

## EFFECTO DE LA TEMPERATURA Y DEL CLORURO SOBRE LA TOXICIDAD DEL NITRITO EN LA CARPA HERBIVORA *CTENOPHARYNGODON IDELLA* (PISCES, CYPRINIDAE)

Guillermina ALCARAZ y Sonia ESPINA

Laboratorio de Ecofisiología, Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, UNAM. Coyoacán, 04510 D.F., México.

(Recibido marzo de 1993, aceptado julio de 1993)

Palabras clave: ecotoxicología, nitrito, cloruro, temperatura, *Ctenopharyngodon idella*

### RESUMEN

En los juveniles de la carpa herbívora aclimatados a 24, 29 y 32°C, se midió la toxicidad aguda del nitrito; para observar el efecto de los iones nitrito y cloruro se utilizó agua destilada. Asimismo, mediante ensayos agudos a corto plazo se determinó el efecto tóxico del nitrito. Posteriormente se evaluó el efecto combinado de la temperatura y cloruro en peces expuestos por 48 h a las CL50, CL70 y CL90 del nitrito. Tanto la temperatura como el cloruro tuvieron un efecto protector ante la toxicidad del nitrito. Los niveles de los estimadores de esta acción del nitrito aumentaron tanto en 29 como en 32°C en comparación con 24°C, siendo mayor en la primera. La protección del cloruro se manifestó en peces expuestos al nitrito a la concentración donde se registró la CL50 y menos evidente en las CL70 y CL90. Se calculó la ecuación polinomial, que engloba a las variables investigadas y predice que al aumentar la razón iónica (nitrito/cloruro) se incrementa la mortalidad siendo ésta menor en 29°C que en las otras temperaturas.

### ABSTRACT

In juvenile grass carp acclimated at 24, 29 and 32°C the acute toxicity of nitrite was measured; in order to isolate the ionic effects of nitrite from chloride, distilled water was used. Subsequently, combined effects of temperature, nitrite and chloride on fish exposed to nitrite-CL50, CL70, and CL90 for 48 h was measured. The mortality estimator levels increased at both 29 and 32°C compared with 24°C, being greater the former than the latter. Chloride protection was manifest in fish exposed to the CL50 and less evident in those exposed to the nitrite-CL70 and CL90. A polynomial equation which includes all variables and predict that increasing the ionic ratio (nitrite/chloride) the mortality augments but less at 29°C than at the other temperatures, was calculated.

---

### INTRODUCCION

La acumulación de compuestos nitrogenados, como el amonio y el nitrito, es uno de los problemas más preocupantes para el cultivo de peces ya que puede producir efectos nocivos y en ciertos niveles llegan a ser tóxicos. El nitrito se incorpora en los estanques por escurrimiento desde tierras aledañas que contienen fertilizantes ricos en estos compuestos, útiles para la agricultura. También se forman en el interior

de los estanques por descomposición de la materia orgánica y cuando aumenta el amonio, producto del alimento suministrado y la excreción de los peces, al interrumpirse el proceso de nitrificación (Arredondo 1987, Diab y Shilo 1988, Milstein 1990, Verma y Prakash 1991, Sumayaisan *et al.* 1991).

En los peces de agua dulce, el nitrito es tóxico en concentraciones subletales ya que afecta la condición fisiológica de los organismos, disminuyendo el he-

matocrito, la cantidad de eritrocitos y los niveles de proteína en sangre, lo cual es indicativo tanto de la condición de hipoxia como del estrés general del organismo (Hilmy *et al.* 1987, Jensen *et al.* 1987). El mecanismo de acción tóxica que mejor se conoce es la oxidación de la hemoglobina a ferrihemoglobina (metahemoglobina) debido a lo cual la sangre pierde su capacidad de transportar oxígeno a los tejidos (Watenpaugh y Beitinger 1985). La sensibilidad al contaminante es específica; por ejemplo, en la trucha arcoiris *Salmo gairdneri* se han señalado concentraciones letales medias de N-nitrito de 0.4 mg/L (Russo *et al.* 1974), 23.3 mg/L en *Ictalurus punctatus*, 147.4 mg/L en *Pimephales promelas* (Tomasso y Carmichael 1986) y hasta de 460.4 mg/L en la lobina *Micropterus salmoides* (Gutzmer y Tomasso 1985).

