

**NO SALE A  
DOMICILIO**



**UNAP**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
Escuela de Formación Profesional  
de Acuicultura

**“IDENTIFICACION DE LA DOSIS LETAL MEDIA (DL<sub>50</sub>) DE AMONIO  
Y NITRITO EN ALEVINOS DE PAICHE (*Arapaima gigas*)**

**TESIS**

Requisito para optar el título profesional de

**BIÓLOGO ACUICULTOR**

AUTOR

**JUVENAL NAPUCHI LINARES**

ELABORADO POR:  
JUVENAL NAPUCHI LINARES  
Linares  
In. ... 28 de 01 de 2014

YURIMAGUAS - PERU

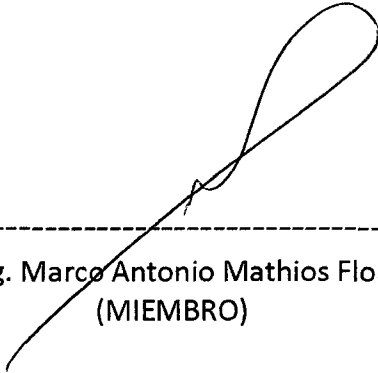
2013



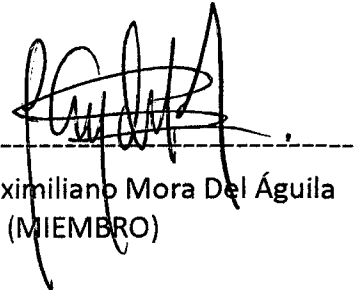
## **JURADOS**



Ing. Mariela Van Heurck de Romero.  
(PRESIDENTE)

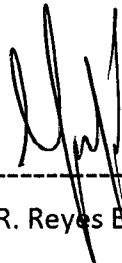


Ing. Marco Antonio Mathios Flores.  
(MIEMBRO)



Blgo. Maximiliano Mora Del Águila  
(MIEMBRO)

## **ASESOR**



Ing. Magno R. Reyes Bedriñana



Facultad de  
Ciencias Biológicas

## ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

En la ciudad de Yurimaguas, a los 24 días del mes de mayo del 2013 y siendo las 10:00 a.m. horas, el Jurado Calificador y Dictaminador que suscribe, designado con Resolución de Coordinación N° 020-2012-CEPPA-FCB-UNAP-Ygs, presidido e integrado por:


Ing. LOURDES MARIELLA VAN HEURCK DE ROMERO. MSc.  
Ing. MARCO ANTONIO MATHIOS FLORES. Mg.  
Blgo. MAXIMILIANO MORA DEL AGUILA

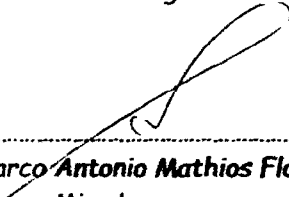
Se constituyó en la Sala de Conferencias de la Facultad de Zootecnia, para calificar la Tesis titulada: **"IDENTIFICACIÓN DE LA DOSIS LETAL MEDIA (DL<sub>50</sub>) DE AMONIO Y NITRITO EN ALEVINOS DE PAICHE ARAPAIMA GIGAS"**, el Bachiller JUVENAL NAPUCHI LINARES, graduado de Bachiller con R.R. N° 2323-2009-UNAP.


Después de sustentada la Tesis, los bachilleres fueron sometidos a un interrogatorio sobre el tema en cuestión, habiendo absuelto en forma MUY BUENA con las observaciones y objeciones que fueron formuladas por los miembros del Jurado Calificador y Dictaminador.

Luego de la deliberación y votación, el Jurado Calificador y Dictaminador dio como veredicto APROBADO la Tesis por UNANIMIDAD quedando el candidato APTO para ejercer la profesión de Biólogo, previo otorgamiento del Título Profesional por la autoridad Universitaria competente y su correspondiente inscripción en el Colegio de Biólogos del Perú.

Terminado el acto, el Presidente del Jurado Calificador y Dictaminador levantó la sesión siendo las 11:00 a.m. horas y en fe de la cual, todos los integrantes del Jurado Calificador y Dictaminador suscriben la presente Acta por triplicado.

  
.....  
Ing. Lourdes Mariella van Heurck de Romero. MSc.  
Presidente

  
.....  
Ing. Marco Antonio Mathios Flores. Mg.  
Miembro

  
.....  
Blgo. Maximiliano Mora del Águila  
Miembro

## **DEDICATORIA**

*A las personas dedicadas a la crianza de paiche,  
los resultados obtenidos en esta investigación sean  
mucha utilidad y que esto se vea reflejado en la mejora  
de las condiciones para su cultivo y su manejo.*

## **AGRADECIMIENTO**

En primer lugar quiero expresar mi más emotivo agradecimiento a mis padres; Don Juvenal Napuchi y Doña Lourdes Linares, que en todo momento supieron apoyarme y alentarme a seguir adelante a lo largo de toda mi vida. También quiero agradecer a Linda Jessica García Mozombite por haberme brindado su comprensión y paciencia durante el tiempo que realicé mi trabajo de tesis.

De manera especial y sincera a mi asesor, Ing. Magno Reyes Bedriñana y de igual forma al Dr. Fred Chu Koo. Su apoyo y su confianza en mi trabajo y sus reconocidas capacidades han sido un aporte invaluable, no solamente en el desarrollo de la tesis, sino también en mi formación como investigador.

Al Blgo. Luciano Rodríguez Chu, por su importante aporte y participación en el desarrollo de esta tesis. Al Ing. Salvador Tello Martín, Director del Programa AQUAREC, por permitir que esta tesis se haya desarrollado en las instalaciones del mencionado programa. Así mismo, agradecer su amabilidad y disponibilidad durante mi estancia en el IIAP.

Quiero extender un sincero agradecimiento al Sr. Lamberto Arévalo Llerena. Del mismo modo extiendo mi profundo agradecimiento a los técnicos: Hugo Marichi, Cherry Yahuarcani, Italo Orbe, Edwin Agurto y Asunción Guerra; que en todo momento mostraron su buena voluntad en colaborar con mis actividades de investigación.

Cierro este capítulo de agradecimiento, no sin antes dejar de mencionar mi gratitud al Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana (IIAP) por el financiamiento de esta tesis.

## INDICE

	<b>Pág.</b>
Jurados y Asesor .....	ii
Dedicatoria .....	iii
Agradecimiento .....	iv
Resumen .....	ix
I. Introducción .....	13
II. Revisión de Literatura .....	15
III. Materiales Y Métodos .....	21
IV. RESULTADOS .....	29
V. DISCUSIÓN .....	33
VI. CONCLUSIONES .....	39
VII. RECOMENDACIONES .....	40
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	41

## TABLAS.

TABLA	TITULO	Pág.
1	Características de la calidad de agua reconstituida utilizada en los experimentos.	25
2	Concentraciones de parámetros fisicoquímicos de las soluciones en prueba correspondiente a la prueba con amonio.	26
3	Concentraciones de parámetros fisicoquímicos de las soluciones en prueba correspondiente a la prueba con nitrito.	26
4	Concentraciones de amonio (NH <sub>4</sub> ) o nitrito (NO <sub>2</sub> ) preparadas a partir de una solución de trabajo 300 mg/l (NH <sub>4</sub> ).	27
5	Concentraciones de amonio y nitritos utilizadas en los bioensayos de identificación de las dosis letales medias (DL50) para alevinos de paiche, <i>Arapaima gigas</i> .	27
6	DL <sub>50</sub> -96 h de amonio (NH <sub>4</sub> ), obtenidos para alevinos de paiche ( <i>Arapaima gigas</i> ) mediante el análisis Trimmed Spearman-Kärber.	30
7	DL <sub>50</sub> -96 h de nitritos (NO <sub>2</sub> ), obtenidos para alevinos de paiche ( <i>Arapaima gigas</i> ) mediante el análisis de Trimmed Spearman-Kärber.	31

