

METABOLISME ANAERÒBIC EN PEIXOS SOTMESOS A CONTAMINACIÓ PER METALLS PESANTS

LLUÍS TORT

*Departament de Fisiologia Animal. Facultat de Ciències.
Universitat Autònoma de Barcelona.*

Rebut 12 juny 1984

SUMMARY

Heavy metals have been shown to produce a wide range of effects on fishes and, as a consequence, several mechanisms are developed to compensate such affects. At the metabolic level heavy metal toxicity produces tissue hypoxia, enzymatic disturbance and energy defficiency. Fish responses involve not only the way in which ATP is produced, but also the way in wich ATP is used, as the motor activity or energy expenditure. Aerobic metabolism response involves mostly higher rates of metabolic turnover, enzymatic activity or mitochondrial mass. In anaerobic metabolism strong increases of lactate concentration as well as other anaerobic metabolites as alanine, succinate or ethanol have been described, and alternative anaerobic pathways have been postulated to explain the accumulation of such metabolites. However, as long-term treatments show normal metabolite levels it is suggested that anaerobic metabolism would play a role as a short-term energy source, immediately after metal action, while longterm adaptations in aerobic pathway or in physiological mechanisms take place.

INTRODUCCIÓ

A partir de la Revolució Industrial i l'increment de població —sobretot en el present segle— i dels processos de mobilització i transformació de les matèries primeres en productes manufacturats, s'ha originat una variació cada vegada més important del medi que ens envolta. Així, el problema de la pol·lució i la contaminació, abans marginals,

s'ha transformat en objecte de la preocupació, no tan sols científica, sinó també dels poders públics i de la població en general, tant pel que afecta als recursos naturals com als efectes i repercussions en les cadenes tròfiques i la salut pública.

De totes maneres, són els organismes integrants del medi contaminat els que pateixen, en primera instància, les conseqüències de la contaminació. En el cas dels peixos, la gran

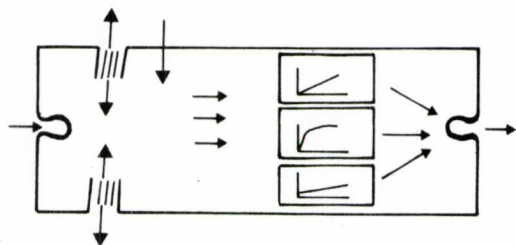


Fig. 1. Diagrama que representa les possibles entrades del metall a l'organisme (via digestiva, respiratòria o cutània), transport via sang cap als diferents òrgans (amb diferents taxes d'acumulació i reciclatge) i excreció.

quantitat d'estudis publicats darrerament sobre el tema, demostra que la contaminació afecta de manera important molts nivells de l'individu. Particularment els metalls pesants són responsables d'efectes des de l'àmbit molecular fins al fisiològic, ecològic o de comportament. (Per a revisions recents del tema veure: VERNBERG et al. 1977, BRYAN 1979, COOMBS 1980.)

RESPOSTES FISIOLÒGIQUES A LA CONTAMINACIÓ PER METALLS

Els metalls que estan en el medi poden entrar als organismes bàsicament per tres rutes: cutània, tracte alimentari i vies respiratòries. La importància de cadascuna d'elles depèn de l'espècie en qüestió. En molts peixos la via més important sol ser la respiratòria. Efectivament, el pas continu de l'aigua a través de les brànquies implicarà un procés creixent de contaminació quan aquestes aigües estiguin pol·lucionades. No obstant això, en certs metalls i certes espècies la via digestiva és la més important. Un cop el metall ha entrat, l'organisme pot adoptar diferents estratègies per fer front a la situació. Així, hi ha espècies que acumulen el metall, mentre que d'altres el mantenen en un nivell molt baix en l'organisme (Figura 1). Els primers, utilitzarien una sèrie de mecanismes compensatoris de les possibles repercuissions del metall i també sistemes d'immobilització en estructures ade-

quades. En els segons, bàsicament es posen en marxa els mecanismes d'impediment de l'entrada i sobretot els d'excreció. De totes maneres, i malgrat el comportament general de l'individu, els diversos òrgans poden seguir, al seu torn, diferents estratègies.