La toxicidad del nitrito en los animales acuáticos depende, entre otros factores, de la calidad del agua; al respecto, se conoce que la presencia de cloruro disminuye el daño producido por el nitrito; el efecto antagonístico del cloruro se ha demostrado en varias especies como *Oncorhynchus kisutch* (Perrone y Meade 1977), *Ictalurus punctatus* (Wedemeyer y Yasutake 1978, Bowser *et al.* 1983), *Lepomis machrochirus* (Huey *et al.* 1982), *Salmo gairdneri* (Smith y Williams 1974, Wedemeyer y Yasutake 1978, Williams y Eddy 1986), entre otras.

Los ciprínidos, en general, se consideran como especies tolerantes al nitrito; sin embargo, la carpa herbívora *Ctenopharyngodon idella* es muy sensible al contaminante cuando la concentración de cloruro en el medio se encuentra en niveles bajos (Alcaraz y Espina 1993). El efecto protector del cloruro contra la toxicidad del nitrito se atribuye a la competencia de los iones por los mecanismos de intercambio en el epitelio branquial (Bath y Eddy 1980). En este contexto se ha propuesto una relación inversa entre la concentración letal del nitrito y la concentración de cloruro ambiental, a la vez que se sugiere que el nitrito actúa como inhibidor competitivo del cloruro (Russo *et al.* 1981, Williams y Eddy 1986).

Entre los factores ambientales, la temperatura es importante como controlador de los procesos fisiológicos y por lo tanto influye la sensibilidad de los organismos acuáticos a los contaminantes. Así, se ha descrito que aumenta la toxicidad del nitrito en el bagre *I. punctatus* (Huey *et al.* 1984).

Se seleccionó la carpa herbívora, *Ctenopharyngodon idella*, como organismo de prueba por la importancia

que tiene esta especie en el país en lo referente a la acuicultura (Aguilera *et al.* 1988). Debido a que la acumulación de nitrito, en los estanques de cultivo puede ser un fenómeno de corta duración durante el ciclo diurno, como también lo es el efecto adverso que provoca en los peces, en este estudio se llevaron a cabo ensayos de corto plazo. En especímenes juveniles aclimatados a 24, 29 y 32°C se determinó la concentración letal media (CL50-96 h) del N-nitrito, posteriormente, se midió el efecto combinado nitrito-cloruro sobre los parámetros de toxicidad CL50, CL70 y CL90, en animales aclimatados a dichas temperaturas.

## MATERIALES Y METODOS

Los juveniles de *C. idella* (0.45 ± 0.5 g) se obtuvieron en el Centro Piscícola de Tezontepec de Aldama, Estado de Hidalgo, México. En el laboratorio se mantuvieron en contenedores de plástico con agua filtrada por carbón activado, de pH 7, alcalinidad de 136-139 mg CaCO<sub>3</sub>/L, 80-115 mg Cl<sup>-</sup>/L, 6.5-7.0 mg O<sub>2</sub>/L y 24°C, la cual fue la temperatura de los estanques de origen de los peces en el momento de la captura. El fotoperíodo se fijó en 12 h de luminosidad; durante el período de mantenimiento se proporcionó alimento balanceado y alfalfa (75:25) a una ración equivalente al 10% del peso húmedo de los organismos. Después de un período de alimentación de dos horas, diariamente se recambió el agua de los acuarios en un tercio de su volumen. Los animales permanecieron en estas condiciones por tres semanas.

En seguida, las carpas se separaron en tres contenedores de plástico (60 L), con agua de características similares a las anteriores; la temperatura de dos de estos se incrementó a una tasa de 1°C/día hasta alcanzar 29 y 32 ± 1°C y el tercero continuó en 24 ± 1°C. En estas condiciones los peces estuvieron dos semanas.

