

**RESISTENCIA A DIVERSOS TOXICOS Y ANESTESICOS EN *POECILIA RETICULATA*
PETERS, 1859.**

**RESISTENCE TO DIFFERENT TOXICS AND ANAESTHETICS IN *POECILIA*
RETICULATA PETERS, 1859**

Carolina Cassará¹
Sergio E. Gómez^{2,3}
Anabella Giusto¹
Ricardo A. Ferriz²
Vanessa Asikian

ABSTRACT

Resistance to various toxins and anaesthetics in *Poecilia reticulata* Peters, 1859.

Following the maximum critical technique (MC) we carried out tests of resistance on different toxins in *Poecilia reticulata*. The results obtained in decreasing order were: Sodium Hypochloride, Leaded super oil (high octane), Formaldehyde, Non-leaded super oil (high octane), Hydrogen Peroxide, Common oil, Diesel oil, Petroleum ether, Ethanol 96% and Methanol. In addition, with LSO and CO, experiments were performed at different salinities with LSO always being more toxic than CO giving a negative and significant correlation between MC and salinity. In the experiments carried out with ethanol using the resistance time technique of 50% (tR50%), values for distinct concentrations were determined and related in the equation $tR50\% = 0,83 \cdot CE^{-0,4337}$ with $R^2 = 83,7$ (n=8). Following the use of this equation $CL50-96h = 0,284\%$ is estimated. Different anaesthetics were analysed recording their action times for *Poecilia reticulata*. The six utilised were divided into two groups: of rapid action (Benzocaine, menthol and macerated of tobacco) and of slow action (Diazepan, Diethyl barbituric acid and Sodium diethyl barbiturate). The benzocaine is the most rapid in having an effect with a 100% recuperation with doses less or equal to 1gr/L. The second in efficiency is menthol with a recuperation of 100% with doses of 5 gr/L. The macerated of tobacco is the one which presents the highest mortality.

Key words: Fishes, ecotoxicology, oils and anaesthetics, *Poecilia reticulata*.

⁽¹⁾ Autorizadas en el Museo Argentino de Ciencias Naturales "Bernardino Rivadavia".

⁽²⁾ Museo Argentino de Ciencias Naturales "Bernardino Rivadavia". Av. Angel Gallardo 470 - 1405 Buenos Aires. Rep. Argentina.

⁽³⁾ Instituto de Limnología, Casilla de Correo 712 - 1900 La Plata, Prov. de Buenos Aires, Rep. Argentina.

INTRODUCCION

La industria del petróleo origina modificaciones en el ambiente y concomitantes efectos biológicos. Los aceites impregnan las superficies e impiden los intercambios gaseosos, los desperdicios fenólicos impiden la absorción de oxígeno y los nafténicos son directamente tóxicos. En los peces se produce asfixia, deshidratación e intoxicación. Esta actividad ha provocado profundos cambios en la composición íctica en la zona costera del río de La Plata (RINGUELET, 1967). El alcohol o la mezcla de estos son desechos comunes en la industria celulósica y tienen efectos letales en los peces.

Los anestésicos por su parte son utilizados, en peces, con diversos objetivos como por ejemplo: transporte, manipuleo quirúrgico, controles de rutina en plántulas de cultivo, marcación, etc. Entre los conocidos el MS-222 es el más efectivo y utilizado (SUMMERFELT y SMITH, 1990), no obstante en muchas circunstancias no se justifica su uso y puede ser reemplazado por otros compuestos de más fácil adquisición.

En los últimos años existe la tendencia a aplicar los resultados obtenidos con peces en la interpretación y cuantificación del impacto ambiental. Diferentes autores como DE LA TORRE et al. (1997), MACCHI et al. (1992) y la American Fisheries Society utilizan a los peces como indicadores de estrés ambiental.

Existen diferentes técnicas para determinar la susceptibilidad de los organismos a factores químicos o ambientales (GOMEZ, 1996). Tradicionalmente la concentración letal para el 50% (CL 50%) puede ser calculada con los métodos de «dosificación de mortalidad (CL50-96hs)» o «tiempos de resistencia (tR50)» (FRY, 1971; STEPHAN, 1977; GOMEZ y TORESANI, 1998). Una técnica alternativa que brinda una medida indirecta de la resistencia es la de «máximo crítico (MC)», extensamente utilizada por diversos autores (BECKER y GENOWAY, 1979; PALADINO et al., 1980). El valor de esta técnica radica en que permite una rápida comparación entre diferentes compuestos o especies.

El valor de estos bioensayos, en donde se expone un organismo a concentraciones crecientes de un tóxico, son de utilidad para establecer criterios de calidad de aguas y manejo de recursos naturales, pudiéndose establecer niveles máximos de tóxicos que pueden permitirse en el ambiente sin causar

daños significativos a la biota residente (STEPHAN, 1977; WARD y PARRISH, 1982; SPRAGUE, 1990).

Poecilia reticulata Peters 1859, es originario de las zonas tropicales del norte de sudamérica, incluyendo Barbados y Trinidad, encontrándose en ambientes lénticos y lóxicos (FREY, 1961; WINEMILLER, 1989). Al igual que la mayoría de los Cyprinodontiformes son eurióticos (DROSTE et al, 1982). Es un pez de aguas superficiales y que presenta la capacidad de realizar respiración acuática superficial "ASR" (KRAMER, 1983).

