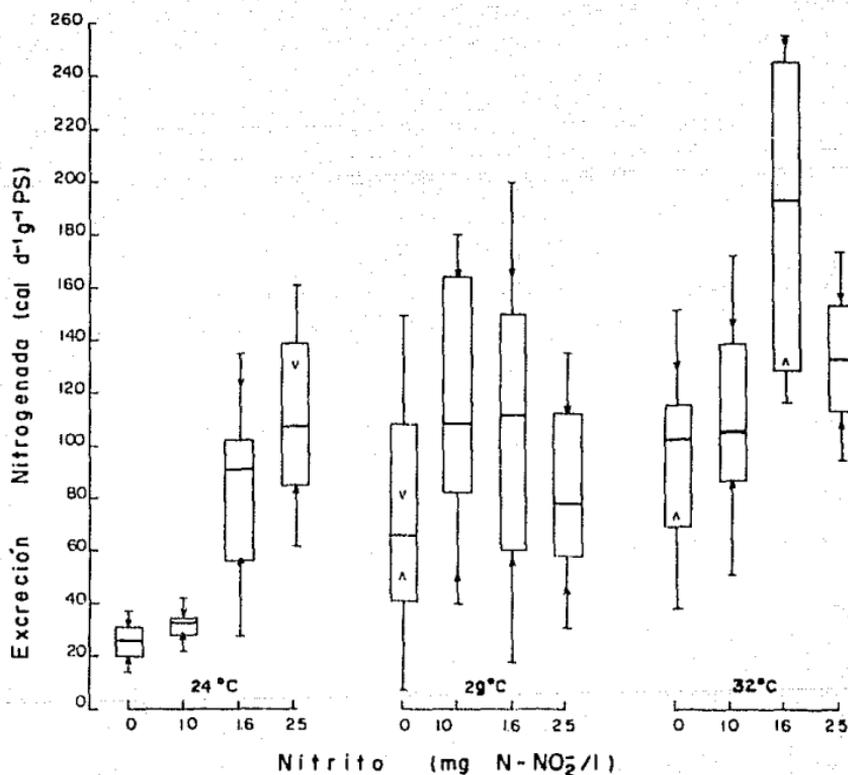


FIG. 12. DIAGRAMA DE CAJAS EN PARALELO DE LA EXCRECION NITROGENADA DE *C. idella* EXPUESTOS A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE NITRITO Y ACLIMATADOS A 24, 29 Y 32 °C.

Se conoce que la tasa metabólica de los organismos acuáticos, incluyendo la excreción nitrogenada, se relaciona con el peso de manera potencial (Jobling, 1981); sin embargo en este estudio el peso tuvo poco efecto en la producción de amonio de las carpas. Resultados similares han sido reportados por Elliott (1976) para Salmo trutta.

Existe una amplia variación intra e interespecifica en los niveles de producción de amonio en peces. Cui y Liu (1990) señalan que en el pez amazónico Pseudobagrus fulvidraco, la producción de amonio fué de 31.75 a 44.69 cal d⁻¹g⁻¹PS mientras que en la carpa común, Cyprinus carpio la excreción de amonio varió de 83.50 a 130.54 cal d⁻¹g⁻¹PS. En este estudio, los niveles de amonio excretados por los juveniles de C. idella se encuentran dentro del intervalo de valores citados para peces. Sin embargo, Tátral (1981) destaca la dificultad de comparar valores de excreción amoniaca promedio debido a la amplia variación de la respuesta en función del alimento suministrado, lo cual puede conducir a la subestimación o sobrestimación de la producción de amonio.

El principal sustrato metabólico en peces carnívoros son las proteínas y los lípidos (Foster y Goldstein, 1969; Mommsen, et al., 1980; Walton y Cowey, 1982; Du Prezz y Crockroft, 1988 a y b). Phillips (1969) señala que en los salmónidos, el 70 % de las calorías obtenidas de la dieta derivan de proteínas. En general, el incremento en la producción de amonio se atribuye al aumento del catabolismo de las proteínas ingeridas por los peces en la dieta. C. idella es un pez herbívoro, pero es probable que debido a la alteración de la tasa metabólica

producida por el nitrito, las carpas obtengan una mayor proporción de energía a través de la deaminación enzimática de aminoácidos (degradación de proteínas). Debido a que las alteraciones producidas por el nitrito en peces implican un déficit de oxígeno y la cantidad de oxígeno necesario para oxidar lípidos es más de dos veces la cantidad necesaria para oxidar proteínas, el metabolismo de los peces se podría incrementar con base en los aminoácidos como sustrato metabólico (Walton y Cowey, 1982).

La degradación de proteínas en el ciclo de los ácidos tricarbóxicos, tiene lugar en el tejido hepático (Leninher, 1984). Asimismo, se conoce que en peces, el hígado es el sitio principal de formación de amonio, aunque el mecanismo exacto de la deaminación es desconocido a la fecha. Michael et al. (1987) observaron modificaciones en el tejido hepático de Clarias lazera expuestos al nitrito. Estas alteraciones se caracterizaron por la vacuolización de células hepáticas, asociadas a un incremento en los niveles de la actividad de las transaminasas, implicadas en el proceso de la deaminación, que se completa en este órgano (Walton y Cowey, 1982). Si bien los autores no señalan una relación entre la actividad hepática y el catabolismo de proteínas, esta modificación en el hígado de los peces expuestos a nitrito podría estar asociada a un incremento en la degradación enzimática de aminoácidos. La habilidad de incrementar la actividad de deaminación enzimática en peces es un factor importante en la respuesta de los organismos para compensar un déficit energético (Sakaguchi y Kawai, 1970 citado por Coloso et al., 1988).

En referencia a la temperatura de aclimatación, la tasa de excreción amoniaca de los juveniles de carpa herbívora se incrementó significativamente al elevarse la temperatura ($P < 0.05$). En los peces del grupo testigo la producción de amonio fué 2.55 y 3.96 veces mayor en 29 y 32°C, respectivamente, que en la menor temperatura ($P < 0.05$). Asimismo, en los organismos expuestos al nitrito la producción de amonio tendió a incrementarse al aumentar la temperatura de aclimatación, independientemente de la concentración del contaminante.

Como se ha señalado anteriormente, la temperatura incrementa la tasa fisiológica de los organismos acuáticos. Muchos autores han concluido que la temperatura es uno de los factores más importantes que modifican la excreción de amonio en peces (Elliott, 1976; Brett y Groves, 1979; Paulson, 1980; Tatrai, 1981; Du Prezz y Crockoft, 1988 a y b), lo cual concuerda con lo observado en este estudio.

e) Campo de Crecimiento (P)

El campo de crecimiento representa la suma de los efectos individuales producidos por las diferentes combinaciones de nitrito y temperatura, sobre los sistemas, órganos y funciones bioquímicas, que modifican a su vez la canalización de energía de las carpas. Es por esto que el campo de crecimiento se utiliza como un indicador de estrés (Viarengo y Canesi, 1991).