A nivell fisiològic els peixos responen a la contaminació per metalls pesants contrarestant els efectes produïts. Així, la ventilació resulta incrementada tant en volum com en freqüència, per a compensar la manca d'oxigen produïda per disfuncions branquials; es registra bradicàrdia i increment de volum per batec; es produeixen canvis en l'hematòcrit i l'hemoglobina (SKIDMORE 1970, HUGHES & ADENEY 1977, MAJEWSKI & GILES 1981, HUGHES & TORT 1985). També s'han detectat canvis en l'excreció (WALDICHUK 1979) i, a nivell hormonal, variacions en els corticosteroids (DONALDSON & DAY 1975).

A nivell cel·lular i molecular s'han trobat també diferents tipus de resposta: formació de cèl·lules del clorur en brànquies amb una funció de control de l'osmolaritat i possible excreció de ions divalents (LAURENT & DUNEL 1980, CRESPO et al. 1981); formació de granulacions intracel·lulars riques en pirofosfats que immobilitzarien el metall (SIMKISS & TAYLOR 1981) i inducció de proteïnes lligadores de metalls o metal·lotioneïnes (dites així pel gran nombre de grups —SH presents en moltes d'elles). Aquestes proteïnes captarien els metalls i els immobilitzarien o metal·litzarien (KITO et al. 1982, FLOS et al. 1983) (veure la Figura 2).

ADAPTACIONS METABÒLIQUES

En aquest nivell les conseqüències dels metalls poden agrupar-se en tres grups: disfuncions en els enzims produïdes per recanvis isomòrfics en indrets de proteïnes que estan normalment lliures o ocupats per altres metalls (COLEMAN 1967); increments de la demanda energètica degut a intervencions superiors de sistemes com l'excretor o bran-

TAULA I
Canvis en metabòlits del múscul de peixos sotmesos a hipòxia durant terminis curts de temps.
Valors en $\mu\text{mols/g}$ teixit

Peix	Lactat	Alanina	Succinat	Autor
CARPA <i>Cyprinus carpio</i>	14-30	4,0-8,9	0,4-0,3	Smith & Heath (1980)
PEIX VERMELL <i>Carassius auratus</i>	1,0-3,5	1,0-1,7	0,3-0,4	Shoubridge & Hochachka (1980)
TRUITA <i>Salmo gairdneri</i>	14-22	4.2-8.0	0.4-0.8	Smith & Heath (1980)
RAJADA <i>Raja clavata</i>	4,3-11	1,5-2,5	1,7-4,1	Hughes & Johnston (1978)
PLANA <i>Platichthys flesus</i>	7,7-15	1,4-2,4	0,2-0,2	Jørgensen & Mustafa (1980)

quial (BRYAN 1979) i generalment també, hipòxia derivada de la interacció del metall amb el sistema respiratori (BURTON et al. 1972, TORT et al. 1982a). En definitiva, es produeix una manca energètica que ha de ser resolta a base d'adaptacions en el metabolisme, no només en el mode de producció de l'ATP sinó també en la utilització d'aquest ATP. Adaptacions d'aquesta mena han estat

detectades en el comportament, transport d'oxigen, metabolisme aeròbic i anaeròbic i també en el metabolisme normal o de manteniment. En aquest sentit els teleostis semblen ser més aptes per a regular la captació d'oxigen dins d'una àmplia gamma de nivells d'oxigen en l'aigua, mentre que els elasmobranquis tindrien menys aptitud. Així, la carpa té una capacitat especial per a l'extracció d'oxigen en condicions de baixos nivells de PO_2 originats per temperatura, metalls o baixa disponibilitat d'oxigen (JONES et al. 1970).

Les adaptacions en l'activitat enzimàtica, malgrat haver estat albirades en casos relacionats amb la manca d'oxigen (GREANY et al. 1980), són més difícils de detectar en relació al tractament amb metalls pesants (JACKIM 1974), precisament perquè alguns dels enzims implicats resulten afectats degut a la seva interacció directa amb el metall. Alguns d'ells tenen també metall en la seva estructura, de manera que en constitueixen un element essencial, però també poden arribar a ser factors de toxicitat o de disfunció en concentracions superiors a les normals.