Al finalizar el período de aclimatación térmica, se efectuaron pruebas de toxicidad a corto plazo de tipo estático sin recambio (Buikema *et al.* 1982). Se utilizó agua destilada como medio de dilución del contaminante para separar el efecto de los iones (N-nitrito y cloruro). Con el fin de determinar la CL50 del N-nitrito, se colocaron 10 peces en cada uno de seis acuarios de vidrio (37 L) con agua destilada (pH 7.1 a 7.5; 3 mg Cl<sup>-</sup>/L) y aireación suave y constante lo que permitió una adecuada concentración de oxígeno (6.5 a 7.0 mg/L). Después de 24 h se agregó

el contaminante y el período de exposición duró 96 h. El nitrito se adicionó como  $\text{NaNO}_2^-$  (Merck, 99 % de pureza); la concentración final obtenida en cada acuario fue de 0 (testigos), 1, 2, 4, 8 y 10 mg  $\text{N-NO}_2^-/\text{L}$ . Las concentraciones reales se midieron al inicio y al final de la prueba (APHA 1985). Se hicieron observaciones cada 24 h y se registró el número de peces muertos; el criterio de muerte fue el cese del batido opercular y la falta de respuesta a estímulos mecánicos suaves. Las diferentes concentraciones letales se calcularon empleando el programa de cómputo DORES (Ramírez 1989). Posteriormente, se llevaron a cabo las pruebas para medir el efecto combinado de nitrito-cloruro, para lo cual los juveniles de *C. idella*, aclimatados a 24, 29 y 32°C, se expusieron durante 48 h a las concentraciones letales de  $\text{N-NO}_2^-$  (CL50, CL70 y CL90 en 96 h) en combinación con 3 (testigos), 5, 6 y 6.5 mg  $\text{Cl}^-/\text{L}$ . Se utilizó la sal sódica ( $\text{NaCl}$ , Merck 99 % de pureza) y se procedió como anteriormente. En ambos tipos de ensayos, los peces permanecieron por 24 h sin alimento antes de ser sometidos a las diferentes pruebas.

## RESULTADOS Y DISCUSION

Durante el período de mantenimiento, así como en la aclimatación térmica de los peces, no se observó mortalidad. Las temperaturas experimentales, son naturales para la carpa herbívora ya que a menudo se registran a través del año en los estanques de procedencia de los animales. En los acuarios experimentales no se notaron cambios en la concentración

de nitrito con respecto al tiempo ( $P \geq 0.05$ ) y tampoco hubo diferencias significativas entre las concentraciones nominales y las reales ( $P \geq 0.05$ ). Durante las pruebas de toxicidad aguda no se registró mortalidad en los grupos testigos.

En los organismos expuestos al nitrito se observó una coloración en las branquias más oscura que en las del grupo testigo, lo cual se atribuye a la condición de metahemoglobinemia desarrollada por los peces (Bowser *et al.* 1983).

El efecto tóxico del nitrito en los animales aclimatados a las distintas temperaturas, se evaluó a través de las concentraciones letales para el 50, 70 y 90 % de los organismos (Tabla I, Fig. 1). Cuando los juveniles de *C. idella* se expusieron por 96 h al contaminante, tanto la CL50 del N-nitrito como los otros estimadores de toxicidad letal, CL70 y CL90 (Fig. 1) variaron con la temperatura. Es importante destacar que la concentración letal media fue más alta en la temperatura que los peces seleccionan activamente en un gradiente térmico, es decir, 29°C (Espina *et al.* 1986); resultados similares se obtuvieron tanto para la CL70 como para la CL90.

Smith y Williams (1974) muestran que la carpa común (*Cyprinus carpio*) tolera concentraciones de 1.8 mg  $\text{N-NO}_2^-/\text{L}$  en sistemas de cultivo con reutilización de agua; sin embargo, los valores obtenidos para *C. idella*, no son comparables con los de *C. carpio* ya que una concentración similar (1.7 mg/L de N-nitrito) corresponde a la concentración letal media del contaminante para la carpa herbívora, en agua

TABLA I. CONCENTRACIONES LETALES DE NITRITO PARA LOS JUVENILES DE *C. idella* ACLIMATADOS A DIFERENTES TEMPERATURAS

Temperatura °C	Mortalidad %	CL ± E.E. mg/L	$X^2$	$X^2_{0.05}$	gl*
24	50	1.71 ± 0.21	0.22	9.40	4
	70	2.23 ± 0.32			
	90	3.41 ± 0.75			
29	50	6.68 ± 1.22	0.53	11.10	5
	70	9.33 ± 1.99			
	90	12.65 ± 3.05			
32	50	4.47 ± 0.47	4.41	9.40	4
	70	6.81 ± 0.62			
	90	9.52 ± 0.89			