El campo de crecimiento se calculó por la diferencia en los valores de la tasa de asimilación (A) y la de respiración (R) y excreción nitrogenada (N),

$$P = A - (R + N)$$

En las tres temperaturas de aclimatación el campo de crecimiento de los juveniles de carpa herbívora disminuyó al aumentar la concentración de nitrito. En los peces aclimatados a 24 °C el campo de crecimiento disminuyó 55.2, 20.7 y 67.2 % en los peces expuestos a 1.0, 1.6 y 2.5 mg N-NO₂⁻/L respectivamente y en las carpas aclimatadas a 29 °C la disminución fué del 89.3, 91.4 y 69.7 %, en comparación con el grupo testigo. En los animales aclimatados a la mayor temperatura el campo de crecimiento de los peces testigo y los aclimatados a 1.0 mg N-NO₂⁻/L fué similar, sin embargo en las carpas expuestas a 1.6 mg N-NO₂⁻/L el campo de crecimiento fué 32.8 % mayor respecto al testigo. Es importante destacar que en esta temperatura, el campo de crecimiento de los peces expuestos a la mayor concentración del contaminante fué negativo (Tabla 15, Fig. 13).

La calidad del agua, así como la variación de los factores ambientales, determinan el estado fisiológico de los organismos, y con ello la canalización de energía a los diferentes procesos fisiológicos. El patrón de distribución de energía en los organismos acuáticos determina la probabilidad de éxito de una población. Aunque una gran cantidad de respuestas bioquímicas y fisiológicas pueden ser indicadoras de estrés, el campo de crecimiento es de especial importancia

debido a que es una respuesta compleja ya que implica la integración de varias respuestas fisiológicas.

Tabla 15. Respuestas fisiológicas y campo de crecimiento de *C. idella* (cal d⁻¹g⁻¹PS) expuestas a diferentes concentraciones de nitrito.

T	NITRITO	I	A	R	N	P
(°C)	(mg /L)	(cal d ⁻¹ g ⁻¹ PS)				
24	0	1618.62	1100.66 (68.0)	720.92 (65.50)	25.87 (2.35)	353.87 (32.15)
	1.0	1227.82	834.92 (68.0)	643.51 (77.08)	32.93 (3.94)	158.48 (18.98)
	1.6	1441.74	883.21 (61.0)	512.06 (57.98)	90.55 (10.25)	280.60 (31.77)
	2.5	1340.34	658.64 (49.0)	435.46 (66.12)	107.02 (16.25)	116.16 (17.64)
29	0	2368.14	1611.28 (68.0)	994.29 (61.71)	65.86 (4.09)	551.13 (34.21)
	1.0	2596.14	1805.36 (69.5)	1637.99 (90.77)	108.15 (5.99)	59.22 (3.28)
	1.6	2392.49	1671.39 (69.9)	1512.40 (90.49)	111.72 (6.68)	47.27 (2.83)
	2.5	2083.23	1437.43 (69.0)	1191.86 (82.92)	78.79 (5.48)	166.78 (11.60)
32	0	4904.99	2892.96 (59.0)	2459.92 (85.03)	102.31 (3.54)	330.73 (11.49)
	1.0	4782.34	3060.22 (64.0)	2604.67 (85.11)	115.25 (3.77)	340.30 (11.12)
	1.6	5768.03	2675.44 (46.0)	2080.51 (77.75)	191.69 (7.17)	403.24 (15.07)
	2.5	3901.94	2502.31 (64.0)	2913.52 (116.49)	131.71 (5.26)	-542.92 (-21.70)

I = ingestión; A = asimilación; R = respiración; N = excreción nitrogenada y P = campo de crecimiento. En parentesis, el porcentaje de energía invertida en los diferentes procesos.

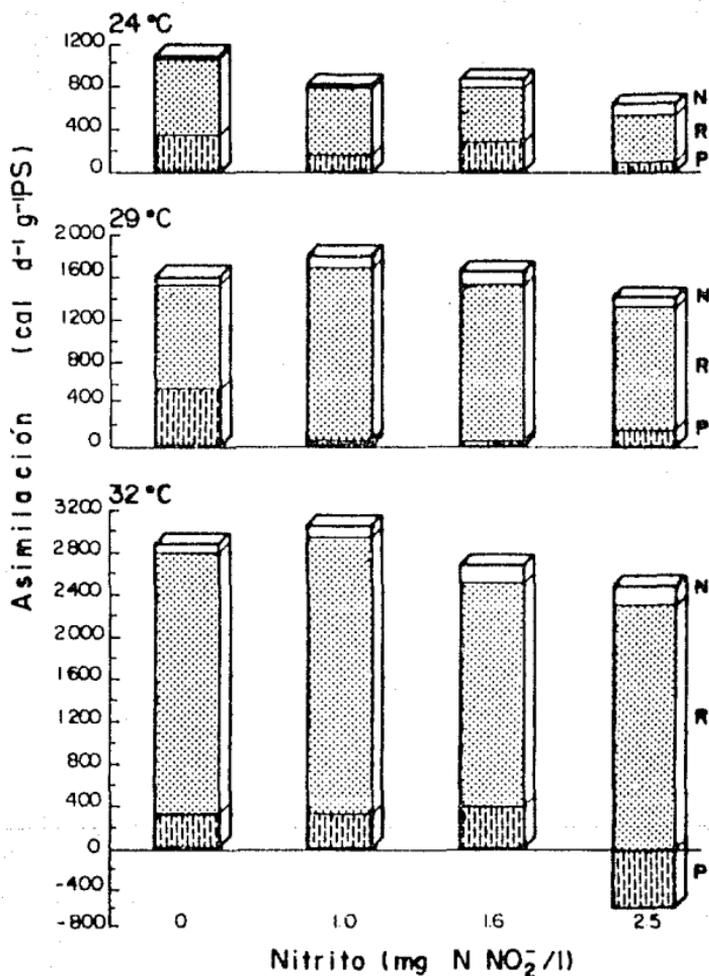


FIG. 13. ASIMILACION DE *C. idella* EXPUESTOS A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE NITRITO, ACLIMATADOS A TRES TEMPERATURAS, 24, 29 y 32 °C.

El campo de crecimiento permite conocer la energía que los organismos pueden disponer para crecimiento somático y producción de gametos, en organismos adultos, lo cual destaca su valor adaptativo. La disminución del campo de crecimiento de los peces expuestos al nitrito es indicador del estrés producido por el contaminante en los animales. Este hecho se puede atribuir a la modificación del patrón de distribución de energía a los procesos fisiológicos de los animales. Por ejemplo, de la energía contenida en el alimento ingerido, los peces expuestos a nitrito asimilaron entre el 49 % al 70 % independientemente de la temperatura. De la proporción asimilada, la energía perdida en heces varió entre 4 % y 10 %, en tanto que en los procesos metabólicos se invirtió entre el 57 % y el 91 % . Esto significa que la energía potencial de crecimiento fué baja, con un intervalo que comprende desde 31.77 % hasta valores negativos. En los grupos testigo, el valor más alto se obtuvo en el grupo de peces aclimatados a 29 °C y el menor en 32 °C (Tabla 15).