Tienen un marcado dimorfismo sexual, alta tasa de reproducción y tamaño manejable. Las hembras juveniles pueden ser diferenciadas por un punto negro que llevan sobre la aleta anal, mientras que los adultos se diferencian por los colores y la aleta anal modificada en gonopodio en los machos. Este pequeño animal tiene un régimen alimentario de tipo omnívoro, es usualmente empleado como control biológico de larvas de mosquito en regiones tropicales (SKELTON, 1993; COAD, 1996), y también es ampliamente utilizado en bioensayos (KRAMER y MEHEGAN, 1981; DROSTE et al 1982; MERINO y DROSTE, 1982). Su condición de pez ornamental y la ventaja de que se reproducen con facilidad en acuarios, ha hecho que se los críe prácticamente en todas partes del mundo (CASSARA, 1993; GOMEZ et al., 1994).

Esta especie fue elegida para este trabajo por que se cultiva prácticamente en todos los países, es utilizada habitualmente en bioensayos (KRAMER y MEHEGAN, 1981; DROSTE et al., 1982; MERINO y DROSTE, 1983), y puede ser empleada como organismo testigo para establecer la respuesta de otras especies, de la misma manera que se lo ha utilizado para establecer la sensibilidad de **Salmo gairdneri** y **Pimephales promelas** en relación a la de **P. reticulata** (PESSAH et al., 1973).

Los objetivos de este trabajo son estudiar la resistencia relativa de **Poecilia reticulata**, en presencia de diferentes productos tóxicos de naturaleza química y probar la efectividad de distintos anestésicos de bajo costo y fácil uso en el campo. La realización de bioensayos con compuestos tan disímiles pretende generar una base de datos que provea un marco comparativo para posteriores trabajos con Cyprinodontiformes de la Argentina, con el objeto de utilizar, a estos, como indicadores biológicos.

MATERIALES Y METODOS

Las experiencias con los tóxicos se realizaron con grupos de 5 animales criados en cautividad y

colocados en una cuba de vidrio con un litro de agua. Las características físicas y químicas del agua utilizada para el mantenimiento de los animales y la mayoría de los tests se indican en la tabla 1.

Tabla 1- Características físicas y químicas del agua utilizada en los ensayos.

COMPOSICION IONICA EN mg/l			
RESIDUO SOLIDO (gr/l)	0,954	BICARBONATOS	67,0
NITRATO (en mg N/l)	5,19	CARBONATOS	0
NITRITO (en mg N/l)	0,181	CALCIO	24,4
AMONIO (en mg N/l)	1,535	MAGNESIO	3,8
FOSFORO TOTAL (en mg P/l)	2,125	CLORURO	27,2
CONDUCTIVIDAD (μ s)	314 a 480	SODIO	24,5
pH	5,7 a 6,4	POTASIO	5,1
TEMPERATURA ($^{\circ}$ C)	23,5 a 28	SULFATO	46,0

En cada caso el tóxico en su forma pura fue añadido a una velocidad constante de 0,5 cc cada 30 minutos; registrando temperatura, pH inicial y final, concentración de muerte para cada animal y longitud estándar de los mismos.

Para cada grupo se calculó la concentración media letal (CL) y su desviación estándar (DE), como el promedio aritmético de las concentraciones individuales de muerte, también se calculó la concentración máxima alcanzada (CM) y la longitud estándar media del grupo.

Se utilizaron los siguientes tóxicos (1-10) y anestésicos (11-16):

1 Eter de petróleo, 2 Nafta común, 3 Nafta especial con plomo, 4 Nafta especial sin plomo, 5 Gas oíl, 6 Solución de hipoclorito de sodio (55 gr de cloro libre por litro), 7 Formaldehido 40%, 8 Peróxido de hidrógeno 100 vol., 9 Etanol 96%, 10 Metanol puro, 11 Mentol, 12 Macerado de tabaco, 13 Benzocaina, 14 Acido di-etil barbitúrico, 15 Sodio di-etil barbitúrico, 16 Diazepan. Los anestésicos fueron utilizados en las concentraciones que se indican en la tabla 5.

Dado que se ha indicado que la toxicidad de los hidrocarburos se incrementa con la salinidad (NEFF y ANDERSON, 1981) se realizaron experimentos adicionales con nafta común y nafta super con plomo a distintas salinidades, que previamente fueron

determinadas como no letales en 24 horas, con el objeto de establecer las correspondientes diferencias (GIUSTO *et al.*, en prensa).

Adicionalmente en el caso del etanol se determinó el tR50 para diferentes concentraciones, relacionando ambas variables mediante un modelo multiplicativo. Asimismo se utilizó este modelo para calcular la CL50-96 h. También se empleó un programa computarizado (HARRASS, 1986) que calcula valores letales mediante tres métodos: transformación probit, medias móviles y método de Spearman-Kärber.

Para el caso de los anestésicos se utilizó un número variable de animales y se experimentó con distintas diluciones, en cada caso se registró el tiempo de volteo (TV= tiempo requerido para la pérdida del equilibrio) de cada uno de los individuos, y se los relacionó con la concentración de los anestésicos mediante un modelo exponencial.