\* gl: no. de concentraciones (n-1) que producen la muerte de los peces, donde  $0 < n < 100$

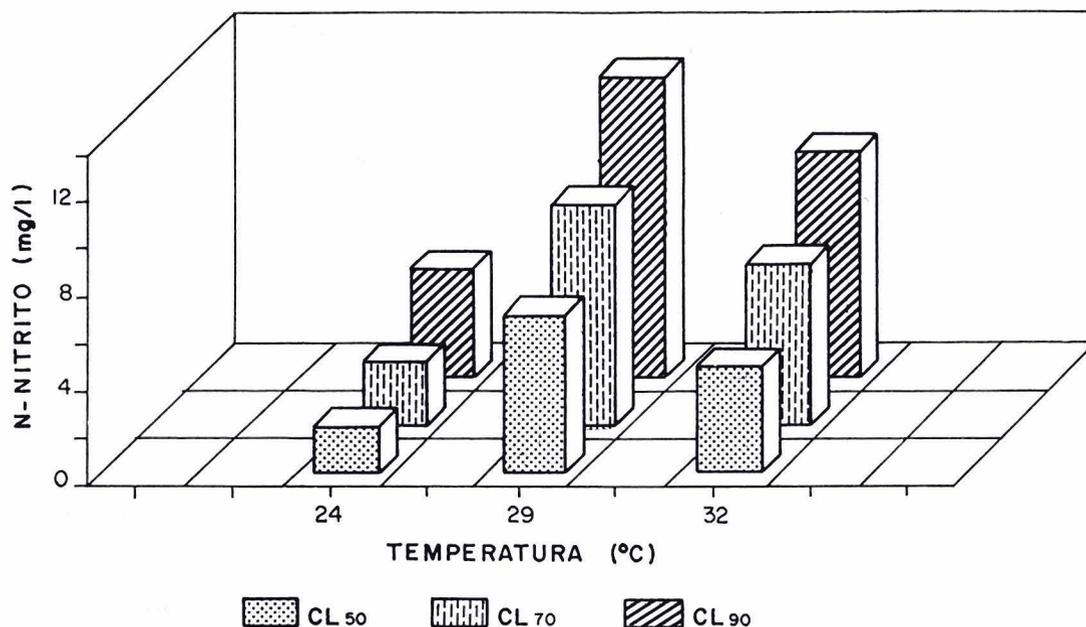


Fig. 1. Concentraciones de N-nitrito que producen la muerte del 50, 70 y 90% de los juveniles de *C. idella* en diferentes temperaturas

destilada. Así, la discrepancia se puede atribuir a la presencia de otros iones, cationes y aniones, en los estanques de cultivo de la carpa común, lo cual ha sido comprobado en la trucha arcoiris (*Salmo gairdneri*) por Bath y Eddy (1980). Los autores señalan que al exponer los peces a la CL50 de  $\text{NO}_2^-$  en agua destilada sólo sobrevivió el 10% de los ejemplares y la sobrevivencia aumentó al 50% cuando agregaron 2 mM/L de  $\text{Ca}^{2+}$  al agua; también mencionan que el cloruro actuó de manera similar al calcio, pero en concentraciones menores al 30% del catión y concluyen que la toxicidad del nitrito es fuertemente influenciada por la composición química del agua.

Con base en los resultados obtenidos en la carpa herbívora es posible agregar que dicha toxicidad, también es afectada por la temperatura ya que se constató que a 29°C se presenta un efecto protector contra la toxicidad del nitrito; asimismo en la temperatura más alta ensayada (32°C), se requieren concentraciones 52 y 56% más elevadas que en 24°C, para producir la mortalidad del 50, 70 ó 90% de los peces (Fig. 1). El efecto de la temperatura ha sido observado en las etapas larvares de anfibios (Salibián comunicación personal)\*; en cambio en otros peces como el bagre, *Ictalurus punctatus*, la toxi-

cidad del nitrito aumenta al subir la temperatura (Huey *et al.* 1984).