El metabolisme aeròbic també presenta dificultats a l'hora de caracteritzar les seves adaptacions als metalls. En ser la via normal de producció d'energia, les modificacions

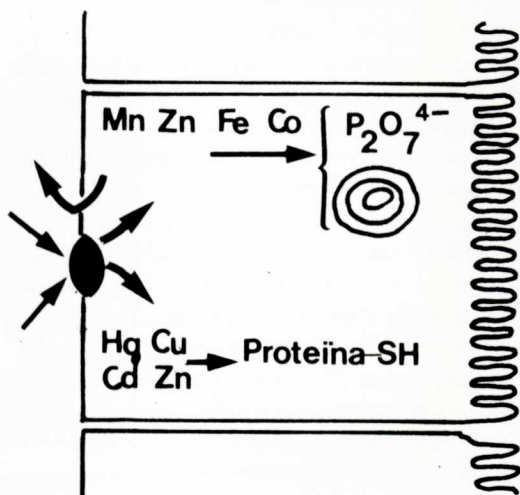


Fig. 2. Sistemes d'immobilització i acumulació de metalls en granulacions o proteïnes intracel·lulars i la distribució més probable en cada sistema segons el metall.

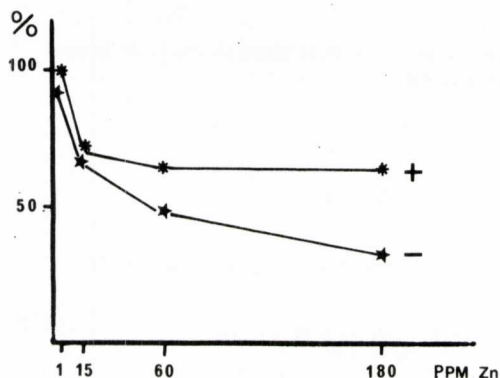


Fig. 3. Taxa de respiració tissular en brànquies de *Scyliorhinus canicula* en presència (+) o absència (—) de membrana en condicions de concentracions creixents de zenc.

descrites consisteixen, en la majoria dels casos, en incrementar el rendiment dels seus processos, en l'impediment de la penetració del metall cap a l'interior de la cèl·lula, o en accions localitzades més a nivell de sistema fisiològic. Per exemple, en algunes espècies s'ha descrit l'acoplament entre els ritmes cardíac i ventilatori per provocar un intercanvi d'oxigen sang/aigua més eficient a les brànquies (HUGHES 1972). També s'ha observat un increment de la capacitat d'extracció d'oxigen mitjançant una pujada en l'afinitat de l'oxigen per l'hemoglobina (RANDALL 1970). Han estat descrites indicacions sobre rendiments superiors observant l'increment del nombre de mitocondris per massa cel·lular i fins i tot de succinat-oxidassa i deshidrogenassa en mitocondris (citats per VAN DEN THILLART 1982). Per altra banda, MELA et al. (1977), trobaren taxes dobles de rendiment o utilització de la cadena respiratòria. Respecte a l'impediment de l'entrada del metall tant a la cèl·lula com a la maquinària energètica, s'han fet relativament pocs experiments, però hi ha indicacions que suggereixen que les membranes podrien jugar un paper protector en front de concentracions altes de metall (TORT et al 1982b) (veure la Figura 3). Finalment, un altre tipus d'adaptació metabòlica consisteix en l'adequació

relativa del consum d'ATP a base de reduir els requeriments, mitjançant la disminució de l'activitat i la baixada de la taxa metabòlica. Això permet a algunes espècies de sobreviure llargues temporades en condicions francament adverses (MATHUR 1967).