RESULTADOS

Las concentraciones letales para los distintos tipos de tóxicos utilizados se indican en la tabla 2 y en la figura 1 se representa la mortalidad en función de la concentración de los cuatro combustibles utilizados.

Tabla 2 - Para cada uno de los compuestos se indica la concentración letal media (MC: máximo crítico), la concentración máxima alcanzada (CM), la temperatura de exposición (Te) y la longitud estándar media del grupo.

COMPUESTO	MC(cc/l)	CM(cc/l)		Te	Lst(mm)
HIPOCLORITO DE SODIO	1,2	1,5	28,5		23,40
NAFTA ESPECIAL CON PLOMO	1,91	2,0	19,5		26,68
FORMALDEHIDO	2,4	2,5	26,1		20,60
NAFTA ESPECIAL SIN PLOMO	2,6	3,0	20,7		22,30
PEROXIDO DE HIDROGENO	2,9	3,5	23,0		22,80
NAFTA COMUN	3,9	4,0	28,9		23,08
GAS OIL	> 9,0	9,0	24,1		23,20
ETER DE PETROLEO	> 7,5	7,5	6,9		17,50
ETANOL 96%	> 7,5	7,5	23,3		23,44
METANOL	> 9,0	9,0	21,6		22,06

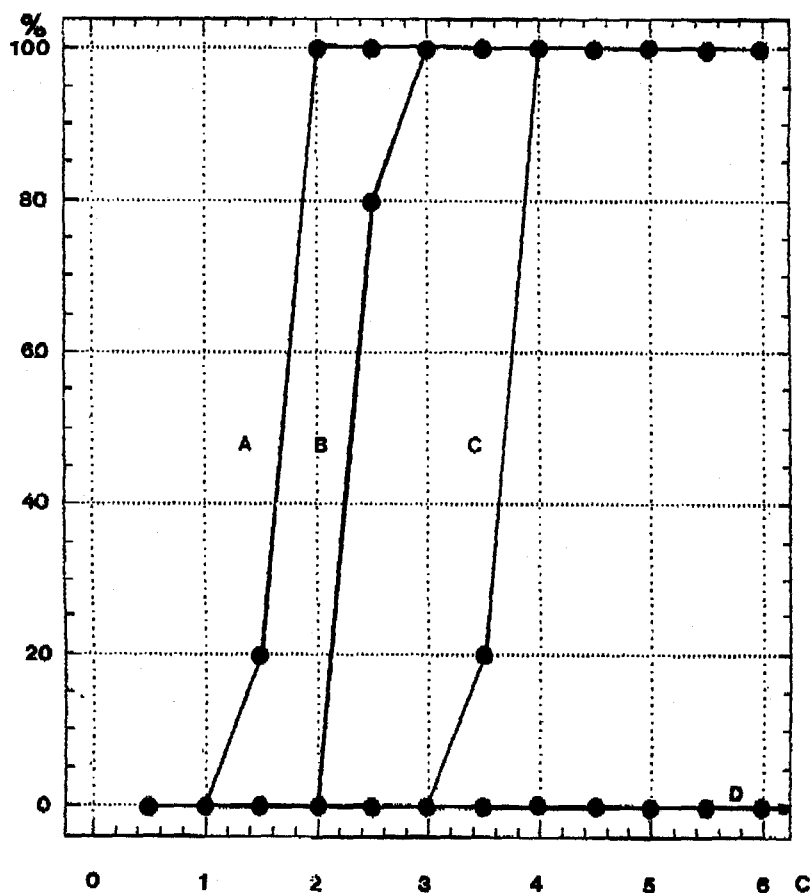


Figura 1 - Porcentaje de mortalidad (%) en *Poecilia reticulata* en función de la concentración (C: en cc/l) de cuatro tipos de combustibles. A: nafta super con plomo; B: nafta super sin plomo; C: nafta común y D: gasoil.

El compuesto más tóxico resultó ser el hipoclorito de sodio con una concentración letal equivalente a la mitad de la concentración letal con formaldehído. Los compuestos menos tóxicos resultaron ser: gas oíl, eter de petróleo, etanol 96% y metanol, a las concentraciones indicadas en la tabla 2 (7,5 a 9 cc/l). Entre los combustibles el más tóxico resultó ser la nafta super con plomo y el menos tóxico el gas oíl (figura 1).

Los resultados obtenidos con nafta super con plomo (NSP) y nafta común (NC) a distintas concentraciones salinas se exponen en la tabla 3 y figura 2. En todos los casos la NSP resultó más tóxica que la NC. El análisis de regresión arrojó el siguiente resultado:

$CL = e^{(0,855 + S \cdot -0,855)}$ con $R^2 = 60,3\%$ ($n=7$), para NSP.

$CL = e^{(1,377 + S \cdot -0,017)}$ con $R^2 = 61,0\%$ ($n=8$), para NC.

El análisis de correlación entre concentración letal media y salinidad indicó una relación negativa

y significativa ($p < 0,05$) en ambos casos con valores de $r = -0,777$ y $-0,781$ respectivamente.

Los resultados obtenidos de tR50 en función de distintas concentraciones de etanol (CE) se resumen en la tabla 4, ambas variables se vinculan mediante la ecuación (figura 3):

$$tR50 = 0,8358 \cdot CE^{-1,4337}$$

con un $R^2 = 83,7\%$ ($n = 8$). El análisis de correlación resultó significativo ($p < 0,05$) con un $r = -0,9149$. A partir de esta ecuación considerando un tiempo de 5760 minutos se estimó una CL50-96h = 0,284 %.

