

Relación peso-longitud en larvas de la Rana de Junín *Batrachophrynus macrostomus* Peters 1873 (Anura: Leptodactylidae) para su uso en ecotoxicología en condiciones de zocriadero

Relationship weight-length in Junin Giant frog tadpoles *Batrachophrynus macrostomus* Peters, 1873 (Anura: Leptodactylidae) for its use in ecotoxicology in zoo breeding place conditions

Galia Manyari^{1,2} & José Iannacone¹

¹ Laboratorio de Ecofisiología Animal. Facultad de Ciencias Naturales y Matemática. Universidad Nacional Federico Villarreal. Correo-electrónico: joseiannacone@hotmail.com

² Dirección Regional de Pesquería- Zocriadero- Centro Experimental Ranícola "La Huaycha" (CERLH)- Junín. Correo-electrónico: galianm83@latinmail.com

RESUMEN

Se realizó una evaluación para determinar la relación de crecimiento: peso (Wt) (en g) y longitud total (Lt) (en cm) de 150 formas larvianas de *Batrachophrynus macrostomus* Peters de los estadios 26 y 27 en la escala propuesta por Gosner con el fin de tener una cohorte de organismos homogénea para su empleo en ecotoxicología. Los ensayos se llevaron a cabo en el Laboratorio de la Dirección Regional de Pesquería- Centro Experimental Ranícola La Huaycha (CERLH)- Junín, Perú. Se llevó a cabo la determinación de cinco ecuaciones de regresión (lineal, logarítmica, cuadrática, cúbica y exponencial) para relacionar Wt y Lt, para el total de renacuajos evaluados y para cada uno de los tres metales pesados (cadmio, mercurio y plomo) separadamente. En todos los casos las ecuaciones de regresión obtenidas fueron estadísticamente significativas y consistentes. La ecuación exponencial resultante fue $Wt = 0,45 Lt^{0,65}$. La linearización de esa relación $Wt = -0,10 + 0,87Lt$ verificó una buena adherencia de los puntos empíricos a la recta planteada, con un coeficiente de determinación $r^2 = 0,69$. El patrón de crecimiento en este estadio larvario fue alométrico negativo. Tampoco se encontraron diferencias en los promedios de Wt y Lt entre los especímenes empleados en los ensayos ecotoxicológicos con los tres metales pesados. Finalmente el patrón de relación obtenido entre Wt y Lt de larvas de *B. macrostomus* debido a su homogeneidad, permite su adecuado empleo en ecotoxicología.

Palabras claves: anura, *Batrachophrynus*, crecimiento, ecotoxicología, metal pesado, rana de junín, renacuajos, zocriadero.

INTRODUCCIÓN

Los anfibios son un grupo de vertebrados muy exitosos, que han existido en la tierra por cerca de 365 millones de años. Sin embargo, en la actualidad se observa que los anfibios modernos estén sufriendo la mayor declinación global de su historia, teniéndose entre las principales causas: la precipitación ácida, la radiación ultravioleta, las enfermedades epidémicas, los contaminantes químicos, la fragmentación del hábitat, etc. (Blauenstein *et al.*, 1994; Netting, 2000; Green *et al.*, 2001).

El Perú, se cuenta entre los doce países megadiversos de la Tierra (McNeely *et al.*, 1990). Rodríguez *et al.* (1993) han registrado para el Perú 297 especies de anuros, que forman parte de esta diversidad de vertebrados. Una de estas especies, es la Rana Gigante de Junín *Batrachophrynus macrostomus* Peters, 1873 (Anura: Leptodactylidae), nativa de la ecorregión Puna, de la zona alto andina del Perú y característica del Lago Junín. Según la legislación vigente Peruana esta especie de fauna silvestre está considerada en vías de extinción. Este anuro constituye una de las fuentes proteicas animales que dispone el poblador que habita a más de los 3 000 msnm. Este anfibio netamente acuático, presenta desde las últimas décadas un proceso de disminución de sus poblaciones, debido a la amenaza de sus hábitats por la contaminación por los relaves mineros y a la extracción irracional para su comercialización en los restaurantes de las ciudades de los departamentos de Junín y Lima (Iannacone & Manyari, 2003).