EL PAPER DEL METABOLISME ANAERÒBIC

L'estudi de les vies anaeròbiques s'ha incrementat en gran mesura en els darrers anys. En ser una via de subministrament ràpid d'energia, el seu paper consistiria en un mecanisme d'emergència quan hi ha condicions adverses per a les vies aeròbiques. La producció anaeròbica del lactat ho exemplifica ja que la fermentació de glucosa a lactat produeix 2 ATP/mol en pocs segons, mentre que la producció de propionat produiria 6 ADP/mol de glucosa, però en el termini d'uns quants dies (HOCHACHKA 1980). Aquest mateix aspecte es pot veure en les Figures 4 i 5 on es mostren els nivells de metabòlits en brànquies del gat de mar *Scyliorhinus canicula* sotmès a concentracions de zenc (TORT et al. 1984a). A curt termini, la producció de lactat s'incrementa fortament durant les primeres hores —fins a 4 vegades més en alguns casos—, alhora que es redueix significativament el nivell de glicogen i ATP.

Però no només l'oxidació del lactat pot proporcionar energia a través de les vies anaeròbiques. VAN DEN THILLART i KESBEKE (1978) van mesurar la degradació de glicogen i la concentració de lactat, trobant que només prop d'un 50 % era cobert pel lactat. Per tant havien d'existir altres vies. Darrerament han estat descrites algunes vies alternatives en els peixos, les quals juguen un paper important en la contribució energètica. De fet, encara que es pot assumir que els peixos tenen la mateixa maquinària bioquímica que els altres vertebrats, existeixen certes diferències tant en quantitat com en qualitat d'alguns enzims, i algunes rutes metabòliques

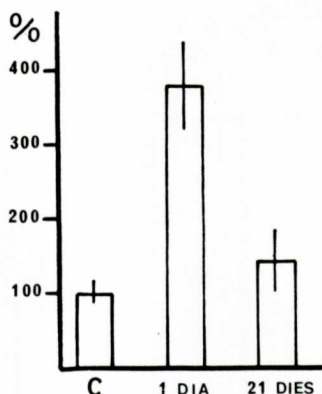


Fig. 4. Nivells de lactat en brànquies de *Scyliorhinus canicula* al cap d'un dia i 21 dies de tractament amb 10 ppm de zenc. Mitjanes referides al control, i error standard.

poden ser diferents. Per exemple: els peixos marins que viuen a grans profunditats tenen molt poca lactat deshidrogenasa (10 U/g) (CHILDRESS & SOMERO 1979), mentre que peixos altament actius com la tonyina tenen una activitat LDH altíssima (HOCHACHKA 1980).

La taula I mostra els canvis i acumulacions de diversos metabòlits de les vies anaeròbiques diferents del lactat. Un primer cas és l'acumulació de succinat produït a partir de l'oxalacetat. Aquesta via té com avantatge el consum de NADH que resulta afavorit en condicions de manca d'oxigen (Figura 6a). Una segona via és la de la formació d'alanina a través d'una aminació oxidativa catalitzada per la glutamat-deshidrogenasa (Figura 6b). La tercera via que s'ha descrit en els peixos és la de formació d'etanol. Aquest tercer procés pot ser de gran importància en aquest grup animal, ja que diversos autors l'han descrit com a quantitativament més important en algunes espècies (SHOUBRIDGE & HOCHACHKA 1980). En aquesta via la conversió lactat-etanol no està acoplada a producció d'ATP, la qual cosa afavoreix en gran mesura la producció d'etanol (Figura 6c).

En qualsevol cas, els estudis realitzats fins al moment semblen indicar que, en la majo-

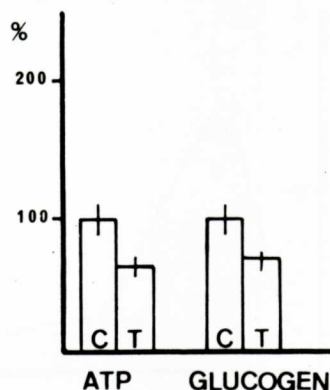


Fig. 5. Nivells relatius d'ATP i glicogen en brànquies de *Scyliorhinus canicula* després de tractament durant 24 hores amb 80 ppm de zenc. (C = control, T = tractat). Mitjana i error standard.

ria d'espècies, la via anaeròbica no seria rendible a llarg termini. (Ja s'ha comentat el rendiment inferior de l'oxidació del lactat). Aleshores, la recuperació dels mecanismes