## **GRAFICOS.**

GRAFICO	TITULO	Pág.
1	Porcentajes de mortalidad registrados en alevinos de paiche (Arapaima gigas) sometidos a cinco dosificaciones de amonio (NH <sub>4</sub> ) en bioensayos de 96 horas de duración.	29
2	Porcentajes de mortalidad registrados en alevinos de paiche (Arapaima gigas) sometidos a cinco dosificaciones de nitrito (NO <sub>2</sub> ) en bioensayos de 96 horas de duración.	31



## **FOTOS.**

FOTO	TITULO	Pág.
1	Vista del frontis del Centro de Investigaciones de Quistococha, sede de las instalaciones del Programa para el Uso y Conservación del Agua y sus Recursos (AQUAREC). Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana (IIAP).	21
2	Reactivos empleados para la preparación de las sustancias de prueba a diferentes concentraciones. Nitrito de sodio (izquierda) y Cloruro de amonio (derecha).	22
3	Medición de los valores físico químicos del agua de las unidades experimentales.	24
4	Monitoreo de los parámetros fisicoquímicas de las soluciones en prueba.	25

## RESUMEN

A fin de evaluar el grado de tolerancia de los alevinos de paiche a compuestos nitrogenados como el amonio y el nitrito, se realizaron bioensayos con diferentes concentraciones (T1:18.75; T2:37.5; T3:75; T4:150; T5:300 ppm) por triplicado de dichos compuestos de manera independiente por espacio de 96 horas. Tanto los tratamientos como las replicas fueron asignados aleatoriamente en peceras de 60 x 30 x 30cm. Un total de 217 alevinos (10 cm y 7 g de talla y peso promedio inicial) fueron distribuidos en grupos de 7 peces en cada unidad experimental, donde se mantuvo una densidad de 5g de pez/l. Los parámetros de calidad de agua fueron monitoreados cada 24 horas durante el transcurrir de la prueba. Para los bioensayos con amonio, este fue incorporado a partir del cloruro de amonio ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) y los bioensayos de nitrito a partir de nitrito de sodio ( $\text{NaNO}_2$ ). De igual forma se preparó una solución madre de cada uno que contenía 1g/l del ión  $\text{NH}_4$  y  $\text{NO}_2$  y una solución de trabajo de 300 mg/l de las mismos iones, lo cual sirvió para la preparación de las concentraciones evaluadas preparadas el mismo día del ensayo. Los peces no fueron alimentados durante el tiempo que duro el ensayo con la finalidad de evitar algún tipo de variación en las concentraciones. Para el cálculo de la  $\text{DL}_{50-96 \text{ h}}$  del amonio ( $\text{NH}_4$ ) y del nitrito ( $\text{NO}_2$ ), se utilizó el programa "LC<sub>50</sub> Programs JS Pear Test" basado en el método Trimmed Spearman-Kärber. La  $\text{DL}_{50-96 \text{ h}}$  del amonio ( $\text{NH}_4$ ) sobre alevinos de paiche *Arapaima gigas* estimado por el método aplicado fue de  $105.85 \pm 4.26 \text{ mg/l}$ , con un intervalo de

confianza de 95% (81.82 – 137.18) y un coeficiente de variación de 3.12% y para el caso del nitrito ( $\text{NO}_2$ ) fue de  $70.31 \pm 5.95$  mg/l, con un intervalo de confianza de 95% (54.45 – 90.49) y un coeficiente de variación de 5.94%. Estos resultados nos demuestran la alta resistencia de los alevinos de paiche a estos compuestos nitrogenados.

## ABSTRACT

To assess the degree of tolerance of fingerlings paiche into nitrogen compounds like ammonia and nitrite, bioassays were performed with different concentrations (T1: 18.75, T2: 37.5, T3: 75 T4: 150; T5: 300 ppm) of these compounds in triplicate independently for about 96 hours. Both treatments and the replicas were randomly assigned in 31 fish tanks 60x30x30cm. A total of 217 fingerlings (10 cm. And 7g of height and initial weight) were divided into groups of 7 fish in each experimental unit, which had a density of 1 g of fish/l. The water quality parameters were monitored every 24 hours during the passage of the test. For bioassays with ammonium, this was built from ammonium chloride (NH<sub>4</sub>Cl) and bioassays of nitrite from sodium nitrite (NaNO<sub>2</sub>). Likewise, a stock solution was prepared each containing 1g/l of NH<sub>4</sub> and NO<sub>2</sub> ion and a working solution of 300 mg/l of the same ions, which served for the preparation of the evaluated concentrations, prepared the same day test. The fish were not fed during the time of the trial to avoid any variation in working concentrations. For the calculation of the LD<sub>50</sub>-96 h of ammonium (NH<sub>4</sub>) and nitrite (NO<sub>2</sub>), we used the "Pear JS LC50 Test Programs" based on the Trimmed Spearman-Kärber method. The LD<sub>50</sub>-96 h of ammonium (NH<sub>4</sub>) on fingerlings of *Arapaima gigas* paiche estimated by the method used was 105.85 ± 4.26 mg/l, with a confidence level of 95% (81.82 - 137.18) and a coefficient of variation of 3.12 % and in the case of nitrite (NO<sub>2</sub>) was 70.31 ± 5.95 mg/l, with a confidence level of 95% (54.45 - 90.49) and a

coefficient of variation of 5.94%. These results demonstrate the high resistance of fry  
paiche these nitrogen compounds.

## I. INTRODUCCION

El amonio y nitrito son sustancias tóxicas para los peces, incluso a bajas concentraciones, (Baldisseroto, 2002). Son componentes naturales del ciclo de nitrógeno en los diversos ecosistemas pero su presencia en el ambiente es un problema potencial debido a su bien documentada toxicidad para los animales tanto terrestres como acuáticos (Lewis y Morris, 1986; Jensen, 2003). En sistemas de cultivo con grandes flujos de agua, la eliminación de estos compuestos se lleva a cabo rápidamente, evitando su incremento. En el caso de sistemas cerrados, sin embargo, es importante contar con filtros biológicos dotados con bacterias nitrificantes para atenuar su conocida toxicidad (Baldisseroto, 2002).

Los animales acuáticos presentan mayor riesgo de intoxicación por estos compuestos dado que en el agua, ambas sustancias pueden ser mucho más activas a través del epitelio de las branquias y se pueden acumular a muy altas concentraciones en los fluidos del cuerpo. En ese sentido, las concentraciones elevadas de estos dos compuestos nitrogenados causan grandes problemas en sistemas de cultivo intensivo de peces en acuicultura.

El paiche (*Arapaima gigas*), es en estos momentos la especie íctica con mayor proyección de la acuicultura amazónica peruana, por su reconocida rusticidad y adaptación a diversas sistemas y condiciones de crianza, rápido crecimiento y buena demanda en el mercado internacional (Chu-Koo Y Alcántara, 2009). En acuicultura, los peces carnívoros como el paiche suelen recibir alimentos con niveles altos de proteína

animal, mientras que se desconoce el rango de tolerancia de esta especie a los compuestos nitrogenados, información que es importante para el desarrollo de la crianza intensiva y súper intensiva de esta especie.

Para determinar la toxicidad relativa de una sustancia en un organismo acuático, es preciso realizar un ensayo de toxicidad aguda, para estimar la dosis letal media ( $DL_{50}$ ) de la sustancia en el agua en que los organismos están expuestos. La  $DL_{50}$  es la concentración que produce la muerte del 50% de la población sometida a la prueba, en un período de tiempo específico (Martínez y Colus, 2002).

En ese sentido, el propósito del presente trabajo fue evaluar la tolerancia del paiche a varias concentraciones de amonio y nitritos, a través de la identificación de la dosis letal media ( $DL_{50}$ ) de estos compuestos. La aplicación práctica de los resultados de este trabajo es inmediata, puesto que la información generada servirá para establecer los rangos adecuados de ambas sustancias en el manejo de alevinos de esta promisoriosa especie de la acuicultura amazónica.

## II. REVISION DE LITERATURA

El nitrito es un producto intermedio e importante en los procesos de nitrificación y desnitrificación bacteriana en el ciclo del nitrógeno. Concentraciones elevadas de nitritos pueden ser encontradas en aguas que reciben efluentes de nitrógeno (Ej. acuicultura), en diversos entornos de hipoxia o en los efluentes de industrias productoras de metales, tintes y celuloide (Pitter, 1999).