3) EFICIENCIAS DE CRECIMIENTO: BRUTA (K₁) Y NETA (K₂).

Las eficiencias bruta y neta de crecimiento son parámetros de gran importancia cuando se utilizan como índices predictivos, ya que permiten conocer en términos energéticos, la producción bajo ciertas características ambientales (Duncan y Klokowski, 1975; Klokowski y Duncan, 1975). Las eficiencias de crecimiento varían en las diferentes especies de peces, en función de los factores del medio.

En este estudio, la K_1 y K_2 tendieron a disminuir en presencia de nitrito, independientemente de la temperatura del medio (Tabla 16). En 24 °C, la K_1 y la K_2 disminuyeron 60.3 y 45.5 % respectivamente en presencia de la mayor concentración de nitrito (2.5 mg N-NO₂⁻/L); mientras que en 29 °C las eficiencias de crecimiento disminuyeron hasta 91 % en las carpas expuestas a 1.6 mg N-NO₂⁻/L. En los peces aclimatados a la mayor temperatura, las eficiencias de crecimiento bruta y neta se modificaron sólo ligeramente en presencia de 1.0 y 1.6 mg N-NO₂⁻/L. Sin embargo, en los peces expuestos a 2.5 mg N-NO₂⁻/L las eficiencias de crecimiento fueron negativas. Urban (1984; citado por Kamler, *et al.*, 1989) estimó las eficiencia bruta y neta de crecimiento de los juveniles de *C. idella*, menores de seis días, obteniendo valores de 10 y 33 % respectivamente, sin embargo aunque estos valores son menores a los obtenidos en este estudio, la edad de los organismos utilizados no permite hacer comparaciones.

En los peces testigo, las eficiencias de crecimiento más altas se presentaron en los peces aclimatados a 29 °C, sin embargo en los peces expuestos al nitrito (experimentales) las máximas eficiencias se observaron en los peces aclimatados a la menor temperatura. Las mayores eficiencias de crecimiento de los peces testigo aclimatados a 29 °C se atribuyen a que esta temperatura es óptima para la especie; asimismo, la baja eficiencia bruta y neta de crecimiento en 32 °C puede deberse a que esta temperatura se encuentra cercana al límite letal para los juveniles de esta especie. Respecto al nitrito, se conoce que en 29 °C los juveniles de carpa herbívora acumulan

menor concentración de nitrito en el plasma respecto a las otras temperaturas ensayadas, sin embargo, las bajas eficiencias de crecimiento de las carpas aunadas al incremento de la energía destinada a la respiración y excreción, pueden sugerir que los peces expuestos al nitrito, invierten gran cantidad de energía en el proceso de detoxificación, lo cual disminuye la proporción energética destinada a crecimiento.

Tabla 16. Eficiencias de crecimiento bruta (K₁) y neta (K₂) de los juveniles de *C. idella* expuestos a diferentes concentraciones de nitrito (mg N-NO₂⁻/L).

T (°C)	NITRITO	EFICIENCIAS DE CRECIMIENTO	
		(K ₁)	(K ₂)
24	0	21.86	32.15
	1.0	12.91	18.98
	1.6	19.46	31.77
	2.5	8.67	17.64
29	0	23.27	34.21
	1.0	2.28	3.28
	1.6	1.98	2.83
	2.5	8.01	11.60
32	0	6.74	11.43
	1.0	7.12	11.12
	1.6	6.99	15.07
	2.5	-13.91	-21.70

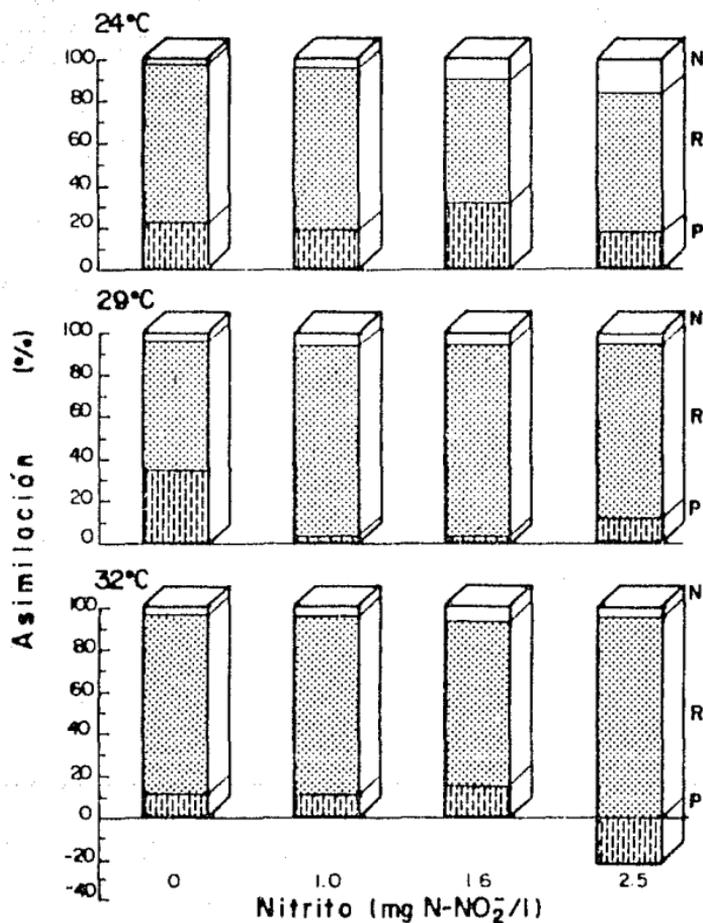


FIG. 14. PROPORCIONES DE LA ENERGIA ASIMILADA CANALIZADA A LAS RESPUESTAS FISIOLÓGICAS QUE CONFORMAN EL BALANCE ENERGÉTICO DE *C. idella*.

En el grupo experimental donde las eficiencias de crecimiento bruta y neta tuvieron valores negativos (2.5 mg N-NO₂⁻/L, 32 °C), asociados a una disminución en la biomasa y un incremento en la proporción de energía canalizada a la respiración, indica que la cantidad de energía incorporada a través del alimento se encontró por debajo del límite de mantenimiento. En este caso, los peces utilizaron sus reservas corporales para cubrir las necesidades energéticas producidas por el nitrito. Al respecto, Buhler y Halver (1961) señalan que cuando la energía incorporada en la dieta es insuficiente, la pérdida de peso de los animales es acompañada de un decremento inmediato de grasas y una posterior disminución del contenido de proteínas corporales, lo cual se refleja en un incremento de la excreción amoniaca. En este aspecto, es importante recordar que la sobrevivencia de las carpas expuestas por dos semanas a 2.5 mg N-NO₂⁻/L fué baja (61.1 %), lo cual permite suponer que en esta condición experimental el estrés causado por el nitrito fué severo y la sobrevivencia de este grupo experimental dependió únicamente del tiempo de exposición al contaminante.

En las tres temperaturas de aclimatación la exposición a nitrito incrementó la energía necesaria para la respiración y para la excreción, disminuyendo con esto la proporción de energía canalizada al crecimiento de los peces, determinada a través de las eficiencias bruta (K₁) y neta (K₂) de crecimiento.