Con el programa de cálculo de HARRASS (1986) se obtuvieron valores de 0,210; 0,177 y 0,210 (figura 4). Promediando las cuatro estimaciones la CL50-96 h para el etanol es de 0,220 (DE = 0,0453).

Tabla 3 - Concentración letal media (MC: máximo crítico en cc/l) para *Poecilia reticulata* expuestos a nafta super con plomo (NSP) y nafta común (NC) a distintas salinidades (S en gr/l). Se indica además la concentración máxima alcanzada (CM) temperatura de exposición (Te) y la longitud estándar (LST) media del grupo (5 ejemplares).

COMPUESTO	S	MC	CM	Te	Lst (mm)
NSP	0,005	2,1	2,5	19,9	22,3
	2,75	1,9	2,0	19,0	23,4
	5,50	2,9	3,5	19,5	21,5
	8,25	1,7	2,0	19,4	18,3
	11,00	2,0	2,5	19,8	22,5
	16,50	2,1	2,5	20,6	18,3
	22,00	1,6	2,0	19,4	22,7
	27,50	1,5	1,5	19,4	21,1
NC	33,00	1,1	1,5	19,0	19,8
	0,005	3,9	4,0	28,9	23,1
	5,50	3,4	4,5	20,5	18,8
	11,00	3,6	4,5	19,5	23,3
	19,25	3,7	4,5	19,0	19,3
	22,00	2,1	2,5	19,4	20,2
	27,50	2,4	3,0	19,5	21,6
33,00	2,4	3,0	19,3	23,9	

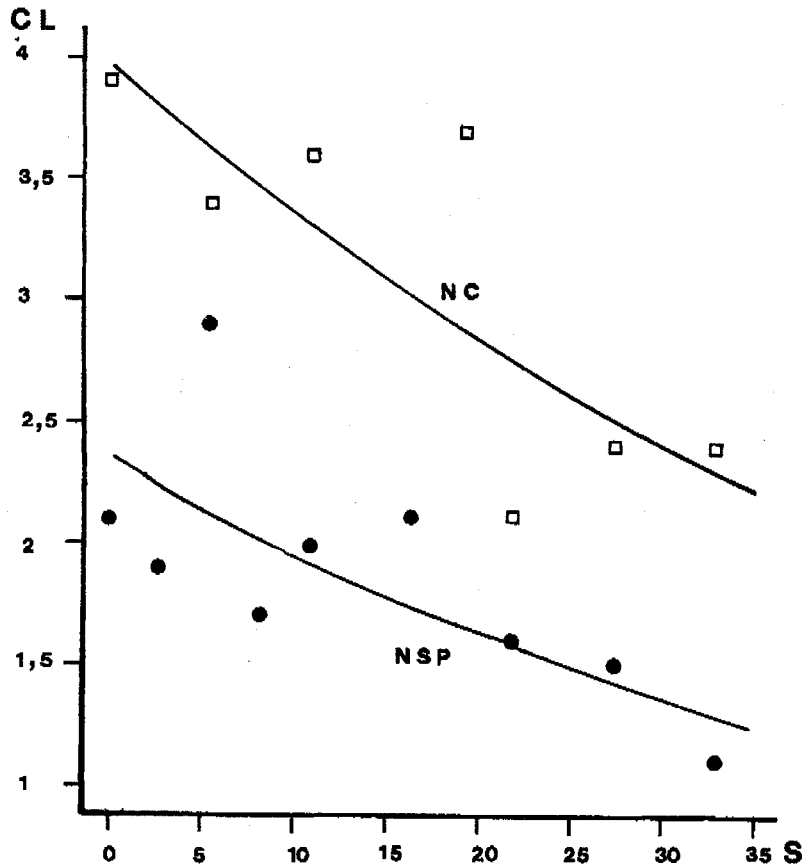


Figura 2 - Concentração letal média (CL em cc/l) para *Poecilia reticulata* expostos a nafta super com plomo (NSP) y nafta común (NC) a distintas salinidades (S em gr/l).

Tabla 4 - Tiempos de resistencia del 50% (tR50) en *Poecilia reticulata* expuestos a diferentes concentraciones de etanol (CE). Se indica además el rango de los tiempos individuales de muerte, la mortalidad a 96 horas (M), la temperatura de exposición (Te) y la longitud estándar media del grupo (LST).