Tras el inicio del proceso de nitrificación en filtros biológicos, o durante el desequilibrio en el proceso, las concentraciones de nitritos pueden llegar hasta 50 mg/l o más (Avnimelech et al, 1986; Kamstra, et al, 1996). Esto puede resultar en una masiva mortalidad de peces (Svobodova y Kolarova, 2004; Svobodova et al., 2005). Según Russo y Thurston (1991), los factores que afectan el proceso de la nitrificación son el pH, temperatura, concentración de oxígeno disuelto, el número de bacterias nitrificantes, y la presencia de compuestos inhibidores de, por ejemplo, ácido nitroso, NH<sub>3</sub>, azul de metileno, los antibióticos, y algunos compuestos orgánicos (anilina, dodecilamina, P nitrobenzaldehído).

Los peces de agua dulce, son hiperosmóticos con relación a su medio ambiente y por tanto, necesitan una captación activa de iones a través de las branquias para compensar los iones perdidos con la orina y el flujo de salida pasiva a través de las branquias. La mayoría de peces son capaces de acumular iones por mecanismos de respuesta activos asociados con las células de cloruro de las agallas (Maetz, 1971). En el agua dulce, estas células pueden emitir el amonio o iones de hidrógeno a cambio de un



número igual de iones de sodio y pueden emitir iones de bicarbonato a cambio de un número equivalente de iones de cloruro (Love, 1980).

Problemas con el nitrito en animales de agua dulce derivan del hecho de que el NO<sub>2</sub> tiene una afinidad por el mecanismo de absorción de cloruro branquial, por lo que siempre el nitrito está presente en el agua del ambiente (Jensen, 2003).

Según Williams y Eddy (1986), los peces con alta tasa de absorción branquial de cloruro (Ej. trucha arco iris y perca) son más sensibles a los nitritos que aquellas especies con baja tasa de respuesta (Ej. anguila, carpa y tenca). Se conoce que parte del nitrito ingresa a los peces a través de la difusión del HNO<sub>2</sub>, pero ésta ruta parece ser insignificante en la mayoría de los casos (Jensen, 2003).

En organismos dulceacuícolas las concentraciones de nitrito en el plasma sanguíneo pueden ser hasta 60 veces superiores a las concentraciones en el medio circundante. Sin embargo, el nitrito también se acumula en tejidos, como branquias, hígado, cerebro y músculo (Margiocco et al., 1983). La sangre parece ser el principal objetivo de actuación del nitrito. Desde el plasma sanguíneo, se difunde a las células rojas de la sangre, donde se oxida. El hierro de la hemoglobina al estado de oxidación se llama metahemoglobina o ferrihemoglobina (Kiese, 1974), la capacidad de carga total, le da un color marrón a la sangre, que tiene un espectro óptico con un máximo de absorción alrededor de 635 nm. Así que un síntoma visible de los niveles de metahemoglobina elevada es el color marrón de la sangre y agallas de los peces afectados. Este fenómeno fue observado en Tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*) tan pronto como los niveles

de metahemoglobina alcanzaron alrededor del 20% de la hemoglobina total (Svobodova et al., 2005).

La cantidad de metahemoglobina necesaria para matar, reducir el crecimiento o para impedir el normal comportamiento de los peces, varía según la especie y las condiciones ambientales. Como una regla empírica, las concentraciones de metahemoglobina superiores al 50% pueden considerarse una amenaza para los peces (Bowser et al., 1983). Un caso extremo fue registrado en el bagre de canal (*Ictalurus punctatus*) que llegaron a sobrevivir durante 2 días con una exposición del 100% de metahemoglobina (Tomasso et al., 1979). Cuando las concentraciones de metahemoglobina están por debajo del 50%, por lo general no se produce mortalidad en esta especie.

Por su parte, el amonio es un producto de la degradación de las proteínas y representa entre el 60 y el 80% del nitrógeno que excreta un pez (Hasan y Macintosh, 1986). El pez digiere la proteína de su alimentación y excreta amonio a través de sus branquias y de sus heces. La cantidad de amonio excretado por los peces varía con la cantidad de alimento que existe en el estanque o del sistema de cultivo, y aumenta a medida que se incrementa las tasas de alimentación. El amonio también entra en el estanque a través de las bacterias de la materia orgánica en descomposición, tales como alimentos no consumidos o algas y plantas acuáticas muertas.

Concentraciones muy elevadas de amonio pueden causar reducciones en la tasa de crecimiento, cambios histopatológicos, reducción de la capacidad de transporte de

oxígeno por la hemoglobina, hasta provocar la muerte del pez. La toxicidad del amonio ha sido intensamente investigada en numerosas especies. Los salmónidos son los peces más sensibles en comparación con otras especies como la carpa o el bagre de canal (Richardson, 1991).

La sensibilidad al amonio de muchas especies de *teleósteos* de agua dulce puede conducir a la muerte de estos peces (Moraes et al., 2004). Síntomas de intoxicación aguda por amonio son la hiperventilación, hiperexcitabilidad, pérdida del equilibrio, coma y muerte (Twitchen y Eddy, 1994). Esta toxicidad aguda se debe principalmente a su efecto sobre el sistema nervioso central, pero el mecanismo de acción del amonio es aún controversial, tanto para los mamíferos y los peces (Person-Le Ruyet et al, 1998).

Según Randall y Tsui (2002), la causa de toxicidad primaria del amonio en los peces resulta del efecto despolarizante de este ión sobre las neuronas, que actúan en lugar de  $K^+$  que conduce a una activación de los receptores del glutamato NMDA excesiva del tipo (N-metil-D-aspartato) y la muerte celular posterior. En los salmónidos expuestos a altas concentraciones de amonio, hay en un principio cambios en la sangre (aumento de las concentraciones plasmáticas de amonio total, glutamina y lactato) y el cerebro (disminución de los niveles de glutamato, azúcares y ATP). Posteriormente todas las funciones biológicas, tales como osmorregulación, respiración y excreción, son rápidamente alteradas (Person-Le Ruyet et al, 1998).

Existen registros de peces que toleran altos niveles de amonio en el agua como *Opsanus beta*, *Porichthys notatus*, todos de la familia *Batrachoididae* (Wang y Walsh,

2000). Esta tolerancia puede estar asociada a diversas adaptaciones o estrategias desarrolladas por los peces a lo largo de su evolución, como el hecho de reducir al mínimo la acción del amonio produciendo compuestos derivados como la urea en *Clarias batrachus* (Saha et al, 2002), o glutamina, en *Oncorhynchus mykiss* (Wicks y Randall, 2002).

La tilapia (*Oreochromis sp.*) puede tolerar condiciones desfavorables, que otras especies no soportarían, como concentraciones de hasta 0.10 ppm de oxígeno disuelto en el agua, temperaturas mínimas de 20°C y concentraciones máximas de 2.4 ppm de amonio. A consecuencia de las altas densidades de siembra en estanques, se incrementa la probabilidad de exposición de los peces a concentraciones elevadas de amonio y nitritos (Lovell, 1989).

La toxicidad del amonio para los salmónidos y otras especies de agua dulce en diferentes condiciones ha sido ampliamente revisada y puede variar en función de sensibilidad de la especie, etapa de desarrollo, la duración de la exposición y las condiciones ambientales. La DL<sub>50</sub> (96 horas) para el promedio de NH<sub>4</sub> en teleósteos de agua dulce en general es de 0.82 mg L<sup>-1</sup> NH<sub>3</sub> (Person-Le Ruyet et al., 1995).