INTEGRACION Y CONCLUSIONES

Se conoce que a diferencia de muchos contaminantes que causan daño por contacto, el producido por el nitrito depende de la acumulación del contaminante en el tejido de los animales, lo cual depende a su vez de la tasa de penetración (transporte) y de eliminación (sistema metahemoglobina reductasa) del tóxico. El nitrito acumulado en el plasma del organismo oxida la hemoglobina a metahemoglobina produciendo metahemoglobinemia. Tal efecto del nitrito, en los peces ha recibido considerable atención. En la figura 15 se presenta un esquema que intenta integrar los resultados obtenidos de este estudio.

La toxicidad del nitrito depende tanto de las características propias del organismo (tamaño), como de los factores ambientales. Entre estos, la temperatura es un factor importante ya que controla la tasa metabólica a la vez que puede modular la tasa de captación del nitrito y la actividad de la metahemoglobina reductasa que participa en el proceso de desintoxicación de los animales. Asimismo, el tamaño es una característica determinante en lo que se refiere a la toxicidad aguda del nitrito. Las carpas pequeñas presentaron mayor sensibilidad que las más grandes lo cual fue dependiente de la temperatura. En el grupo de peces más pequeños la concentración letal media (CL50-96 h) del nitrito disminuyó al aumentar la temperatura de aclimatación. En cambio, en los peces más grandes la concentración letal media fue mayor en 29 °C que a 24 y 32 °C. La mayor sensibilidad observada en los peces del primer grupo se podría deber, por una parte, a que al

aumentar la temperatura se incrementaría la tasa de captación del nitrito con la subsecuente acumulación. Por otra parte, se podría inferir que el sistema enzimático metahemoglobina reductasa sería menos eficiente en los juveniles tempranos que en los de mayor tamaño. El hecho que en las carpas del segundo grupo la CL50-96 h fue mayor en 29 °C que en las otras temperaturas, se podría atribuir a que en los juveniles de mayor tamaño el sistema reductor de la metahemoglobina reductasa estaría funcionando más eficientemente a esta temperatura, que es la temperatura óptima para la especie en este estadio del desarrollo. Así, en este grupo, la acumulación de nitrito y sus efectos adversos estaría compensada por el proceso de detoxificación del contaminante.

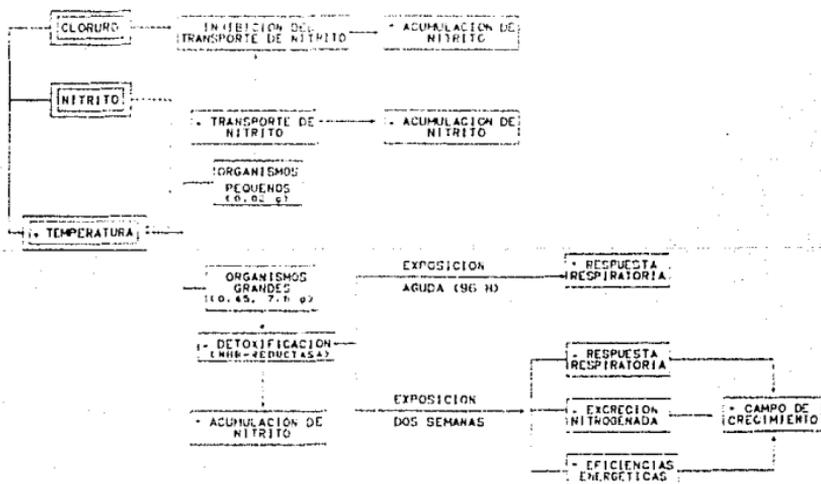


Fig. 15. Descripción de la acción tóxica del nitrito en los juveniles de Clenopharyngodon idella.

Uno de los factores que modifican el efecto tóxico del nitrito es la presencia de cloruro, ya que este anión como el nitrito compiten por el mismo mecanismo de transporte (Bath y Eddy, 1980; Williams y Eddy, 1986). El efecto del cloruro sobre la toxicidad del nitrito en los juveniles de C. idella se determinó mediante la mortalidad y a través de la respuesta respiratoria de los animales. La presencia de nitrito incrementó la mortalidad y disminuyó la tasa respiratoria de las carpas, independientemente de la temperatura de aclimatación. La adición de cloruro al medio provocó la disminución de la mortalidad y la tasa respiratoria se recuperó a niveles similares a los del testigo; esto último hizo evidente el efecto protector del cloruro contra la toxicidad del nitrito en C. idella, como ha sido demostrado en varias especies de peces. (Lewis y Morris, 1986). La alta toxicidad del nitrito en presencia de bajas concentraciones de cloruro se atribuye a que bajo estas condiciones la tasa de captación del contaminante se incrementa produciendo un aumento de metahemoglobina en sangre, como ha sido demostrado por Rangel (en preparación). Por lo tanto, el incremento de la mortalidad, así como la disminución de la respuesta respiratoria de las carpas expuestas a nitrito puede atribuirse a la formación de metahemoglobina.

Asimismo, en presencia de mayores concentraciones de cloruro la tasa de captación del nitrito respecto al transporte de cloruro disminuye, acumulándose así menor cantidad de nitrito en la sangre de los animales. Las modificaciones tanto de la mortalidad como de la tasa respiratoria de los organismos, en las diferentes combinaciones de nitrito y cloruro permitieron

demostrar que el efecto tóxico del contaminante depende de la proporción relativa de ambos iones en el medio y no de la concentración de cada uno de ellos. Esto es, cuando el valor de la razón nitrito/cloruro es bajo, la mortalidad y la inhibición observada en la respuesta respiratoria fueron menos evidentes.

Las concentraciones subletales de nitrito en 96 h resultaron letales en exposiciones de 15 días. En esta última fase experimental las concentraciones utilizadas causaron hasta del 40 % de la mortalidad de las carpas expuestas a la mayor concentración de nitrito aclimatadas a la mayor temperatura. Al respecto, se conoce que aunque la mayor parte de la acumulación de nitrito en el plasma de las carpas se alcanza durante las primeras 96 horas de exposición, la toxicidad del contaminante se incrementa con el tiempo de exposición al mismo.

En los experimentos semicrónicos se midieron el campo de crecimiento y las eficiencias de crecimiento (K_1 y K_2) y de asimilación en los juveniles de la carpa herbívora a través de la integración de las respuestas fisiológicas de los peces expuestos al nitrito. Dichas integraciones se consideraron como índices del estrés producido por el contaminante.

En contraste con los resultados obtenidos de la fase de exposición aguda (96 h), en donde independientemente de la temperatura de aclimatación de las carpas la presencia de nitrito disminuyó la tasa respiratoria de los animales, la respiración de las carpas expuestas por dos semanas al nitrito

se incrementó en la temperatura óptima de la especie. Así, la respuesta de los organismos al nitrito en lapsos de exposición cortos (96 h) y medianos (15 días) es diferente.