GRUPO	CE (%)	tR50 (min)	RANGO (min)	M (%)	Te (°C)	LST (mm)
1	5,0	31,64	27-30	100	24,9	19,8
2	2,5	160,33	132-185	100	25,3	21,0
3	1,5	1555,18	345-2545	100	24,4	22,2
4	1,0	2412,83	1440->5760	80	23,5	19,8
5	0,5	3796,87	3397-4110	100	22,4	19,1
6	0,25	7138,0	3235->5760	40	22,6	21,7
7	0,1	10488,0	1710->5760	40	23,9	20,8
8	0,05	>5760	-	0	23,5	20,6

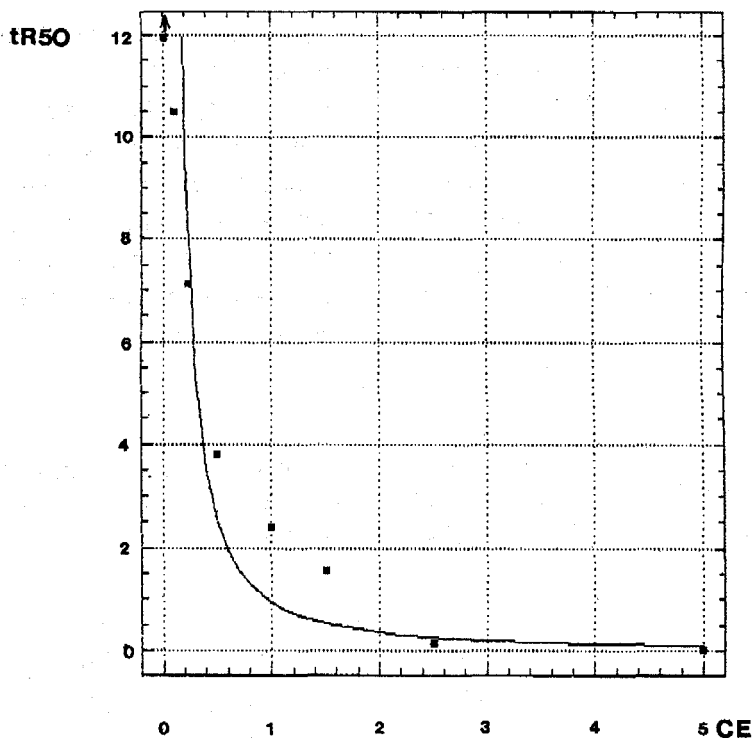


Figura 3 - *Poecilia reticulata*, relación entre el tiempo de resistencia del 50 % (tR50: minutos/1000) y la concentración de etanol (CE en por ciento), en 8 grupos experimentales. El punto indicado con flecha indica 100% de sobrevivientes a las 96 h.

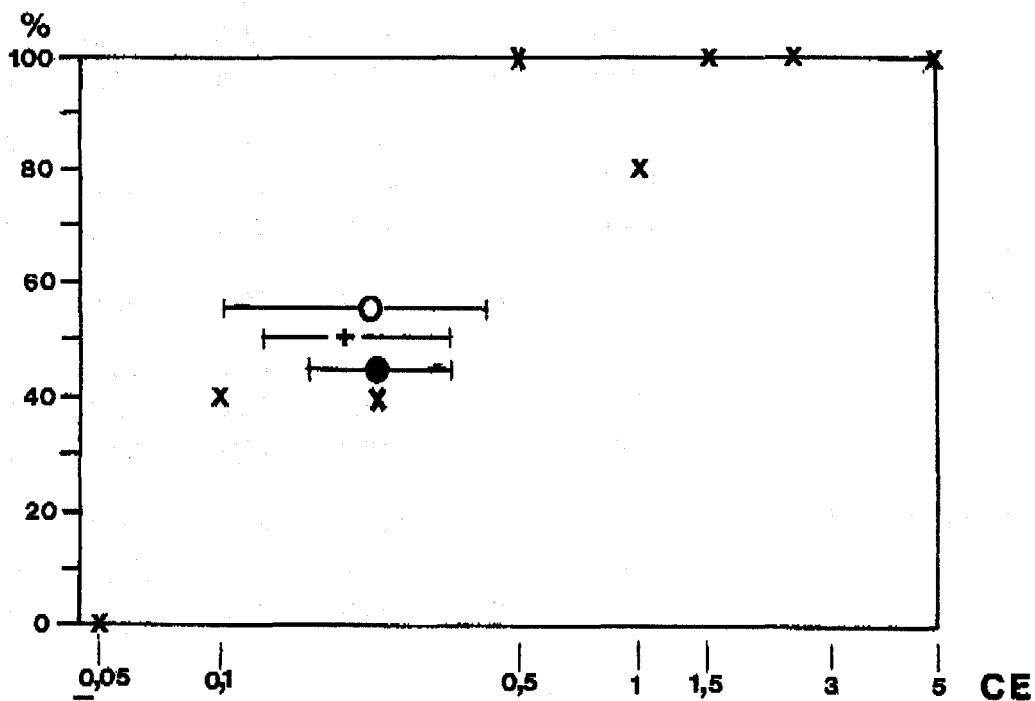


Figura 4 - Porcentaje de mortalidad a las 96 h (%) en *Poecilia reticulata* sometidos a distintas dosis de etanol (CE en por ciento). Las estimaciones de CL50-96 h se realizaron mediante los métodos: probit (círculo vacío), medias móviles (cruz) y Spearman-Kärber (círculo lleno).

Para los seis anestésicos utilizados a distintas concentraciones se indican los respectivos tiempos de volteo en la tabla 5; entre estos pueden distinguirse dos amplios grupos: los de acción rápida (benzocaina, mentol y macerado de tabaco) y los de acción lenta (diazepan, ácido dietil barbitúrico y sodio dietil barbitúrico). Los tiempos de volteo son significativamente diferentes y variaron entre los 9 segundos con 1 gr/l de

benzocaina hasta los 5820 segundos con 0,15 gr/l de diazepan. En la figura 5 puede verse la relación entre tiempo de volteo y concentración para los tres anestésicos de acción rápida. En los tres casos la correlación entre tiempo de volteo y concentración fue inversa y significativa ($p < 0,05$) obteniéndose coeficientes de $-0,75$; $-0,98$ y $-0,97$ para la benzocaina, macerado de tabaco y mentol respectivamente.