El paiche, (*Arapaima gigas*) de hábito alimenticio carnívoro, es considerado un pez rústico (Imbiriba, 2001) por su respiración aérea, hecho que le permite tolerar aguas con bajos tenores de oxígeno disuelto, en tanto, su tolerancia al amonio no es aún conocida. Es una de las especies dulceacuícolas más grandes del mundo ya que puede alcanzar los 3 m de longitud y pesar hasta más de 200 kg (Rebaza et al, 1999; Chu-Koo y

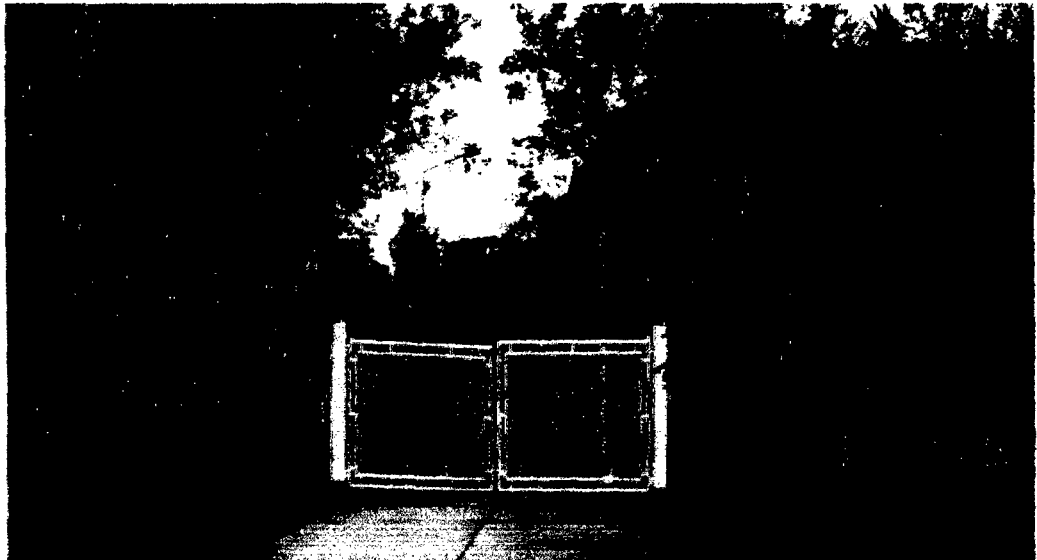
Alcántara, 2007). Se distribuye naturalmente en la cuenca amazónica, particularmente en países como Perú, Brasil, Colombia, Bolivia y Guyana. Es un recurso pesquero tradicional y popular en la cuenca amazónica. Científicamente es de gran interés por ser una especie primitiva única en su género (Barthem, 1996).

En los últimos años, el paiche, se ha perfilado como una especie promisoría y de gran importancia para la piscicultura, debido a la excelente calidad de su carne, su alto valor comercial, por ser resistente al manipuleo en cautiverio y por presentar respiración aérea, lo que facilita su cultivo en sistemas intensivos como las jaulas flotantes (Chu-Koo et al, 2007; Chu-Koo y Alcántara, 2009). Asimismo, este pez posee la mejor tasa de crecimiento entre las especies amazónicas destinadas a piscicultura, alcanzando entre 10 a 15 kg por año (Chu-Koo y Alcántara, 2009)

### **III. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1. Área de estudio.**

El estudio se realizó en las instalaciones del Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana IIAP – Quistococha, ubicado en la comunidad de Quistococha en el Km. 4.5 de la Carretera Iquitos - Nauta, en la provincia de Maynas, departamento de Loreto.



**Foto 1.** Vista del frontis del Centro de Investigaciones de Quistococha, sede de las instalaciones del Programa para el Uso y Conservación del Agua y sus Recursos (AQUAREC). Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana (IIAP).

#### **3.2. Tipo de estudio.**

La presente investigación es de tipo experimental, es decir, donde se manipularon variables para explicar relaciones de causa y efecto. Se hizo uso del método científico para obtener resultados que nos permitan dar respuesta a las preguntas de investigación formuladas en el planteamiento del problema.

En el desarrollo del estudio se emplearon técnicas y métodos de investigación, así como herramientas de colecta y análisis de datos estandarizados dentro de la comunidad científica por lo que nuestros ensayos son replicables y repetibles.

### 3.3. Sustancias de prueba

**3.3.1. Amonio:** Ión monovalente positivo, de fórmula  $\text{NH}_4$ , derivado del amoníaco por adición de un ión hidrógeno. Fue incorporado a la prueba a partir del Cloruro de Amonio, el cual se presenta en estado sólido con una coloración que varía entre incoloro y blanco, es inodoro e higroscópico en diversas formas. Su punto de sublimación es de  $350\text{ }^\circ\text{C}$ . Su densidad relativa (agua = 1) es 1.5. La presión de vapor que genera es de  $0.13\text{ kPa}$  a  $160\text{ }^\circ\text{C}$  y su peso molecular es de  $53.49\text{ g/mol}$ . El peso molecular del amonio es de:  $18\text{ g/mol}$ .

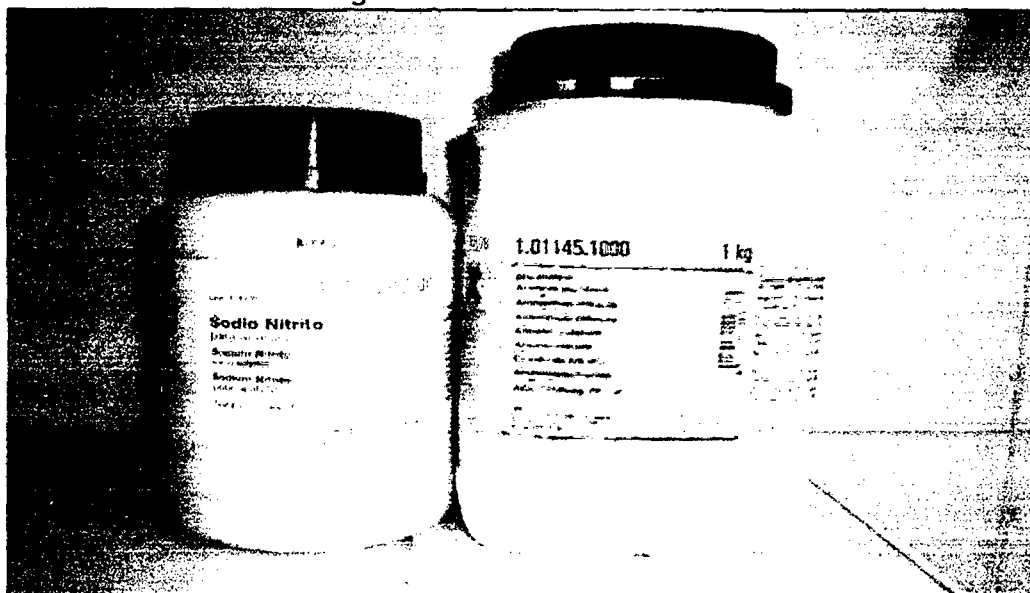


Foto 2. Reactivos empleados para la preparación de las sustancias de prueba a diferentes concentraciones: Nitrito de sodio (izquierda) y Cloruro de amonio (derecha).

**3.3.2. Nitrito:** El ión nitrito es el  $\text{NO}_2$ . Los nitritos son o bien sales o bien ésteres del ácido nitroso ( $\text{HNO}_2$ ). En la naturaleza los nitritos se forman por oxidación biológica de las aminas y del amoníaco, o por reducción del nitrato en condiciones anaeróbicas. Fue incorporado a la prueba a partir de Nitrito de sodio, el cual presenta un aspecto sólido higroscópico, de color entre blanco y amarillo en diversas formas e inodoro. Con densidad relativa (agua =1) de 2.17, solubilidad en agua de 2 g/100 ml a 20 °C, punto de ebullición de 320 °C (se descompone por debajo), punto de fusión de 271 °C. El peso molecular del nitrito es de: 46 g/mol.

#### **3.4. Especie biológica.**

Nombre científico	:	<i>Arapaima gigas</i>
Nombre común	:	Paiche, Pirarucu
Estadio	:	Alevinos sanos
Coloración	:	Castaño claro
Tamaño	:	Entre 8 – 12 cm.
Alimentación	:	Peces pequeños ad libitum
Cultivo	:	Agua reconstituida
Pre-tratamientos	:	Ninguno

#### **3.5. Aparatos**

Equipos de uso común y rutinario en laboratorio y especialmente necesarios fueron los siguientes:





- Oxímetro YSI Modelo 55: Control del oxígeno disuelto y temperatura el agua.
- Peachímetro pH meter 330i: Control del potencial de hidrogeniones (acidez/alcalinidad) de las soluciones utilizadas en el estudio.
- Kit Lamotte AQ-2 para medición de aguas dulces (dureza, amonio y nitritos).
- Tanques hechos de material químicamente inerte y de capacidad suficiente en relación a la carga recomendada.