Con respecto a las variaciones de los niveles de cloruro en el medio (Fig. 2), al incrementar la concentración del ión desde 3 mg/L en el agua destilada (testigos) a 5, 6 y 6.5 mg  $\text{Cl}^-/\text{L}$  en los grupos experimentales expuestos a la CL50 del nitrito, la mortalidad de los juveniles de *C. idella* aclimatados a 29°C, descendió del 50% a 30, 20 y 10% respectivamente, en cambio, tanto en 24 como en 32°C, la menor concentración de cloruro ambiental protegió al 100% de los peces (0% de mortalidad) y se mantuvo entre 90 y 80% al elevarse los niveles de cloruro en el medio a 6 y 6.5 m/L (Tabla II). En los otros parámetros de toxicidad se observó una respuesta similar. Esto llevaría a considerar la importancia que tienen las razones en las que se encuentran ambos iones, más que la concentración de estos en forma aislada. Así a 32°C, cuando los animales están expuestos a la CL50-96 h del nitrito, se requieren razones de 0.69 a 0.90 ( $\text{N-NO}_2^-/\text{Cl}^-$ ), para protegerlos de la toxicidad de éste, en tanto que razones menores de 0.26 a 0.34 producen el mismo efecto a 24°C. En esta última temperatura, las razones iónicas entre 0.3 y 0.7  $\text{N-NO}_2^-/\text{Cl}^-$  resguardan a los juveniles de *C. idella* de la toxicidad del nitrito en concentraciones equivalentes a la de los tres parámetros letales; esto es, la mortalidad disminuyó en un 40% en relación a la CL50 y en un 60 a 80% a las CL70 y

\* Dr. Alfredo Salibián: Laboratorio de Ecofisiología y Ecotoxicología. Universidad Nacional de Luján, Luján, Argentina.

TABLA II. ESTIMADORES DEL EFECTO TOXICO (CONCENTRACION LETAL, CL) DEL NITRITO EN COMBINACION CON DIFERENTES CONCENTRACIONES DE CLORURO EN JUVENILES DE *C. idella*

Temperatura °C	CL %	N-NO <sub>2</sub> mg/L	Cl mg/L	N-NO <sub>2</sub> /Cl	Mortalidad %
24	50	1.7	3.0	0.56	50
		1.7	5.0	0.34	0
		1.7	6.0	0.28	10
		1.7	6.5	0.26	20
	70	2.7	3.0	0.90	70
		2.7	5.0	0.54	80
		2.7	6.0	0.45	70
		2.7	6.5	0.41	20
	90	4.5	3.0	1.50	90
		4.5	5.0	0.90	100
		4.5	6.0	0.75	40
		4.5	6.5	0.69	10
29	50	6.7	3.0	2.23	50
		6.7	5.0	1.34	30
		6.7	6.0	1.12	20
		6.7	6.5	1.03	10
	70	9.3	3.0	3.10	70
		9.3	5.0	1.86	70
		9.3	6.0	1.55	60
		9.3	6.5	1.43	10
	90	12.7	3.0	4.23	90
		12.7	5.0	2.54	100
		12.7	6.0	2.12	90
		12.7	6.5	1.95	50
32	50	4.5	3.0	1.50	50
		4.5	5.0	0.90	0
		4.5	6.0	0.75	10
		4.5	6.5	0.69	20
	70	6.8	3.0	2.26	70
		6.8	5.0	1.36	80
		6.8	6.0	1.13	60
		6.8	6.5	1.05	20
	90	9.5	3.0	3.17	90
		9.5	5.0	1.90	100
		9.5	6.0	1.58	40
		9.5	6.5	1.46	10

CL90. En 32°C el intervalo, en el cual los especímenes están protegidos es más amplio (0.69 a 1.46) y engloba tanto a los grupos expuestos a la CL50 como a la CL90 (Tabla II). En cambio en 29°C, son necesarias razones de 1.0 a 1.4, en las cuales se ma-

nifiesta el efecto positivo sólo en los peces expuestos a la CL50 y a la CL70 por 96 h; con una razón de 1.95 la mortalidad disminuye al 50% únicamente. Una posible explicación sería que en tal situación, la protección de la temperatura quedaría enmascarada