Batrachophrynus macrostomus es una especie de fauna silvestre promisoría en el Perú, pues su carne presenta un alto contenido proteico y vitamínico. Además desde el punto de vista etnobiológico y bromatológico se le atribuyen propiedades curativas y afrodisiacas (Chaves, 1991).

Los metales pesados como el cadmio, mercurio y plomo producen efectos deletéreos en las aguas naturales (Iannacone & Alvaríño, 1999; Iannacone & Dale, 1999; Iannacone *et al.*, 2000; Fernández & Beiras, 2001).

Se ha empezado a investigar el efecto en bioensayos ecotoxicológico de diferentes sustancias químicas, entre ellas los metales pesados sobre algunas especies de anuros, principalmente en la etapa larval (Ferrari *et al.*, 1997; Natale *et al.*, 2000; Demichelis *et al.*, 2001; Peakall, 2001; Vogiatzis & Loumbourdis, 2001; Tavera-Mendoza *et al.*, 2002; Iannacone & Manyari, 2003).

El grado de repetibilidad, precisión o variabilidad de las pruebas

ecotoxicológicas es un criterio importante para la selección de un bioensayo y evaluar tóxicos de referencia y muestras ambientales (Iannacone *et al.*, 2003; Iannacone & Alvaríño, 2004).

Por lo tanto, el objetivo específico planteado en la presente investigación fue determinar la relación de crecimiento peso (Wt) (en g) y longitud total (Lt) (en cm) del renacuajo *B. macrostomus* del estadio 26 y 27 como un criterio de repetibilidad bajo la exposición de tres metales pesados (mercurio, cadmio y plomo) para su empleo en ecotoxicología en condiciones de zocriadero.

MATERIALES Y MÉTODOS

Rana de Junín

Los Renacuajos de primer estadio de *B. macrostomus* se obtuvieron de las pozas y artesas del Centro Experimental Ranícola ("Zocriadero") "La Huaycha" (CERLH), ubicado en el Distrito de Orcotuna, Provincia de Concepción, Departamento de Junín (11°30' y 12° 05' LS; 75°10'-75°30' LO), a 3244 msnm (Figs 1-2). El material de estudio para el análisis fueron estados pre-metamórficos denominados renacuajos del estadio 26-27 según la escala de Gosner (1960) de 47 estadios, sin miembros anteriores ni posteriores de aproximadamente 1 mes de edad (Figs. 3-4), o del estadio I en una escala de tres estadios en base a los criterios morfológicos externos en base a la "Rana toro" *Rana catesbeiana* Shaw (Ranidae) (Iannacone & Manyari, 2003). Los tres metales pesados (mercurio, cadmio y plomo), la físico-química del agua y los ensayos ecotoxicológicos son los descritos por Iannacone & Manyari (2003).

Diseño Experimental y tratamiento estadístico

Para determinar las relaciones de crecimiento: peso (Wt) (en g) y longitud total (Lt) (en cm) de 150 formas larvianas de *B. macrostomus* del estadio 26 y 27 se llevó a cabo la determinación de cinco ecuaciones de regresión (lineal, logarítmica, cuadrática, cúbica y exponencial) para el total de renacuajos evaluados (n = 150) y para cada grupo de cincuenta renacuajos empleados para los bioensayos con tres metales pesados (cadmio, mercurio y plomo) separadamente (n = 50). Se determinó la validez de cada ecuación de regresión mediante el estadístico Fisher calculado por el ANDEVA de una vía respectivo, en armonía con lo mencionado por Zar (1996). Se calcularon los coeficientes de determinación (r^2) para cada ecuación de regresión. Además, se empleó el ANDEVA para determinar si existían diferencias en las longitudes totales y en los pesos de las larvas de *B. macrostomus* usadas en los ensayos ecotoxicológicos con cada metal pesado, previa prueba de Levene para determinar homogeneidad de varianzas, y para evaluar las diferencias de los r^2 para las ecuaciones de regresión propuestas. Se empleó el paquete estadístico SPSS versión 13 para el cálculo de las pruebas estadísticas descriptivas e inferenciales (Zar, 1996).