### 3.6. Diseño de la investigación.

Se utilizó un sistema estático, sin renovación de agua, sin aireación, con una carga de 5.0 g de pez/l, y una temperatura oscilante entre 26 y 28 °C. Los peces no fueron alimentados durante las pruebas. Los valores de pH, temperatura y dureza del agua de reposición fueron medidos 24 horas antes y al inicio de la prueba. Los parámetros de calidad de agua fueron monitoreados cada 24 horas durante el transcurrir de cada prueba.



**Foto 3.** Medición de los valores físico químicos del agua de las unidades experimentales dentro del Laboratorio de Reproducción de Peces del CIQ - IIAP.

### 3.7. Características de la calidad del agua reconstituida

Se midieron los valores de pH, temperatura y dureza del agua reconstituida 24 horas antes y al inicio de la prueba, los cuales se presentan en la Tabla 1.

**Tabla 1.** Características de la calidad del agua reconstituida utilizada en los experimentos.

PH	Temperatura (°C)	Dureza (mg CaCO <sub>3</sub> /l)
6.8 - 7.7	25.5 - 27 °C	80 - 100

### 3.8. Concentraciones de parámetros fisicoquímicos de las soluciones en prueba

Se midieron los valores de pH, temperatura, dureza y concentración de oxígeno de la solución madre y las soluciones en prueba cada 24 horas durante el transcurrir la prueba, obteniéndose los siguientes resultados mostrados en las Tablas 2 y 3.



**Foto 4.** Monitoreo de los parámetros fisicoquímicos de las soluciones en prueba.

**Tabla 2.** Concentraciones de parámetros fisicoquímicos de las soluciones en prueba correspondiente a la prueba con amonio.

Concentración (mg/l)	PH	Temperatura (°C)	[ ] de Oxígeno (mg/l)
18.75	7.1 – 7.7	25 – 27	4 -7
37.5	7.5 – 7.9	25 – 27	4 -7
75	7.2 – 7.6	26 – 27	5 -7
150	7.5 – 7.6	25 – 26	4 -7
300	7.3 – 7.9	25 - 27	5 -7

**Tabla 3.** Concentraciones de parámetros fisicoquímicos de las soluciones en prueba correspondiente a la prueba con nitrito.

Concentración (mg/l)	PH	Temperatura (°C)	[ ] de Oxígeno (mg/l)
18.75	7.5 – 7.9	26 – 27	5 -7
37.5	7.2 – 7.7	25 – 26	4 -7
75	7.1 – 7.6	26 – 27	4 -7
150	7.3 – 7.8	25 – 27	4 -7
300	7.7 – 7.9	25 - 27	4 -7

### 3.9. Preparación de las soluciones madres y de las soluciones de prueba.

Para los bioensayos, el amonio y el nitrito fueron incorporados a partir de Cloruro de Amonio ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) y Nitrito de Sodio ( $\text{NaNO}_2$ ), respectivamente. De igual forma se preparó una solución madre de cada uno que contenía 1 g/l del ión  $\text{NH}_4$  y  $\text{NO}_2$  y una solución de trabajo de 300 mg/l de los mismos iones, lo cual sirvió para la preparación de las concentraciones evaluadas: 18.75, 37.5, 75, 150, 300 mg/l, preparadas el mismo día del ensayo.

El rango de concentraciones utilizadas para los bioensayos fue determinado después de ensayar la prueba límite de cada uno de los iones, los cuales mostraron que a la dosis de 100 mg/l había una alta supervivencia de la especie, por lo que fue necesario aumentar la dosis.

En la Tabla 4 se describen las concentraciones finales de  $\text{NH}_4$  y  $\text{NO}_2$  obtenidas para la realización de los bioensayos y los volúmenes de solución inicial utilizados para obtener dichas diluciones.

**Tabla 4.** Concentraciones de amonio ( $\text{NH}_4$ ) o nitrito ( $\text{NO}_2$ ) preparadas a partir de una solución de trabajo 300 mg/l.

Volumen de la solución de trabajo (ml)	Volumen de H <sub>2</sub> O reconstituida (ml)	Concentración de Amonio / Nitrito (mg/l)
3000	7000	300
1500	8500	150
750	9250	75
375	9625	35.7
187.5	9812.5	18.75

Para el presente trabajo se utilizaron las concentraciones mostradas en la Tabla 5, para evaluar la tolerancia de los alevinos de paiche a estas sustancias y a la vez determinar las dosis letales medias ( $\text{DL}_{50}$ ).

**Tabla 5.** Concentraciones de amonio y nitritos utilizadas en los bioensayos de determinación de las dosis letales medias ( $\text{DL}_{50}$ ) para alevinos de paiche, *Arapaima gigas*.

COMPUESTOS	CONCENTRACIONES (ppm)				
Amonio	18.75	37.5	75	150	300
Nitrito	18.75	37.5	75	150	300

Cabe mencionar que por cada tratamiento se realizaron tres (3) replicas.

### **3.10. Número de peces utilizados.**

En cada prueba se utilizaron siete (7) alevinos de paiche por cada una de las concentraciones del tóxico evaluado, en todas las replicas y también para la prueba control.

Los peces fueron previamente aclimatados en agua reconstituida por lo menos 12 días antes de las pruebas, y no se les alimentó 12 horas antes del inicio de las pruebas. Al momento de la prueba, las peceras fueron cubiertas con una tela y los peces se mantuvieron en oscuridad para evitar el estrés y atenuar la degradación de las sustancias evaluadas. La duración de cada bioensayo fue de 96 horas.

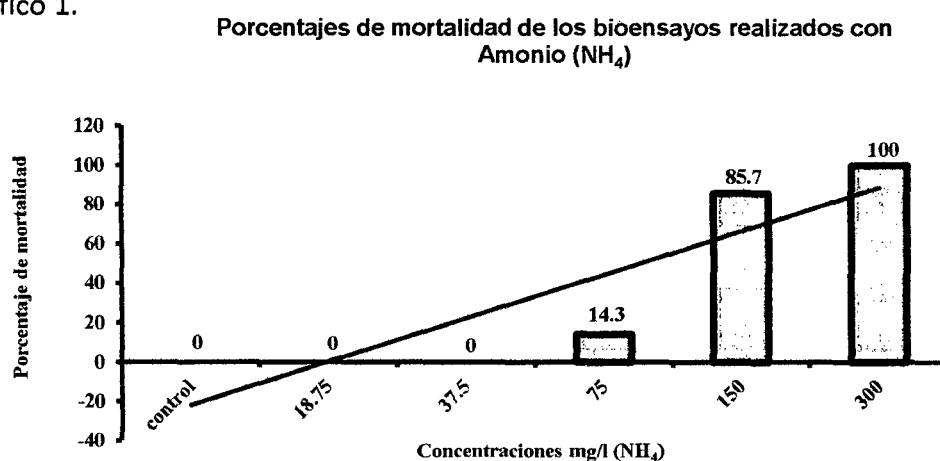
### **3.11. Análisis de datos.**

Las concentraciones letales para el 50% ( $DL_{50}$ ) de la población de alevinos de *Arapaima gigas* y sus respectivos intervalos de confianza al 95% fueron estimados mediante el método de Trimmed Spearman Karber por ser la prueba estadística más apropiada y utilizada para este tipo de estudios, usando el programa "LC50 Program JS Pear Test".

#### IV. RESULTADOS

##### 4.1. Identificación de la dosis letales media (DL<sub>50</sub>) para el amonio (NH<sub>4</sub>)

Se realizaron tres bioensayos con el amonio (NH<sub>4</sub>) usando un grupo control (agua reconstituida semidura) y cinco concentraciones diferentes (18.75, 37.5, 75, 150, 300 mg/l) que fueron evaluados sobre alevinos de *Arapaima gigas* tras una exposición de 96 h. Los resultados se muestran en porcentajes de mortalidad en la Tabla 6 y el Gráfico 1.