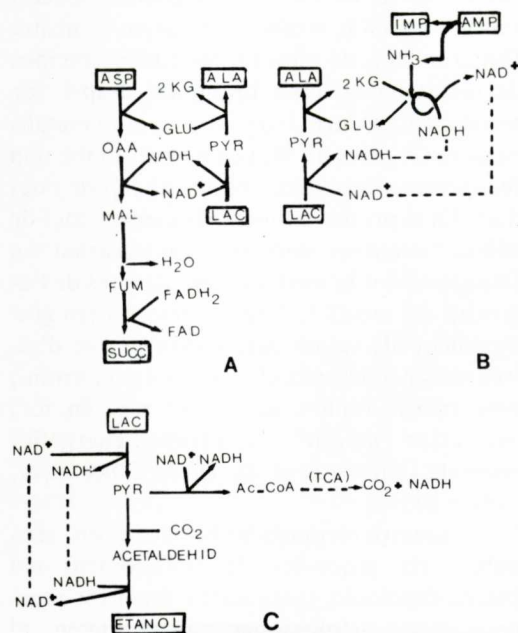


Fig. 6. Vies anaeròbiques acoplades a l'oxidació del lactat. Possible esquema de les reaccions que tindrien lloc (Segons Van den Thillart, 1982). A: Via d'acumulació de succinat, B: Formació d'alanina, C: Acumulació d'etanol.

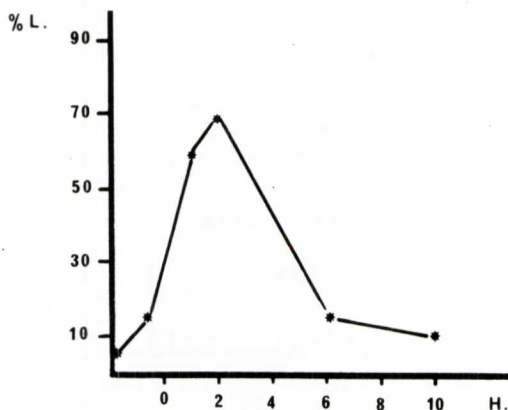


Fig. 7. Concentració relativa de lactat en sang de truites sotmeses a hipòxia severa al llarg del temps d'exposició (L = Lactat, H = Hores). (Segons Heath & Pritchard, 1965).

aeròbics aniria substituint paulatinament els anaeròbics. Així, també, la Figura 7 mostra com es produeix un increment dels nivells de lactat en sang, que després retorna als valors basals en les hores següents. Aquest aspecte ha estat també estudiat en el nostre Departament, en mesurar les concentracions de lactat en el teixit branquial després de tractaments a curt i llarg termini amb metalls pesants (Figures 8 i 9), i en trobar també una recuperació dels valors basals al cap de pocs dies. En el primer moment els mecanismes de subministrament energètic es posarien en funcionament immediatament després de l'agressió del metall i, després, retornarien gradualment als valors basals mentre que d'altres mecanismes més eficients a llarg termini, però menys ràpids, anirien entrant en joc, permetent assolir els nivells energètics normals (DICKSON et al. 1982, TORT et al. 1984 a,b).

En aquesta recuperació hi participen, sens dubte, els processos de restabliment del balanç fisiològic, metabòlic i fins i tot regeneracions morfològiques que permeten, al seu torn, les recuperacions funcionals. HUGHES, PERRY & BROWN (1979) varen observar processos de reparació de danys histològics després de contaminació amb metalls.

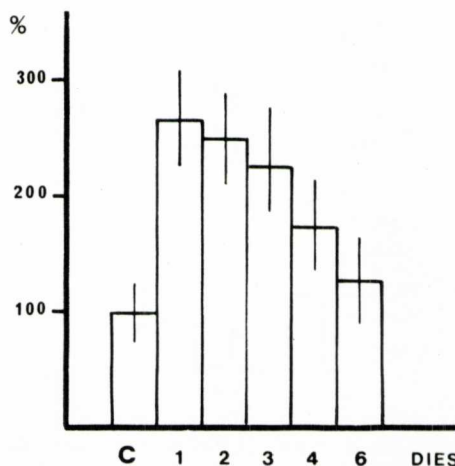


Fig. 8. Nivells relatius de lactat en brànquies de *Scyllorhinus canicula* després de tractament amb 50 ppm de cadmi durant 1, 2, 3, 4 i 6 dies. C = nivells controls.