El aumento del consumo de oxígeno de los peces aclimatados a 29 °C expuestos al nitrito se podría atribuir a un incremento en el pigmento respiratorio de los peces, o bien, a una mayor eficiencia en la extracción del oxígeno disuelto. Es importante destacar que en las carpas aclimatadas a 29 °C, los bajos niveles de nitrito en el plasma se atribuyen a la reducción enzimática de la metahemoglobina, proceso que demanda energía. Así, es probable que el alto costo energético que demanda la actividad de la metahemoglobina reductasa se podría manifestar a través del incremento de la tasa metabólica, lo cual redujo la energía potencial canalizada a crecimiento en este grupo de organismos. Al respecto es importante destacar, que los valores de campo de crecimiento de los peces testigo aclimatados a la temperatura óptima (29 °C) fueron mayores a los correspondiente aclimatados a 24 y 32 °C; sin embargo, el campo de crecimiento de los peces expuestos al nitrito en 29 °C fue menor que el campo de crecimiento de los grupos experimentales de las otras temperaturas. Esto indicaría que si bien la temperatura óptima protege a los peces contra la toxicidad del nitrito, estos no estarían exentos de estrés en exposiciones prolongadas.

En el mismo sentido, se puede argumentar que si bien en la temperatura óptima de la especie, la actividad de la metahemoglobina reductasa es alta, la actividad de esta enzima y los niveles de nitrito en el plasma no son los únicos

factores que determinan el estado fisiológico de los peces expuestos al nitrito. En este caso parece ser que los bajos niveles de nitrito en el plasma de los peces expuestos al contaminante por períodos prolongados requiere un gasto energético extra, lo cual disminuye la energía disponible para el crecimiento. Así, el contaminante alteraría el *preferendum* final de temperatura de la especie, donde los organismos llevan a cabo sus funciones con máxima eficiencia. Sin embargo, en esta temperatura muchos procesos individuales, como la actividad de ciertas enzimas, puede aún ser óptima lo que no implica un beneficio para el organismo *in toto*.

En el campo de crecimiento de los peces se integran varias respuestas fisiológicas como las de ingestión, asimilación, respiración y excreción nitrogenada; por esta razón se considera una integración compleja que es útil como índice de estrés. El hecho de que los valores más altos del campo de crecimiento se observaron en los organismos que permanecieron sin el contaminante (testigos), indica que la presencia de nitrito altera el balance homeostático de los animales. En los grupos experimentales los valores más altos del campo de crecimiento de las carpas expuestas al nitrito se observaron en los peces aclimatados a la mayor temperatura; lo cual podría indicar que en estas condiciones los juveniles de la carpa herbívora se encuentran mejor protegidos del efecto del nitrito que los aclimatados a las temperaturas más bajas. No obstante, las bajas eficiencias bruta y neta de crecimiento, así como las menores eficiencias de asimilación indican que los peces expuestos a nitrito a 32 °C utilizan la energía del alimento con baja eficiencia y canalizan poca energía al crecimiento

somático. Así, los altos valores de campo de crecimiento de los peces expuestos a nitrito se atribuyen a la alta tasa de ingestión en 32 °C, más que a la protección de la temperatura contra la toxicidad del contaminante.

Los resultados obtenidos permiten profundizar los conocimientos que se tienen sobre el efecto del nitrito en los peces herbívoros. Asimismo, en este estudio se destaca la necesidad de evaluar el efecto de los contaminantes sobre los organismos mediante la utilización de varios índices de estrés que permitan la integración de la información, lo cual concuerda con lo reportado por Viarengo y Canessi (1991). También se subraya la importancia de evaluar la estrecha interacción existente entre algunos factores ambientales y las características propias de los organismos ya que sólo la interacción compleja de factores endógenos (condición fisiológica) y exógenos (factores del medio) y la integración de estos puede indicar los probables mecanismos de toxicidad del nitrito.

LITERATURA CITADA

- Alcaraz G.Z., 1989. Alteraciones producidas por el detergente en las respuestas fisiológicas y de comportamiento de la carpa herbívora Ctenopharyngodon idella en relación con la temperatura. Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias, U.N.A.M., Mexico, 31 pp.
- Alcaraz, G., C. Rosas, and S. Espina, 1993. Effect of detergent on the response to temperature and growth of grass carp Ctenopharyngodon idella. *Bull. Envir. Contam. Toxicol.* 50 (5): 659-664.
- Almendras J.M.E., 1987. Acute toxicity and methemoglobinemia in juvenile milkfish (Chanos chanos Forsskae). *Aquacult.* 61: 33-40.
- Anderson, K.A., T.L. Beitinger, L.C. Fitzpatrick, and E.G. Zimmerman, 1980. Temperature effect on oxygen consumption in genic/MDH variants of red shiner (Notropis lutrensis) populations. *Comp. Biochem Physiol.* 67A: 497-500.
- Anthonesen A.C., P.C. Loehr, T.B.S. Prakasam, and E.G. Srinath, 1976. Inhibition of nitrification by ammonia and nitrous acid. *J. WPCF.* 48 (5): 835-852.
- APHA, 1985. *Standard methods for examining the water and waste waters.* 16ava edición, APHA Washington 1266 pp.

- Araki T., M. Ito, and O. Oscarsson, 1961. Anion permeability of the synaptic and non-synaptic motoneurone membrane. *J. Physiol.* 159: 410-435.
- Arillo, A.; E. Gaino; C. Margiocco; P. Mensi, and G. Schenone, 1984. Biochemical and ultrastructural effects of nitrite in rainbow trout: liver hypoxia as the root of the acute toxicity mechanisms. *Environ. res.* 34: 135-154.
- Arredondo, J.F. y J.P. Juarez, 1986. *Manual para el cultivo de carpas*. Dirección General de Acuicultura, Secretaría de Pesca. México, 121 pp.
- Bailey, J.R., D.H. Sephton, and W.R. Driedzic, 1990. Oxygen uptake by isolated perfused fish hearts with differing myoglobin concentrations under hypoxic conditions. *J. Mol. Cell. Cardiol* 22 (10): 1125-1134.
- Bath, R.N. and F.B. Eddy, 1980. Transport of nitrite across fish gills. *J. Exp. Zool.* 214: 119-121.
- Bartlett, G.R., A.R. Schwantes, and A.L. Val, 1987. Studies on the influence of nitrite on methemoglobin formation in amazonian fishes. *Comp. Biochem. Physiol.* 86C (2): 249-256.
- Beamish, F.W.H., A.J. Niimi and P.F.K.P. Leet, 1975. Bioenergetic of teleost fishes: Environmental influence. In: Comparative Animal Functional. Aspects of structural Materials (Bolis L., H.P. Madreell and K. Schmidt-Nielsen eds.). North-Holland Pub. Co. Amsterdam