**Grafico 1.** Porcentajes de mortalidad registrados en alevinos de paiche (*Arapaima gigas*) sometidos a cinco dosificaciones de amonio (NH<sub>4</sub>) en bioensayos de 96 horas de duración.

En la Tabla 6 se muestran los resultados de la DL<sub>50</sub>-96 h del amonio (NH<sub>4</sub>), obtenidos mediante el análisis con el método Trimmed Spearman-Kärber:

**Tabla 6.** DL<sub>50</sub>-96 h de amonio (NH<sub>4</sub>), obtenidos para alevinos de paiche (*Arapaima gigas*) mediante el análisis Trimmed Spearman-Kärber.

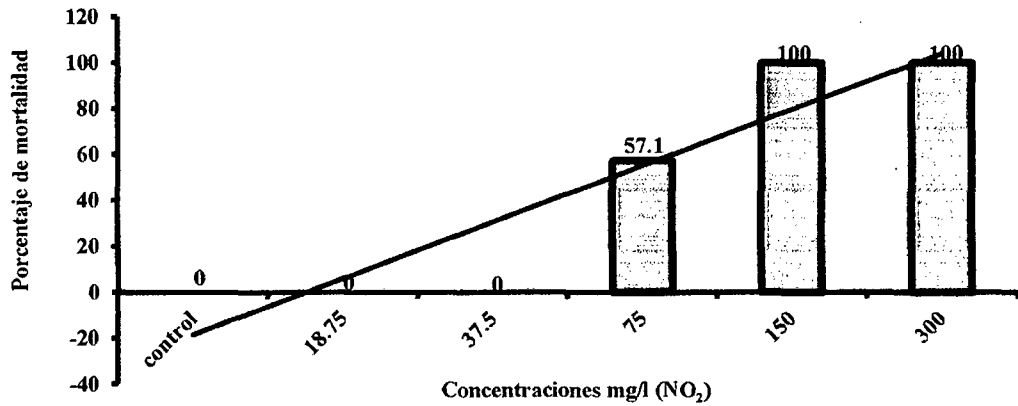
Bioensayos	Límite Inferior	DL <sub>50</sub> -96 h	Límite Superior
1	81.84	106.07 mg/l	137.46
2	79.12	102.22 mg/l	134.78
3	84.50	108.41 mg/l	139.30
Promedio ± Desv.		105.85 ± 4.26	
Est.	81.82	mg/l	137.18
CV (%)		3.12	

La DL<sub>50</sub>-96 h del amonio registrada para los alevinos de *Arapaima gigas* fue de 105.85 ± 4.26 mg/l, con un intervalo de confianza de 95% (81.82 – 137.18) y un coeficiente de variación de 3.12%.

#### 4.2. Identificación de la dosis letales media (DL<sub>50</sub>) para el nitrito (NO<sub>2</sub>)

Se realizaron tres bioensayos con el nitrito (NO<sub>2</sub>), usando un grupo control (agua reconstituida semidura) y cinco concentraciones diferentes (18.75, 37.5, 75, 150, 300 mg/l) que fueron evaluados sobre alevinos de *Arapaima gigas* tras una exposición de 96 h. Los resultados se muestran en porcentajes de mortalidad en el grafico 2 y la Tabla 7.

**Porcentajes de mortalidad de los bioensayos realizados con Nitritos (NO<sub>2</sub>)**



**Gráfico 2.** Porcentajes de mortalidad registrados en alevinos de paiche (*Arapaima gigas*) sometidos a cinco dosificaciones de nitrito (NO<sub>2</sub>) en bioensayos de 96 horas de duración.

**Tabla 7.** DL<sub>50</sub>-96 h de nitritos (NO<sub>2</sub>), obtenidos para alevinos de paiche (*Arapaima gigas*) mediante el análisis de Trimmed Spearman-Kärber.

Bioensayos	Límite Inferior	DL <sub>50</sub> -96 h	Límite Superior
1	55.07	71.38 mg/l	92.51
2	60.02	75.65 mg/l	95.42
3	48.25	63.90 mg/l	83.55
Promedio ± Desv. Est.	54.45	70.31 ± 5.95 mg/l	90.49
CV (%)		5.94	

La DL<sub>50</sub>-96 h de NO<sub>2</sub> para alevinos de *Arapaima gigas* fue de 70.31 ± 5.95 mg/l, con un intervalo de confianza de 95% (54.45 – 90.49) y un coeficiente de variación de 5.94%.



La toxicidad de los compuestos nitrogenados, dependen de la especie, edad y aspectos biológicos de la misma, así como de ciertas condiciones ambientales, que serán discutidos en la siguiente sección.

## V. DISCUSIÓN

Como se ha detallado en secciones anteriores del presente documento, el amonio es un producto de la degradación de las proteínas y representa entre el 60 y el 80% del nitrógeno que excreta un pez (Hasan y Macintosh, 1986). La cantidad de amonio excretado por un pez varía con la cantidad de alimento ofertado y aumenta a medida que se incrementa la tasa de alimentación.

También fue detallado que concentraciones altas de este compuesto puede reducir la tasa de crecimiento, inducir cambios histopatológicos y reducir la capacidad de transporte de oxígeno por la hemoglobina, hasta provocar la muerte del pez. La toxicidad del amonio ha sido intensamente investigada en numerosas especies, siendo los salmónidos los peces más sensibles en comparación con la carpa o el bagre de canal (Richardson, 1991). Los síntomas de la intoxicación aguda por amonio incluyen hiperventilación, hiperexcitabilidad, pérdida del equilibrio, coma y muerte (Twitchen y Eddy, 1994; Moraes et al, 2004).

La toxicidad del amonio puede variar en función de la sensibilidad de la especie, etapa de desarrollo, la duración de la exposición y las condiciones ambientales. La  $DL_{50}$  (96 horas) para el promedio de  $NH_4$  teleósteos de agua dulce en general es de 0.82 mg/l  $NH_3$  (Person-Le Ruyet et al, 1995). En el caso específico del paiche, sorprendió sobremanera la alta tolerancia de este pez a las altas concentraciones evaluadas en el agua. La dosis letal media calculada para los alevinos de *Arapaima gigas* en el presente estudio (105.85 mg/l) coloca al paiche entre los peces con mayor resistencia a este

tóxico en el mundo, lo cual de por sí ya es una gran ventaja comparativa con respecto a otros peces amazónicos.

El resultado obtenido en este trabajo está totalmente fuera del rango de toxicidad sugerida por Abdalla y MacNabb (1998), quienes afirman que la concentración letal media de amonio no ionizado para peces varía entre 0.32 y 3.1 mg/l en exposición aguda de 96 horas. Entretanto, el tamaño de los animales también tiene influencia en el nivel de toxicidad, puesto que peces pequeños reciben una mayor dosis por unidad de peso, siendo, más susceptibles a la toxicidad del amonio, lo que explica la diferencia entre los resultados de diversos autores previos al presente trabajo. Por ejemplo, Cavero et al. (2004) expusieron juveniles de *Arapaima gigas* a 2.0 mg/l de amonio no ionizado por 24 horas, y no observaron ningún efecto en su desempeño, atribuyendo esta alta resistencia al hecho de que el paiche tiene la capacidad de respirar oxígeno atmosférico.

Existen registros de peces que toleran altos niveles de amonio en el agua como *Opsanus beta*, *Porichthys notatus*, todos de la familia *Batrachoididae* (Wang y Walsh, 2000). Esta tolerancia puede estar asociada a diversas adaptaciones o estrategias desarrolladas por los peces a lo largo de su evolución, como el hecho de reducir al mínimo la acción del amonio produciendo compuestos derivados como la urea en *Clarias batrachus* (Saha et al, 2002), o glutamina, en *Oncorhynchus mykiss* (Wicks y Randall, 2002). A juzgar por los resultados del presente estudio, es muy posible que el paiche haya desarrollado algunas adaptaciones evolutivas que le permiten tolerar las

altas concentraciones de compuestos nitrogenados. *Arapaima gigas*, de hábito alimenticio carnívoro, es considerado un pez rústico (Imbiriba, 2001) por su respiración aérea, hecho que le permite tolerar aguas con bajos tenores de oxígeno disuelto, en tanto, su alta tolerancia al amonio no era aún conocida, aunque existían leves sospechas mencionadas por Cavero et al. (2004).