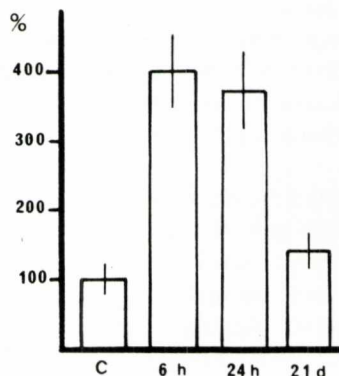


Fig. 9. Nivells relatius de lactat en brànquies de *Scyllorhinus canicula* després de tractament amb 10 ppm de zinc durant 6 hores, 24 hores i 21 dies. C = control. Mitjana i error standard.

Altres processos de recuperació han estat observats en aspectes com el ventilatori i cardíac (HUGHES & TORT 1985). En aquest sentit, alguns autors proposen un model que seguiria un procés com el descrit en la Figura 10 (HEATH, BURTON & SMITH 1980).

El paper del metabolisme anaeròbic consistiria, doncs, en proporcionar, ràpidament, energia a les cèl·lules, especialment just després de l'agressió del metall, mentre es posen en marxa processos adaptatius tant fi-

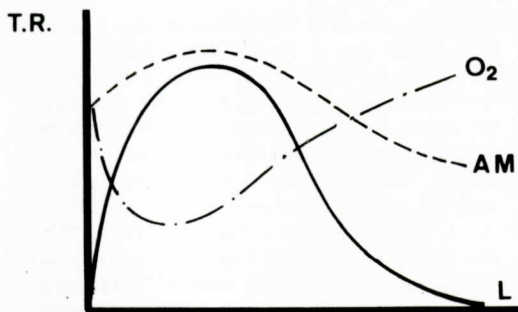


Fig. 10. Model proposat per Heath et al. (1980) per a la recuperació d'algunes variables fisiològiques després de sotmetre els peixos a factors que produeixen manca d'oxigen. TA: Taxa relativa, O₂: Nivell d'oxigen dels teixits, AM: Activitat motora, L: Acumulació de lactat.

siològics com de comportament, que consistirien en un descens dels requeriments degut a la baixa d'activitat, per un cantó, i en la millora de l'eficiència dels mecanismes aeròbics per l'altre. El restabliment de les condicions fisiològiques normals, o el procés d'empitjorament progressiu i mort a mig o llarg termini, dependrà de cada espècie i sobretot del metall i la concentració a la qual es trobi.

RESUM

Els metalls pesants ocasionen una gran diversitat d'efectes sobre els peixos i originen una sèrie de mecanismes que tendeixen a contrarestar aquests efectes. A nivell metabòlic, l'acció tòxica produeix hipòxia tissular, disfuncions enzimàtiques i, en definitiva, deficiència energètica. Les respostes que els peixos desenvolupen impliquen tant les vies de producció energètica com les de l'ús de l'ATP: activitat motora i despesa metabòlica. Les adaptacions en el metabolisme aeròbic es centren especialment en uns majors rendiments en la taxa d'utilització de la cadena respiratòria, concentració enzimàtica i massa mitocondrial. En el metabolisme anaeròbic s'han observat increments importants de la concentració de lactat i darrerament,

també, d'altres metabolits com alanina, succinat o etanol, postulant-se vies alternatives d'acumulació d'aquests productes. A terminis mitjans o llargs de temps els estudis realitzats mostren que els mecanismes esmentats romanen en els seus nivells basals. Donades les característiques de rapidesa de subministrament però baix rendiment, el paper del metabolisme anaeròbic consistiria en proporcionar ATP ràpidament, mentre es produeixen adaptacions a més llarg termini en els mecanismes fisiològics i les vies aeròbiques.