RESULTADOS

Las Tablas 1 al 4 nos indican las ecuaciones de regresión lineal, logarítmica, cuadrática, cúbica y exponencial para los 150 renacuajos de estadio 26 y 27 de *B. macrostomus* evaluados en conjunto y para cada uno de los tres metales pesados evaluados: cadmio, mercurio y plomo en forma individual. En todos los casos las ecuaciones de regresión obtenidas fueron estadísticamente significativas. Los coeficientes de determinación (r^2) explican las ecuaciones de regresión en un 66 % y 76 % (Tablas 1 al 4). Se observaron ligeras diferencias significativas en los r^2 de la ecuación de regresión lineal y de la cúbica (F = 2,80; P = 0,05).

Para el total de larvas de *B. macrostomus* se encontró la siguiente secuencia de los tipos de ecuaciones con relación a su r^2 en orden descendente: cúbica > cuadrática > logarítmica > exponencial > lineal (Tabla 1). Para las larvas de *B. macrostomus* expuestas al cadmio se encontró la siguiente secuencia de los tipos de ecuaciones con relación a su r^2 en orden descendente: cúbica > cuadrática > logarítmica = exponencial > lineal (Tabla 2). Para las larvas de *B. macrostomus* expuestas al mercurio se encontró la siguiente secuencia de los tipos de ecuaciones con relación a su r^2 en orden descendente: cúbica = cuadrática > logarítmica > exponencial > lineal (Tabla 3). Para las larvas

de *B. macrostomus* expuestas al plomo se encontró la siguiente secuencia de los tipos de ecuaciones con relación a su r^2 en orden descendente: cúbica = cuadrática > logarítmica > exponencial > lineal (Tabla 4).

No existieron diferencias estadísticamente significativas en los pesos y longitudes de los renacuajos expuestos al cadmio, mercurio y plomo (Tabla 5).

Tabla 1. Ecuaciones de regresión para determinar la relación de crecimiento del peso (g) y la longitud total (cm) de 150 formas larvarias de *Batrachophrynus macrostomus*.

Tipo de Ecuación	Ecuación	r^2	F
Lineal	$W_t = -0,10 + 0,87L_t$	0,68	325,68*
Logarítmica	$\ln W_t = 0,61 + 1,46 \ln L_t$	0,70	348,03*
Cuadrática	$W_t = -3,55 + 5,03 L_t - 1,24 L_t^2$	0,72	197,17*
Cúbica	$W_t = -2,42 + 2,97 L_t - 0,24 L_t^3$	0,73	199,25*
Exponencial	$W_t = 0,45 L_t^{0,65}$	0,69	338,15*

W_t = Peso en g. L_t = Longitud total en cm. * = Significativo.

Tabla 2. Ecuaciones de regresión para determinar la relación de crecimiento del peso (g) y la longitud total (cm) de 50 formas larvarias de *Batrachophrynus macrostomus* expuestos al cadmio.

Tipo de Ecuación	Ecuación	r^2	F
Lineal	$W_t = -0,01 + 0,81 L_t$	0,71	121,99
Logarítmica	$\ln W_t = 0,64 + 1,38 \ln L_t$	0,73	130,93
Cuadrática	$W_t = -3,15 + 4,55 L_t - 1,10 L_t^2$	0,75	73,01
Cúbica	$W_t = -2,15 + 2,73 L_t - 0,22 L_t^3$	0,76	73,84
Exponencial	$W_t = 0,80 L_t^{0,52}$	0,73	130,93

W_t = Peso en g. L_t = Longitud total en cm. * = Significativo.

Tabla 3. Ecuaciones de regresión para determinar la relación de crecimiento del peso (g) y la longitud total (cm) de 50 formas larvarias de *Batrachophrynus macrostomus* expuestos al mercurio.

Tipo de Ecuación	Ecuación	r^2	F
Lineal	$W_t = -0,13 + 0,89 L_t$	0,66	96,15
Logarítmica	$\ln W_t = 0,60 + 1,49 \ln L_t$	0,68	102,06
Cuadrática	$W_t = -3,74 + 5,27 L_t - 1,32 L_t^2$	0,70	56,60
Cúbica	$W_t = -2,55 + 3,10 L_t - 0,26 L_t^3$	0,70	57,05
Exponencial	$W_t = 0,44 L_t^{0,67}$	0,67	101,35

W_t = Peso en g. L_t = Longitud total en cm. * = Significativo.