El amonio es producido en el hígado y es excretado por difusión bajo la forma de amoniaco ( $\text{NH}_3$ ) a través de las branquias. Niveles elevados de amonio inducen a un notable incremento de la ventilación branquial posiblemente por estimulación de los quimiorreceptores del oxígeno. En aguas ácidas y con altos niveles de  $\text{CO}_2$  la excreción del amonio se intensifica, constituyendo este mecanismo una especie de detoxificación ambiental del amonio. Los peces tienen enormes dificultades en excretar el amonio en aguas alcalinas o con altas concentraciones de amonio ambiental o cuando se encuentran fuera del agua (Randall y Ip, 2006).

Por ejemplo, *Periphalmodon schlosseri*, es un pez de respiración aérea (similar al paiche), capaz de activar el transporte del ión amonio ( $\text{NH}_4$ ), manteniendo bajos sus niveles internos de amonio no ionizado, también conocido como amoniaco ( $\text{NH}_3$ ). Para prevenir el reingreso de  $\text{NH}_3$  hacia las branquias, este pez puede aumentar la excreción de ácidos a través de las branquias y reducir la permeabilidad de la membrana al  $\text{NH}_3$  mediante la modificación de la composición de colesterol y fosfolípidos de su piel (Ip et al, 2004; Randall y Ip, 2006). Otras especies de peces de respiración aérea pueden excretar el amonio hacia el exterior usando un mecanismo de volatilización del amonio

no ionizado ( $\text{NH}_3$ ), una adaptación del comportamiento como fisiológica que podría estar sucediendo en *Arapaima gigas* si consideramos que esta especie adquiere casi el 80% del oxígeno necesario para su supervivencia de la atmósfera. Otros peces transforman el amonio total en glutamina o urea (Ip et al, 2004). Estudios futuros en estas especies pueden brindar mayores pistas sobre la naturaleza de la toxicidad del amonio ionizado (amoníaco) en general.

Como regla general, los peces dulceacuícolas son organismos hiperosmóticos a su medio ambiente y por tanto, necesitan una captación activa de iones a través de las branquias para compensar los iones perdidos con la orina y el flujo de salida pasiva a través de las branquias. Los problemas con el nitrito derivan del hecho de que el  $\text{NO}_2$  tiene una afinidad por el mecanismo de absorción de cloruro en las células branquiales (Jensen, 2003).

Al igual que lo observado en los bioensayos con el amonio, en el caso específico del paiche, éste pez soporta altas concentraciones de nitritos en el agua. La dosis letal media calculada para los alevinos de *Arapaima gigas* en el presente estudio (70.31 mg/l) coloca nuevamente al paiche entre uno de los peces con mayor resistencia a este tóxico, lo cual sumado a la alta tolerancia al amonio significa una enorme ventaja comparativa con respecto a otros peces amazónicos.

Según Williams y Eddy (1986), los peces con alta tasa de absorción branquial de cloruro (por ejemplo, la trucha arco iris y las percas) son organismos más sensibles a la presencia de nitritos que aquellas especies con baja tasa de respuesta (Ej. anguila, la

carpa y la tenca). En el caso del paiche, el ser un pez propio de ambientes lénticos, a veces altamente eutrofizados, y poseer respiración casi exclusivamente aérea, lo convierte en una especie menos sensible a la acción tóxica del amonio y de los nitritos. La sangre parece ser el principal objetivo de actuación del nitrito. Las concentraciones de nitrito en el plasma sanguíneo pueden ser más hasta 60 veces más altas que las concentraciones en el medio circundante. Desde el plasma sanguíneo, se difunde a las células rojas de la sangre, donde se oxida. El hierro de la hemoglobina al estado de oxidación se llama metahemoglobina o ferrihemoglobina (Kiese, 1974), la capacidad de carga total, le da un color marrón a la sangre, que tiene un espectro óptico con un máximo de absorción alrededor de 635 nm. Así que un síntoma visible de los niveles de metahemoglobina elevada es el color marrón de sangre y agallas.

Este fenómeno del color marrón de la sangre fue observado en Tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*) tan pronto como los niveles de metahemoglobina alcanzó alrededor del 20% de la hemoglobina total (Svobodova et al, 2005).

No existen estudios que hayan reportado la presencia de metahemoglobina en el paiche y hubiera sido muy interesante realizar un estudio de las concentraciones de nitritos en la sangre, sin embargo no descartamos realizar estas pruebas en el corto plazo.

Los resultados del presente trabajo revelaron que *Arapaima gigas* es un organismo que tolera altos niveles de compuestos nitrogenados en el agua, característica que sumada a la comodidad, rusticidad, resistencia a manipuleo y respiración casi exclusivamente

aérea (Chu-Koo et al., 2007), le otorga más ventajas comparativas a esta especie con respecto a varios peces actualmente cultivados en el mundo, y que sin duda facilitará su cultivo a altas densidades. De hecho, existen estudios preliminares sobre el rendimiento de *Arapaima gigas* a altas densidades, tanto en jaulas como en tanques-red (Cavero et al, 2003).

Algunos autores sostienen que el paiche debido a su rusticidad posee una resistencia natural a ciertos compuestos químicos como el CO<sub>2</sub> y desechos nitrogenados (Sanguino et al, 2007), hasta la fecha se desconocían los niveles letales de amonios y nitritos para esta especie amazónica, por lo que el presente trabajo contribuye significativamente al incremento del conocimiento de esta especie íctica emblemática de la Amazonía peruana.

## VI. CONCLUSIONES

1. El paiche (*Arapaima gigas*) en la fase de alevino presenta una alta tolerancia a los compuestos nitrogenados de desecho, lo que convierte a esta especie en un pez reconocidamente rústico e ideal para cultivos intensivos y súper-intensivos.
2. La  $DL_{50-96}$  h del amonio ( $NH_4$ ) sobre alevinos de paiche *Arapaima gigas* estimado por el método Trimmed Spearman-Kärber fue de  $105.85 \pm 4.26$  mg/l, con un intervalo de confianza de 95% (81.82 – 137.18) y un coeficiente de variación de 3.12%. Lo que le convierte al paiche en una de las especies más resistentes a este compuesto nitrogenado y que a su vez es muy favorable.
3. La  $DL_{50-96}$  h del nitrito ( $NO_2$ ) sobre alevinos de paiche *Arapaima gigas* estimado por el método Trimmed Spearman-Kärber fue de  $70.31 \pm 5.95$  mg/l, con un intervalo de confianza de 95% (54.45 – 90.49) y un coeficiente de variación de 5.94%. Al igual que en el caso del amonio, el paiche también es altamente resistente a este compuesto nitrogenado, interpretando estos resultados como favorables.



## **VII. RECOMENDACIONES**

1. Evaluar la tolerancia a los compuestos nitrogenados de ejemplares de paiche de varias edades.
2. Determinar los mecanismos fisiológicos que le han dado a este pez, la característica de alta tolerancia a los compuestos nitrogenados.
3. Diagnosticar las concentraciones de sustancias nitrogenadas, a las que se manifiesta la metahemoglobina en el paiche.
4. Evaluar la tolerancia a los compuestos nitrogenados como el amonio y el nitrito, de otras especies de interés para la acuicultura amazónica peruana.

## VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdalla AA, Macnabb CD. Acute and sublethal growth effects of un-ionized ammonia to Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. [monografía en internet] [acceso el 8 junio 2011]. Disponible en: <http://www.hep.pac.dfo-o.gc.ca/congress1998/nitrogen>.
- Avnimelech Y, Weber B, Hopher B, Milstein A, Zorn M. Studies in circulated fish ponds: organic matter recycling and nitrogen transformation. *Aquaculture and Fisheries Management*. 1986; 17: 231-242.
- Baldisseroto B. *Fisiologia de Peixes Aplicada à Piscicultura*. Editorial Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria. 2002; RS. 212p.
- Barthem R. Perspectivas para el manejo de los bagres migradores de la Amazonía. *Boletín Científico INPA*. 1996; 4: 19-28.
- Bo L, Fan Q, Zhang L, Fang W, Yang K, Sun C et al. Acute toxic effects of ammonia and nitrite on yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*) at different dissolved oxygen levels. *Freshwater Fisheries*. 2009; 39(3):567-579.
- Boudreaux PJ. Acute ammonia toxicity and chloride inhibition of nitrite uptake in non-teleost Actinopterygian fishes. Master of Sciences Thesis. Nicholls State University. Thibodaux, Louisiana, USA. 2006; 39p.