- Beitinger, T.L. and L.C. Fritzpatrick, 1979. Physiological and ecological correlates of preferred temperature in fish. *Am. Zool.* 19: 319-329.
- Bodanski, O., 1961. Methemoglobin and methemoglobin producing compounds. *Pharmac. Rev.* 3: 144-196.
- Bowser, P.R., W.W. Falls, J. VanZandt, H. Collier and J.D. Phillips, 1983. Methemoglobinemia in channel catfish: Methods of prevention. *Prog. Fish-Cult.* 45 (3): 154-158.
- Brett, J.R., and T.P.D. Groves, 1979. Physiological energetics. In: *Fish Physiology*. (Hoar, W.S. and D.J. Randall, eds.) Vol VIII. Academic Press, New York.
- Brown D.A. and D.J. McLeay, 1975. Effect of nitrite on methemoglobin and total hemoglobin in juvenile rainbow trout. *Prog. Fish. Cult.* 37: 36-42.
- Buhler D.R. and J.E. Halver, 1961. Nutrition of salmonid fishes IX. Carbohydrate requirement of chinook salmon. *J. Nutr.* 74: 307-318.
- Bukeima, A.L., B.R. Niederlehner, and J. Cairns Jr., 1982. Biological monitoring. Part. IV. Toxicity testing. *Water Res.* 16: 239-262.
- Cairns, et al., 1975. The effect of temperature upon the toxicity of chemicals to aquatic organisms. *Hydrobiol.* 47: 135-171.

Cameron, J.N., 1971. Methemoglobin in erythrocytes of rainbow trout. *Comp. Biochem. Physiol.* 40 A: 743-749.

Geniceros A. y C Rodriguez, 1985. Selección de temperatura y balance energético de Ctenopharyngodon idella y Megalobrama amblycephala (Pisces, Cyprinidae). Tesis de Licenciatura, U.N.A.M. México, 43 p.

Collins, M.T., J.B. Gratzek, E.B. Jr. Shotts, D.L. Dawe, L.M. Campbell, and D.R. Senn, 1975. Nitrification in an aquatic recirculating system. *J. Fish. Res. Bd. Can* 32 (11): 2025-2031.

Coloso, R.M., L.V. Benitez, and L.B. Tiro, 1988. The effect of dietary protein-energy levels on growth and metabolism of milkfish (Chanos chanos Forsskal). *Comp. Biochem Physiol.* 89 A (1): 11-17.

Colt, J. y G. Tchobanoglous, 1976. Evaluation of short-term toxicity nitrogenous compounds in the channel catfish, Ictalurus punctatus. *Aquacult.* 8: 209-224.

Colt, J. R. Ludwig, G. Tchobanoglous y J.J. Cech Jr., 1981. The effect of nitrite on the short-term growth and survival of channel catfish Ictalurus punctatus. *Aquacult.* 24: 111-122.

Conover, R.J., 1966. Assimilation of the organic matter by zooplankton. *Limnol. Oceanog.* 11: 338-345.

- Crowford, R.E. and G.H. Allen, 1977. Seawater inhibition of nitrite toxicity to chinook salmon. *Trans. Amer. Fish. Soc.* 106: 105-109.
- Cui Y. and R.J. Wootton, 1988. Bioenergetics of growth of a cyprinid Phoxinus phoxinus; the effect of ratio, temperature, and body size on food consumption, faecal production and nitrogenous excretion. *J. Fish. Biol.* 33: 431-443.
- Cui, Y. and J. Liu, 1990. Energy budget among six teleosts. I. Food consumption, faecal production and nitrogenous excretion. *Comp. Biochem. Physiol.* 96 A (1): 163-171.
- Davalos, A.P., 1992. Alteraciones producidas por la exposición aguda a nitrito en la carpa herbívora Ctenopharyngodon idella Val. (Pisces, Cyprinidae). Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias, U.N.A.M., México, 39 pp.
- Delwiche, C.C., 1970. The nitrogen cycle. En: Scientific American. *The Biosphere*. W.T. Freeman and Co., San Francisco.
- Diab, S., and M. Shilo, 1988. Effect of light on the activity and survival of Nitrosomonas sp and Nitribacter sp isolated from fish ponds. *Israeli J. Aquat. Biomiggeh* 40(2): 50-56.
- Duncan, A. and R.Z. Klekowski, 1975. Parameters of and energy budget. In: *Methods for Ecological Bioenergetics* (Grodzinski, W., R.Z. Klekowski, and A. Duncan, eds.). I.B.P. 24, Blackwell Ser. Publ. Oxford.

- Du Preez H.H. and A.C. Crockraft, 1988a. Nonfaecal and faecal losses of Pomadasyx commersonni (Teleostei, Pomadasyidae) feeding on the surf clam Donax serra. *Comp. Biochem. Physiol.* 90 A: 63-70.
- Du Preez H.H. and A.C. Crockraft, 1988b. Nonfaecal and faecal losses of marine teleost Lichia amia (Linnaeus, 1758) feeding on live southern mullet Liza richardsoni (Smith, 1946). *Comp. Biochem. Physiol.* 90 A: 71-77.
- Eddy, F.B., P.A. Kunzlik, and R.N., Bath, 1983. Uptake and loss of nitrite from blood of rainbow trout, Salmo gairdneri Richardson, and atlantic salmon, Salmo salar L. in freshwater and dilute sea water. *J. Fish. Biol.* 23: 105-116.
- Eddy, F.B. and E.M. Williams, 1987. Nitrite and freshwater fish. *Chem. Ecol.* 3 (1): 1-38.
- Elliot, J.M. and W. Davison, 1975. Equivalents of oxygen consumption in animal energetics. *Oecologia* 19: 195-201.
- Elliot, J.M. 1976. Energy losses in the waste products of brown trout (Salmo trutta L.). *J. Animal. Ecol.* 45: 561-580.
- Elliot, J.M., 1979. Energetics of freshwater teleosts. *Symp. zool. Soc. Lond.* 44: 29-61.
- Elliot, J.M., 1982. The effect of temperature and ratio size on the growth and energetics of salmonids in captivity. *Comp. Biochem. Physiol.* 73 B (1): 81-91.

- Evans, D.F., 1987.. The fish gill: Site of action and model for toxic effects on environmental pollutants. *Environ. Health. Perspect.* 71: 47-58.
- Fisher, Z., 1970. The elements of energy balance in grass carp (Ctenopharyngodon idella Val.). Part I. *Pol. Arch. Hydrobiol.* 17 (30): 421-434.
- Fisher, Z., 1972. The elements of energy balance in grass carp (Ctenopharyngodon idella Val.). Part II. Fish fed with animal food. *Pol. Arch. Hydrobiol.* 19: 65-82.
- Foster R.P., and L. Goldstein, 1969. Formation of excretory products In: Fish Physiology (Hoar and Randall eds.). Vol. I. 313-350 p. Acad. Press New York.
- Freeman, L., T.L. Bettinger, and D.W. Huey, 1983. Methemoglobin reductase activity in phylogenetically diverse piscine species. *Comp. Biochem. Physiol.* B 75: 27-30.
- Gaino, E., A. Arillo, and P. Mensi, 1984. Involvement of the gill chloride cells of trout under acute nitrite intoxication. *Comp. Biochem. Physiol.* 77 A (4): 611-617.
- Gutzmer, M.P., and J.R. Tomasso, 1985. Nitrite toxicity to the crayfish Procambarus clarkii. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 34: 369-376.