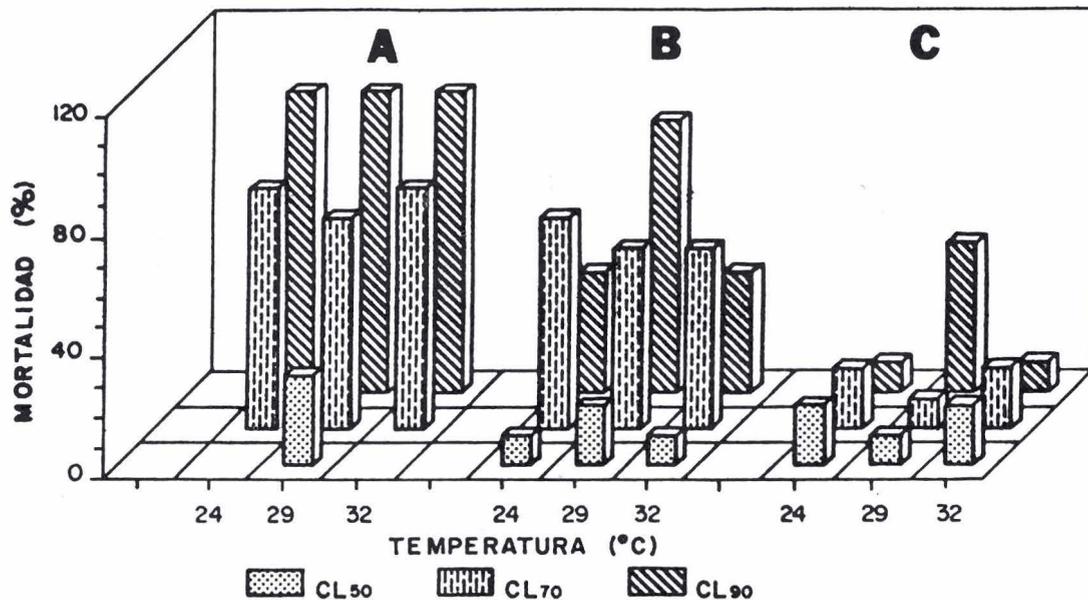


Fig. 2. Mortalidad (%) de *C. idella* expuesta a concentraciones letales de N-nitrito en combinación con cloruro (A = 5, B = 6 y C = 6.5 mg Cl<sup>-</sup>/L) a diferentes temperaturas

por las altas concentraciones del contaminante (12 mg N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/L).

En este trabajo fue posible establecer cuantitativamente la acción combinada de la temperatura y la razón entre las concentraciones de N-nitrito y de cloruro. Las concentraciones del contaminante corresponden a los parámetros de toxicidad CL50, CL70 y CL90 de N-nitrito (mg/L). El modelo que mejor explica y predice las relaciones entre las variables fue:

$$\hat{M} = 955.151 + 14.355 R - 65.795 T + 1.147 T^2$$

donde  $\hat{M}$  es el valor esperado de la mortalidad, codificado mediante la transformación angular de los datos (Zar 1985), R es la razón entre las concentraciones letales del N-nitrito y el cloruro; T es la temperatura (24, 29 y 32°C). El modelo es altamente significativo ( $P = 0.001$ ) y explica el 98.62% de la variación observada en  $\hat{M}$  ( $R^2$ ); el estimador de Durbin-Watson obtenido (1.225) demostró la ausencia de autocorrelación de las variables (Montgomery y Peck 1982).

En este estudio, al utilizar agua destilada, fue posible separar la acción letal del nitrito del efecto pro-