- Bowser PR, Falls WW, Van Zandt J, Collier N, Phillips JD. Methaemoglobinaemia in channel catfish: methods of prevention. *Progressive Fish-Culturist*. 1983; 45:154–158.
- Cavero BAS, Pereira-Filho M, Roubach R, Ituassu DR, Gandra AL, Crescencio R. Biomassa sustentável de juvenis de pirarucu em tanques-rede de pequeno volume. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*. 2003; 38(6):723-728.
- Cavero BAS, Pereira-Filho M, Bordinhori AM. Tolerância de juvenis de pirarucu ao aumento da concentração de amônia em ambiente confinado. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*. 2004; 39(5):513-516.
- Chu-Koo F, Alcántara BF. De la selva su acuicultura. Sobre los avances en acuicultura en la Amazonía peruana y las oportunidades de inversión. *Perú Económico*. 2007; 30(1):11-12.
- Chu-Koo F, Alcantara BF. Cultivo de paiche doméstico. Perspectivas económicas. *Pesca Responsable*. 2009; 57 (marzo-abril): 32-33.
- Chu-Koo FW, Valdivieso MG, Tello S, Rebaza MA, Rebaza CA, Deza ST, Alcántara BF. Cría de paiche en jaulas flotantes. Análisis económico. *Infopesca Internacional*. 2007; 30(2):28-31.
- Hasan MR, Macintosh DJ. Acute toxicity of ammonia to common carp fry. *Aquaculture*. 1986; 54:97-107.
- Imbiriba EP. Potencial da criação de pirarucu, *Arapaima gigas*, em cativeiro. *Acta Amazonica*. 2001; 7: 299-316.

- Ip YK, Chew SF, Wilson JM, Randall DJ. Defences against ammonia toxicity in tropical air-breathing fishes exposed to high concentrations of environmental ammonia: a review. *J Comp Physiol B*. 2004; 174:565-575.
- Jensen FB. Nitrite disrupts multiple physiological functions in aquatic animals. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A*. 2003; 135: 9-24.
- Kamstra A, Span JA, Van Weerd JH. The acute toxicity and sublethal effects of nitrite on growth and feed utilization of European eel, *Anguilla anguilla* (L.). *Aquaculture Research*. 1996; 27:903-911.
- Kiese M. *Methaemoglobinaemia: A Comprehensive Treatise*. CRD Press, Cleveland, OH. 1974. 108-109.
- Lewis WM, Morris DP. Toxicity of nitrite to fish: A Review. *Transactions of the American Fisheries Society*. 1986; 115: 183-195.
- Lima R L, Braun N, Kochhann D, Lazzari R, Neto JR, Moraes BS et al. Survival, growth and metabolic parameters of silver catfish, *Rhamdia quelen*, juveniles exposed to different waterborne nitrite levels. *Neotropical Ichthyology*. 2011; 9(1):147-152.
- Love MR. *The chemical biology of fishes. Vol. II, Advances 1968-1977 with a supplementary key to the chemical literature* Academia Press, New York. 1980; 943p.
- Lovell, C. *Nutrition and Feeding of Fish*. Van Nostrand Reinhold Publishers, New York, USA. 1989; 256 p.

- Maetz, J. Fish gills: mechanism of salt transfer in fresh water and sea water. Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B Biological Sciences. 1971; 262:209–249.
- Margiocco C, Arillo A, Mensi P, Shenone G. Nitrite bioaccumulation in *Salmo gairdneri* Rich. and haematological consequences. Aquatic Toxicology. 1983; 3: 261–270.
- Martinez CBR, Cólus IM. Biomarcadores em peixes neotropicais para o monitoramento da poluição aquática na bacia do rio Tibagi. In: Medri, M.E.; Bianchini, E.; Shibatta, O.A.; Pimenta, J. A. (eds.) A Bacia do Rio Tibagi. Londrina. 2002; PR. p.551-577.
- Moraes G, Polez VL, Iwama GK. Biochemical responses of two Erythrinidae fish to environmental ammonia. Brazilian Journal of Biology. 2004; 64(1):95-102.
- Person-Le Ruyet J, Chartois H, Quemener L. Comparative acute ammonia toxicity in marine fish and plasma ammonia response. Aquaculture. 1995; 136:181-194.
- Person-Le Ruyet J, Boeuf G, Zambonino Infante J, Helgason S, Le Roux A. Short-term physiological changes in turbot and seabream juveniles exposed to exogenous ammonia. Comparative Biochemistry and Physiology. 1998; 119: 511-518.
- Pitter P. Hydrochemistry (in Czech). Editor VSCHT, Prague. 1999; 568p.
- Randall DJ, Ip YK. Ammonia as a respiratory gas in water and airbreathing fishes. Respiratory Physiology and Neurobiology. 2006; 154(1-2):216- 25.
- Randall DJ, Tsui TKN. Ammonia toxicity in fish. Marine Pollution Bulletin. 2002; 45:17-23.

- Rebaza M, Alcántara F, Valdivieso M. Manual de piscicultura del paiche *Arapaima gigas*. Secretaria Pro Tempore del Tratado de Cooperación Amazónica (TCA) – IIAP – FAO. 1999; 35p.
- Richardson J. Acute toxicity of ammonia to inanga (*Galaxias maculatus*). New Zealand Marine and Freshwater Research. 1991; 25:327-330.
- Russo RC, Thurston RV. Toxicity of ammonia, nitrite and nitrate to fishes. In: Brune D.E., Tomasso J.R. (eds): Aquaculture and Water Quality. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana. 1991; 58 – 89.
- Saha N, Kharbuli ZY, Arundhati B, Goswami C, Häussinger D. Effect of alkalinity (pH 10) on ureogenesis in the air-breathing walking catfish, *Clarias batrachus*. Comparative Biochemistry and Physiology Part A. 2002; 132:353-364.
- Sanguino OW, Lucero RSD, Ceballos LR, López MJN. Potencial acuícola del pirarucú (*Arapaima gigas*) en la cuenca amazónica. Revista Electrónica de Ingeniería en Producción Acuícola. 2007; 2(2):75-83.
- Svobodova Z, Kolarova J. A review of the diseases and contaminant related mortalities of Tenca (*Tinca tinca* L.). Veterinarni Medicina. 2004; 49:19–34.
- Svobodova Z, Machova J, Poleszczuk G, Huda J, Hamackova J, Kroupova H. Nitrite poisoning of fish in aquaculture facilities with water-recirculating systems: three case studies. Acta Veterinaria Brno. 2005; 74:129–137.

- Tomasso JR, Simco BA, Davis KB. Chloride inhibition of nitrite-induced methaemoglobinaemia in Channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*. 1979; 36:1141–1144.
- Twitchen ID, Eddy FB. Sublethal effects of ammonia on freshwater fish. In: Müller, R.; Lloyd, R. (eds.). *Sublethal and chronic effects of pollutants on freshwater fish*. Blackwell Scientific Publications, Fishing News Books, London, UK. 1994; p.135-147.
- Wang Y, Walsh PJ. High ammonia tolerance in fishes of the family Batrachoididae (Toadfish and Midshipmen). *Aquatic Toxicology*. 2000; 50:205- 219.
- Wicks BJ, Randall DJ. The effect of sub-lethal ammonia exposure on fed and unfed rainbow trout: the role of glutamine in regulation ammonia. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A*. 2002; 132:275- 285.
- Williams EM, Eddy FB. Chloride uptake in freshwater teleosts and its relationship to nitrite uptake and toxicity. *Journal of Comparative Physiology Part B*. 1986; 156:867–872.