Tabla 5 - Tiempos de volteo (TV, en segundos) para los distintos anestésicos utilizados y a diferentes concentraciones (C en gr/l). Se indica además la temperatura de exposición (Te) y la longitud estándar (LST) media y el peso medio (P en gramos) del grupo.

ANESTESICO	C	N	TV	Te	LST	P
BENZOCAINA	0,10	10	155,5	19,8	25,2	0,48
	0,25	20	46,2	19,8	26,7	0,55
	0,50	10	20,9	19,8	24,5	0,91
	1,00	10	9,0	9,8	23,7	0,28
	2,00	10	11,8	20,3	19,3	0,19
DIAZEPAN	0,05	3	3270	26,0	20,0	0,14
	0,10	8	2872	25,0	19,5	0,23
	0,15	5	5820	22,5	20,6	0,15
ACIDO-D-BARBITURICO	5,00	3	396	28,0	19,4	0,10
	10,00	6	4610	23,5	31,8	1,15
	20,00	6	4400	21,3	26,9	0,73
SODIO-D-BARBITURICO	20,00	7	2949	22,2	22,5	0,74
MENTOL	1,25	10	55,3	23,5	30,2	1,00
	2,50	10	29,0	22,2	25,3	0,68
	5,00	7	16,7	23,5	30,6	1,21
MACERADO DE TABACO	4,0	10	169,1	20,7	20,7	0,21
	6,0	10	140,7	20,3	22,2	0,30
	8,0	10	129,0	20,7	20,9	0,20

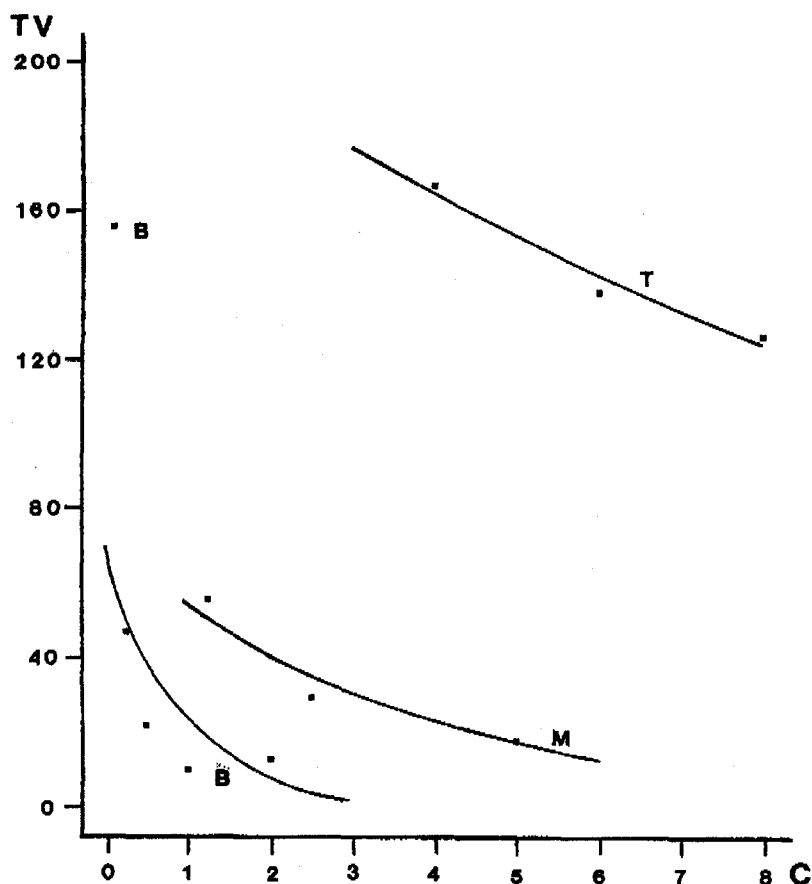


Figura 5 - Relación entre el tiempo de volteo (TV en segundos) y la concentración (C en gr/l) en *Poecilia reticulata* expuestas a tres anestésicos de acción rápida. T: macerado de tabaco, M: mentol y B: benzocaína.

DISCUSION

En niveles subletales se observó, solos o en combinación, alteración de la frecuencia cardíaca y respiratoria, cambios de pigmentación, especialmente oscurecimiento del pedúnculo caudal y parte del tronco, cambios de comportamiento (agresividad, búsqueda de alimento y movimiento natatorio) y ASR. Por debajo de niveles subletales y debido a que exposiciones prolongadas pueden causar un debilitamiento general del animal aumentando su susceptibilidad a enfermedades y o predación; es correcto denominarlos sin efecto mensurable. Se considera en estado de estrés al animal que exhibe una disminución o alteración de las funciones, lo cual indica una muerte potencial o baja de la reproducción llevando a una declinación de la población (HEATH, 1995).