Tabla 4. Ecuaciones de regresión para determinar la relación de crecimiento del peso (g) y la longitud total (cm) de 50 formas larvarias de *Batrachophrynus macrostomus* expuestos al plomo.

Tipo de Ecuación	Ecuación	r^2	F
Lineal	$W_t = -0,18 + 0,92 L_t$	0,68	105,28*
Logarítmica	$\ln W_t = 0,58 + 1,54 \ln L_t$	0,70	111,92*
Cuadrática	$W_t = -3,79 + 5,31 L_t - 1,32 L_t^2$	0,72	62,01*
Cúbica	$W_t = -2,59 + 3,12 L_t - 0,26 L_t^3$	0,72	62,67*
Exponencial	$W_t = 0,42 L_t^{0,69}$	0,69	110,75*

W_t = Peso en g. L_t = Longitud total en cm. * = Significativo.

Tabla 5. Comparación de los pesos y longitudes totales promedios de larvas de *B. macrostomus* expuestos a bioensayos con tres metales pesados.

Metal pesado	Longitud total L_t (Promedio \pm DS)	Peso W_t (Promedio \pm DS)
Cadmio	1,61 \pm 0,13 a	1,30 \pm 0,12 a
Mercurio	1,60 \pm 0,11a	1,30 \pm 0,12 a
Plomo	1,60 \pm 0,11a	1,30 \pm 0,13 a
Prueba de Levene	0,166	0,129
P	0,84	0,87
F	0,084	0,004
P	0,92	0,99

Letras minúsculas iguales en sentido vertical indican que los promedios son estadísticamente iguales según la prueba de Tukey (SPSS versión 13).