Agraïments

L'autor agraeix l'ajut dels Drs. Jordi Balasch i Rosa Flos del Departament de Fisiologia Animal de la Facultat de Ciències de la Universitat Autònoma de Barcelona així com la col·laboració del Dr. Pere Arté de l'Institut d'Investigacions Pesqueres de Barcelona. Aquest treball ha estat finançat en part per la «Comissió Assesora de Investigación Científica y Técnica».

BIBLIOGRAFIA

- BRYAN G.W. (1979) Bioaccumulation of marine pollutants. *Phil. Trans. R. Soc.*, 286:483-505.
- BURTON D.T., JONES A.H., CAIRNS J.Jr. (1972) Acute zinc toxicity to Rainbow trout: Confirmation that death is related to tissue hypoxia. *J. Fish. Res. Bd. Can.* 29:1.463-1.466.
- CHILDRESS J.J., SOMERO G.N. (1979) Depth-related enzymatic activities in muscle, brain and heart of deep-living pelagic marine teleosts. *Mar. Biol.* 52:273-283.
- COLEMAN J.E. (1967) Metal ion dependent binding of sulphonamide to carbonic anhydrase. *Nature (London)*, 214:193-194.
- COOMBS T.L. (1980) Heavy metal pollutants in the aquatic environment. «Animals and environmental fitness», pp. 283-302. Ed: R. Gilles. Pergamon Press.
- CRESPO S., SORIANO E., SAMPERA C., BALASCH J. (1981) Zinc and copper distribution in the excretory organs of dogfish *Scyliorhinus canicula* and chloride cell response following treatment with zinc sulphate. *Mar. Biol.* 65:117-123.
- DICKSON G.W., GIESY J.P., BRIESE L.A. (1982) The effect of chronic cadmium exposure on phosphoadenylate concentration and adenylate energy charge of