Asimismo los hidrocarburos en niveles subletales alteran el sabor de la carne de los peces lo que incide negativamente en su comercialización (RINGUELET, 1967; MACKIE *et al*, 1972). La salinidad afecta la CL50 de varias sustancias incluyendo los hidrocarburos. Debido a esto los componentes del petróleo son más tóxicos a elevadas concentraciones de sales (STICKLE *et al*, 1982).

De los anestésicos utilizados, en estas experiencias, (tabla 5 y figura 5) el más rápido en manifestar sus efectos fue la benzocaína a la cual le correspondió un 100% de animales recuperados a dosis iguales o menores a 1 gr/l, mientras que para dosis mayores la mortalidad fue de un 80%. Utilizando una concentración de 0,25 gr/l se obtuvieron tiempos de volteo, para machos y hembras tratados separadamente, de 44,8 y 47,6 segundos respectivamente; estas diferencias son no

significativas ($t = -0,35383$, $p < 0,05$) por lo que se puede considerar un tiempo de volteo general de 46,2 segundos. Cabe destacar que machos y hembras diferían significativamente ($p < 0,05$) en el peso corporal con valores de 0,21 y 0,89 gr respectivamente. La recuperación total de los ejemplares anestesiados fue de unos 3 a 5 minutos. Adicionalmente se obtuvo información para ejemplares de otras especies, a concentraciones de 0,25 gr/l para: **Cichlasoma facetum** 32 segundos (85,3 gr); **Cnesterodon decemmaculatus** 35 segundos (1,0 gr); **Pseudotropheus zebra** 40 segundos (1,4 gr) y **Cichlasoma biocellatum** 60 y 95 segundos (5,7 y 23,6 gr). PARMA DE CROUX (1990) indicó tiempos de volteo para **Prochilodus lineatus** (de 5,5-26,6 gr) entre 120 y 180 segundos con concentraciones de 0,2 gr/l y menores. En base a lo expuesto el tiempo de volteo no parece depender del peso corporal sino de características propias de la especie. Conclusiones similares fueron obtenidas por ROMAN et al. (1997) que recomienda dicho anestésico en una concentración de 0,1 gr/l para **Prochilodus platensis** y **Carassius auratus** entre otras especies, con tiempos de volteo de 90 y 75 segundos respectivamente. Le sigue en eficiencia el mentol con una recuperación del 100% luego de 1 a 2 minutos con una dosis de 5 gr/l; el macerado de tabaco fue el que presentó mayor mortalidad en las distintas dosis utilizadas rondando entre un 80% y 100% luego de dos minutos de la sedación total, lo cual lo inhabilita para ser utilizado en controles, manipuleos prolongados y transporte. Los restantes anestésicos utilizados manifestaron una eficiencia significativamente menor a los anteriormente nombrados.

En contraposición con lo observado en los anestésicos mencionados, los tiempos de volteo con: diazepam, ácido dietil barbitúrico y sodio dietil barbitúrico mostraron una correlación positiva y significativa ($p < 0,05$) con la longitud estándar de los ejemplares, con coeficientes de correlación de 0,63; 0,73 y 0,76 respectivamente. Cabe destacar que el macerado de tabaco es el anestésico más económico y de fácil preparación en el campo para ser utilizado en la rápida sedación y muerte de ejemplares que deban ser fijados para colección.

Los resultados obtenidos para **P. reticulata** pueden ser usados como patrones de comparación en la investigación de otras especies, en la medida en que se establece para cada compuesto estudiado un valor o un rango de respuesta efectiva, y estos valores pueden ser tomados como punto de partida en futuras investigaciones.

AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan su agradecimiento al Dr. Coussac (CRUB) por sus valiosas sugerencias y la Sra. Cristina A. Bentos (MACN) por su valiosa y desinteresada colaboración en tareas de laboratorio.

BIBLIOGRAFIA

- BECKER, C.D. and R.G. GENOWAY, 1979. Evaluation of the critical thermal maximum for determining thermal tolerance of freshwater fish. **Env. Biol. Fish** 4(3): 245-246.
- CASSARA, H. 1993. Argentina, Ornamental fish production and market status. **OFI Journal** (Official Pub. of ornamental Fish International) 5: 9.
- COAD, B.W. 1996. Exotic and transplanted fishes in southwest Asia. **Publ. Espec. Inst. Esp. Oceanogr.**, 21: 81-106.
- DE LA TORRE, F.R.; S.O. DEMICHELIS; FERRARI, L. and A. SALIBIAN. 1997. Toxicity of Reconquista River water: Bioassays with juvenile **Cnesterodon decemmaculatus**. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.**, 58:558-565.
- DROSTE, H.J.; T.F. MERINO y SALAZAR, A. 1982. Adaptación del guppy **Lebistes reticulatus** al ambiente. **Actualidades biológicas**, 11(40): 40-47.
- FREY, H. 1961. **Illustrated dictionary of tropical fishes**. TFH Publ. Inc., New York, 768 pp..
- FRY, F.E.J. 1971. Effects of environmental factors on the physiology of fish. En: **Fish Physiology** Vol VI (1): 1-97. Ed. HOAR W.S. y D.J.RANDALL. Academic Press, New York.
- GIUSTO, A.; S.E.GOMEZ; CASSARA, C. y R.A. FERRIZ. 1998. Resistencia a la temperatura y salinidad en **Poecilia reticulata**. **Bioikos**, 12(2) (en prensa).
- GOMEZ, S.E. 1996. Resistenza alla temperatura e salinità in pesci della provincia di Buenos Aires (Argentina), con implicazioni zoogeografiche. In: **Atti 4 Convegno Nazionale Assoc. Ital. Ittiol. Acque dolci**, Trento, Italy: 171-192.
- GOMEZ, S.E. y N.I. TORESANI. 1998. Nivel mínimo letal de pH en **Cnesterodon decemmaculatus** (Jenyns, 1842), (Pisces, Atheriniformes). **Rev. Mus. Arg. Cienc. Nat. "Bernardino Rivadavia"**, Hidrobiología, 8(7): 65-67.