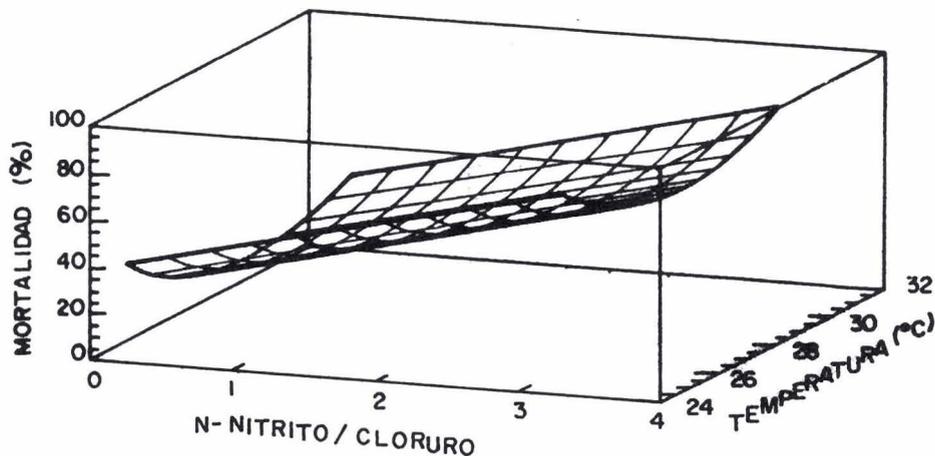


Fig. 3. Relación entre la tasa de mortalidad de *C. idella*, la razón iónica (N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/Cl<sup>-</sup>) existente en el medio y la temperatura

lector del cloruro y de otros iones, cuya acción positiva es conocida como en el caso del calcio (Bath y Eddy 1980). Asimismo, se pudo aislar la influencia que tuvo la temperatura sobre la toxicidad del N-nitrito tanto en forma directa sobre los parámetros de toxicidad CL50, CL70 y CL90, como en las razones iónicas que disminuyeron dicha toxicidad (Fig. 3).

Por otra parte, es importante destacar que aún cuando los peces se encuentren a la temperatura equivalente al *preferendum* final, la presencia del contaminante deteriora sus funciones fisiológicas. Se conoce que en el intervalo de temperatura que los organismos acuáticos seleccionan activamente en un gradiente térmico, sus funciones son óptimas (Kellog y Gift 1983), sin embargo, en lo que atañe al nitrito los resultados obtenidos en los juveniles de *C. idella* revelan trastornos fisiológicos incompatibles con la vida de estos organismos, prueba de lo cual es la alta mortalidad observada (90%) en las bajas concentraciones de cloruro, así como a temperaturas diferentes de la óptima para los juveniles de la especie.

En conclusión, a diferencia de lo observado en *I. punctatus* (Huey *et al.* 1984), en *C. idella* la temperatura es un factor relevante que se debe incluir en los modelos de toxicidad. Asimismo la presencia de contaminantes no sólo modifica el comportamiento termorregulador de los organismos acuáticos (Cherry y Cairns 1982) sino que también provoca trastornos fisiológicos. En *C. idella* fue posible detectar estas alteraciones al incluir en el diseño experimental la temperatura óptima (29°C) que los juveniles de la especie seleccionan activamente en un gradiente térmico.

## AGRADECIMIENTOS

Al personal del Centro Piscícola de Tezontepec de Aldama, Estado de Hidalgo, México, por haber proporcionado los peces utilizados en este trabajo.

## REFERENCIAS

Aguilera P.H., Zarza E. y Sánchez R. (1988). *La carpa y su cultivo*. FONDEPESCA. México, D.F. 46 p.  
 Alcaraz G. y Espina S. (1993). Effect of nitrite on survival of grass carp *Ctenopharyngodon idella*. Bull. Environ. Contam. Toxicol. En prensa.