DISCUSIÓN

Muchas especies propuestas como herramientas para bioensayos ecotoxicológicos requieren ser no solo sensibles, sino que provean ensayos reproducibles, con poca variabilidad en su respuesta (Iannacone & Alvaríño, 2004). La variabilidad en el peso y la longitud total, así como sus relaciones entres estas dos variables son factores que pudieran influir en la reproducibilidad de un bioensayo ecotoxicológico (Iannacone *et al.*, 2003). Nuestros resultados muestran a través de las ecuaciones de regresión de relación entre el W_t y la L_t una buena estimación del W_t a partir de la L_t para el total de renacuajos empleados, como para los tres metales por separado (Tablas 1 al 4). En adición la homogeneidad en los W_t y las L_t nos muestran una baja variabilidad de los resultados (Tabla 5), y por ende un adecuado empleado de estos renacuajos para ensayos ecotoxicológicos con metales pesados bajo condiciones de zoocriadero.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ♦ Blaustein, A.R.; Wake, D.B. & Sousa, W.P. 1994. Amphibian declines: judging stability, persistence, and susceptibility of population to local and global extinctions. *Conservation Biology* 8: 60-71.
- ♦ Chaves, P, J, A. 1991. Estudio Bromatológico de la Rana de Junín (*Batrachophrynus macrostomus* Peters, 1873). Tesis para optar el grado de Bachiller en Ciencias Biológicas. Perú. Lima. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Facultad de Ciencias Biológicas. 320 p.
- ♦ Demichelis, S.O.; De la Torre, F.R.; Ferrari, L.; García, M.E. & Salibian, A. 2001. Tadpole assay: its applications to a water toxicity assessment of a polluted urban river. *Environ. Monit. Assess.* 68: 63-73.
- ♦ Fernández, N. & Beiras, R. 2001. Combined toxicity of dissolved mercury with copper, lead and cadmium on embryogenesis and early larval growth of *Paracentrotus lividus* sea-urchin. *Ecotoxicol.* 10: 263-271.
- ♦ Ferrari, L.; Demichelis, S.; García, M.; de la Torre, F. & Salibian, A. 1997. Premetamorphic anuran tadpoles as test organism for an acute aquatic toxicity assay. *Environ. Toxicol. Water. Qual.* 12: 117-121.
- ♦ Gosner, K.L. 1960. A simplified table for staging anuran embryos and larvae. *Herpetologica* 16: 183-190.
- ♦ Green, D.M.; Carroll, R.L. & Reynoso, V.H. 2001. Patrones de extinción en anfibios: pasado y presente. pp. 169-200. En: Enfoques contemporáneos para el estudio de la biodiversidad. Hernández, H.M.; García, A.; Álvarez, F.; Ulloa, M. (Eds). Instituto de Biología. UNAM, México.
- ♦ Iannacone, J. & Alvaríño, L. 1999. Ecotoxicidad aguda de metales pesados empleando juveniles del caracol de agua dulce *Physa venusta* (Gould, 1847) (Mollusca). *Gayana* 63: 101-110.
- ♦ Iannacone, J. & Alvaríño, L. 2004. Variabilidad de un ensayo ecotoxicológico con *Chironomus calligraphus* Goeldi (Diptera: Chironomidae) para evaluar cobre. *Rev.per.Ent.* 44: 125-130.
- ♦ Iannacone, J.; Alvaríño, L. & Rodríguez, P. 2000. Una técnica de bioensayo empleando a los ciliados de vida libre *Stentor coeruleus* Enrenberg y *Spirostomum ambiguum* Enrenberg para la evaluación de los efectos del mercurio y arsénico. *Acta Toxicol. Argent.* 8: 5-9.
- ♦ Iannacone, J. & Dale, W. 1999. Protocolo de bioensayo ecotoxicológico para evaluar metales pesados contaminantes de agua dulce con *Chironomus calligraphus* (Diptera: Chironomidae) y *Moina macrocopa* (Crustácea: Cladópera), en el Río Rímac, Lima, Perú. *Rev. per. Ent.* 41: 111-120.
- ♦ Iannacone, J. & Manyari, G. 2003. Ecotoxicidad del mercurio, cadmio y plomo sobre renacuajos de la rana de Junín *Batrachophrynus macrostomus* Peters 1873 (Anura: Leptodactylidae). *Rev. Bras. Toxicol.* 16: 15-20.
- ♦ Iannacone, J.; Salazar, N. & Alvaríño, L. 2003. Variabilidad del ensayo ecotoxicológico con *Chironomus calligraphus* Goeldi (Diptera: Chironomidae) para evaluar cadmio, mercurio y plomo. *Ecol. Apl.* 2: 103-110.
- ♦ McNeely, J.; Miller, K.; Reid, W.; Mittermeier, R. & Werner, T. 1990. Conserving the World's Biological Diversity. IUCN, Gland, Switzerland; WRI, CI, WWF-US, and the World Bank, Washington, DC.
- ♦ Natale, G.S.; Basso, N.G. & Ronco, A.E. 2000. Effect of Cr(VI) on early life stages of three species of hydrid frogs (Amphibia, Anura) from South America. *Environ. Toxicol.* 15: 509-512.
- ♦ Netting, J. 2000. Pesticides implicated in declining frog numbers. *Nature* 408: 760.
- ♦ Peakall, D.B. 2001. Ecotoxicology of Amphibians and reptiles. *Ecotoxicol.* 10: 323-324.
- ♦ Rodríguez, L.O.; Córdova, J.H. & Icochea, J. 1993. Lista preliminar de los anfibios del Perú. *Publ. Mus. Hist. nat. UNMSM (A)* 45: 1-22.
- ♦ Tavera-Mendoza, L.; Ruby, S.; Brousseau, P.; Fournier, M.; Cyr, D. & Marcogliese, D. 2002. Response of amphibian tadpole (*Xenopus laevis*) to atrazine during sexual differentiation of the testis. *Environ. Toxicol. Chem.* 21: 527-531.
- ♦ Vogiatzis, A.K. & Loumbourdis, N.S. 2001. Exposure of *Rana ridibunda* to lead II. Impact of lead on various parameters of liver metabolism of the frog *Rana ridibunda*. *J. Appl. Toxicol.* 21: 269-274.
- ♦ Zar, J.H. 1996. *Biostatistical analysis*. New Jersey, Prentice-Hall, Inc., 3th ed., 662 p.