Harris, R.R. and S. Coley, 1991. The effect of nitrite on chloride regulation in the crayfish Pacifastacus leniusculus Dana (Crustacea, Decapoda). *J. Comp. Physiol.* 161 B: 199-206.

Hasan M.R. and C.B. Macintosh, 1986. Effect of chloride concentration on the acute toxicity of nitrite in common carp, Cyprinus carpio L. fry. *Aquacult. Fish. Manag.* 17: 19-30.

Hilmy, A.M., El-Domiaty, N.A. and K. Wershana, 1997. Acute and chronic toxicity of nitrite to Clarias lazera. *Comp. Biochem. Physiol.* 86 C: 247-253.

Hoar, W.S. and D.J. Randall, 1984. *Fish Physiology*. Vol X. Academic Press, Orlando, FL.

Huey, D.W., Simco, B.A. and D.W. Criswell, 1980. Nitrite induced methemoglobin formation in channel catfish. *Trans. Amer. Fish. Soc.* 109 : 558-562.

Huey, D.W., M.C. Wooten, L.A. Freeman, and T.L. Beitinger, 1982. Effect of pH, and chloride on nitrite-induced lethality in bluegill (Lepomis macrochirus). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 28: 3-6.

Huey, D.W., T.L. Beitinger, and M.C. Wooten. 1984. Nitrite-induced methemoglobin formation and recovery in channel catfish (Ictalurus punctatus) at three acclimation temperatures. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 32: 674-681.

- Hughes, G.M., 1981. Effect of low oxygen and pollution on respiratory system of fish. In: Stress and Fish (Pickering A.D. ed.). Academic Press, New York. pp 121-146.
- Ivlev, V.W., 1939. Transformation of energy by aquatic animals. *Int. Revue ges. Hydrobiol. Hydrogr.* 38: 449-458.
- Jensen, F.B., N.A. Andersen, and H. Heisler, 1987. Effect of nitrite exposure on blood respiratory properties, acid-base regulation in the carp (Cyprinus carpio). *J. Comp. Physiol. B* 157: 533-541.
- Jobling, M., 1981. Temperature tolerance and final preferendum-rapid methods for the assessment of optimum growth temperatures. *J. Fish. Biol.* 19: 439-455.
- Kamler, E., M. Szlaminska, E. Urban-Jeziarska, 1989. Reproduction and early development of fish: Summary of studies carried out at the Department of Ecological Bioenergetics, Institute of Ecology, Dziekanów Lesny Warsaw, Poland. *Pol. Arch. Hydrobiol.* 36 (4): 517-122.
- Kellog, R.L. and J.J. Gift, 1983. Relationship between optimum temperatures for growth and preferred temperatures to young four fish species. *Trans. Amer. Fish. Soc.* 112: 424-230.
- Klekowski, R.Z. and A. Duncan, 1975. Physiological approach to ecological energetics. In: *Methods for Ecological Bioenergetics*. I.B.P. 24. Blackwell Sci. Publ. Oxford.

- Krous, S.R., V.S. Blazer, and T.L. Meade, 1982. Effect of acclimation time on nitrite movement across the gill epithelia of rainbow trout: the role of "chloride cells". *Prog. Fish. Cult.*, 44 (3): 126-130.
- Lehninger, A.L., 1984. *Bioquímica*. Ed. Omega S.A., Barcelona, España, 1117 pp.
- Lewis Jr., W.M. and D.P. Morris, 1986. Toxicity of nitrite to fish: A review. *Trans. Amer. Fish. Soc.* 115: 183-195.
- Maetz, J. 1971. Fish gills: mechanisms of salt transfer in fresh water and sea water. *Philos. Trans. Royal Soc. London B. Biol. Sci.* 262: 209-249.
- Mallat, J., 1985. Fish gill structural changes induced by toxicants and other irritants: a statistical review. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 42: 630-648.
- Margiocco, C.A., A. Arillo, P. Mensi, and G. Schenone, 1983. Nitrite bioaccumulation in Salmo gairdneri Rich. and hematological consequences. *Aquatic Toxicol.* 3: 261-270.
- Mazik, P.M., M.L. Hinman, D.A. Winkelmann, J.J. Klaine, B.A. Simco, and H.C. Parker, 1991. Influence of nitrite and chloride concentration on survival and haematological profiles of striped bass. *Trans Amer. Fish Soc.* 120 (2): 247-254.

- McCauley, R.W. and W.L. Pond, 1971. Temperature selection in rainbow trout (Salmo gairdneri) fingerlings in vertical and horizontal gradients. *J. Fish. Res. Bd. Can.* 28: 1801-1804.
- Mensi, P., A. Arillo, C. Margiocco, and G. Schenone, 1982. Lysosomal damaged under nitrite intoxications in rainbow trout (Salmo gairdneri Rich.). *Comp Biochem. Physiol. C* 73: 161-165.
- Michael, M.I., A.M. Hilmy, H.A. El-domiaty, and K. Wershana, 1987. Serum transaminase activity and histopathological changes in Clarias lazera chronically exposed to nitrite. *Comp. Biochem. Physiol* 86 C (2): 255-262.
- Milstein, A. 1990. Water quality in an intensive outdoor commercial fish culture system with mechanically stirred ponds. *Israeli J. Aquat. Bandedg.* 42 (4): 99-109.
- Mires D., Y. Amit, Y. Avnimelech, S. Diab and M. Cochaba, 1990. Water quality in a recycled intensive fish culture system under field conditions. *Israel. J. Aquac. -Bandedg* 42 (4): 110-121.
- Mommsen T.P., C.J. French, and P.W. Hochachka, 1980. Sites and patterns of protein and aminoacid utilization during spawning migration of salmon. *Can. J. Zool.* 1785-1799.
- Montgomery D.C. and E.A. Peck, 1982. *Introduction to Lineal Regresssion Analysis.* Wiley & Son, New York. 504 p.

Nichols, J.W., and L.J. Weber, 1989. Oxidation of cardiac myoglobin in vivo by sodium nitrite or hydroxylamine. *Arch. Toxicol.* 63: 484-488.

Palachek, R.M., and J.R. Tomasso, 1984a. Toxicity of nitrite to channel catfish (Ictalurus punctatus), Tilapia (Tilapia aurea) and largemouth bass (Micropterus salmoides): evidence for a nitrite exclusion mechanism. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 41: 1739-1744.

Palachek, R.M., and J.R. Tomasso, 1984b. Nitrite toxicity to fathead minnows: effect of fish weight. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 32: 238-242.

Pandian N. A., K.A. Markossian, and R.M. Nalbandyan, 1985. The effect of nitrite on cytochrome oxidase. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 133: 1104-1111.

Paulson, L. J., 1980. Models of ammonia excretion for brook trout (Salvelinus fontinalis) and (Salmo gairdneri). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 37: 1421-1425.

Perrone, S.J. and T.L. Meade, 1977. Protective effect of chloride on nitrite toxicity to coho salmon (Oncorhynchus kisutch). *J. Fish. Res. Board. Can.* 34: 486-492.