APHA (1985). *Standard methods for examining the water and waste waters* 16<sup>th</sup> Ed., APHA Washington, 1266 p.  
 Arredondo F.J.L. (1987). Policultivo experimental de ciprínidos asiáticos en México. Tesis Doctoral. Inst. Cienc. del Mar y Limnol., UNAM, México, 129 p.  
 Bath R.N. y Eddy F.B. (1980). Transport of nitrite across fish gills. J. Exp. Zool. 214, 119-121.  
 Bowser P.R., Falls W.W., VanZandt J., Collier N. y Phillips J.D. (1983). Methemoglobinemia in channel catfish: methods of prevention. Prog. Fish-Cult. 45, 154-158.  
 Buikema A.L., Niederlehner B.R. y Cairns J. Jr. (1982). Biological monitoring. Part IV. Toxicity testing. Water Res. 16, 239-262.  
 Cherry D.S. y Cairns J. Jr. (1982). Biological monitoring. Part V. Preference and avoidance studies. Water Res. 16, 263-301.  
 Diab S. y Shilo M. (1988). Effect of light on the activity and survival of *Nitrosomonas* sp and *Nitrobacter* sp isolated from fish ponds. Israeli J. Aquat. Bamidgeh 40, 50-56.  
 Espina S., Díaz F., Rosas C. y Rosas I. (1986). Influencia del detergente en el balance energético de *Ctenopharyngodon idella* a través de un bioensayo crónico. Contam. Ambient. 2, 25-37.  
 Gutzmer M.P. y Tomasso J.R. (1985). Nitrite toxicity to the crayfish *Procambarus clarkii*. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 34, 369-376.  
 Hilmy A.M., El-Domiatiy N.A. y Wershana K. (1987). Acute and chronic toxicity of nitrite to *Clarias lazera*. Comp. Biochem. Physiol. 86 C, 247-253.  
 Huey D.W., Wooten M.C., Freeman L.A. y Beitingner T.L. (1982). Effect of pH and chloride on nitrite induced lethality in bluegill (*Lepomis macrochirus*). Bull. Environ. Contam. Toxicol. 28, 3-6.  
 Huey D.W., Beitingner T.L. y Wooten M.C. (1984). Nitrite-induced methemoglobin formation and recovery in channel catfish (*Ictalurus punctatus*) at three acclimation temperatures. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 32, 674-681.  
 Jensen F.B., Andersen N.A. y Heisler H. (1987). Effect of nitrite exposure on blood respiratory properties, acid-base regulation in the carp (*Cyprinus carpio*). J. Comp. Physiol. 157 B, 533-541.  
 Kellog R. L. y Gift J.J. (1983). Relationship between optimum temperatures for growth and preferred temperatures for the young of four fish species. Trans. Am. Fish. Soc. 112, 424-430.  
 Milstein A. (1990). Water quality in an intensive outdoor commercial fish culture system with mechanically stirred ponds. Israeli J. Aquat. Bamidgeh. 42, 99-109.  
 Montgomery D.C. y Peck E.A. (1982). *Introduction to linear regression analysis*. Wiley, Nueva York, 504 p.  
 Perrone S.J. y Meade T.L. (1977). Protective effect of

- chloride on nitrite toxicity to coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). J. Fish. Res. Bd. Can. 34, 486-492.
- Ramírez A. (1989). Programa de cómputo DORES. Curso Regional sobre ensayos biológicos y pruebas de toxicidad. INDERENA/PAC/COI/PNUMA/FAO/IDAIEA. Cartagena de Indias, Colombia.
- Russo R.C., Smith C.E. y Thurston R.V. (1974). Acute toxicity of nitrite to rainbow trout (*Salmo gairdneri*). J. Fish. Res. Bd. Can. 31, 1653-1655.
- Russo R.C., Thurston R.V. y Emerson K. (1981). Acute toxicity of nitrite to rainbow trout (*Salmo gairdneri*): pH, nitrite species, and anion species. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 38, 387-393.
- Smith C.E. y Williams W.G. (1974). Experimental nitrite toxicity in rainbow trout and chinook salmon. Trans. Amer. Fish. Soc. 103, 89-90.
- Sumayaisan N.S., Marquez F.E. y Chiu-Chern Y.N. (1991). Evaluation of different supplemental feeds for milkfish (*Chanos chanos*) reared in brackishwater ponds. Aquaculture 93, 177-190.
- Tomasso J.R. y Carmichael G.J. (1986). Acute toxicity of ammonia, nitrite, and nitrate to the Guadalupe bass, *Micropterus treculi*. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 36, 866-870.
- Verma D.K. y Prakash C. (1991). Certain observations on nitrogen profile in ponds under controlled conditions. Agricult. Biol. Res. 7, 38-46.
- Watenpaugh D.E. y Beitinger T.L. (1985). Oxygen consumption in fathead minnows (*Pimephales promelas*) following acute exposure to water-borne selenium. Comp. Biochem. Physiol. 80 C, 253-256.
- Wedemeyer G.A y Yasutake W.T. (1978). Prevention and treatment of nitrite toxicity in juvenile steelhead trout (*Salmo gairdneri*). J. Fish. Res. Bd. Can. 35, 822-827.
- Williams E.M. y Eddy F.B. (1986). Chloride uptake in freshwater teleosts and its relationship to nitrite uptake and toxicity. J. Comp. Physiol. 15 B, 867-872.
- Zar J.H. (1985). *Biostatistical analysis*. 2a Ed., Prentice-Hall, Englewood Cliffs, Nueva Jersey, 718 p.