- GOMEZ, S.E.; H. CASSARA y BORDONE, S. 1994. Producción y comercialización de los peces ornamentales en la República Argentina. **Revista de Ictiología**, Vol 2/3 N° 1/2: 13-20.
- HARRASS, M. 1986. LC50 calculation program, version 2.0 (October, 1986).
- HEATH, A.G. 1995. **Water Pollution and Fish Physiology**. Second edition. Lewis Publisher, Boca Raton, Florida, 359 pp.
- KRAMER, D.L. 1983. Aquatic surface respiration in the fishes of Panama: distribution in relation to the risk of hypoxia. **Env. Biol. Fish.** 8(1): 49-54.
- KRAMER, D.L. and J.P. MEHEGAN. 1981. Aquatic surface respiration and adaptive response to hypoxia in the guppy *Poecilia reticulata*, Pisces Poeciliidae. **Env. Biol. Fishes**, 6: 299-314.
- MACCHI, G.J.; A. AUBONA and CHRISTIENSEN, H.E. 1992. Incidence of pathologies in white croaker (*Microponias furnieri*) ovaries, and their relation with different Buenos Aires and Uruguay coastal areas. **Atlántica**, 14:73-85.
- MACKIE, P.R.; A.S. MCGILL and HARDY, R. 1972. Diesel oil contamination of brown trout (*Salmo trutta*). **Environmental pollution**, 3(1): 9-16.
- MERINO, T.F. y H.J. DROSTE. 1983. Adaptación del guppy *Lebistes reticulatus* al ambiente. II. La adaptación fisiológico-metabólica. **Actualidades biológicas**, 12(45): 68-76.
- NEFF, J.M. and J.W. ANDERSON. 1981. **Responses of Marine Animals to Petroleum and Specific Petroleum Hydrocarbons**. Applied Science, London.
- PALADINO, F.V.; J.R. SPOTILA; SCHUBAUER J.P. and K.T. KOWALSKI. 1980. The critical thermal maximum: a technique used to elucidate physiological stress and adaptation in fishes. **Rev. Can. Biol.** 39: 115-122.
- PARMA DE CROUX, J. 1990. Benzocaine (Ethyl-p-Aminobenzoate) as an anaesthetic for *Prochilodus lineatus*, Valenciennes (Pisces, Curimatidae). **J. Appl. Ichthyol.**, 6:189-192.
- PESSAH, E.; J.S. LOCH and MACLEOD, J.C. 1973. Preliminary report on the acute toxicity of Canadian petroleum refinery effluents to fish. **Fish. Res. B. Can., Tech. Rep.** Num. 408:43 pp.
- RINGUELET, R.A. 1967. Contaminación o polución del ambiente acuático con referencia especial a la que afecta el área Platense. **Agro**, 9(15):5-33.
- ROMAN, L.H.; B.L. TRAVI y BENTARCOR, L.D. 1977. Benzocaina como anestésico en peces. **Rev. Med. Vet**, 58(2):145-149.
- SKELTON, P. 1993. **A Complete Guide of the Freshwater Fishes of Southern Africa**. Souther Book Publishers, Harare. 388 pp.
- STEPHAN, C.E. 1977. Methods for calculating an LC50. En: **Aquatic toxicology and hazard evaluation**, ASTM STP 634, F.L.Mayer y J.L.Hamelink (Eds.), American Society for Testing and Materials: 65-84.
- STICKLE, W.B.; T.D. SABOURIN and RICE, S.D. 1982. Sensitivity and osmoregulation of coho salmon *Oncorhynchus kisutch*, exposed to toluene and naphthalene at different salinities. In: **Physiological Mechanisms of Pollutant Toxicity**, Vernberg, W.B., Calabrese, A., Thurberg, F.P and Vernberg, F.J., Eds., Academic Press, New York, 1982, 331
- SPRAGUE, J.B. 1990. Aquatic toxicology. In: **Methods for fish biology**. Schreck, C.B. y P.B.Moyle, Eds, Cap.: 15, AFS, Bethesda, Maryland, 684 pp.
- SUMMERFELT, R.C. and L.S. SMITH, 1990. Anesthesia, surgery and related techniques. In: **Methods for fish biology**. Schreck, C.B. & P.B. Moyle, Eds. Cap.: 8, AFS, Bethesda, Maryland, 684 pp.
- WARD, G.S. y P.R. PARRISH, 1982. Manual de métodos de investigación del medio acuático. Parte 6. Ensayos de Toxicidad. **FAO, Doc. Téc. Pesca**, (185), 25 pp.
- WINEMILLER, K.O. 1989. Patterns of variation in life among South American fishes in seasonal environments. **Oecologia**, 81: 225-241.