Phillips, M.D., 1972. Calorie energy requirement. In. *Fish Nutrition*. (J.E. Halver, Ed.). Academic Press, N.Y., 227 p.

- Pickering, Q.H., 1988. Evaluation and comparison of two short fathead minnow tests for estimating chronic toxicity. *Water. Res.* 22 (7): 883-839.
- Potts, WTW y WR Fleming, 1970. The effects of prolactin and divalent ions on the permeability to water of Fundulus kansae. *J. exp. Biol.* 53: 317-327.
- Prosser, C.L., 1958. General Summary: The Nature of Physiological Adaptation. In: *Physiological Adaptation*. Am. Physiol Soc., Washington, D.C.
- Prosser, C.L., 1973. *Comparative Animal Physiology*. Saunders College Publishing, Philadelphia, 966 pp.
- Prosser, C.L., 1991. *Environmental and Metabolic Animal Physiology*. Wiley-Liss, Inc. Pub. New York. 578 pp.
- Rangel, L.A.R., Modificaciones producidas por el nitrito en la respuesta respiratoria y en algunos parámetros sanguíneos de la carpa herbívora Ctenopharyngodon idellam (Pisces, Cyprinidae) (en proceso).
- Ramírez, 1989. *Dosis-Respuesta*. Ensayos biológicos y pruebas de toxicidad. Curso Regional INDERENA/PAC/PNUMA/FAO/COI Cartagena, Colombia.
- Rozin, P. and J. Mayer, 1961. Regulation of food intake in gold fish. *Am. J. Physiol.* 201: 968-974.

- Russo, R.C., C.E. Smith and R.V. Thurston. 1974. Acute toxicity of nitrite to rainbow trout (Salmo gairdneri). *J. Fish Res. Bd. Can.* 31: 1653-1655.
- Russo, R.C., R.V., Thurston, and K. Emerson, 1981. Acute toxicity of nitrite to rainbow trout (Salmo gairdneri): effects of pH, nitrite species, and anion species. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 38: 387-393.
- Schmidt-Nielsen, K. 1984. *Animal Physiology*. Third Ed. Cambridge University Press. New York. 619 pp.
- Scott, E.M. and J.P. Harrington, 1985. Methemoglobin reductase activity in fish erythrocytes. *Comp. Biochem. Physiol.* 82 B: 511-513.
- Schwedler, T.E. and C.S. Tucker, 1983. Empirical relationship between percent methemoglobin in channel catfish and dissolved nitrite and chloride in ponds. *Trans. Amer. Fish. Soc.* 112: 117-119.
- Skidmore, J.F., 1970. Respiration and osmoregulation in rainbow trout with gills damaged by zinc sulfate. *J. exp. Biol.* 52: 481-484.
- Smith, C.E. and W.G. Williams, 1974. Experimental nitrite toxicity in rainbow trout and chinook salmon. *Trans. Amer. Fish. Soc.* 103: 89-90.

- Spote, S., 1970. *Fish and Invertebrate Culture. Water management in closed systems.* Wiley & Son. New York. 145 p.
- Sprague, J.B., 1971. Measurement of pollutant toxicity to fish. III Sublethal effects and "safe" concentration. *Water Res.* 5: 245-266.
- Sun, L.T. and G.W. Klontz, 1990. Water chemistry of nitrification in a recirculating system. *J. Fish. Soc. Taiwan* 17(1): 43-52.
- Tátrai, I., 1981. Diurnal pattern of the ammonia and urea excretion of feeding and starved bream, Abramis brama, L. *Comp. Biochem. Physiol.*, 70 A: 211-215.
- Thomford, H.W. and C.E. Boyd, 1991. Effects of aeration on water quality in channel catfish production. *Israeli J. Aquacult. Bamidgah* 43 (1): 23-26.
- Tomasso, J.R., B.A., Simco, and K.B., Davis, 1979. Chloride inhibition on nitrite-induced methemoglobinemia in channel catfish (Ictalurus punctatus). *J. Fish. Res. Bd. Can.* 36: 1141-1144.
- Tomasso, J.R., M.I. Wright, B.A. Simco, and K.B. Davis, 1980. Inhibition of nitrite-induced toxicity in channel catfish by calcium chloride and sodium chloride. *Prog. Fish. Cult.* 42(3): 144-148.
- Tomasso, J.R., and G.J. Carmichael, 1991. Differential resistance among channel catfish strains and intraspecific hybrids to environmental nitrite. *J. Aquat. Animal Health* 3 (1): 51-54.

US EPA, 1989. Environmental Protection Agency. *Short-term methods for estimating chronic toxicity of effluents and receiving waters to freshwater organisms*. Segunda Ed. Environmental Monitoring Systems Laboratory. Cincinnati. 249 p.

Vlarenco, A. and L. Canesi, 1991. Mussels as biological indicators of pollution. *Aquacult.* 94: 225-243.

Walsh, G.E., L.H. Bahner, and W. Horning, 1980. Toxicity of textile mill effluent to freshwater and estuarine algae, crustaceans and fishes. *Environ. Pollut. Ser. A.* 21: 169-179.

Walton M.J. and C.B. Cowey, 1982. Aspects of intermediary metabolism of salmonid fish. *Comp. Biochem. Physiol.* 73 B. 59-79.

Warren C. and G.E. Davis, 1967. Laboratory studies on the feeding, bioenergetic and growth of fish. In: *The Biological Basis in Freshwater Fish Production*. (Gerking S.D. ed.). Wiley & Son. New York.

Watenpugh, D.E., T. L. Beltinger, and D.W., Huey, 1985. Temperature tolerance of nitrite exposed channel catfish. *Trans. Amer. Fish. Soc.* 114: 272-273.

Watenpugh, D.E., T. L. Beltinger, 1985. Swimming performance of Channel catfish (Ictalurus punctatus) after nitrite exposure. *Bull Environ. Contam. Toxicol.* 34: 754-760.

- Watenpaugh, D.E., T. L. Beitinger, 1985b. Oxygen consumption in fathead minnows (Pimephales promelas) following acute exposure to water-borne selenium. *Comp. Biochem Physiol.* 80 C (2): 253-256.
- Watenpaugh, D.E., and T.L. Beitinger, 1985. Resistance of nitrite-exposed catfish, Ictalurus punctatus, to hypoxia. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 37: 802-807.
- Wedemeyer, G.A., and W.T. Yasutake, 1978. Prevention and treatment of nitrite toxicity in juvenile steelhead trout (Salmo gairdneri). *J. Fish. Res. Bd. Can.* 35: 822-827.
- Williams, E.M. and F.B. Eddy, 1966. Chloride uptake in freshwater teleosts and its relationship to nitrite uptake and toxicity. *J. Comp. Physiol.* 15 B: 867-872.
- Wootton R.J., 1991. *Ecology of Teleost Fishes*. Fish and Fisheries Ser. 1. Chapman & Hall. 404 p.
- Zar, J.H., 1974. *Biostatistical Analysis*. Prentice-Hall, New York. 820 pp.