- gills and dorsal muscle tissue of crayfish. *Environ. Toxicol. Chem.* 1:147-156.
- DONALDSON E.M., DYE H.M. (1975) Corticosteroid concentrations in sockeye salmon *Oncorhynchus nerka* exposed to low concentrations of copper. *J. Fish. Res. Bd. Can.* 32:533-539.
- FLOS R., HIDALGO J. (1983) Cd metallothionein in elasmobranchs: its presence in the dogfish. V Conference of E.S.C.P.B. Taormina. Italia.
- GREANY G.S., PLACE A.R., CASHON R.E., SMITH G., POWERS D.A. (1980) Time course changes in enzyme activities and blood respiratory properties of killifish during longterm acclimation to hypoxia. *Physiol. Zool.* 53:136-144.
- HEATH A.G., PRITCHARD A.W. (1965) Effects of severe hypoxia on carbohydrate energy stores and metabolism in two species of freshwater fish. *Physiol. Zool.* 38:325-334.
- HEATH A.G., BURTON D.T., SMITH M.J. (1980) Anaerobic metabolism in fishes: Environmental thresholds and time dependence. *Rev. Can. Biol.* 39:123-128.
- HOCHACHKA P.W. (1980) Living without oxygen. Harvard Univ. Press. Cambridge.
- HUGHES G.M. (1972) The relationship between cardiac and ventilatory rhythms in the dogfish *Scyliorhinus canicula* L. *J. Exp. Biol.* 57:415-434.
- HUGHES G.M., ADENEY R.A. (1977) The effects of zinc on the cardiac and ventilatory rhythms of rainbow trout *Salmo gairdneri* Richardson and their responses to environmental hypoxia *Water Res.* 11:1069-1077.
- HUGHES G.M., JOHNSTON I.A. (1978) Some responses of the electric ray to low ambient oxygen tensions. *J. Exp. Biol.* 73:107-117.
- HUGHES G.M., PERRY S.F., BROWN V.M. (1979) A morphometric study of effects of nickel, chromium and cadmium on the secondary lamellae of rainbow trout gills. *Water Res.* 13:665-679.
- HUGHES G.M., TORT L. (1985) Cardiorespiratory responses of rainbow trout during recovery from zinc treatment. *Environ. Pollut. (A)*, 37:255-266.
- JACKIM E. (1974) Enzyme responses to metals in fish. «Pollution and Physiology of marine organisms». Ed: F.J. Vernberg, W.B. Vernberg, pp. 59-65 Academic Press. New York.
- JONES D.R., RANDALL D.J., JARMAN G.M. (1970) A graphical analysis of oxygen transfer in fish. *Resp. Physiol.* 10:285-298.
- JØRGENSEN J.D., MUSTAFA T. (1980) The effect of hypoxia on carbohydrate metabolism in flounder *Platichthys flesus*. Utilisation of glycogen and accumulation of glycolytic endproducts in various tissues. *Comp. Biochem. Physiol.* 67:243-248.
- KITO H., TAZAWA T., SATO T., ISHIKAWA T. (1982) Formation of metallothionein in fish. *Comp. Biochem. Physiol.* 73:129-134.
- LAURENT P., DUNEL S. (1980) Morphology of gill epithelia in fish. *Am. J. Physiol.* 238:147-159.
- MAJEWSKI H.S., GILES M.A. (1981) Cardiovascular-respiratory responses of rainbow trout *Salmo gairdneri* during chronic exposure to sublethal concentrations of cadmium *Water Res.*, 15:1211-1217.
- MATHUR G.B. (1967) Anaerobic respiration in a cyprioid fish *Rasbora daniconius*. *Nature* 214: 318-319.
- MELA L., GOODWIN C.W., MILLER L.D., (1977) In vivo adaptation of O₂ utilisation to O₂ availability: Comparison of adult and newborn mitochondria. «Oxygen and Physiological function», pp. 283-291. Ed: F. Jobsis. P.I.L. Dallas.
- RANDALL D.J. (1970) Gas exchange in fish. «Fish Physiology» Ed: W.S. Hoar, D.J. Randall. vol. VI:253-287. Academic Press New York.
- SHOUBRIDGE E.A., HOCHACHKA P.W. (1980) Ethanol: Novel endproduct of vertebrate anaerobic metabolism. *Science*, 209:308-309.
- SIMKISS K., TAYLOR M. (1981) Cellular mechanisms of metal ion detoxification and some new indexes of pollution. *Aquat. Toxicol.* 1:279-290.
- SKIDMORE J.F. (1970) Respiration and osmoregulation in rainbow trout with gills damaged by zinc sulphate. *J. Exp. Biol.* 52: 481-494.
- SMITH M., HEATH A.G. (1980) Responses to acute anoxia and prolonged hypoxia by rainbow trout and mirror cap red and white muscle: Use of conventional and modified metabolic pathways. *Comp. Biochem. Physiol.* 66:267-272.
- TORT L., CRESPO S., BALASCH J. (1982)a. Oxygen consumption of the dogfish gill tissue after zinc treatment. *Comp. Biochem. Physiol.* 72:145-148.
- TORT L., FLOS R., BALASCH J., (1982)b. Oxygen uptake by dogfish gill tissue after several «in vitro» zinc treatments. *Rev. Esp. Fisiol.* 38:339-344.
- TORT L., FLOS R., BALASCH J. (1984)a. Metabolic levels in dogfish gill tissue after zinc treatments. *Rev. Esp. Fisiol.* 40:149-152
- TORT L., HIDALGO J., TORRES P. (1984)b. Short term cadmium effects on gill tissue metabolism. *Mar. Pollut. Bull.* 15 (12):448-450.
- VAN DEN THILLART G., KESBEKE F. (1978) Anaerobic production of carbon dioxide and ammonia by goldfish *Carassius auratus*. *Comp. Biochem. Physiol.* 59:393-400.
- VAN DEN THILLART G. (1982) Adaptations of fish energy metabolism to hypoxia and anoxia. *Mol. Physiol.* 2:49-61.
- VERNBERG Y.W., PALABRESE A., THURBERG F.P., VERNBERG W.B. (1977) Physiological responses of marine biota to pollutants. Academic Press. New York.
- WALDICHUK M. (1979) The assessment of sublethal effects of pollutants in the sea. *Royal Soc. London eds.*, pp. 399-422.